



## Jagd auf den Adlermörder – Entdeckung eines neuen Cyanotoxins

Steffen Breinlinger<sup>1</sup>, Timo H. J. Niedermeyer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kykeon Analytics Ltd, 08500 Vic (Barcelona), Spain

<sup>2</sup> Institut für Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

### Zusammenfassung.

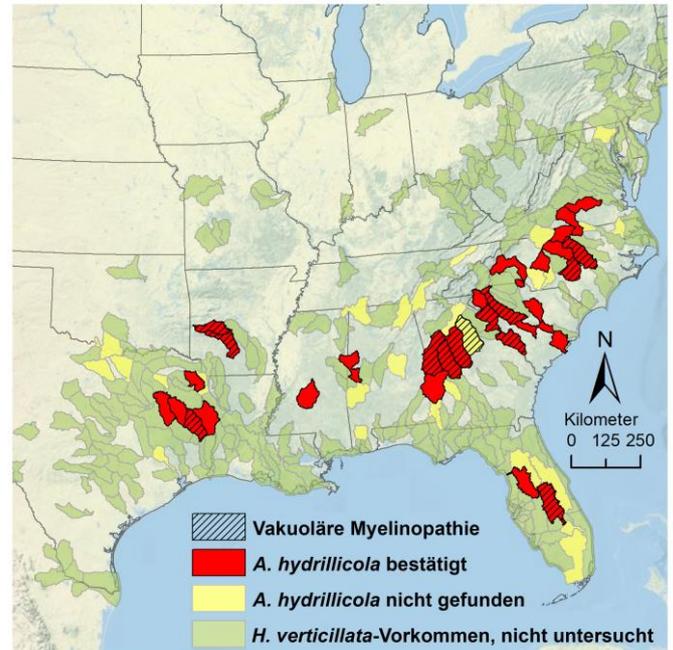
Mehr als 70 Weißkopfsaadler wurden in den Wintern 1994/95 und 1995/96 am DeGray Lake, Arkansas, USA tot aufgefunden – fast die gesamte Population der dort überwinternden Tiere [1]. Die verendeten Tiere zeigten weder äußerliche Verletzungen noch Anzeichen für Infektionskrankheiten. Auch bekannte Umweltgifte konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Alle Tiere wiesen jedoch den gleichen histologischen Befund auf: eine schwammartige Veränderung in der Weißen Substanz in Gehirn und Rückenmark. Die Myelinscheiden hatten sich von den Axonen gelöst und es bildeten sich Vakuolen, insbesondere in Sehzentrum, Kleinhirn und Hirnstamm. Diese neuartige neurodegenerative Erkrankung wurde deshalb Vakuoläre Myelinopathie (VM) genannt.

### Vakuoläre Myelinopathie – eine mysteriöse Erkrankung

In Herbst und Winter der darauffolgenden Jahre fanden Forscher:innen mehr und mehr betroffene Vögel, auch pflanzenfressende Wasservögel wie Blässhühner. 1998 hatte sich die Krankheit bereits auf zehn Gewässer in sechs Bundesstaaten im Südosten der USA ausgebreitet. Nicht nur Vögel entwickeln VM: Auch bei Amphibien, Reptilien und Fischen wurde die Krankheit inzwischen diagnostiziert [2]. Betroffene Tiere zeigen neurologische Beeinträchtigungen, verlieren die Orientierung, ihre motorischen Fähigkeiten sind eingeschränkt, sie werden lethargisch und sterben.

Die Ursache für VM stellte Wissenschaftler:innen vor ein Rätsel. Frühe Studien legten die Vermutung nahe, dass ein saisonal auftretendes Neurotoxin der Auslöser für VM sein könnte. Epidemiologische Untersuchungen in VM-positiven Gebieten lieferten erste Anhaltspunkte: Erkrankte und verendete Vögel wurden ausschließlich in der Umgebung künstlich angelegter Gewässer gefunden, die dicht mit Unterwasserpflanzen (hauptsächlich *Hydrilla verticillata*, Grundnessel) bewachsen waren. Diese invasive Pflanze, die in den 1950er Jahren als Aquariumpflanze aus Asien nach Florida eingeschleppt wurde, ist in den südöstlichen US-Bundesstaaten weit verbreitet [3]. Allerdings gibt es auch *Hydrilla*-bewachsene Gewässer, an denen VM nicht auftritt. Weitergehende Untersuchungen führten zur Entdeckung eines bislang unbekanntes, auf Pflanzen lebenden Cyanobakteriums (*Aetokthonos hydrillicola*), das nur in VM-positiven Gewässern *Hydrilla*-Blätter besiedelt (Abb. 1) [4]. Versuche bestätigten, dass pflanzenfressende Wasservögel, die sich von mit *A. hydrillicola* kolonisierten *H. verticillata*-Pflanzen ernähren, VM entwickeln [5]. Erkrankte Tiere stellen leichte Beute für Raubvögel dar, die nach dem Verzehr ihrer Beute ebenfalls an VM erkranken und

verenden – das Neurotoxin wird über die Nahrungskette weitergegeben [6].



**Abb. 1.** VM in Wasserscheiden, in denen Grundnesseln (*H. verticillata*) von Cyanobakterien (*A. hydrillicola*) bewachsen sind. Schraffiert: Wasserscheiden, in denen VM diagnostiziert wurde. Grün: Vorkommen von *H. verticillata*, noch nicht auf Vorhandensein von *A. hydrillicola* untersucht. Gelb: *A. hydrillicola* bisher nicht gefunden. Rot: Funde von mit *A. hydrillicola* bewachsene *H. verticillata*. Abb. nach [7]

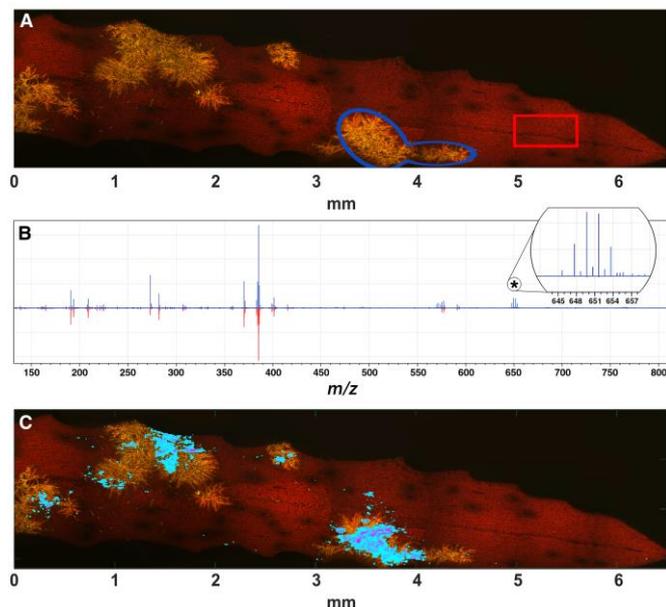
Cyanobakterien sind berüchtigt für die Produktion von Toxinen – in der breiten Öffentlichkeit im Zusammenhang mit giftigen Algenblüten bekannt. Deshalb legte diese Entdeckung die Vermutung nahe, dass VM durch ein cyanobakterielles Toxin ausgelöst wird.

### Dem „Adlermörder“ auf der Spur

2011 sammelten unsere Kooperationspartner um Susan Wilde (University of Athens, Georgia, USA) mit *A. hydrillicola* kolonisierte Grundnesseln aus dem VM-positiven J. Strom Thurmond Reservoir in Georgia/South Carolina. Wir isolierten anschließend das darauf wachsende Cyanobakterium, um es im Labor zu kultivieren und das vermutlich gebildete Cyanotoxin zu isolieren. Damit sollte unsere Hypothese, dass VM durch ein Cyanotoxin ausgelöst wird, bestätigt werden. Aufgrund des extrem langsamen Wachstums der Cyanobakterien benötigte es umfangreiche Versuche zu geeigneten Kultivierungsbedingungen und viel Geduld, bis nach etwa zwei Jahren aus-

reichend Biomasse der Cyanobakterien für erste Fütterungsversuche zur Verfügung stand. Unsere Kooperationspartner fanden jedoch, dass unsere Cyanobakterien-Biomasse in den Versuchstieren keine VM auslöste – ein Rückschlag, denn es schien, als ob unsere Hypothese nicht zuträfe.

Bakterien können bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Naturstoffe produzieren [8]. Produziert *A. hydrillicola* das postulierte Toxin eventuell nur, wenn es auf *H. verticillata* wächst? Mit dieser neuen Hypothese im Hinterkopf wollten wir cyanobakterielle Metabolite *in situ* auf kolonisierten Blättern von *H. verticillata* nachweisen. Dafür setzten wir die Methode *atmospheric-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging* ein. Dabei wird eine Probe mit einem Laser systematisch abgescannt und massenspektrometrisch untersucht. Pixel für Pixel können so räumlich aufgelöst Informationen über die chemische Zusammensetzung der Probenoberfläche gewonnen werden. Mit Hilfe spezialisierter Software werden die einzelnen Pixel dann zu Bildern zusammengesetzt. Wir untersuchten die Oberfläche eines kolonisierten Blattes und konnten tatsächlich einen Metaboliten detektieren, dessen Verteilung sich mit den *A. hydrillicola*-Kolonien auf dem Blatt deckt (Abb. 2), der in unseren Laborkulturen jedoch nicht nachweisbar war.



**Abb. 2. AP-MALDI-MSI-Untersuchung eines mit *A. hydrillicola* kolonisierten Blattes offenbart einen Cyanobakterium-spezifischen Metaboliten.** (A) Mikroskopisches Bild von *A. hydrillicola*-Kolonien auf einem Blatt von *H. verticillata*. (B) Vergleich der gemittelten Massenspektren der beiden Regionen rot (Blatt ohne Cyanobakterium) und blau (Kolonie) in (A). Vergrößert das für eine fünfmal bromierte Verbindung charakteristische Isotopenmuster bei  $m/z$  645. Diese Verbindung ist ausschließlich in der Cyanobakterienkolonie detektierbar. (C) Übereinanderlegen von (A) und dem MSI-Bild zeigt den räumlichen Zusammenhang zwischen diesem Metaboliten und den Kolonien. Abb. nach [7]

Die durch die massenspektrometrische Analyse ermittelte Summenformel  $C_{17}H_6Br_5N_3$  ließ vermuten, dass es sich bei dieser Substanz um einen bisher nicht beschriebenen Naturstoff handelt. Und – Heureka! – wir wussten augenblicklich, warum diese Substanz in unseren Laborkulturen nicht gebildet wurde: Für die Biosynthese dieses Stoffes wird – wie aus der Summenformel ersichtlich – Bromid benötigt, das in den Standard-Kultivierungsmedien für Cyanobakterien nicht enthalten ist. In der Tat, nach Zugabe von Kaliumbromid zum Medium konnten wir diese Substanz auch in unseren Laborkulturen nachweisen, insbesondere unter Stressbedingungen: Eine Reduktion der Temperatur oder Scheerstress (starkes Rühren/Schütteln der Kulturen) steigerten die Produktion der Substanz auf das Hundertfache. Wir konnten ebenfalls nachweisen, dass *Hydrilla* in der Lage ist, Bromid zu akkumulieren – dadurch könnte dem Cyanobakterium ein natürliches bromidreiches Umfeld zur Verfügung stehen.

Ein anschließendes Screening von *H. verticillata* / *A. hydrillicola*-Biomassen von VM-positiven und VM-negativen Gebieten bestätigte unsere heiße Spur: Die bromierte Substanz konnte ausschließlich in Biomasse aus VM-positiven Gebieten nachgewiesen werden. Gewebeproben erkrankter Blässhühner aus demselben Gebiet gaben weitere Gewissheit: Die Substanz fand sich in den Proben, was die Aufnahme des möglichen Toxins über den Magen-Darmtrakt bestätigte.

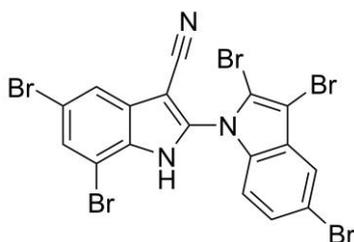
## Identifizierung und Charakterisierung von Aetokthonotoxin

Nach der Isolierung der Substanz konnten wir ihre Struktur aufklären und stellten fest, dass es sich tatsächlich um einen neuen und strukturell sehr ungewöhnlichen Naturstoff handelte, den wir Aetokthonotoxin nannten (AETX, Abb. 3). In unseren Kultivierungsversuchen fügten wir neben KBr auch Kaliumiodid zum Kultivierungsmedium hinzu. Biomasse aus diesen Versuchen sowie die *H. verticillata* / *A. hydrillicola*-Biomasse aus VM-positiven Gebieten analysierten wir mit Hilfe von Haloseeker, ein Softwarepaket um einfach und schnell halogenierte Substanzen in HRMS Daten zu identifizieren [9]. Dabei fanden wir nicht nur verschiedene AETX Biosynthese-Vorstufen, sondern auch iodidierte Derivate [10].

Die ungewöhnliche Struktur von AETX legten die Vermutung nahe, dass *A. hydrillicola* auf eine außergewöhnliche biochemische Werkzeugkiste zurückgreifen kann. Die Sequenzierung des Genoms von *A. hydrillicola* erlaubte uns die Identifizierung des Biosynthese-Genclusters von AETX. Wir bestätigten experimentell, dass eine der beiden Halogenasen (AetF) in der Lage ist, Tryptophan mit dem beobachteten Substitutionsmuster zu bromieren.

Basierend auf unserer initialen Charakterisierung konnte die Arbeitsgruppe um B. Moore kürzlich den kompletten Biosyntheseweg von AETX nachweisen. Dabei erwies sich die Halogenase AetF als eine bisher einzigartige Flavin-Reduktase bzw. Flavin-abhängige Tryptophan Halogenase [11]. Ein Team

um Jiang und Snodgrass et. al untersuchte die Aktivität von AetF mit nicht-nativen Substraten. Ihre vor wenigen Wochen veröffentlichten Experimente zeigen, dass AetF die enantioselektive Bromierung und Iodierung einer breiten Palette von Substraten katalysieren kann [12].



**Abb. 3.** Struktur von Aetokthonotoxin (AETX)

Abschließend charakterisierten wir die biologische Aktivität von AETX in *in vivo*-Assays. AETX ist sehr toxisch für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (LC<sub>50</sub> 40 nM) und Zebrafische (*Danio rerio*; LC<sub>50</sub> 275 nM). Hühner (*Gallus gallus*), die AETX verabreicht bekamen, entwickelten die für VM charakteristischen neurologischen Läsionen – der Beleg dafür, dass AETX das lange gesuchte VM-auslösende Toxin ist!

Eine wichtige offene Frage ist, woher in der freien Wildbahn das für die Biosynthese benötigte Bromid stammt. Wahrscheinlicher als eine natürliche geologische Herkunft ist ironischerweise ein anthropogener Ursprung: Zur Kontrolle der invasiven Pflanze *H. verticillata* wird ein bromidhaltiges Herbizid eingesetzt (Diquat-Dibromid). Auch ein Eintrag aus Kohlekraftwerken, Kraftstoffzusätzen oder der Flammenschutzmittelindustrie ist wahrscheinlich.

Wechselwirkungen in Ökosystemen sind oft komplexer, als sie uns oberflächlich betrachtet erscheinen. Die Auswirkungen von *A. hydrillicola* und seinem Neurotoxin auf aquatische Ökosysteme ist ungeklärt: AETX ist lipophil und reichert sich über die Nahrungskette an. Das Gefahrenpotenzial für Säugetiere einschließlich des Menschen (z.B. durch den Konsum von Fischen und Wasservögeln aus VM-positiven Gewässern) ist noch ungeklärt. Die Schaffung eines öffentlichen Bewusstseins für das Problem und ein verstärktes Monitoring von *A. hydrillicola* und AETX sind daher unbedingt erforderlich. *H. verticillata* ist in Europa nicht invasiv und *A. hydrillicola* wurde bisher noch nicht in Europa gefunden – ob sich beide mit fortschreitendem Klimawandel auch hier ausbreiten werden, bleibt spekulativ.

Teile dieses Artikels wurden bereits in *BIOspektrum* 06.21 veröffentlicht.

## Danksagung

Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung (NI 1152/3-1; INST 271/388-1) und allen zum Projekterfolg beitragenden Studierenden, Mitarbeiter:innen und Kollaborationspartner:innen, insbesondere Tabitha Phillips und Susan Wilde.

## Literatur

- [1] Thomas NJ, Meteyer CU, Sileo L (1998) Epizootic vacuolar myelinopathy of the central nervous system of bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) and American coots (*Fulica americana*). *Vet. Pathol.* 35, 479–487
- [2] Maerz JC, Wilde SB, Terrell VK, et al. (2019) Seasonal and plant specific vulnerability of amphibian tadpoles to the invasion of a novel cyanobacteria. *Biol. Invasions* 21, 821–831
- [3] Madeira PT, Van TK, Steward KK, et al. (1997) Random amplified polymorphic DNA analysis of the phenetic relationships among world-wide accessions of *Hydrilla verticillata*. *Aquat. Botany*, 59, 217–236
- [4] Wilde SB, Johansen JR, Wilde HD, et al. (2014) *Aetokthonos hydrillicola* gen. et sp. nov.: Epiphytic cyanobacteria on invasive aquatic plants implicated in Avian Vacuolar Myelinopathy. *Phytotaxa* 181, 243–260
- [5] Wiley FE, Twiner MJ, Leighfield TA, et al. (2009) An extract of *Hydrilla verticillata* and associated epiphytes induces avian vacuolar myelinopathy in laboratory mallards. *Environ. Toxicol.* 24, 362–368
- [6] Birrenkott AH, Wilde SB, Hains JJ, et al. (2004) Establishing a food-chain link between aquatic plant material and avian vacuolar myelinopathy in mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Wildl. Dis.* 40, 485–492
- [7] Breinlinger S, Phillips TJ, Haram BN, et al. (2021) Hunting the eagle killer: A cyanobacterial neurotoxin causes vacuolar myelinopathy. *Science*, 371, eaax9050
- [8] Scherlach K, Hertweck C (2009) Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* 7, 1753–1760
- [9] Léon A, Cariou R, Hutinet S, Hurel J, Guitton Y, et al. (2019) HaloSeeker 1.0: A User-friendly software to highlight halogenated chemicals in nontargeted high-resolution mass spectrometry data sets. *Anal. Chem.* 91, 3500–3507
- [10] Breinlinger S (2021) Investigations into bioactive natural products from cyanobacteria: a search for drug leads and the discovery of a novel cyanotoxin. *Doctoral Thesis*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [11] Sanjoy A, Lukowski AL, Schäfer RJB, Moore BS (2022) From tryptophan to toxin: nature's convergent biosynthetic strategy to aetokthonotoxin. *JACS* 144, 2861–2866
- [12] Jiang Y, Snodgrass HM, et al. (2022) The single-component flavin reductase/flavin-dependent halogenase AetF is a versatile catalyst for selective bromination and iodination of arenes and olefins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, accepted author manuscript.

## Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Timo Niedermeyer  
Institut für Pharmazie, AG Biogene Arzneistoffe  
Universität Halle-Wittenberg, Hoher Weg 8  
06120 Halle (Saale)  
Tel: +49 / (0)345 / 55-25765  
Fax: +49 / (0)345 / 55-27407  
E-Mail: [timo.niedermeyer@pharmazie.uni-halle.de](mailto:timo.niedermeyer@pharmazie.uni-halle.de)  
<https://ag-bioarznei.pharmazie.uni-halle.de/>

Dr. Steffen Breinlinger  
Kykeon Analytics Ltd.  
C. Jaume I Conqueridor 18 bx  
08500 Vic (Barcelona), Spain  
E-Mail: [sbreinlinger@kykeonanalytics.com](mailto:sbreinlinger@kykeonanalytics.com)