

Sterine in *Chlamydomonas reinhardi* (Grünalgen) *

W. Eichenberger **

Institut für Biochemie der Universität Bern

Summary

Sterols of the green alga *Chlamydomonas reinhardi* (wildtype and 2 streptomycin-resistant mutants) have been analyzed by DC, GC and MS. Major sterols were found to be ergosterol and 7-dehydroporiferasterol. Minor components were composed of $\Delta^{7,22}$ -ergostadienol, Δ^7 -ergostenol, chondrillasterol, Δ^7 -chondrillasterol and traces of cholesterol. Sterols, about 10% of which are found in the esterified form, account for about 1% of the total lipids of the cells.

Wildtyp (ss) und streptomycinresistente Mutanten (sr_3 und sr_{35}) von *Chlamydomonas reinhardi* dienen zur Untersuchung der Membranbildung in Chloroplasten [1]. Im Rahmen einer Bestandesaufnahme der von

* Eingegangen am 17. Dezember 1975

** Dr. W. Eichenberger, Institut für Biochemie, Länggassstrasse 7, CH-3012 Bern

diesen Organismen gebildeten Lipide [2] wurden auch die Sterine näher untersucht. Diese Verbindungen sind in der Pflanzenzelle am Aufbau der Membranen des endoplasmatischen Retikulums wesentlich beteiligt [3] und kommen möglicherweise auch in den Chloroplasten vor [4]. In Algen treten Sterine als freie Alkohole und als Ester [5], in vereinzelt Fällen auch in wasserlöslicher Form [6] auf. Bei den Grünalgen ist die Art der gebildeten Sterine sehr unterschiedlich, und deren Kenntnis ist daher auch taxonomisch von Bedeutung [7–10]. Wir berichten über die Zusammensetzung der Sterine und deren Anteil am Gesamtlipid.

Der Anteil der Sterine im ätherlöslichen Lipid mixotropher Kulturen von *Chlamydomonas* beträgt im Mittel 1%. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen (ss 0,9%, sr₃ 1,1%, sr₃₅ 0,8%) dürfen mit Rücksicht auf die beobachteten Streuungen nicht als signifikant angesehen werden. Etwa 10% der Gesamtsterine sind verestert, wobei als Fettsäurereste alle in diesen Algen vorkommenden, gesättigten und ungesättigten (Mono- bis Tetraen-) Säuren der C₁₄-, C₁₆- und C₁₈-Reihe vertreten sind [2]. Die gesättigten Fettsäuren sind in den Sterinestern allerdings relativ etwas stärker vertreten als im Gesamtlipid.

Zur Charakterisierung der einzelnen Sterinkomponenten wurde das Gemisch der freien Sterine zunächst auf AgNO₃-imprägnierten Kieselgel-G-Platten aufgetrennt, wobei zwei Zonen erhalten wurden. Fraktion 1 wies den R_f-Wert von Ergosterin (0,14), Fraktion 2 denjenigen von Sitosterin (0,34) auf. Beide Fraktionen wurden gaschromatografisch (als TMS-Derivate) aufgetrennt.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, enthält das Gesamtgemisch zwei Hauptkomponenten H₁ und H₂, welche in Fraktion 1 angereichert sind, sowie vier quantitativ wichtige Nebekomponenten N₁ bis N₄, welche in Fraktion 2 enthalten sind. Die durch präparative GC gewonnenen Einzelkomponenten wurden massenspektrometrisch untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Massenspektrometrische und gaschromatografische Daten der Sterine aus *Chlamydomonas reinhardtii*

	Ergosterin	Hauptkomponenten		Nebekomponenten			
		H ₁	H ₂	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
Massen-Peaks							
M ⁺	396	396	410	398	400	412	414
M-Me	381	381	395	383	383	397	399
M-Me-H ₂ O	363	363	377	365	367	379	381
M-Seitenkette	271	271	271	273	273	273	273
M-Seitenkette-2H [11]	269	269	269	271	271	271	271
Seitenkette *	125	125	139	125	127	139	141
M-Seitenkette-H ₂ O	253	253	253	255	255	255	255
Retentionszeit **, relativ zu Cholesterin	1,24	1,24	1,57	1,27	1,47	1,62	1,86

* Berechnet aus M-[M-Seitenkette]

** Bedingungen siehe methodischer Teil

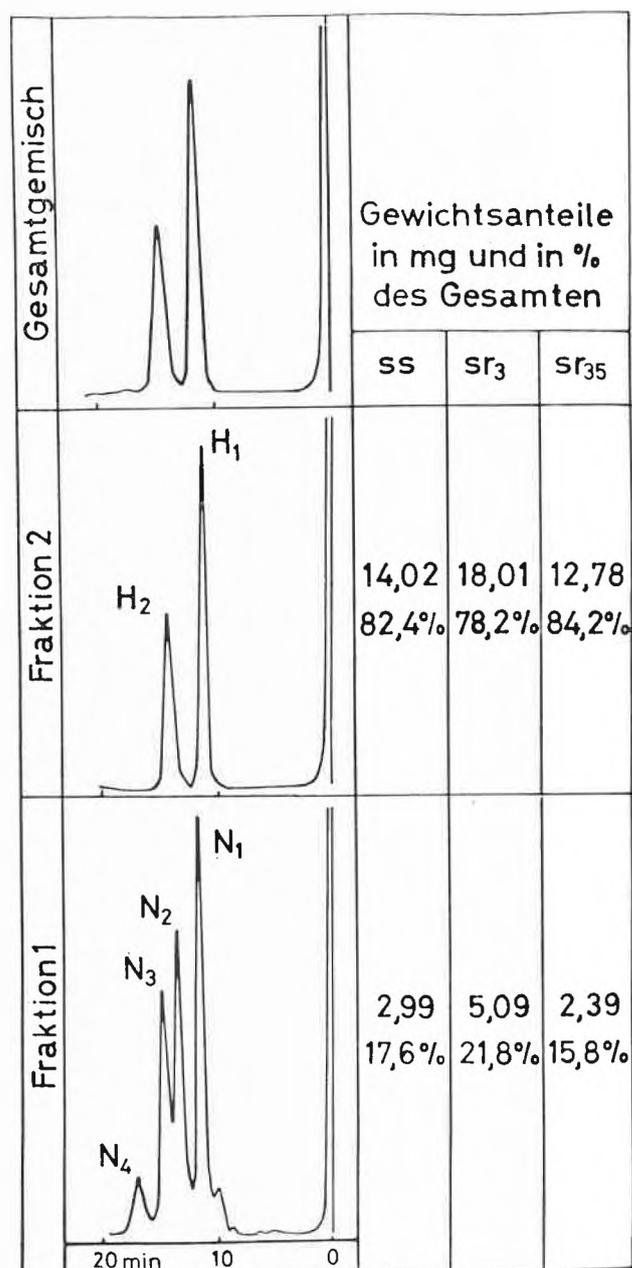


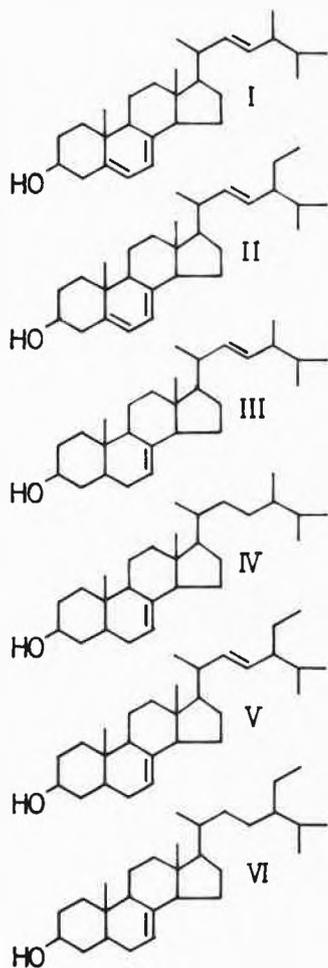
Abb. 1: Freie Sterine aus *Chlamydomonas reinhardtii* (ss, sr₃ und sr₃₅). Gaschromatogramme und Gewichtsanteile von Fraktion 1 (Hauptkomponenten) und Fraktion 2 (Nebekomponenten) nach Trennung auf AgNO₃/Kieselgel. Bedingungen siehe methodischer Teil

Komponente H₁ liefert dieselben Massen-Peaks wie Ergosterin (I). Da die Verbindung auch auf DC-Platten mit und ohne AgNO₃-Zusatz sowie im GC mit Ergosterin co-chromatografiert, muss sie mit diesem identisch sein.

Komponente H₂ ist aufgrund ihres Molgewichtes eine C₂₉-Verbindung.

Die nach Abspaltung der Seitenkette erhaltenen Fragmente sind identisch mit denen aus I, was darauf hinweist, dass das Ringgerüst zweifach ungesättigt ist. Die Tatsache, dass die Verbindung auf AgNO₃-imprägnierten Platten denselben R_f-Wert besitzt wie I, deutet

auf ein $\Delta^{5,7}$ -Dien hin. Aus diesen Befunden ist zu schliessen, dass H_2 dasselbe Ringgerüst besitzt wie I. Die Seitenkette ist aufgrund ihres Molgewichts von 139 einfach ungesättigt und enthält eine Extra-Äthylgruppe. Wird ferner berücksichtigt, dass in Algen bis dahin nur Sterinseitenketten mit 24β -Konfiguration gefunden wurden [9, 10, 13], so kommt für H_2 nur die Struktur des 7-Dehydroporiferasterins (II) in Frage, wie die gute Übereinstimmung von gemessener Retentionszeit mit dem Referenzwert [12] bestätigt.



Was die Nebenkomponenten betrifft, geht aus den Molgewichten in Tabelle 1 hervor, dass N_1 und N_2 C_{28} -Sterine, N_3 und N_4 dagegen C_{29} -Sterine sind. Ferner lässt die Fragmentierung erkennen, dass N_1 und N_2 je eine Seitenkette mit Extra-Methylgruppe, N_3 und N_4 dagegen je eine solche mit Extra-Äthylgruppe enthalten. Zudem sind die Seitenketten von N_1 und N_3 ungesättigt, diejenigen von N_2 und N_4 gesättigt. Durch Abspaltung der Seitenkette ergeben alle vier Nebenkomponenten Fragmente (M-Seitenkette und M-Seitenkette- H_2O), welche um zwei Masseneinheiten grösser sind als die entsprechenden Fragmente von I und II. Daraus ist zu schliessen, dass alle vier Verbindungen einfach ungesättigte Ringsysteme besitzen.

Eine weitere Zuordnung wurde vorgenommen, indem die gemessenen Retentionszeiten der *Chlamydomonas*-Sterine mit denen von Verbindungen verglichen wurden [12], deren Struktur alle obigen Voraussetzungen erfüllt und deren Vorkommen in Pflanzen gesichert ist. Aufgrund dieser Vergleiche kann der Komponente N_1 nur die Struktur von $\Delta^{7,22}$ -Ergostadienol (III) und der Komponente N_2 diejenige von Δ^7 -Ergostenol (IV) zugeordnet werden. Der Komponente N_3 entspricht die Struktur von Chondrillasterin (V) und N_4 diejenige von Δ^7 -Chondrillastenol (VI). V und VI sind damit C_{29} -Analoge von III und IV. Für die Δ^7 -Ringstruktur spricht ferner die Tatsache, dass alle vier Verbindungen mit Liebermann-Burchard-Reagens bei $0^\circ C$ eine sofortige Blaufärbung ergeben [14].

Aus den Gewichtsanteilen von Fraktionen 1 und 2 und den Peak-Flächen der entsprechenden Chromatogramme (Abb. 1) wurde die relative Zusammensetzung der freien Sterine für alle drei Stämme berechnet. Die Werte sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Relative Zusammensetzung der freien Sterine in *Chlamydomonas reinhardi* (ss , sr_3 und sr_{35})

	% der Gesamtsterine		
	ss	sr_3	sr_{35}
Ergosterin (I)	50,3	46,7	50,6
7-Dehydroporiferasterin (II)	32,1	31,2	34,0
$\Delta^{7,22}$ -Ergostadienol (III)	4,5	5,9	4,1
Δ^7 -Ergostenol (IV)	5,8	10,1	7,0
Chondrillasterin (V)	3,7	3,4	2,4
Δ^7 -Chondrillastenol (VI)	2,1	1,5	1,1

Daraus geht hervor, dass die Sterinmuster der drei Stämme im gesamten sehr ähnlich sind. Auf die Hauptkomponenten entfallen 78 bis 84% des Gesamtgemisches, wobei I und II ein Verhältnis von 1,48 bis 1,57 bilden. Der Anteil der Nebenkomponenten beträgt entsprechend 22 bis 16%.

I und II wurden als Hauptkomponenten auch in *Chlamydomonas reinhardi* Dangaard gefunden, wobei II am stärksten vertreten war [10]. Die Nebensterine jenes Stammes wurden jedoch nicht beschrieben. IV, V und VI kommen in einer Reihe von *Chlorella*-Arten sogar als Hauptkomponenten vor [9], während III in *Euglena* [6] und *Saccharomyces* [15] gefunden wurde. Damit gehören die bisher untersuchten *Chlamydomonas*-Stämme zu denjenigen Grünalgen, welche überwiegend $\Delta^{5,7}$ -Sterine bilden, im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen, welche vorwiegend Δ^5 - bzw. Δ^7 -Sterine enthalten [10]. Die in *Chlamydomonas* vorhandenen Δ^7 -Sterine (III bis VI) sind nach den heutigen Vorstellungen über die Sterinbiosynthese [13] als Vorstufen der $\Delta^{5,7}$ -Diene zu betrachten. Da einerseits $\Delta^{5,7}$ -Dienole aus Δ^7 -Enolen entstehen [16] und andererseits die Einführung der Δ^{22} -Doppelbindung durch Dehydrierung der gesättigten Seitenkette erfolgt [17], ist die Reaktionsfolge in der C_{28} -Reihe wahrscheinlich $IV \rightarrow III \rightarrow I$ und entsprechend in der C_{29} -Reihe

VI \rightarrow V \rightarrow II. Dies bedeutet, dass die Desaturierung der Seitenkette vor der Einführung der Δ^5 -Doppelbindung im B-Ring erfolgt.

Im weiteren wurde geprüft, inwiefern sich die Sterinzusammensetzung der Sterinester von derjenigen der freien Sterine unterscheidet. Dazu wurden die veresterten Sterine vorgängig von den freien abgetrennt und ihre Zusammensetzung gaschromatografisch untersucht.

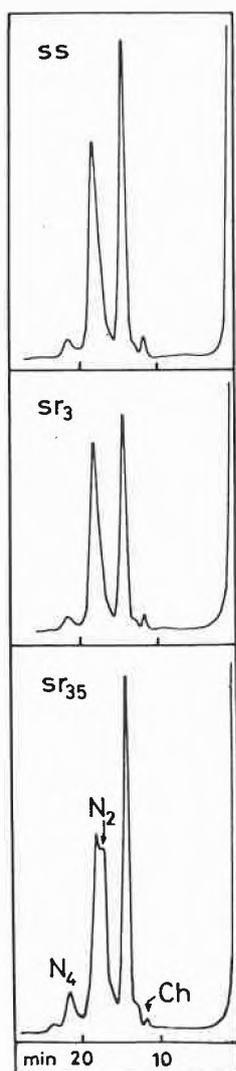


Abb. 2: Sterine aus Sterinestern von *Chlamydomonas reinhardi* (ss, sr₃ und sr₃₅). Gaschromatogramme der Gesamtgemische. Bedingungen siehe methodischer Teil

Aus Abb.2 geht hervor, dass in den Sterinestern die gleichen Komponenten enthalten sind wie in den freien Sterinen, dass hingegen die Nebenkompenten in den Estern mengenmässig allgemein stärker vertreten sind als in den freien Sterinen (vgl. Abb.1). Dies gilt auch für Cholesterin (Ch), welches allerdings stets nur in Spuren vorkommt. Besonders auffallend ist der hohe Anteil von IV in den Sterinestern von Stamm sr₃₅. Ob diese Eigenheit, welche in verschiedenen Ansätzen gefunden wurde und für diese Mutante typisch ist, mit der Mutation selber zusammenhängt, ist Gegenstand weiterer Versuche. Wir sind ferner daran, zu prüfen,

inwiefern das Sterinmuster des Stammes sr₃ während der Streptomycin-induzierten Vergilbung und der nachfolgenden Ergrünung [1] ändert.

Material und Methoden

Die Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardi* und die Extraktion der Lipide wurden früher beschrieben [1,2]. Sterine und Sterinester wurden zunächst an der 10fachen Menge Kieselsäure «Mallinckrodt» mit drei Säulenvolumen (SV) CHCl₃ von den polaren Lipiden abtrennt. Zur Trennung von Sterinestern und freien Sterinen wurde der Rückstand an der 10fachen Menge Al₂O₃ «Merck» (Akt.grad III) mit Petroläther (PA)-Et₂O-Gemischen chromatografiert. Die Sterinester wurden mit 2 SV PA-Et₂O 9:1 (v/v) und 3 SV PA-Et₂O 8:2 und darauf die freien Sterine mit 3 SV PA-Et₂O 1:1 und 2 SV PA-Et₂O 4:6 eluiert. Die endgültige Reinigung der Fraktionen erfolgte auf Kieselgel G mit PA-Et₂O 100:2 für die Sterinester und mit CHCl₃-EtOH 100:2 für die freien Sterine. Umesterung und Auftrennung der Fettsäuren durch GC wurden früher beschrieben [2]. Die freien Sterine wurden auf Kieselgel G mit 5% (g/g) AgNO₃ mit Benzol-Essigester 5:1 (v/v) fraktioniert. Nach Silylierung [3] wurden die Gemische auf OV-101 2% (auf Chromosorb W, 1/8 in. ID (Glas), 6 ft., 220°C, 50 ml N₂/min, FID) getrennt. Die Massenspektren wurden auf einem Massenspektrographen Varian MAT CH 5/DF aufgenommen.

Die Arbeiten wurden vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt. PD Dr. U.Schlunegger, Institut für organische Chemie, danken wir für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Fräulein E.Gerber danken wir für ihre technische Hilfe.

Literaturverzeichnis

- 1 W.Eichenberger und A.Boschetti: FEBS Letters 55 (1975) 117.
- 2 W.Eichenberger: Phytochem., im Druck.
- 3 W.Eichenberger: Chimia 29 (1975) 132.
- 4 B.A.Knights: Lipids 6 (1971) 215.
- 5 B.W.Nichols, in: Phytochemical Phylogeny (J.B.Harborne ed.), p. 105, Academic Press, New York 1970.
- 6 R.D.Brandt, R.J.Pryce, C.Anding und G.Ourisson: Eur. J. Biochem. 17 (1970) 344.
- 7 G.W.Patterson und R.W.Krauss: Plant Cell Physiol. 6 (1965) 211.
- 8 G.W.Patterson: Plant Physiol. 42 (1967) 1457.
- 9 G.W.Patterson: Lipids 6 (1971) 120.
- 10 G.W.Patterson: Comp. Biochem. Physiol. 47B (1974) 453.
- 11 H.Ripperger und H.Budzikiewicz: Phytochem. 14 (1975) 2297.
- 12 G.W.Patterson: Anal. Chem. 43 (1971) 1165.
- 13 L.J.Goad und T.W.Goodwin, in: Progress in Phytochemistry (L.Reinhold und Y.Liwschitz eds.), Vol. 3, p. 113, Interscience, London 1972.
- 14 L.Fieser und M.Fieser: Steroide, Verlag Chemie, Weinheim 1961.
- 15 R.K.Callow: Biochem. J. 25 (1931) 87.
- 16 M.Akhtar, M.A.Parvez und P.F.Hunt: Biochem. J. 113 (1964) 727.
- 17 R.D.Bennett und E.Heftmann: Steroids 14 (1969) 403.