

**Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina* –  
chemische Ökologie  
und assoziierte Bakterien**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

**vorgelegt von  
Carsten Thoms  
aus Karlsruhe**

**Düsseldorf, 2004**

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

Referent : Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferent: Prof. Dr. Christopher Bridges

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2004

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich im Laufe meiner Promotion unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Proksch bedanken. Bereits während meiner Diplomarbeit hatte ich unter seiner Anleitung erste Schritte in der marinen Naturstoffforschung gemacht und mich mit der Ökologie der *Aplysina* – Schwämme beschäftigt. Im Anschluss daran gab er mir die Möglichkeit, im Rahmen meiner Promotion diese spannende Thematik zu vertiefen und auf mikrobiologische Aspekte auszuweiten. Sein stetes Interesse am Verlauf und den Ergebnissen meiner Experimente und seine freundliche Unterstützung haben mir bei meinen Arbeiten sehr geholfen. Durch die zahlreichen Auslandsaufenthalte, die er mir ermöglichte, konnte ich interessante Erfahrungen sammeln und kann nun auf eine sehr erlebnisreiche Promotionszeit zurückblicken.

Herrn Prof. Dr. Christopher Bridges danke ich für seine Unterstützung als Korreferent meiner Arbeit, für sein Interesse an meinen Experimenten und für die interessanten Diskussionen, die er mit mir darüber führte.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ute Hentschel (Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg) für die spannenden Ideen, durch die ich mein Forschungsfeld um mikrobiologische Aspekte erweitern konnte, für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe entsprechende Untersuchungen durchzuführen und für ihre Unterstützung für meine berufliche Zukunft.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch den Mitarbeitern von Frau Dr. Hentschel danken, die mir bei meinem Einstieg in die Mikrobiologie sehr geholfen haben. Hierbei ist vor allem Christine Gernert zu nennen, die mir ihre Tricks und Kniffe bei der DGGE verraten hat.

Seit meinem Studium in Bremen hat mich Herr Prof. Dr. Matthias Wolff (Zentrum für Marine Tropenökologie, Bremen) immer wieder bei unterschiedlichsten Vorhaben unterstützt. Für seine häufig in Anspruch genommene Hilfsbereitschaft möchte ich ihm sehr danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Werner Müller (Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz) bedanke ich mich für spannende Bootsausfahrten und Diskussionen sowie für seine Unterstützung für meine berufliche Zukunft.

Herrn Prof. Dr. Ernesto Fattorusso und all seinen Mitarbeitern danke ich für die Möglichkeit, drei schöne Monate an der Universität von Neapel verbringen zu können und für ihre sensationelle Gastfreundschaft während dieser Zeit.

Bei Herrn Dr. Franz Brümmer (Universität Stuttgart) möchte ich mich für interessante Diskussionen und Informationen zur Ökologie der mediterranen *Aplysina* – Schwämme bedanken.

Prof. Dr. Krohne und seiner Mitarbeiterin Claudia Gehrig (Universität Würzburg) danke ich für die Hilfe bei den Arbeiten am Elektronenmikroskop.

Prof. Dr. Michael Wagner und Dr. Matthias Horn (TU München) danke für die Unterstützung bei der phylogenetischen Analyse der 16S rDNA – Daten des Verpflanzungsexperimentes.

Prof. Dr. Jean Vacelet (Centre d'Océanologie de Marseille, Frankreich) danke ich für die Versorgung mit *Aplysina cavernicola* – Schwämmen für die Experimente mit *Tylodina perversa*.

Bei Herrn Dr. Arno Kunze bedanke ich mich für die Gewebeproben von karibischen *Aplysina* – Schwämmen, die ich für die Biotransformations – Experimente benötigte.

Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jäger (Forschungszentrum Jülich) hat mich mit interessanten Informationen zum Thema „Enzymatik“ versorgt. Dafür danke ich ihm.

Bei Prof. Louis DeVos (Universität Brüssel), Miriam Weber (Hydra – Institut, Elba) und Dr. Peter Schupp (Universität von Guam) bedanke ich mich für die Abbildungen, die sie mir für die Illustration meiner Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Den Mitarbeitern des Hydra – Institutes für Meereswissenschaften auf der Insel Elba, des Laboratoire Arago in Banyuls-sur-mer, Südfrankreich und des Ruder Boscovic – Meeresforschungszentrums in Rovinj, Kroatien danke ich für die Unterstützung bei den Probenahmen, den Tauchgängen und den Freilandexperimenten.

Ich bedanke mich auch ganz besonders bei meinen Kollegen hier am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf für eine schöne Zeit sowie für Hilfe und Unterstützung in den unterschiedlichsten Situationen. Vor allem die Hilfsbereitschaft von Dr. RuAn Edrada – Ebel und Dr. Rainer Ebel waren wichtig für mich. Letzterem danke ich speziell für viele anregende und angeregte Diskussionen. Gero Eck möchte ich für seine Hilfe als Tauchpartner bei zahlreichen Tauchgängen, vor allem im Zusammenhang mit dem taucherisch aufwendigen

Verpflanzungsversuch danken. Sabine Borstel danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung der Reinsubstanzen aus den Schwämmen.

Meinen Eltern danke dafür, dass sie mir die Möglichkeit gaben, „Meeresbiologe“ zu werden und dass sie mich während der gesamten Zeit meines Studiums und meiner Promotion bei meinen Zukunftsplänen unterstützt haben und mir das Gefühl gaben, das Richtige zu tun. Außerdem bedanke ich mich für den Expertenrat auf dem Gebiet der Kommaregeln nach der neuen deutschen Rechtschreibung.

Am allerherzlichsten danke ich meiner Frau Nadine, die tatsächlich den größten Anteil an der Vollendung dieser Arbeit hat. Sie hat ihre Ausbildungsstelle als Goldschmiedin in Bremen aufgegeben (glücklicherweise zugunsten einer weitaus besseren Ausbildungsstelle in Düsseldorf, wie sich aber erst später herausstellte), damit ich in Düsseldorf meine Diplomarbeit beginnen und schließlich promovieren konnte. (Vor allem) während der Wochen der Schreiberei am Computer hat sie mich rundum versorgt, meine Ideen mit mir diskutiert und diese so in halbwegs geordnete Bahnen gelenkt. Außerdem hat sie das gesamte hier vorliegende Werk auf Fehler und allzu verschachtelte Sätze untersucht und es korrigiert. Aber der Grund, weswegen sie den größten Anteil an der Vollendung dieser Arbeit hat ist vor allem, dass ich die ganzen Strapazen einer Doktorarbeit eigentlich nur auf mich genommen habe, um bei ihr damit Eindruck zu machen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sekundärmetabolite in marinen Schwämmen.....	1
1.2. Die mediterrane Schnecke <i>Tylodina perversa</i> .....	11
1.3. Schwammassoziierte Mikroorganismen – Gemeinschaften .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1. Chemikalien und Geräte.....	24
<b>2.1.1. Allgemeine Laborarbeiten</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.2. Transport und Lagerung von Gewebeproben</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.3. Gewebe – Extraktion und Herstellung von HPLC – Proben</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.4. HPLC – UV</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.5. HPLC – MS</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.6. Aquarien – Experimente</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1.7. Befestigung der verpflanzten Schwämme</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1.9. Mikrobiologische Untersuchungen</b> .....	<b>28</b>
2.1.9.1. Zell – Lyse und Extraktion genomischer DNA.....	28
2.1.9.2. Agarose – Gel – Elektrophorese.....	28
2.1.9.3. Gel – Dokumentation .....	29
2.1.9.4. PCR – Bedingungen.....	29
2.1.9.5. Aufreinigung der PCR – Produkte.....	31
2.1.9.6. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE). .....	32
2.1.9.7. Sequenzierung .....	33
2.1.9.8. Phylogenetische Analyse.....	33
2.1.9.9. Fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	34
<b>2.1.10. Tauch – Ausrüstung</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1.11. Unterwasser – Fotografie</b> .....	<b>36</b>

## Inhaltsverzeichnis

2.2. Inhaltsstoff – Analyse der Gewebeproben.....	37
2.2.1. Analyse der Extrakte und Fraktionen mittels HPLC – UV .....	37
2.2.2. Verifikation der Metaboliten – Identifikation mittels HPLC – MS.....	38
2.2.3. Ermittlung der Eichgeraden für die Quantifizierung von <i>Aplysina</i> – Metaboliten in Gewebeproben.....	39
2.2.4. Quantitative Bestimmung der Metabolitengehalte in den Gewebeproben.....	39
2A. Untersuchungen zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i> .....	41
2A.1. Sammlung des Schwammmaterials .....	41
2A.1.1. Sammlung der <i>Aplysina</i> – Schwämme vor Rovinj, Kroatien.....	41
2A.1.2. Sammlung von Gewebe des Schwammes <i>Crambe crambe</i> .....	42
2A.2. Bearbeitung der t0 - Proben für die Experimente mit <i>A. aerophoba</i> und der Proben vom <i>Aplysina</i> - Schwämmen, gesammelt an Standorten mit geringerer Lichtintensität.....	42
2A.3. Behandlung von Gewebestücken des Schwammes <i>A. aerophoba</i> mit organischen Lösungsmitteln.....	43
2A.4. Untersuchung zum Einfluss von Gewebszersetzung auf das Alkaloidmuster in <i>A. aerophoba</i> .....	44
2A.5. Experimente zum Einfluss mechanischer Beschädigung auf das Alkaloidmuster in Gewebe von <i>A. aerophoba</i> .....	45
2A.5.1. Mechanische Schädigung des Gewebes von <i>A. aerophoba</i> unterschiedlicher Intensität.....	45
2A.5.2. Experiment zum Zeitverlauf der Veränderungen im Alkaloidmuster von <i>A. aerophoba</i> .....	46
2A.5.3. Kontrollexperiment mit Gewebe des Schwammes <i>Crambe crambe</i> .....	47

## Inhaltsverzeichnis

<b>2A.6. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters in gefriergetrocknetem Gewebe verschiedener <i>Aplysina</i> – Arten nach Zugabe von Seewasser</b> .....	<b>47</b>
2A.6.1. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe der Schwämme <i>A. aerophoba</i> , <i>A. cavernicola</i> , <i>A. fistularis</i> und <i>A. aercheri</i> .....	47
2A.6.2. Zeitverlauf der Alkaloidmustersveränderung in <i>A. cavernicola</i> .....	49
2A.6.3. Untersuchung zur Hitzestabilität der Isoxazolinalkaloide von <i>A. cavernicola</i> .....	49
2A.6.4. Hemmung der Alkaloidmustersveränderung in Gewebe von <i>A. cavernicola</i> durch Zugabe von Trichloressigsäure .....	50
2A.6.5. Hemmung der Alkaloidmustersveränderung durch kurzzeitiges Aufkochen gefriergetrockneten Gewebes von <i>A. cavernicola</i> .....	50
2A.6.6. Hemmung der Alkaloidmustersveränderung durch langes Kochen gefriergetrockneten Gewebes von <i>A. cavernicola</i> .....	51
<b>2A.7. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters im Mantelgewebe von <i>Tylodina perversa</i></b> .....	<b>52</b>
<b>2A.8. Experimente zur Umsetzung zugesetzter <i>A. aerophoba</i> – Metabolite in Gewebe von <i>A. archeri</i> und <i>C. crambe</i></b> .....	<b>52</b>
2A.8.1. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von <i>Aplysina archeri</i> .....	52
2A.8.2. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von <i>Crambe crambe</i> .....	53
<b>2A.9. Extraktion des gefriergetrockneten Schwammmaterials</b> .....	<b>53</b>
<b>2B. <i>Aplysina</i> – Alkaloide in der Meeresschnecke <i>Tylodina perversa</i></b> ....	<b>54</b>
<b>2B.1. Sammlung der Schnecke <i>Tylodina perversa</i> und der Schwammproben</b> .....	<b>54</b>
<b>2B.2. Wahlfraßversuch</b> .....	<b>55</b>

## Inhaltsverzeichnis

2B.3. Langzeitfraßversuch mit den Schwämmen <i>A. aerophoba</i> und <i>A. cavernicola</i> .....	56
2B.4. Präparation der Schnecken.....	57
2B.5. Extraktion und HPLC – Analyse der Schnecken – und Schwammgewebe.....	57
2B.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Schneckenorganen.....	58
2B.4. Anzuchtversuche mit Veliger – Larven von <i>Tylodina perversa</i> .....	59
2C. Das Verpflanzungsexperiment mit <i>Aplysina cavernicola</i> .....	60
2C.1. Verpflanzung der Schwämme und Probenahme der t0 – Proben vom Originalstandort.....	60
2C.2. Probenahme der verpflanzten Schwämme.....	62
2C.3. HPLC – Analyse der Schwämme.....	63
2C.4. Elektronenmikroskopie (TEM).....	63
2C.5. Extraktion genomischer Bakterien – DNA aus den Schwammproben.....	64
2C.6. Kontrolle der DNA – Extraktion und des PCR – Erfolgs mittels Gel – Elektrophorese.....	66
2C.7. Polymerase – Kettenreaktion (PCR) .....	67
2C.8. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE).....	70
2C.9. Ausschneiden der Banden aus dem DGGE – Gel und anschließende Sequenzierung der darin enthaltenen bakteriellen DNA.....	72
2C.10. Fluoreszente in situ Hybridisierung (FISH).....	74

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>77</b>
3A. Untersuchungen zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i> .....	77
<b>3A.1. Unterschiede in den Alkaloidmustern von <i>Aplysina</i> – Schwämmen verschiedener Herkunft</b> .....	<b>77</b>
3A.1.1. Alkaloidmuster der im August 2003 in Rovinj, Kroatien gesammelten <i>A. aerophoba</i> – Schwämme.....	77
3A.1.2. Alkaloidmuster der im April 2002 bei Banylus-sur-mer, Südfrankreich gesammelten <i>A. aerophoba</i> – Schwämme.....	80
3A.1.3. Alkaloidmuster von <i>Aplysina</i> – Schwämmen, gesammelt in Höhlen und in 26,5 m Wassertiefe bei Rovinj .....	82
<b>3A.2. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i> durch eine verletzungsinduzierte Biotransformation</b> .....	<b>84</b>
3A.2.1. Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf das Alkaloidmuster in frischem Gewebe von <i>A. aerophoba</i> .....	84
3A.2.2. Einfluss von Gewebszersetzung auf das Alkaloidmuster in <i>A. aerophoba</i> .....	86
3A.2.3. Einfluss mechanischer Beschädigung auf das Alkaloidmuster in frischem Gewebe von <i>A. aerophoba</i> .....	86
3A.2.3.1. Veränderungen im Alkaloidmuster in Abhängigkeit vom Grad der Gewebsverletzung.....	86
3A.2.3.2. Zeitverlauf der Veränderungen im Alkaloidmuster nach Verletzung des Gewebes.....	88
3A.2.4. Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in anderen Arten der Gattung <i>Aplysina</i> .....	90
3A.2.4.1. Biotransformation in gefriergetrocknetem Schwammgewebe nach Zugabe von Seewasser.....	90
3A.2.4.2. Zeitverlauf der Biotransformation in Gewebe des Schwammes <i>A. cavernicola</i> .....	93

## Inhaltsverzeichnis

3A.2.4.3.	Hitzestabilität der Isoxazolinalkaloide von <i>A. cavernicola</i> .....	93
3A.2.4.4.	Hemmung der Alkaloidmuster – Veränderungen durch Denaturierung der Enzyme im Schwammgewebe.....	94
3A.2.5.	Kontrollexperimente zur Transformation von Isoxazolinalkaloiden aus <i>A. aerophoba</i> in anderen Schwämmen und in <i>Tylodina perversa</i> .....	98
3A.2.5.1.	Biotransformation von <i>A. aerophoba</i> – Alkaloiden in Gewebe von <i>A. archeri</i> .....	98
3A.2.5.2.	Kontrollexperimente mit Gewebe des Schwammes <i>Crambe crambe</i> .....	99
3A.2.5.3.	Untersuchung zu Veränderungen des Alkaloidmusters im Gewebe von <i>Tylodina perversa</i> .....	100
3B.	<i>Aplysina</i> – Alkaloide in der Meeresschnecke <i>Tylodina perversa</i> .....	102
3B.1.	<b>Wahlfraßversuch</b> .....	102
3B.2.	<b>Langzeitfraßversuch mit den Nahrungsschwämmen <i>A. aerophoba</i> und <i>A. cavernicola</i></b> .....	103
3B.2.1.	Alkaloidgehalte der Nahrungsschwämme.....	103
3B.2.2.	Alkaloidgehalte in den Schneckengeweben.....	105
3B.3.	<b>Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Schneckenorganen</b> .....	112
3B.4.	<b>Anzuchtversuche mit Veliger – Larven von <i>Tylodina perversa</i></b> .....	114
3C.	Das Verpflanzungsexperiment mit <i>A. cavernicola</i> .....	115
3C.1.	<b>Zustand der verpflanzten Schwämme</b> .....	115
3C.2.	<b>Vergleich der Alkaloidmuster in den Schwammproben mittels HPLC – Analyse</b> .....	116

## Inhaltsverzeichnis

3C.3. Elektronenmikroskopische Analyse der Schwammgewebe.....	117
3C.4. DGGE und phylogenetische Analyse der bakteriellen 16S rDNA.....	119
3C.5. Fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	125
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>127</b>
4A. Unterschiede und Veränderungen im Alkaloidmuster von Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i> .....	127
4A.1. Unterschiede in den Alkaloidmustern von mediterranen <i>Aplysina</i> – Schwämmen verschiedener Herkunft.....	127
4A.2 Verletzungsinduzierte Biotransformation der Isoxazolin- alkaloide in <i>Aplysina</i> – Schwämmen.....	134
4B. <i>Aplysina</i> – Alkaloide in der Meeresschnecke <i>Tyrodina</i> <i>perversa</i> .....	161
4B.1. Ursprung des Aerothionins in <i>T. perversa</i> .....	161
4B.2. Cyanobakterien im Gewebe von <i>T. perversa</i> ?.....	169
4C. Das Verpflanzungsexperiment mit <i>Aplysina cavernicola</i> .....	171
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>185</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>205</b>
<b>7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>208</b>
<b>8. Publikationsliste.....</b>	<b>209</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>211</b>

# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 1- Einleitung

#### Abbildungen

Abb. 1-1:	Foto Riffgemeinschaft	S. 1
Abb. 1-2:	Standortfoto <i>Aplysina aerophoba</i>	S. 5
Abb. 1-3:	Standortfoto <i>Aplysina cavernicola</i>	S. 5
Abb. 1-4:	Isoxazolinalkaloide in mediterranen <i>Aplysina</i> -Schwämmen	S. 7
Abb. 1-5:	Biotransformation der Isoxazolinalkaloide	S. 9
Abb. 1-6:	Foto <i>Tyrodina perversa</i> auf <i>A. aerophoba</i>	S. 11
Abb. 1-7:	EM-Aufnahme einer Choanocyste	S. 13
Abb. 1-8:	EM-Aufnahme des Schwamm-Mesohyls	S. 14
Abb. 1-9:	EM-Aufnahme von Bakterien in <i>Aplysina aerophoba</i>	S. 15

#### Tabellen

Tab. 1-1:	Schwämme, die in früheren Studien auf assoziierte Bakterien untersucht worden waren	S. 16
-----------	---	-------

### 2-Material und Methoden

#### Abbildungen

Abb. 2-1:	Lösungsmittelgradient bei der HPLC-UV-Analyse	S. 37
Abb. 2-2:	Lösungsmittelgradient bei der HPLC-MS-Analyse	S. 38
Abb. 2B-1:	Foto Wahlfraßversuch mit <i>Tyrodina perversa</i>	S. 55
Abb. 2C-1:	Foto <i>Aplysina cavernicola</i> -Individuum nach der Verpflanzung	S. 61

### 3-Ergebnisse

#### Abbildungen

Abb. 3A-1	HPLC-Chromatogramm von <i>Aplysina aerophoba</i> aus dem Flachwasser bei Rovinj	S. 77
Abb. 3A-2	Anteile der Alkaloide am Gesamtalkaloidgehalt in <i>A. aerophoba</i>	S. 79
Abb. 3A-3	HPLC-Chromatogramm von <i>A. aerophoba</i> aus Südfrankreich	S. 80
Abb. 3A-4	Foto der <i>Aplysina</i> -Schwämme aus Rovinj	S. 82
Abb. 3A-5	HPLC-Chromatogramm von einem <i>Aplysina</i> -Schwamm aus 26,5 m Tiefe bei Rovinj	S. 83
Abb. 3A-6	HPLC-Chromatogramm von einem <i>Aplysina</i> -Schwamm aus einer Höhle bei Rovinj	S. 83
Abb. 3A-7	Auswirkungen unterschiedlicher Lösungsmittel auf das Alkaloidmuster in <i>A. aerophoba</i>	S. 84
Abb. 3A-8	Auswirkungen mechanischer Beschädigung auf das Alkaloidmuster in <i>A. aerophoba</i>	S. 87
Abb. 3A-9	Zeitverlauf der Alkaloidmusteränderungen in <i>A. aerophoba</i> nach mechanischer Beschädigung	S. 89
Abb. 3A-10	Alkaloidmusteränderungen nach Zugabe von Seewasser zu	

## Inhaltsverzeichnis

	gefriergetrocknetem Gewebe von <i>A. aerophoba</i> u. <i>A. cavernicola</i>	S. 91
Abb. 3A-11	Alkaloidmusteränderungen nach Zugabe von Seewasser zu gefriergetrocknetem Gewebe von <i>A. fistularis</i> u. <i>A. archeri</i>	S. 92
Abb. 3A-12	Zeitverlauf der Alkaloidmusteränderungen in gefriergetrocknetem Gewebe von <i>A. cavernicola</i> nach Seewasserzugabe	S. 93
Abb. 3A-13	Hitzestabilität des Methanolextraktes von <i>A. cavernicola</i>	S. 94
Abb. 3A-14	Einfluss von Säure auf die Biotransformation in <i>A. cavernicola</i>	S. 95
Abb. 3A-15	Einfluss von siebenminütigem Erhitzen des Gewebes von <i>A. cavernicola</i> auf die Biotransformation	S. 96
Abb. 3A-16	Einfluss von achtstündigem Erhitzen des Gewebes von <i>A. cavernicola</i> auf die Biotransformation	S. 97
Abb. 3A-17	Transformation von <i>A. aerophoba</i> -Metaboliten in <i>A. archeri</i>	S. 98
Abb. 3A-18	Kontrollexperiment mit <i>Crambe crambe</i>	S. 100
Abb. 3A-19	Kontrollexperiment mit <i>Tylodina perversa</i>	S. 101
Abb. 3B-1	Wahlfraßversuch mit <i>Tylodina perversa</i>	S. 102
Abb. 3B-2	HPLC-Chromatogramm des Nahrungsschwammes <i>A. aerophoba</i>	S. 103
Abb. 3B-3	Quantifizierte Alkaloide in den Nahrungsschwämmen	S. 104
Abb. 3B-4	Alkaloidmuster in <i>A. aerophoba</i> im Verlauf des Fraßversuches	S. 104
Abb. 3B-5	HPLC-Chromatogramm des Nahrungsschwammes <i>A. aerophoba</i>	S. 105
Abb. 3B-6	HPLC-Chromatogramme verschiedener Organe von <i>T. perversa</i> -Individuen aus den Langzeitfraßversuchen	S. 106
Abb. 3B-7	Alkaloidgehalte in den Mitteldarmdrüsen von <i>T. perversa</i>	S. 108
Abb. 3B-8	Alkaloidgehalte in den Mänteln von <i>T. perversa</i>	S. 108
Abb. 3B-9	Alkaloidgehalte im Laich von <i>T. perversa</i>	S. 109
Abb. 3B-10	EM-Aufnahme des Gewebes von <i>Aplysina aerophoba</i>	S. 112
Abb. 3B-11	EM-Aufnahmen der Gewebe von <i>Tylodina perversa</i>	S. 113
Abb. 3B-12	Mikroskopische Aufnahmen der Larven von <i>T. perversa</i>	S. 114
Abb. 3C-1	Fotos <i>Aplysina cavernicola</i> -Individuen am Ende des Verpflanzungsversuches	S. 115
Abb. 3C-2	HPLC-Chromatogramme von <i>Aplysina cavernicola</i> -Individuen des Verpflanzungsversuches	S. 117
Abb. 3C-3	EM-Aufnahmen von Bakterien in <i>A. cavernicola</i> -Individuen des Verpflanzungsversuches	S. 119
Abb. 3C-4	Aufnahmen der DGGE-Gele des Verpflanzungsversuches	S. 120
Abb. 3C-5	Phylogenetischer Baum der sequenzierten Bakterien-DNA	S. 124
Abb. 3C-6	Aufnahmen der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	S. 126

### Tabellen

Tab. 3A-1	Alkaloidgehalt in <i>A. aerophoba</i> aus dem Flachwasser bei Rovinj	S. 78
Tab. 3A-2	Alkaloidgehalt in <i>A. aerophoba</i> aus Südfrankreich	S. 81
Tab. 3A-3	Alkaloidgehalte in <i>A. aerophoba</i> nach Lösungsmittlexposition	S. 85
Tab. 3A-4	Alkaloidgehalte in <i>Aplysina</i> -Gewebe nach Seewasserzugabe	S. 92
Tab. 3B-1	Alkaloidgehalte in <i>T. perversa</i> im Langzeitfraßversuch	S. 107
Tab. 3C-1	GenBank-Analyse der DGGE-Gel-Banden des Verpflanzungsversuches	S. 122



# 1. Einleitung

## 1.1. Sekundärmetabolite in marinen Schwämmen

### Ökologische Funktionen von Sekundärmetaboliten in marinen Schwämmen

Bereits im Kambrium (vor ca. 580 Millionen Jahren) besiedelten Schwämme die Meere und gehören damit zu den ältesten Metazoa der Erde (Finks 1970, Li *et al.* 1998, Müller 1998). Ihre Verbreitung erstreckt sich von den Tropen (Reiswig 1973, Rützler 1978, Wenner *et al.* 1983, Suchanek *et al.* 1985) über die gemäßigten Breiten (Carballo *et al.* 1997) bis in die Polarmeere (Dayton *et al.* 1974, McClintock 1987, McClintock & Baker 2001).



Abb. 1-1.: Raumkonkurrenz zwischen den Bewohnern eines tropischen Korallenriffs. Bildhöhe: ca. 1m  
Aufnahme: © Peter Schupp

Durch ihre häufig auffälligen Farben und ihre sessile Lebensweise sind Schwämme zahlreichen Gefahren ausgesetzt (Paul 1992; Proksch & Ebel 1998; Paul & Puglisi 2004). Obwohl die Nährstoffe in ihrem Gewebe sicherlich attraktiv für zahlreiche Fraßfeinde sind (Thoms *et al.* 2004), sind sie morphologisch kaum geschützt (Chanas & Pawlik 1996). Vor allem in tropischen Korallenriffen leben sie in extremer Raumkonkurrenz mit anderen sessilen Meereslebewesen (Abb. 1-1) und müssen sich somit ständig dagegen wehren, von ihren Nachbarn überwachsen zu werden (Schmahl 1991, Engel & Pawlik 2000). Darüber

hinaus stellt das Meer einen Lebensraum dar, in dem sämtliche verfügbaren Oberflächen innerhalb kürzester Zeit dem „Biofouling“, dem Bewuchs durch Bakterien und Diatomeen, sowie durch Fortpflanzungsstadien verschiedenster mariner Organismen, ausgesetzt sind (Bakus *et al.* 1986, Lappin-Scott & Costerton 1989, Fusetani 2004). Gerade für Schwämme, die zur Nahrungsaufnahme Seewasser filtrieren, das durch kleine Poren an ihrer Oberfläche eingestrudelt wird (Reiswig 1971, 1974), birgt dies eine besondere Gefahr: Ein solcher Bewuchs würde

zwangsläufig diese Poren verstopfen und damit sowohl ihre Nahrungs- als auch ihre Sauerstoffversorgung blockieren.

Tatsächlich läßt sich nur sehr selten Bewuchs auf Schwammoberflächen feststellen (Jackson & Buss 1975, Fusetani 2004). Obwohl Bakterien im Meerwasser allgegenwärtig sind, ist die Außenhaut von Schwämmen meist nahezu steril (Becerro *et al.* 1994). Um Schwämme herum ist häufig ein abiotischer Saum zu beobachten (Sullivan *et al.* 1983, Porter & Targett 1988, Engel & Pawlik 2000), d.h. ihre Nachbarn werden aktiv zurückgedrängt. Und, obwohl Schwämme oft in Lebensräumen mit hohem Fraßdruck durch Herbivore und Carnivore wachsen (Grigg *et al.* 1984, Huston 1985, Carpenter 1986), finden sich an ihnen nur selten Fraßspuren. Lediglich einige Nahrungsspezialisten und sehr wenige Generalisten sind in der Lage, Schwammgewebe zu fressen (Randall & Hartmann 1968, Green 1977).

Schwämme haben sich in ihrer ca. 600 Millionen Jahre andauernden Evolution zahlreiche chemische Waffen zu eigen gemacht, die sie vor den Gefahren aus ihrer Umwelt schützen (Pawlik 1992, Paul 1992, Hay 1996, Proksch & Ebel 1998, Paul & Puglisi 2004) und waren damit bei der Besiedelung von allen aquatischen Lebensräumen außerordentlich erfolgreich (van Soest 1996). Über 4000 unterschiedliche und häufig in verschiedener Hinsicht bioaktive Sekundärmetabolite sind bereits aus Schwämmen bekannt (MarinLit 2003). Aufgrund der Tatsache, dass diese im Lebensraum der Schwämme biologisch aktiven Substanzen bemerkenswert häufig auch für den Menschen nutzbare pharmakologische Aktivität besitzen (Faulkner 2000), sind Schwämme in den letzten Jahrzehnten stark in das Interesse der Naturstoffforscher gerückt (Faulkner 1993, 1997, Proksch 2002).

### Induzierte chemische Schutzmechanismen im Tier – und Pflanzenreich

Sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich werden bei der Etablierung von Schutzmechanismen verschiedene Strategien verfolgt. Vor allem sessile und langsam bewegliche Tiere sowie Pflanzen sind auf eine effiziente Abwehr ihrer mobilen Fraßfeinde angewiesen. Sind diese Organismen einem konstanten, vorhersehbaren Fraßdruck ausgesetzt, so entwickeln sie meist konstitutive Schutzmechanismen (Hay & Fenical 1988). Hierzu zählen beispielsweise die Bildung von Gehäusen oder Stacheln (mechanischer Schutz) sowie die konstitutive Einlagerung von Fraßschutzmetaboliten in ihr Gewebe (chemischer Schutz).

Weist die Intensität des Fraßdruckes hingegen eine große räumliche oder zeitliche Variabilität auf, so werden vorrangig fakultative Schutzmechanismen gebildet (Adler & Harvell 1990, Harvell 1990a). Fakultative Schutzmechanismen können in zwei verschiedenen Ausprägungen vorliegen. So kann ein störender Faktor (z.B. der Angriff durch einen Fraßfeind oder der Befall durch pathogene Mikroorganismen) die Biosynthese von abwehrenden Sekundärmetaboliten im Gewebe des Organismus induzieren (Havel 1986, Harvell 1990b). Man spricht in diesem Fall von „induzierter Abwehr“. Die Reaktionen auf den Angriff sind langsam. Bis die Abwehrsubstanzen in wirksamen Konzentrationen biosynthetisiert sind können Wochen vergehen (Hammerstrom *et al.* 1998, Taylor *et al.* 2002). Entsprechend schützen solche Reaktionen den angegriffenen Organismus nicht direkt, sondern bereiten ihn auf weitere Angriffe in der Zukunft vor.

Eine andere Form eines fakultativen Schutzmechanismus ist die Transformation von genuin im Gewebe enthaltenen Sekundärmetaboliten in aktivere Abwehrsubstanzen. Nach Paul & van Alstyne (1992) wird diese Form als „aktivierte Abwehr“ bezeichnet, um sie gegen die „induzierte Abwehr“, beispielsweise in Form einer induzierten Biosynthese von Schutzmetaboliten, deutlich abgrenzen zu können. Aktivierte Abwehrreaktionen laufen innerhalb weniger Sekunden ab, um den Opferorganismus direkt gegen den schädigenden Einfluß schützen zu können. Derart schnelle Reaktionen werden meist durch die katalytische Wirkung von Enzymen bewerkstelligt (Paul & van Alstyne). Außerdem beschränken sie sich normalerweise auf den verletzten Teil des Gewebes.

Aktivierte Schutzreaktionen, die mit einer Biotransformation von Sekundärmetaboliten einhergehen, sind im terrestrischen Raum weit verbreitet. So wird in zahlreichen Pflanzenarten, induziert durch Gewebsverletzung, aus cyanogenen Glykosiden die hochtoxische Blausäure gebildet (Conn 1979). In anderen Fällen entsteht aus Senfölglykosiden durch Einwirkung einer Glykosidase Senföl (Isothiocyanat), das abschreckend auf Fraßfeinde wirkt (Jones 1988). In allen diesen Beispielen sind die jeweiligen Vorstufen durch Kompartimentierung innerhalb des Pflanzengewebes physikalisch von den Enzymen, welche die Reaktionen katalysieren, getrennt. Durch mechanische Beschädigung des Gewebes kommt es zu einer Zerstörung der Kompartimente, was dann zu einer Vermischung von Enzym und Substrat und schließlich zum Ablauf der Biotransformation führt.

Auch aus dem marinen Lebensraum sind solche verletzungsinduzierten Biotransformationsreaktionen bekannt. So wird in einer Reihe von Algen der Gattung *Halimeda* das genuin vorhandene Halimedatetraacetat nach Gewebsverletzung zu Halimedatrial transformiert (Paul & van Alstyne 1992). Halimedatrial ist ein stärkeres Toxin und bewirkt auch einen wirksameren Fraßschutz für die Algen als die Vorstufe Halimedatetraacetat. Ein weiteres Beispiel ist die mediterrane Alge *Caulerpa taxifolia*, in der es nach mechanischer Beschädigung zur Deacetylierung von Caulerpenin und damit zur Bildung der Oxytoxine 1 und 2 kommt. Diese stellen sehr wahrscheinlich ebenfalls einen effizienteren Fraßschutz dar als ihre genuin im Gewebe auftretende Vorstufe (Jung & Pohnert 2001). Ein drittes Beispiel für einen „aktivierten Abwehrmechanismus“ wurde erst kürzlich in Makroalgen beschrieben, war aber zuvor schon in einzelligem Phytoplankton bekannt (Wolfe und Steinke 1996, Wolfe *et al.* 1997). Als Folge einer Verletzung wird in zahlreichen Grünalgen (vor allem in Ulvophyceae) und in verschiedenen Rotalgen Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) zu Acrylsäure und Dimethylsulfid (DMS) gespalten (van Alstyne *et al.* 2001, van Alstyne & Houser 2003). Die Reaktion wird durch das Enzym DMSP – Lyase katalysiert. In Versuchen mit Seeigeln wirkten beide Biotransformationsprodukte fraßhemmend, während die Vorstufe DMSP die Fraßaktivität der Versuchstiere verstärkte (van Alstyne *et al.* 2001, van Alstyne & Houser 2003).

Auch im Tierreich sind ähnliche Schutzreaktionen bekannt. Bei dem Schwamm *Suberites domuncula* wurde kürzlich festgestellt, dass dieser aufgrund von Streß zwei antibakteriell wirksame Substanzen biosynthetisiert (Müller *et al.* 2004). In diesem Fall handelt es sich also um eine induzierte Abwehrreaktion. Auch ein Beispiel für eine aktivierte Schutzreaktion in Form einer verletzungsinduzierten Biotransformation von inaktiveren Vorstufen ist bei den Schwämmen bekannt. Dieses Beispiel wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

#### Verletzungsinduzierte Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina*

Alkaloide mit einer Spirocyclohexadienisoxazolin – Partialstruktur, sogenannte Isoxazolinalkaloide (Abb. 1-4), sind charakteristische Inhaltsstoffe von Schwämmen der Ordnung Verongida (Albrizio *et al.* 1994, Aiello *et al.* 1995, Ciminiello *et al.*

1994a,b, 1995, 1996a,b, 1997, 1999, 2000). Schwämme der Gattung *Aplysina* (Syn. *Verongia*), die der Ordnung der Verongida angehören, akkumulieren Isoxazolinalkaloide bis zu Konzentrationen von über 10% ihres Trockengewichtes (z.B. Ciminiello *et al.* 1997, Ebel *et al.* 1999, Puyana *et al.* 2003).



Abb. 1-2: Der mediterrane Schwamm *Aplysina aerophoba* (Bildhöhe: ca. 30 cm)

Im Mittelmeer sind zwei Vertreter der Ordnung Verongida bekannt: die Schwämme *Aplysina aerophoba* und *Aplysina cavernicola* (Abb. 1-2 und 1-3). Die beiden Arten weisen viele Übereinstimmungen auf, unterscheiden sich jedoch in den Habitaten, die sie besiedeln. Während *A. aerophoba* in flachen Regionen von 1 bis 15 m Meerestiefe häufig an stark sonnenexponierten Standorten wächst, ist der Lebensraum von

*A. cavernicola* auf Höhlen und / oder größere Tiefen um 40 m beschränkt (Pansini 1997).

Da die beiden *Aplysina* – Arten recht häufig im Mittelmeer vorkommen, ist ihre Sekundärmetaboliten – Zusammensetzung sehr gut untersucht (Ciminiello 1997). So hatten Teeyapant & Proksch (1993) bereits vor über zehn Jahren Unterschiede im Alkaloidmuster von *A. aerophoba* festgestellt, je nachdem, ob das Schwammgewebe vor der Extraktion gefriergetrocknet oder ob es feucht in organischen Lösungsmitteln konserviert worden war. Im ersten Fall dominierten die oben beschriebenen Isoxazolinalkaloide. Im Fall der Lagerung in einem Seewasser / Lösungsmittel – Gemisch waren diese fast vollständig verschwunden und stattdessen wurden große Mengen der niedermolekularen Alkaloide detektiert.



Abb. 1-3: Der mediterrane Schwamm *Aplysina cavernicola* in 40 m Tiefe (Bildhöhe ca. 1m)

Aufgrund dieser Beobachtung wurden verschiedene Experimente an *A. aerophoba* – Gewebe durchgeführt. Man stellte fest, dass es zu den Veränderungen des Alkaloidmusters auch dann kommt, wenn man gefriergetrocknetem Gewebe von *A. aerophoba* nachträglich Wasser hinzufügt. Nach Erhitzen des Gewebes auf 90 °C

oder bei einer Abkühlung auf 7 °C blieben die Isoxazolinalkaloide jedoch, bei ansonsten gleicher Behandlung, unverändert erhalten (Teeyapant & Proksch 1993). Gleiches galt, als man dem Gewebe 10%ige Trichloressigsäure zugab. Anhand dieser Beobachtung formulierten Teeyapant & Proksch (1993) die Biotransformations – Hypothese, nach der in *A. aerophoba* aus den genuin im Schwamm vorhandenen Isoxazolinalkaloiden unter Einwirkung von postulierten Enzymen die Alkaloide Aeroplysinin-1 und Dienon entstehen. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften der Metabolite folgerte man, dass die Isoxazolinalkaloide zunächst gespalten werden, wobei Aeroplysinin-1 entsteht, welches dann in einem zweiten Schritt weiter zum Dienon (in der Literatur teilweise auch als „dibromoverongiaquinol“ bezeichnet (z.B. Debitus *et al.* 1998)) reagiert (Abb. 1-5).

In den folgenden Jahren wurde darüber hinaus festgestellt, dass entsprechende Veränderungen im Gewebe von *A. aerophoba* auch stattfinden, wenn es in frischem Zustand gemörsert wird (Ebel *et al.* 1997). In der selben Arbeit wurden zellfreie Enzymextrakte von *A. aerophoba* und von einer Reihe weiterer, zum Teil karibischer *Aplysina* – Arten hergestellt, in denen nach Zugabe von Isoxazolinalkaloiden in reiner Form ebenfalls Aeroplysinin-1 und Dienon entstanden. Gleichzeitig verschwanden die Isoxazolinalkaloide aus den Ansätzen. Entsprechende Experimente wurden daraufhin mit Enzymextrakten von Schwämmen durchgeführt, die nicht der Ordnung Verongida angehören (Ebel *et al.* 1997). In diesen Fällen blieben die zugegebenen Isoxazolinalkaloide unverändert erhalten.

In verschiedenen Arbeiten wurden die Charakteristika der postulierten Biotransformations – Enzyme untersucht. Ratana Teeyapant (1994) ermittelte die zugehörige Michaelis – Menten – Kinetik und bestimmte das Temperaturoptimum der Reaktion. Die maximale Enzymaktivität für die Gesamtreaktion von den Isoxazolinalkaloiden zu Dienon lag demnach bei einer Temperatur zwischen 50 und 60 °C. Interessanterweise wiesen die Einzelschritte der Biotransformation, die Spaltung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1 und die Bildung des Dienons, unterschiedliche Temperaturoptima auf. Hieraus schloß man, dass mindestens zwei Enzyme an der Gesamtreaktion beteiligt sein müssen (Teeyapant 1994). Thomas Fendert (2000) untersuchte deshalb in seiner Doktorarbeit beide Transformationsschritte getrennt. Für das postulierte „Isoxazolin – spaltende Enzym“ stellte auch er eine maximale Aktivität zwischen 50 und 60 °C fest. Bei 80 °C kam es in seinen Versuchen zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms.

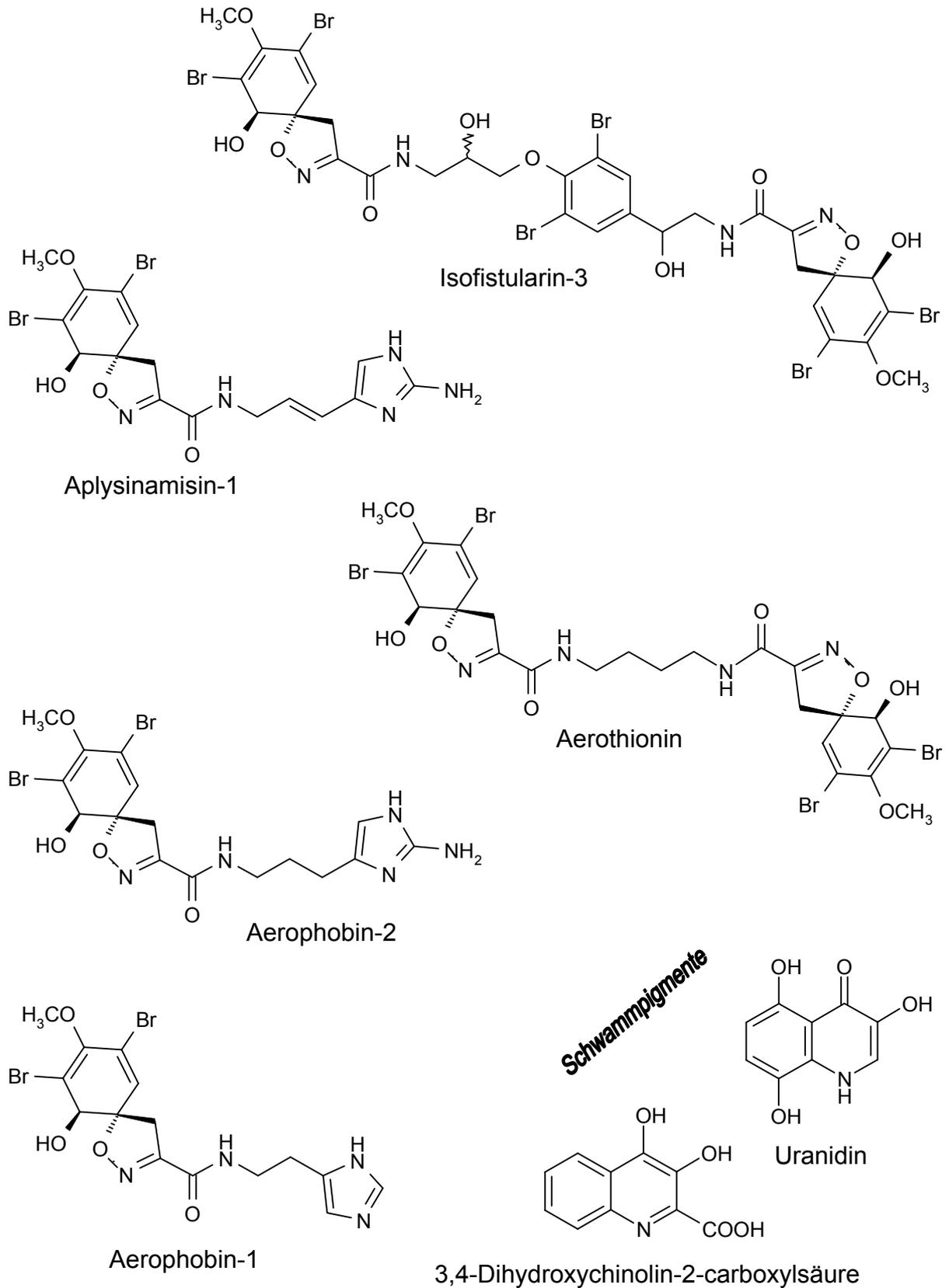


Abb. 1-4: Typische Isoxazolinalkaloide und die Pigmente der mediterranen *Aplysina* – Schwämme (im Anhang dieser Arbeit befinden sich weitere Daten zu den im Rahmen meiner Untersuchungen behandelten Metaboliten)

Das pH – Optimum des ersten Biotransformationsschrittes wurde auf Werte zwischen pH 5,5 und pH 6,5 bestimmt (Fendert 2000). Darüber hinaus wurden verschiedene Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms durchgeführt (Ebel 1998, Fendert 2000, Goldenstein *et al.* 2000). Den Ergebnissen dieser Versuche zufolge sind das Vorliegen eines intakten Spirohexadienisoxazolin – Ringsystems und einer Säureamidseitenkette (Abb. 1-5) essentielle Strukturbestandteile der Substrate für einen effizienten Ablauf der enzymatischen Spaltung. Interessanterweise ist bisher kein Äquivalent eines Enzyms bekannt, das eine ähnliche Reaktion katalysiert. Leider war es bisher trotz aufwändiger Versuche nicht möglich, das Isoxazolin – spaltende Enzym für eine weiterführende Charakterisierung in Reinform zu isolieren (Ebel 1998).

Für den zweiten Biotransformationsschritt, der Bildung des Dienons aus Aeroplysinin-1, wurde anhand der strukturellen Unterschiede der beiden Metabolite auf die Beteiligung einer Nitrilhydratase geschlossen (Ebel 1998, Fendert 2000). Der Einfluß unterschiedlicher Agenzien auf die Enzymaktivität, sowohl in aktivierender als auch in hemmender Weise, ergab Hinweise auf strukturelle Bestandteile des katalysierenden Enzyms, die diese Schlußfolgerung zusätzlich unterstützten (Fendert 2000). Das Aktivitätsoptimum der Nitrilhydratase in *A. aerophoba* wurde bei Temperaturen zwischen 20 und 30 °C ermittelt.

In einer Reihe von Untersuchungen wurde festgestellt, dass die verletzungsinduzierte Biotransformation in *Aplysina* – Schwämmen in verschiedener Hinsicht mit einem starken Anstieg der biologischen Aktivität der Alkaloidzusammensetzung dieser Schwämme einhergeht. So konnte gezeigt werden, dass Aeroplysinin-1 und Dienon antibiotisch, mutagen, hämolytisch und zytotoxisch aktiv sind (Teeyapant *et al.* 1993b). Zur zytotoxischen Aktivität des Aeroplysinin-1 trägt sehr wahrscheinlich die Fähigkeit dieser Substanz bei, freie Radikale zu bilden (Koulman *et al.* 1996).

Die Wirksamkeit der Biotransformationsprodukte beschränkt sich dabei nicht auf terrestrische Organismen. Beide Metabolite waren gegenüber allen 16 in der Arbeit von Weiss *et al.* (1996) getesteten, marinen Bakterienstämmen antibiotisch aktiv. Sie hemmten außerdem das Zellwachstum zweier mariner Algenarten, wirkten abschreckend auf die marine Schnecke *Littorina littorea* und waren toxisch für Larven des Fisches *Blennius pavo* (Weiss *et al.* 1996).

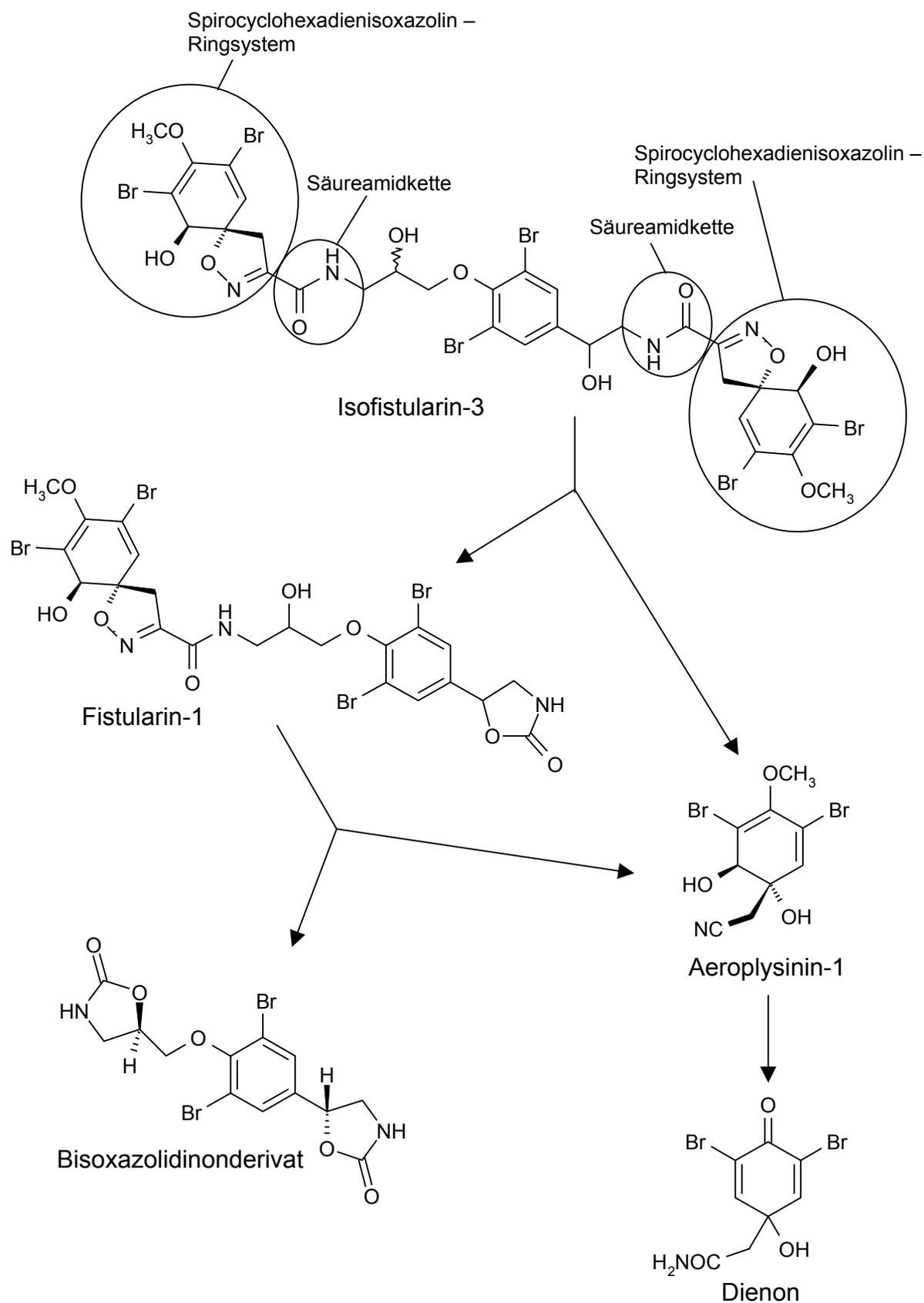


Abb. 1-5: Biotransformation der Isoxazolinalkaloide nach Teeyapant & Proksch (1993) am Beispiel des Isofistularin-3. Am Isofistularin-3 – Molekül sind die für das Ablaufen der Enzymreaktion essentiellen Strukturelemente der Vorstufen markiert (nach Fendert 2000).

In allen genannten Experimenten zeigten dagegen die Vorstufen der Biotransformation in molaren Konzentrationen, in denen auch die Biotransformationsprodukte getestet worden waren, entweder erheblich geringere oder gar keine Aktivität (Teeyapant *et al.* 1993b, Weiss *et al.* 1996).

Einzigste Ausnahme in diesem Zusammenhang ist die abschreckende Wirkung der Alkaloidzusammensetzung in *Aplysina* – Schwämmen gegenüber Fischen. Wie Wahlfraßversuche mit dem mediterranen Fisch *Blennius sphinx* im Rahmen meiner Diplomarbeit (Thoms 2000, Thoms *et al.* 2004) zeigten, nimmt diese Wirkung im Verlauf der Biotransformation von den Isoxazolinalkaloiden hin zu Aeroplysinin-1 und Dienon ab.

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation der Arbeitsgruppe um Joseph Pawlik an der University of North Carolina, Wilmington und William Fenical an der Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, USA wird das Vorhandensein einer Biotransformation in Schwämmen der Gattung *Aplysina* angezweifelt (Puyana *et al.* 2003). In Experimenten an den karibischen *Aplysina* – Arten *A. insularis* und *A. archeri* konnten keine entsprechenden Reaktionen beobachtet werden. Es wird dort angenommen, dass die früheren Beobachtungen an *Aplysina* – Schwämmen, die zur Formulierung der Biotransformations – Hypothese geführt hatten, nicht auf verletzungsinduzierten Transformationsreaktionen, sondern vielmehr auf drei von natürlichen Vorgängen unabhängigen Faktoren beruhen:

- 1) Aufgrund unterschiedlicher Extraktionsmethoden wurden die Metabolite aus Gewebeproben von *Aplysina* – Schwämmen mit unterschiedlicher Effizienz herausgelöst. So kam es in den Ansätzen zu unterschiedlichen, von der gewählten Extraktionsmethode abhängigen Alkaloid – Zusammensetzungen.
- 2) Die Alkaloidmuster von *Aplysina* – Schwämmen sind häufig starken natürlichen Schwankungen unterworfen, die auch die Gehalte von Aeroplysinin-1 und Dienon betreffen. Solche Schwankungen waren in den einzelnen Ansätzen in den Experimenten zur Biotransformation gemessen worden.
- 3) Der Kontakt von frischem Schwammgewebe mit organischem Lösungsmittel führt zur Bildung von Artefakten. Solche Artefakte waren in die Biotransformations – Versuche mit eingegangen.

Puyana *et al.* (2003) gehen davon aus, dass die aufgrund dieser Faktoren beobachteten Unterschiede der Alkaloidzusammensetzungen verschiedener Schwammproben in den vorangegangenen Arbeiten fälschlicherweise als ein

verletzungsinduzierter Anstieg der Konzentrationen von Aeroplysinin-1 und Dienon interpretiert worden war.

Ziel meiner Arbeit war es, die von Puyana *et al.* (2003) angeführten Punkte zu überprüfen. Auf diese Weise wollte ich ermitteln, ob die von Teeyapant & Proksch (1993) postulierten „Biotransformationsprodukte“ Aeroplysinin-1 und Dienon genuin in lebenden *Aplysina* – Schwämmen vorhanden sind, oder aber als Produkte einer verletzungsinduzierten Reaktion entstehen.

## 1.2. Die mediterrane Schnecke *Tylodina perversa*



Abb. 1-6: Mehrere Individuen von *Tylodina perversa* auf dem Schwamm *Aplysina aerophoba* (Bildhöhe: ca. 15 cm)

Die Schnecke *Tylodina perversa* (Syn. *T. citrina*; Abb. 1-6) ist trotz der hohen Konzentrationen an fraßhemmenden Isoxazolinalkaloiden (Abb. 1-4.) im Gewebe der mediterranen *Aplysina* – Arten (Thoms *et al.* 2004) ein spezialisierter Fraßfeind dieser Schwämme (Riedl 1983). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sie den Fraßschutz ihrer

Beuteorganismen nicht nur überwindet, sondern darüber hinaus deren Sekundärmetabolite in ihr eigenes Gewebe einlagert (Teeyapant *et al.* 1993a, Ebel *et al.* 1999). Ebel *et al.* (1999) stellten fest, dass einige Metabolite aus den Schwämmen selektiv in bestimmten Organen der Schnecke angereichert werden. Dies und die Beobachtung, dass vor allem im Mantelgewebe, dem Laich und dem bei Gefahr abgesonderten Schleim von *T. perversa* hohe Konzentrationen der Schwammmetabolite vorhanden sind, legte die Vermutung nahe, dass die aufgenommenen Alkaloide auch in der Schnecke eine ökologische Funktion einnehmen (Ebel. *et al.* 1999).

Frühere Studien beschreiben *T. perversa* stets auf dem Schwamm *Aplysina aerophoba* (Teeyapant *et al.* 1993a, Ebel *et al.* 1999). Becerro *et al.* (2003) nehmen

an, dass die Schnecke ausschließlich diesen Schwamm frisst und die nahe verwandte Mittelmeerart *A. cavernicola* meidet. Diese Studie kommt zu dem Schluss, dass *T. perversa* nicht, wie allgemein angenommen, als carnivorer Organismus auf das Fressen der Schwämme spezialisiert ist, sondern den Herbivoren zuzurechnen ist und diese Schwämme vorrangig aufgrund des Vorhandenseins von Cyanobakterien in ihrem Gewebe als Nahrung auswählt (Becerro *et al.* 2003). Während *A. aerophoba* vor allem in den Oberflächenschichten seines Gewebes große Mengen an Cyanobakterien beherbergt, sind diese in *A. cavernicola* nicht vorhanden (Vacelet 1970, 1975). Aus der Sicht von Becerro *et al.* (2003) kommt *A. cavernicola* deshalb als Nahrung für die Schnecken nicht in Frage.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei chemischen Analysen des Gewebes von *Tyrodina perversa*, neben den aus *Aplysina aerophoba* bekannten Isoxazolinalkaloiden, immer auch der Metabolit Aerothionin aufgefunden wurde. Aerothionin ist den Isoxazolinalkaloiden aus *A. aerophoba* strukturell zwar sehr ähnlich, (Abb. 1-4) war jedoch - zumindest im mediterranen Lebensraum - bisher ausschließlich in der nah verwandten Art *A. cavernicola* gefunden worden (Brenzinger 1996, Ciminiello *et al.* 1997, Thoms *et al.* 2004). Zahlreiche Studien an *Tyrodina* – Individuen aus unterschiedlichsten Regionen des Mittelmeeres bestätigten das Vorkommen des Aerothionins in den Schnecken (z.B. Teeyapant *et al.* 1993b, Ebel *et al.* 1999). In allen diesen Studien waren die Individuen von *A. aerophoba* abgesammelt worden, während *A. cavernicola* in der näheren Umgebung nicht entdeckt wurde.

Ziel meiner Untersuchungen war es, Näheres über den Ursprung von Aerothionin in *T. perversa* zu erfahren. Mit Hilfe von Wahlfraßversuchen wollte ich herausfinden, ob die Schnecken tatsächlich eine Nahrungspräferenz für *A. aerophoba* im Vergleich mit *A. cavernicola* zeigen, oder ob letzterer als Quelle für das Aerothionin in *T. perversa* in Frage kommen könnte. Langzeitfütterungsexperimente mit den Schnecken sollten zeigen, wie sich die Sekundärmetaboliten – Zusammensetzung des jeweiligen Nahrungsschwammes auf das Alkaloidmuster in den Organen von *T. perversa* auswirkt. Schließlich sollte über eine elektronenmikroskopische Analyse der Schneckengewebe untersucht werden, ob die Schnecke beim Fressen der Schwämme neben den Alkaloiden auch die zahlreichen schwammassoziierten Bakterien (siehe Abschnitt 1.3) in ihre Organe transferiert.

### 1.3. Schwammassoziierte Mikroorganismen – Gemeinschaften

#### Die Beziehung zwischen Schwämmen und Bakterien

Die Schwämme (Porifera) unterteilen sich phylogenetisch in drei Klassen: die Hexactinellida (Kieselschwämme), die Calcarea (Kalkschwämme) und die Demospongiae (Hornschwämme). Letztere Klasse umfasst bei weitem die größte Zahl an rezenten Schwammspezies (van Soest 1996).

Die Demospongiae besitzen eine Reihe von gemeinsamen Eigenschaften. So wird das gesamte Gewebe dieser Schwämme von einer Epithelschicht, dem Pinacoderm, umhüllt. Es handelt sich hierbei um ein einschichtiges Epithel aus lose aneinandergereihten Zellen, die eine physikalische Barriere zwischen der inneren Matrix des Schwammgewebes und dem umgebenden Seewasser darstellen (van Soest 1996). In dieser Epithelschicht befinden sich zahlreiche Poren, Ostien genannt, die in ein weitverzweigtes Kanalsystem im Schwamminneren münden.

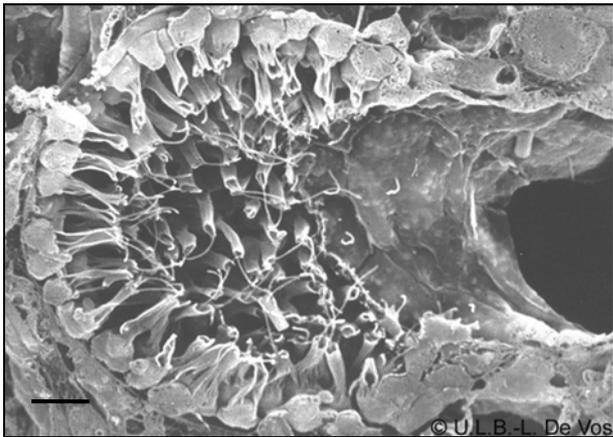


Abb. 1-7: Querschnitt durch eine Choanocyste mit zahlreichen Kragengeißelzellen (REM - Aufnahme: Prof. L. deVos, Universität Brüssel)  
Balken: ca. 5 µm

Schwämme sind in der Lage, immense Mengen an Wasser zu filtrieren. Vogel (1977) konnte zeigen, dass ein 1 kg schweres Exemplar eines lebenden Schwammes eine Filterkapazität von 24000 Liter (24 m<sup>3</sup>) Seewasser am Tag aufweisen kann. Der Wasserstrom wird dabei durch den Geißelschlag von vielen tausend Choanocyten (zu Deutsch Kragengeißelzellen) erzeugt (van Soest 1996). Hierbei handelt es sich um

Schwammzellen, die spezialisierte Kammern innerhalb des Kanalsystems des Schwammes (als Kragengeißelkammern oder Choanocysten bezeichnet (Abb. 1-7)) auskleiden. Das von den Choanocyten gebildete Epithel wird als Choanoderm bezeichnet. Durch den koordinierten Geißelschlag der Choanocyten wird Wasser durch die Ostien in der Schwammoberfläche eingesogen, fließt dann durch das stark verzweigte Kanalsystem im Schwamm und sammelt sich schließlich in den sogenannten Osculen, von wo es wieder nach außen in das umgebende Seewasser abgegeben wird (Reiswig 1974).

Das Filtrieren des Seewassers liefert dem Schwamm Sauerstoff, sowie Nahrung in Form kleinster Zellen (Pico – und Nanoplankton) und organischer kolloidaler Makromoleküle (Reiswig 1971 a, 1974). Wesentlicher Bestandteil der Nahrung von Schwämmen sind Bakterien, die mit einer Effizienz von 75 bis 99% aus dem Seewasser ausgefiltert werden (Reiswig 1971a, 1975a, Wilkinson 1978a). Durch gezielte Strömungen innerhalb des Kanalsystems im Schwamm, verursacht durch den Geißelschlag der Choanocyten, kommt nahezu sämtliches partikuläres Material, das zusammen mit dem Seewasser eingestrudelt wurde, entweder mit dem Pinacoderm oder dem Choanoderm in Kontakt. Sowohl die Pinacocyten als auch die Choanocyten sind zur Phagocytose befähigt und nehmen die Partikel auf (Schmidt 1970; Willenz & Van de Vyver 1982). Bakterien werden dabei hauptsächlich innerhalb der Kragengeißelkammern aufgenommen (Schmidt 1970). Anschließend wird ein Teil der aufgenommenen Bakterien durch Exocytose in die innere Matrix des Schwammes, das Mesohyl, transferiert (Schmidt 1970, Turon *et al.* 1997).

Das Mesohyl der Demospongia (Abb. 1-8) besteht zu einem großen Teil aus Sponginfasern, die sozusagen das Skelett des Schwammes bilden. Den Raum zwischen den Fasern füllen kollagene Proteine aus (van Soest 1996). Darüber hinaus leben hier die aus dem Seewasser aufgenommenen Bakterien. Bereits für eine Vielzahl von Schwämmen wurden große Mengen an assoziierten Bakterien im Gewebe

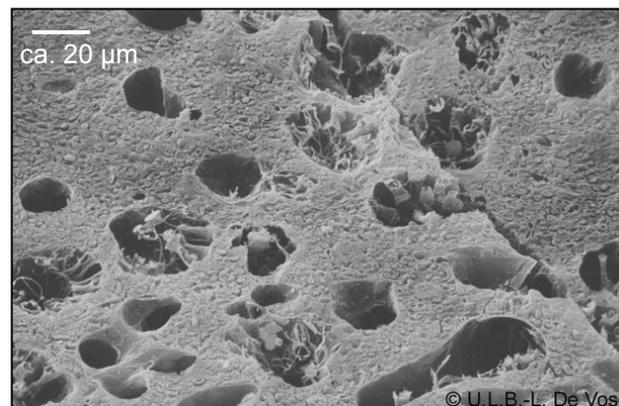


Abb. 1-8: Querschnitt durch das Mesohyl eines Schwammes. Im Gewebe sind zahlreiche Kanäle, Chanocysten und Bakterien (kleine, runde Strukturen) zu erkennen (REM – Aufnahme: Prof. Louis deVos, Universität Brüssel).

beschrieben (Tab. 1-1). In den beiden mediterranen *Aplysina* – Arten *A. cavernicola* und *A. aerophoba* machen sie beispielsweise ca. 40% der „Schwammbiomasse“ aus (Vacelet 1975). In *Ceratoporella nicholsoni* nehmen sie sogar einen Anteil von 57% der Biomasse ein (Willenz & Hartmann 1989). Die Bakterienzahl in *A. aerophoba* wurde auf  $6,4 \pm 4,6 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$  geschätzt (Friedrich *et al.* 2001). Dies ist ein Wert, der zwischen zwei und drei Zehnerpotenzen über dem des Seewassers liegt. Auch in *Rhopaloeides odorabile* liegt die Bakterienzahl mit  $1,5 \times 10^8 - 8,3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  in einem ähnlichen Bereich (Webster & Hill 2001).

In äußeren, lichtexponierten Schichten des Schwammgewebes treten häufig Cyanobakterien auf (Rützler 1985). Verschiedene Gattungen dieser photosynthetisch aktiven Mikroorganismen (*Aphanocapsa* sp., *Synechocystis* sp., *Prochloron* sp., *Oscillatoria* sp.) wurden dabei in unterschiedlichen Schwämmen identifiziert. Die Art *Aphanocapsa feldmannii* scheint dabei jedoch bei weitem am häufigsten vorhanden zu sein. Rützler (1985) beschreibt das Auftreten von *A. feldmannii* in 19 Flachwasserschwämmen, darunter in *A. aerophoba* und in einer Reihe weiterer, tropischer *Aplysina* – Arten.

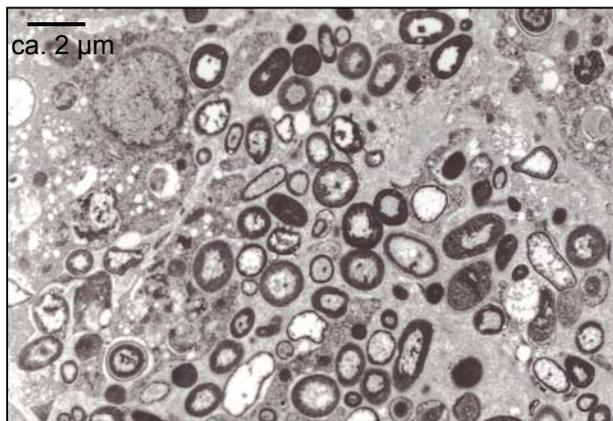


Abb. 1-9: Verschiedene Bakterien – Morphotypen im Gewebe von *Aplysina aerophoba*. Oben links ist eine Schwammzelle mit großem Zellkern zu erkennen, die Bakterien phagocytiert. (TEM-Bild)

Neben den autotrophen Mikroorganismen machen in vielen Schwämmen häufig heterotrophe Bakterien (Abb. 1-9) einen Großteil der Mikroorganismen – Gemeinschaft aus. Meist leben diese extrazellulär in der Kollagenmatrix des Schwammes (Abb. 1-2 und 1-3). Sie besiedeln dabei sowohl innere als auch äußere Schichten des Schwammgewebes. In den Schwammarten *Astrosclera willeyana* und *Petrosia ficiformis* scheinen die Bakterien in speziellen Kompartimenten, sogenannten „bacteriocytes“, vorzuliegen (Vacelet & Donadey 1977; Wörheide 1998). Auch in *Aplysina* – Schwämmen wurden, neben der großen Zahl an frei im Schwammgewebe auftretenden Bakterien, Gruppen von Bakterien in kompartimentähnlichen (als „cellule poches“ bezeichneten) Gebilden gefunden (Vacelet 1975).

Neben den Bakterien leben im Mesohyl auch die Schwammzellen selbst. Sie sind den Mikroorganismen jedoch oft zahlenmäßig weit unterlegen (Abb. 1-9). Ein Großteil der Schwammzellen ist frei beweglich und wandert in amöboider Weise durch die Mesohyl – Matrix (van Soest 1996). Treffen die Schwammzellen auf geeignete Bakterien, so werden diese durch Phagozytose aufgenommen und verdaut (Schmidt 1970). Entsprechend sind Bakterien häufig auch innerhalb der Schwammzellen zu finden. Meist liegen sie dort in unterschiedlichen Verdauungsstadien innerhalb von Verdauungsvesikeln vor.

Tab. 1-1: Liste von Schwammarten, in deren Gewebe bereits Mikroorganismen – Gemeinschaften beschrieben wurden (nach Hentschel *et al.* 2003)

<b>Schwammart</b>	<b>Ordnung</b>	<b>Referenz</b>
<u>Hohe Dichte an Bakterien</u>		
<i>Aplysina aerophoba</i>	Verongida	Vacelet 1975, Friedrich <i>et al.</i> 2001
<i>Aplysina cavernicola</i>	Verongida	Vacelet 1975, Friedrich <i>et al.</i> 1999
<i>Agelas oroides</i>	Agelasida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Plakina trilopha</i>	Homosclerophorida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Petrosia ficiformis</i>	Aplosclerida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Ircinia wistarii</i>	Dicytoceratida	Wilkinson 1978 a-c
<i>Jaspis stellifera</i>	Astrophorida	Wilkinson 1978 a-c; Fürst <i>et al.</i> 1999
<i>Theonella swinhoei</i>	Lithistida	Bewley and Faulkner 1998
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	Dictyoceratida	Webster & Hill 2001
<i>Astrosclera willeyana</i>	Agelasida	Wörheide 1998
<i>Ceratoporella nicholsoni</i>	Agelasida	Willenz & Hartmann 1989, Santavy <i>et al.</i> 1990
<u>Geringe Dichte an Bakterien</u>		
<i>Pleraplysilla spinifera</i>	Dendroceratida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Thenea muricata</i>	Astrophorida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Oscarella lobularis</i>	Astrophorida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Grantia compressa</i>	Calcaronea	Vacelet & Donadey 1977
<i>Acanthella acuta</i>	Axinellida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Axinella polypoides</i>	Axinellida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Reniera mucosa</i>	Haplosclerida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Crambe</i> sp.	Poecilosclerida	Vacelet & Donadey 1977
<i>Petrobiona massiliana</i>	Calcaronea	Vacelet & Donadey 1977
<i>Pericharax heteroaphis</i>	Clathrinida	Wilkinson 1978 a-c
<i>Neofibularia irata</i>	Poecilosclerida	Wilkinson 1978 a-c
<i>Niphates</i> sp.	Haplosclerida	J. Weisz & N. Lindquist (unpubl.)

Vereinzelt wurden in Gewebe von *A. aerophoba* Bakterien in den Zellkernen der Schwammzellen gefunden (Vacelet 1970, Friedrich *et al.* 1999). Hierbei handelt es sich stets um morphologisch einheitliche, filamentöse Spezies. Das Auftreten solcher Bakterien scheint mit einer Degeneration der Wirtszellen einher zu gehen, was auf eine pathogene Wirkung dieser Mikroorganismen hinweist.

Die amöboid beweglichen Zellen der Schwämme werden Archaeocyten genannt. Sie sind totipotent, das heißt, sie können sich in verschiedenster Weise in unterschiedliche funktionelle Zellen ausdifferenzieren (van Soest 1996). Kommt es beispielsweise zu einer Verletzung des Schwammgewebes, dann entwickeln sich die Archaeocyten zu Pinacocyten und Choanocyten und verschließen so innerhalb kurzer Zeit die Wunde. Bei der sexuellen Vermehrung der Schwämme bilden sich aus den Archaeocyten die Spermatozoen und Oocyten. Aus ihnen können aber auch die sogenannten Rosettenzellen entstehen, die z.B. in *Aplysina* – Schwämmen die Lagerstätten der Isoxazolinalkaloide sind (Thompson *et al.* 1983, Turon *et al.* 2000).

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Schwamm unterscheidet sich meist deutlich von der im Seewasser, das den Schwamm umgibt (Giovannoni & Rappe 2000). Neuere Studien zeigen, dass das erfolgreiche Wachstum von Bakterien häufig abhängig von dem chemischen Milieu ist, in dem sie sich befinden (Connon & Giovannoni 2002, Kaeberlein *et al.* 2002, Rappé *et al.* 2002, Zengler *et al.* 2002). Insofern ist es wahrscheinlich, dass Schwämme durch ihre Sekundärmetabolite Einfluss auf die Struktur der Mikroorganismen – Gemeinschaft in ihrem Gewebe nehmen.

### Symbiotische Beziehungen zwischen Schwämmen und Bakterien

Die Frage, ob zwischen Schwämmen und ihren assoziierten Bakteriengemeinschaften symbiotische Beziehungen bestehen, ist ein in der Literatur häufig diskutiertes Thema. Da hierbei der Terminus „sponge symbionts“ recht uneinheitlich verwendet wird, sollen zunächst die Definitionen unterschiedlicher Beziehungen zwischen Schwämmen und Bakterien nach Hentschel *et al.* (2003) beschrieben werden:

Die meisten Bakterien, die von Schwämmen aus dem Seewasser aufgenommen werden, dienen diesen als Nahrung und werden innerhalb kurzer Zeit verdaut

(Wilkinson 1974). Einem Teil der Seewasserbakterien gelingt es jedoch, über einen längeren Zeitraum im Schwammgewebe zu überleben. Zu dieser aus dem Seewasser stammenden schwammassoziierten Mikroorganismen – Gemeinschaft gesellen sich weitere Bakterienspezies, die über Fortpflanzungsstadien der Schwämme an die jeweils nächste Generation weitergegeben wurden. Auch wenn allen Vertretern dieser mikrobiellen Gemeinschaft gemeinsam ist, dass sie dauerhaft mit dem Schwamm assoziiert sind, gehen sie unterschiedlich enge Beziehungen mit ihrem Wirt ein:

Pathogene Beziehungen zwischen Bakterien und Schwämmen bringen Nachteile für den Wirt, in dem durch sie Zell - und / oder Gewebsschäden verursacht werden, die letztlich zum Tod des Wirtes führen können. In kommensalistischen Beziehungen nutzen die Mikroorganismen lediglich das Schwamm – Mesohyl als Lebensraum, ohne ihrem Wirt dabei einen Nutzen oder einen Schaden zu bringen. Spricht man von einer Symbiose, so impliziert das einen gegenseitigen Nutzen beider Partner füreinander.

Für unterschiedliche Schwamm – Bakterien – Systeme wurden bereits verschiedene symbiotische Interaktionen vorgeschlagen. Hierzu gehört, dass die Mesohyl – Bakterien zur Ernährung ihres Wirtes beitragen können, indem sie ihre Verdauungsprodukte an ihn weitergeben (Wilkinson & Garrone 1980; Borowitzka *et al.* 1988). Darüber hinaus können Bakterien die Nährstoffversorgung ihres Wirtsschwammes ergänzen, indem sie ihn an speziellen Stoffwechselprozessen wie Autotrophie, Stickstofffixierung und Nitrifikation teilhaben lassen (Wilkinson & Fay 1979). Die Verwertung von Abfallprodukten des Schwammstoffwechsels bringt sowohl den Bakterien als auch den Schwämmen einen Nutzen (Beer & Ilan 1998). Und schließlich wird in vielen Fällen angenommen, dass Bakterien an der Produktion von Abwehrsubstanzen beteiligt sind, die ihre Wirte beispielsweise vor Fraßfeinden und vor Biofouling schützen (Bakus *et al.* 1986, Unson *et al.* 1994, Bewley *et al.* 1996).

Eine kritische Durchsicht der zu dieser Thematik vorhandenen Literatur zeigt jedoch, dass experimentelle Beweise für symbiotische Interaktionen zwischen Schwämmen und Bakterien selten sind (Hentschel *et al.* 2003). In vielen Fällen erschwert die Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft in Schwämmen eine entsprechende Beweisführung (Steinert *et al.* 2000).

## Biotechnologisches Potential von schwammassoziierten Mikroorganismen

Bereits in den sechziger Jahren wurden Schwämme als Quelle für neue, pharmakologisch interessante Naturstoffe entdeckt. Seither wurden über 4000 Substanzen aus diesen Organismen isoliert (MarinLit 2003). Viele von ihnen erwiesen sich in pharmazeutischen Tests als vielversprechende Wirkstoffe gegen Krankheiten wie Krebs, AIDS und Malaria (z.B. McKee *et al.*, 1994; Kikuchi *et al.*, 2001). Dennoch sind bis heute nur wenige Pharmaka, die auf Sekundärmetaboliten aus Schwämmen basieren, in der klinischen Anwendung (Faulkner 2000). Ein wesentlicher Grund hierfür ist das von Faulkner (2000) beschriebene „supply problem“: Meist sind die pharmazeutisch interessanten Komponenten nur in Spuren in den Schwämmen zu finden. Entsprechend müssten gewaltige Mengen an Schwammmaterial gesammelt und extrahiert werden, um die für die Entwicklung eines Medikamentes erforderlichen vorklinischen Studien durchführen zu können. Eine solche Vorgehensweise wäre aus ökologischer Sicht nicht vertretbar. Darüber hinaus erlauben die Gesetze der Länder, in deren Gewässern die Schwämme wachsen, einen solchen Raubbau meist nicht. Bisher wurde das „supply problem“ von Naturstoffchemikern weitgehend ignoriert (Faulkner 2000). Erst in den letzten Jahren beginnt man, nach alternativen Lösungswegen zu suchen (Tramper *et al.* 2003):

Aus kommerzieller Sicht wäre die Synthese der pharmazeutisch interessanten Naturstoffe, nachdem sie in den Schwämmen gefunden wurden, sicherlich der attraktivste Weg (Faulkner *et al.* 2000). Häufig sind diese Substanzen jedoch in ihrer chemischen Struktur so komplex, dass ihre Herstellung mit aufwändigen Syntheseprozessen verbunden wäre (Pomponi & Willoughby, 1994). Vor allem, wenn eine Substanz sich noch in klinischen Tests befindet und ihre medizinische Anwendbarkeit noch nicht gesichert ist, sind solche Prozesse meist nicht rentabel (Faulkner 2000).

In vielen Fällen liegt große Hoffnung in der Annahme, dass nicht die Schwämme selbst, sondern die mit ihnen assoziierten Mikroorganismen die tatsächlichen Produzenten der pharmazeutisch interessanten Naturstoffe sind (Faulkner *et al.* 2000, Proksch *et al.* 2002). Da die pharmazeutische Industrie bereits viel Erfahrung mit der Fermentation von Bakterien hat, wären Mikroorganismen eine attraktive Quelle für solche Substanzen (Faulkner *et al.* 2000). In einzelnen Fällen konnte

bereits nachgewiesen werden, dass vermeintliche Schwammmetabolite tatsächlich bakteriellen Ursprungs sind (z.B. Stierle *et al.* 1988, Unson & Faulkner 1993, Schmidt *et al.* 2000). In einer ganzen Reihe von Fällen nimmt man einen solchen Ursprung an, da die strukturellen Charakteristika der Substanzen eher auf eine Produktion durch Protozoa als durch Metazoa hinweisen (Kerr 2000, Proksch *et al.* 2002).

### Kriterien, die den mikrobiellen Ursprung von bioaktiven Substanzen aus Schwämmen belegen

Es existieren verschiedene molekularbiologische Techniken, mit deren Hilfe festgestellt werden kann, ob für die Produktion von Naturstoffen, die man aus Schwammgewebe isoliert hat, tatsächlich Mikroorganismen verantwortlich sind. Ein Beispiel hierfür sind Nukleotidsonden, mit denen die Biosynthese – Gene innerhalb des Genoms des Bakteriums, das man als Naturstoffproduzent vermutet, lokalisiert werden können (Hildebrand *et al.* 2004). Um eine solche Nucleotidsonde herzustellen, muss jedoch zunächst das fragliche Gen identifiziert und eindeutig mit der Biosynthese – Funktion in Zusammenhang gebracht werden. Das hierfür erforderliche Klonieren eines Biosynthese – Genes aus einem Bakterium und die Determinierung seiner Funktion sind jedoch sehr aufwändig und stellen meist schon ein eigenes umfangreiches Projekt dar.

Ein weiterer Ansatz zur Determinierung der Naturstoffproduktion in einem Bakterium ist die Herstellung von Antikörpern gegen die erforderlichen Biosynthese – Enzyme. Doch auch hierbei sind die notwendigen Vorarbeiten in ihrem Aufwand denen ähnlich, die für die Herstellung von Gensonden erbracht werden müssen. Zunächst muss das Biosynthese – Enzym und seine Funktion identifiziert und charakterisiert werden. Anschließend bedarf es einer Aufreinigung oder einer Expression des Enzyms, um damit die korrespondierenden Antikörper herzustellen zu können.

Beide beschriebenen Ansätze sind so aufwändig, dass es unumgänglich ist, die Symbiosforschung mit dem Sammeln von Indizien zu beginnen. Erst wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine Symbiose besteht und die dabei stattfindenden Interaktionen sowie die Symbiosepartner charakterisiert sind, lohnen sich die oben erläuterten weiteren experimentellen Schritte (Hildebrand *et al.* 2004). Folgendermaßen können solche Indizien aussehen:

1) Ähnlichkeiten der betreffenden Substanzen mit bekannten Sekundärmetaboliten von Bakterien

Gehören die aus dem Gewebe von Schwämmen isolierten Metaboliten Naturstoffklassen an, die nicht aus mehrzelligen Organismen, sondern nur aus Bakterien bekannt sind, so erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, dass mikrobielle Symbionten an der Produktion der Substanzen beteiligt sind. Solche Schlussfolgerungen müssen jedoch mit der nötigen Vorsicht gezogen werden, da selten ausgeschlossen werden kann, dass ein Metabolit, der bisher als Produkt eines mikrobiellen Stoffwechsels galt, auch eine andere, bisher unbekannte Herkunft haben kann (Hildebrand *et al.* 2004). Darüber hinaus ist es möglich, dass ein Naturstoff zwar ursprünglich mikrobiellen Ursprungs war, durch lateralen Gen – Transfer die Fähigkeit seiner Synthese aber von dem Bakterium auf den Wirtsorganismus übergegangen ist (Kondo *et al.* 2002).

2) Der Ort, an dem die Substanz im Schwamm vorliegt

In manchen Fällen lässt sich ein Metabolit im Schwamm eindeutig innerhalb der Symbiontenzellen oder aber eindeutig innerhalb der Schwammzellen lokalisieren. Das kann einen Hinweis auf den Produzenten des Metaboliten geben. Doch auch hier ist Vorsicht geboten, denn Substanzen können nach ihrer Synthese vom Syntheseort weg diffundieren oder aktiv an einen anderen Ort transportiert werden. So ist beispielsweise von freilebenden Mikroorganismen bekannt, dass diese die von ihnen produzierten antibiotisch aktiven Substanzen sehr effektiv aus ihren Zellen hinaus transportieren (Zhang *et al.* 2000). Auf diese Weise schützen sie sich vor Schäden durch ihre Stoffwechselprodukte.

3) Stabile Assoziationen zwischen dem Schwamm und den Mikroorganismen in seinem Gewebe; Korrelation zwischen dem Auftreten der Sekundärmetabolite und der Präsenz von Bakterienspezies

Da im Gewebe von Schwämmen meist eine Vielzahl an Bakterien vorhanden sind, ist es ein wichtiger Schritt für die Identifikation von Symbiosen, variabel im Schwamm auftretende und dauerhaft mit ihm assoziierte Spezies zu unterscheiden und somit den Kreis der potentiellen Symbionten einzuengen.

Treten Veränderungen im Sekundärstoffmuster des Schwammes auf, können außerdem Korrelationen zwischen dem Vorhandensein von bestimmten

Metaboliten und der Präsenz von bestimmten Bakterienarten weitere Hinweise für deren Beteiligung an der Naturstoffsynthese liefern. Solche Veränderungen können auch durch experimentelle Manipulationen des Schwamm – Bakterien – Systems künstlich verursacht werden. Entsprechende Beobachtungen lassen sich allerdings nur dann machen, wenn die Dauer der experimentellen Untersuchung die Dauer des Turnovers der Metabolite im Gewebe des Schwammes übersteigt.

Keiner der genannten Punkte kann einen endgültigen Beweis für das Vorhandensein einer Symbiose zwischen einem Schwamm und seinen assoziierten Bakterien liefern. Jedoch können durch Experimente, in denen entsprechende Zusammenhänge untersucht werden, zahlreiche Indizien für die Auswahl eines geeigneten Schwamm – Bakterien – Systems für weitere Untersuchungen gesammelt werden. Darüber hinaus kann die Suche nach potentiellen Symbionten in der komplexen Mikroorganismen – Gesellschaft in einem Schwamm auf einen in Frage kommenden Teil dieser Gemeinschaft fokussiert werden.

#### Ziele des Verpflanzungsexperimentes mit *Aplysina cavernicola*

Das Ziel der Verpflanzung von Individuen des mediterranen Schwamm *Aplysina cavernicola* war, diese innerhalb ihres natürlichen Lebensraumes deutlichen Veränderungen auszusetzen. Auf diese Weise sollte die Stabilität des Naturstoffmusters und der Bakterien – Gemeinschaft in *A. cavernicola* unter Einfluss dieser Veränderungen untersucht werden, um somit Rückschlüsse auf die Präsenz potentieller mikrobieller Symbionten und deren Einfluss auf die Sekundärmetaboliten – Produktion im Schwamm ziehen zu können.

Der Schwamm *A. cavernicola* wurde als Modellsystem für dieses Experiment ausgewählt, da a) sowohl sein Naturstoffmuster (Ciminiello *et al.* 1997, Brenzinger 1996, Thoms 2000) als auch die mit ihm assoziierte Mikroorganismen – Gemeinschaft (Vacelet 1971, 1975, Friedrich *et al.* 1999) bereits in mehreren Studien charakterisiert worden waren, b) sein Lebensraum ausschließlich auf größere Meerstiefen und / oder Höhlen beschränkt und somit klar definiert ist (Pansini 1997) und c) frühere *in situ* Verpflanzungsexperimente gezeigt hatten, dass eine verstärkte

Lichtexposition bei *A. cavernicola* zu Streß und in Folge dessen zu einer verringerten Wachstumsrate führt (Wilkinson & Vacelet 1979).

Die Schwämme wurden aus ihrem 40 m tief gelegenen natürlichen Habitat in flachere Zonen (zwischen 7 und 15 m) versetzt und dort für drei Monate belassen. Durch eine Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) der aus den Schwammproben isolierten und anschließend PCR – amplifizierten 16S rDNA und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde die bakterielle Gemeinschaft im Schwamm vor und nach der Verpflanzung analysiert. Anhand der HPLC – Analyse des Gewebes der verpflanzten Individuen sollten mögliche Veränderungen der Naturstoffmuster der Schwämme in Folge der Verpflanzung untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Geräte

#### 2.1.1. Allgemeine Laborarbeiten

- Waage Sartorius 1103
- Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 200µl; 1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg
- Pipetten (10 µl; 100 µl; 200µl; 1000 µl); Eppendorf AG, Hamburg
- Eppendorf – Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml); Eppendorf AG, Hamburg
- Skalpell; Swann – Morton
- Proben – Röhrchen „Falcon Tubes“ (10 und 50 ml); Becton Dickinson GmbH
- Korkbohrer (4 und 12 mm Durchmesser)

#### 2.1.2. Transport und Lagerung von Gewebeproben

- Kunststoffbeutel (Volumen 2 und 8 l)
- PE-Kunststoffbehälter 1000 ml
- PE-Kunststoffbehälter 50 ml
- Stickstoff – Transportbehälter, Air Liquide Cryotechnik
- -80 °C Gefriertruhe; Forma Scientific
- -20 °C Gefriertruhe; verschiedene
- + 4 °C Kühlschrank; verschiedene
- Flüssiger Stickstoff
- Trockeneis
- Kühl – Akkus “Extra – Cooler”

### 2.1.3. Gewebe – Extraktion und Herstellung von HPLC – Proben

#### Chemikalien

- Ethanol; CA\*
- Methanol; CA \*
- Aceton; CA \*
- Methanol LiChroSolv HPLC; Merck
- Nanopur-Wasser; Merck

\* Die mit CA gekennzeichneten Chemikalien wurden von der Chemikalienausgabe der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in technischer Qualität bezogen und vor Gebrauch destilliert.

#### Geräte

- Gefriertrockner LYOVAC GT2 mit Pumpe TRIVAC E
- Mikrowaage Sartorius MC-1 RC210P
- Magnetrührer Heidolph MR1000
- Rotationsverdampfer Vacuubrand PC510 und Rotavapor R200, Büchi
- Wasserbad IKA-WA
- SpeedVac SPD 111V, Savant
- Trockenschrank Heraeus T5050
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK510 S
- Zentrifuge Heraeus Biofuge pico
- DC-Fertigplatte (Alufolie), Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0.2mm Schichtdicke; Merck
- UV – Betrachter Camag (254 und 366 nm)
- Digital-pH-Meter Knick 646
- 1 ml HPLC - Gläschen

### 2.1.4. HPLC – UV

- Dionex HPLC – System
  - Pumpe P580, Dionex (mit integriertem Degaser)
  - Automatischer Probengeber ASI-100, Dionex
  - Säulenofen STH 585 Dionex
  - Detektor UVD 340 S, Dionex
  - Steuerungs – und Datenauswertungs – Software Chromeleon (V 6.3)
  - Drucker Hewlett Packard HP 4050
- Trennsäule Eurospher RP18, Knauer (Innendurchmesser: 4 mm; Länge: 125 mm; Korngröße: 5 µm)
- Eluenten:
  - NanoPur – Wasser, pH = 2,0 (eingestellt mit ortho-Phosphorsäure, 85 % p.a.; Merck)
  - Methanol LiChroSolv HPLC; Merck

### 2.1.5. HPLC - MS

- HPLC – System Agilent 1100 Series
  - Pumpen 2 x G1311 A QuatPump 1100; Agilent
  - Degaser G1322 A 1100; Agilent
  - Automatischer Probengeber G1313 A ALS 1100; Agilent
  - UV – Detektor G1315 B DAD 1100; Agilent
- Massenspektrometer LC-Q Deca, Finnigan
- Steuerungs – und Datenauswertungs – Software Excalibur
- Trennsäule Eurospher C<sub>18</sub>, Knauer (Innendurchmesser: 2 mm; Länge: 250 mm; Korngröße: 5 µm)
- Eluenten:
  - Acetonitril LiChroSolv HPLC; Merck
  - 0.1% Ameisensäure; Barnstead (hergestellt mit NanoPur – Wasser)

### 2.1.6. Aquarien – Experimente

- Glas – Aquarium (B x H x T = 170 x 40 x 80 cm)
- Glas – Aquarium (B x H x T = 140 x 30 x 45cm)
- Plexiglas – Aquarien (B x H x T = 20 x 20 x 10 cm)
- Kunststoffkanister 5 l
- Belüftungspumpe „The Pump 40“ Typ SPP40GJ-L mit Schlauchmaterial und Sprudelsteinen
- Aquarienfilter Sera Titan T
- Bakterienkultur „Cycle Biologischer Aquariumzusatz“

### 2.1.7. Befestigung der verpflanzten Schwämme

- Baumörtel
- Aluschalen 20 x 10 x 5 cm
- Polyesterharz VIAPAL 332 BS; Behnke
  - Härter MEKP; Behnke
- Einwegspritzen 100 ml mit Kanülen
- Kunststoff – ummantelter Draht (Durchmesser 3 mm)

### 2.1.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

- Elektronenmikroskop Zeiss EM10, Zeiss, Jena
- Inkubationsofen, Memmert TV 40b
- Ultramikrotom OM U3, Reichert
- Glutaraldehyd, Ferak
- Osmiumtetroxid, Serva
- 10 x PBS-Puffer, Serva
- Ethanol, Merck
- 1,2-Propylenoxid, Merck
- Epon 812, Serva

## 2.1.9. Mikrobiologische Untersuchungen

### 2.1.9.1. Zell – Lyse und Extraktion genomischer DNA

- FastPrep FP220A Instrument; Q-Biogene, Heidelberg
- FastDNA SPIN Kit for Soil; Q-Biogene, Heidelberg  
bestehend aus:
  - MULTIMIX 2 Tissue Matrix Tubes
  - PPS (Protein Precipitating Solution)
  - DNA-Binding Matrix
  - SEWS-M (Salt/Ethanol Wash Solution)
  - DES (DNA Elution Solution)
  - Natriumphosphat-Puffer
  - BBS gel loading dye
  - MT Buffer
  - SPIN Filters and Catch Tubes

### 2.1.9.2. Agarose – Gel – Elektrophorese

- Elektrophorese – Kammer, Pharmacia
- Gleichspannungstransformator, Pharmacia

<i>Elektrophorese – Bedingungen</i>	
Spannung	90 V
Dauer	ca. 2 h

- Zusammensetzung der Agarose – Gele:

	<i>0,8%ig</i>	<i>2%ig</i>
Agarose	1,2 g	3,0 g
TAE-Lösung	150 ml	150 ml

- ultraPure Agarose Electrophoresis Grade, Life Technologies, Paisley Scotland

- TAE-Lösung als Elektrolysepuffer

Tris / HCl	424,2 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 1000 ml

- Stopp-Puffer

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
Ficoll Type 400	2,5 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad. 10 ml

### 2.1.9.3. Gel – Dokumentation

- wässrige Ethidumbromid – Lösung (0,5 µg ml<sup>-1</sup>), Serva
- Dokumentationssystem GelDoc 2000, BioRad Laboratories GmbH, München
  - Video Printer, Mitsubishi, P91W

### 2.1.9.4. PCR - Bedingungen

#### PCR vor und nach DGGE

- PCR – Ansatz:

DNA – Probe	1 µl
10xPCR – Puffer	45,5 µl
dNTPs 10mM	1 µl
Primer 341f (GC) 100 pmol	1 µl
Primer 907r 100 pmol	1 µl
Taq – Polymerase	0,5 µl

- PCR – Programm:

Schritt	Reaktionstemp.	Dauer	Funktion	
1	96 °C	120 sec	Initialisierung der Denaturierung	
30 x	2	96 °C	60 sec	Denaturierung
	3	54 °C	60 sec	Anlagerung der Primers an Template
	4	72 °C	90 sec	Elongation der Primers
	5	72 °C	10 min	Elongation; Abschluß der Reaktion
6	10 °C	bis Ende	Kühlen der Probe	

### ABI – Sequenzier – PCR

- PCR-Ansatz (PCR für Forward – und Revers – Primer getrennt):

DNA – Probe	3 µl
Premix	4 µl
Primer 341f (GC) oder 907r	25 pmol 25 pmol
ABI – Wasser	1 µl
	2 µl

- PCR – Programm:

Schritt	Reaktionstemp.	Dauer	Funktion	
1	96 °C	120 sec	Initialisierung der Denaturierung	
25 x	2	96 °C	30 sec	Denaturierung
	3	56 °C	15 sec	Anlagerung der Primers an Template
	4	60 °C	240 sec	Elongation der Primers
	5	10 °C	bis Ende	Kühlen der Probe

### Reagenzien und Geräte für die PCR

- Mastercycler Gradient; Eppendorf AG, Hamburg
- Reaktionsgefäße: 0,5 ml Reaktionsgefäße; Eppendorf AG, Hamburg
- TE – Puffer zur Verdünnung der DNA – Proben:

Tris / HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad. 1000 ml

- Primer (Bezugsquelle: MWG Biotech AG, Ebersberg)
  - 341fGC:
    - Sequenz: 5'- cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcc tac ggg agg cag cag -3'
    - Schmelztemperatur  $T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
  - 341f:
    - Sequenz: 5'- cct acg gga ggc agc ag -3'
    - Schmelztemperatur  $T_m$
  - 907r:
    - Sequenz: 5'- ccg tca att c(ac)t ttg agt tt -3'
    - Schmelztemperatur  $T_m = 57,6 \text{ }^\circ\text{C}$
  
- dNTPs = Desoxynucleotidtriphosphat – Mix (Sigma Aldrich GmbH, München)

dATP 100 mM	100 $\mu\text{l}$
dCTP 100 mM	100 $\mu\text{l}$
dGTP 100 mM	100 $\mu\text{l}$
dTTP 100 mM	100 $\mu\text{l}$
Millipore – Wasser	ad. 1 ml

- Taq – Polymerase; Quiagen GmbH, Hilden
- 10 x PCR – Puffer; Quiagen GmbH, Hilden
- DNA- und RNA-freies ABI - Wasser, Applied Biosystems
- Premix Puffer – Konzentrat, Applied Biosystems

### 2.1.9.5. Aufreinigung der PCR – Produkte

#### PCR – Produkt – Reinigung

- PCR – Purification – Kit; Quiagen GmbH, Hilden  
bestehend aus:
  - PB – Lösung
  - PE – Lösung
  - Filtereinsätze

PCR – Produkt – Reinigung durch Ethanol – Fällung

- SpeedVac, UNIVAPO 150 H Uniequip
- ABI – Wasser, Applied Biosystems
- 3M NaAc pH 5,2
- 100% ABI – Ethanol, ABI
- 70% Ethanol, Merck

**2.1.9.6. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)**

DCode System für DGGE; BioRad Laboratories GmbH, München

<i>Elektrophorese – Bedingungen</i>	
Spannung	150 V
Temperatur	60 °C
Dauer	ca. 6 h

- Zusammensetzung der Acrylamid – Gele:

<b><i>Gehalt an denaturierenden Reagenzien</i></b>	<b><i>0%</i></b>	<b><i>20%</i></b>	<b><i>30%</i></b>	<b><i>70%</i></b>	<b><i>80%</i></b>	<b><i>100%</i></b>
40% Acrylamid / Bis	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
TAE-Puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Aqua dest.	73 ml	73 ml	73 ml	73 ml	73 ml	73 ml
Formamid	/	8 ml	12 ml	28 ml	32 ml	40 ml
Harnstoff	/	8,4 g	12,6 g	29,4 g	33,6	42,0 g

Reagenzien

- 40% Acrylamid / Bis (37,5:1); BioRad Laboratories GmbH, München
- 50x TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.1.9.2)
- 100% deionisierte Formamid – Lösung; BioRad Laboratories GmbH, München
- Harnstoff; BioRad Laboratories GmbH, München
- Ammoniumpersulfatlösung (0,1g pro 1 ml Aqua dest.); BioRad Laboratories GmbH, München
- TEMED; BioRad Laboratories GmbH, München

- DGGE-Ladepuffer; BioRad Laboratories GmbH, München:

Bromphenolblau	0,25 ml
Xylen Cyanol	0,25 ml
Glycerin	8,2 ml
Aqua dest.	1,3 ml

- 10% SDS, Serva
- 96% Ethanol, Merck

### Gel – Dokumentation

siehe 2.1.9.3.

### Ausschneiden der Banden

- Durchlicht – UV – Lampe
- ABI – Wasser, Applied Biosystems

### **2.1.9.7. Sequenzierung**

- ABI- 377XL Automated Sequencer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- ABI Prism Autoassembler v.2.1. Software; Perkin Elmer, Foster City, CA, USA

### **2.1.9.8. Phylogenetische Analyse**

- BLAST 16S rDNA – Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- ARB Software – Paket; <http://www.arb-home.de/>
- GenBank – Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

### 2.1.9.9. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

#### Schneiden der Proben

- Gefriermikrotom Mikrom HM 500 OM, Mikrom GmbH, Walldorf
  - Temperaturen: Box:  $-35^{\circ}\text{C}$ ; Träger  $-25^{\circ}\text{C}$
- Freezing Agent, Mikrom GmbH, Walldorf

#### Fixierung der Proben

- Carnoy-Lösung, Sargent-Welch, Illinois, USA
- Ethanol, Merck

#### Hybridisierung des Gewebes

- Hybridisierungsöfen, Memmert
- Feuchtkammer, Memmert
- Sonden:

<i>Sonde</i>	<i>Target</i>
EUB338mix	Eubakterien generell
TK 66	Holophaga/ Acidobakterien, UC26f

- Hybridisierungspuffer:
  - für Sonde EUB338mix:

NaCl 5M	362 $\mu\text{l}$
Tris	40 $\mu\text{l}$
Formamid	600 $\mu\text{l}$
steriles Wasser	998 $\mu\text{l}$
SDS 10% (1M)	2 $\mu\text{l}$

- für Sonde TK66:

NaCl 5M	362 µl
Tris*	40 µl
Formamid	200 µl
steriles Wasser	1398
SDS 10% (1M)	2 µl

### Bearbeitung der Proben nach Hybridisierung

- Heizbad
- Heizblock
- Waschlösungen:
  - für Sonde EUB338mix:

NaCl 5M	1020 µl
Tris	1000 µl
SDS 10% (1M)	50 µl
steriles Wasser	ad 50 ml

- für Sonde TK66:

NaCl 5M	4500 µl
Tris	1000 µl
SDS 10% (1M)	50 µl
steriles Wasser	ad 50 ml

- Tris = 121, 14 g Tris Base + 1l H<sub>2</sub>O mit HCl auf pH 8,0 eingestellt, dann autoklaviert
- Citifluor, Citifluor Ltd., Canterbury, GB

### Fluoreszenzmikroskopische Analyse

- Mikroskop Zeiss Axiolab
- Digital-Kamera Micro CS 2000 mit Sensor 2/3" ICX 205 AL CCD Monochrome, Intas GmbH, Göttingen
- Zeiss Filter Set 15 (Anregungslicht: 546 nm; Emission: 590 nm)

### 2.1.10. Tauch – Ausrüstung

- Anzug Waterproof A-Zor 5 mm
- Jacket Technisub Vario
- Flossen Seeman Sub
- Maske Technisub Look
- Schnorchel Technisub
- Atemregler Scubapro
  - erste Stufe Scubapro MK 20
  - zweite Stufe Scubapro S 600
  - Oktopus Scubapro R 380
- Tauchcomputer Suunto Vyper
- 3er – Konsole (Finimeter, Tiefenmesser, Kompass) Suunto CB-2 in line

### 2.1.11 Unterwasser – Fotografie

- Unterwasserkamera Nikonos V; Nikon
  - Unterwasserblitz SB – 102; Nikon
- Unterwasserkamera Motormarine II Ex; Sea & Sea
  - Unterwasserblitz YS – 60 TTL; Sea & Sea
  - Makro – Objektiv; Sea & Sea

## 2.2. Inhaltsstoff – Analyse der Gewebeproben

### 2.2.1. Qualitative Analyse der Extrakte und Fraktionen mittels HPLC – UV

Für die HPLC – Analyse wurde ein HPLC – System der Firma Dionex verwendet. Die Software „Chromleon“ diente der Steuerung der Anlage und der Datenauswertung. Standardmäßig wurden von jeder Probe 20 µl injiziert. Der Extrakt wurde über eine Eurosphere – C<sub>18</sub> Säule (125 x 4 mm) aufgetrennt. Für alle analysierten Proben wurde ein einheitlicher Gradient aus den Fließmitteln Wasser (mit Phosphorsäure auf pH 2 eingestellt) und Methanol verwendet. Der Verlauf des Gradienten ist in Abb.2-1 dargestellt. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1 ml min<sup>-1</sup>.

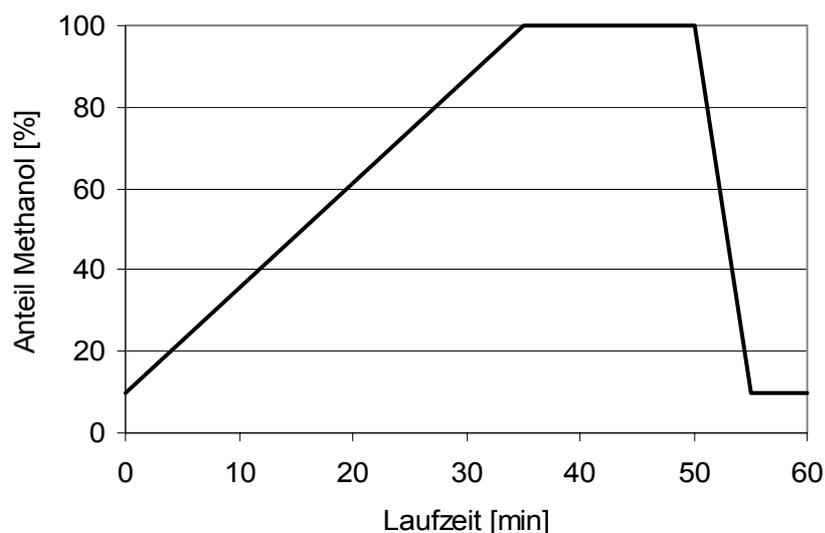


Abb. 2-1: Verlauf des Gradienten der analytischen HPLC – UV – Analyse  
(Eluenten: 0,15%ige Phosphorsäure und Methanol; Fluss: 0,4 ml min<sup>-1</sup>)

Während der Auftrennung der HPLC – Proben in der Säule wurde deren Zusammensetzung online in einem Photodioden – Array – Detektor analysiert. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte standardmäßig bei den UV – Wellenlängen 235, 254, 280 und 340 nm. Anhand der Retentionszeiten der Extraktkomponenten auf der Säule und anhand ihrer UV - Spektren (siehe Anhang) wurden diese, durch Vergleich mit zuvor isolierten Standards, identifiziert. In vielen Fällen erfolgte zudem eine Kontrolle der Identifikation mittels HPLC – MS (Abschnitt 2.2.2.).

### 2.2.2. Verifikation der Metaboliten – Identifikation mittels HPLC - MS

Mit einem Finnigan LCG – Massenspektrometer wurden ESI – MS – Analysen durchgeführt. Die Auftrennung der analysierten Extrakte erfolgte in einem HPLC – System von Agilent (1100 Series) über eine RP-18 Säule von Knauer. Als mobile Phase wurde ein Gradient (Abb. 2-2) aus Acetonitril und 0,1% Ameisensäure verwendet. Die Flussrate betrug  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ .

Die Datenaufnahme und die Steuerung des Systems erfolgte mit der Software „Excalibur“. Die MS – Spektren wurden sowohl im positiven (M+1) als auch im negativen (M-1) Mode aufgezeichnet. Parallel zu den MS – Spektren wurde auch ein UV – Chromatogramm aufgenommen.

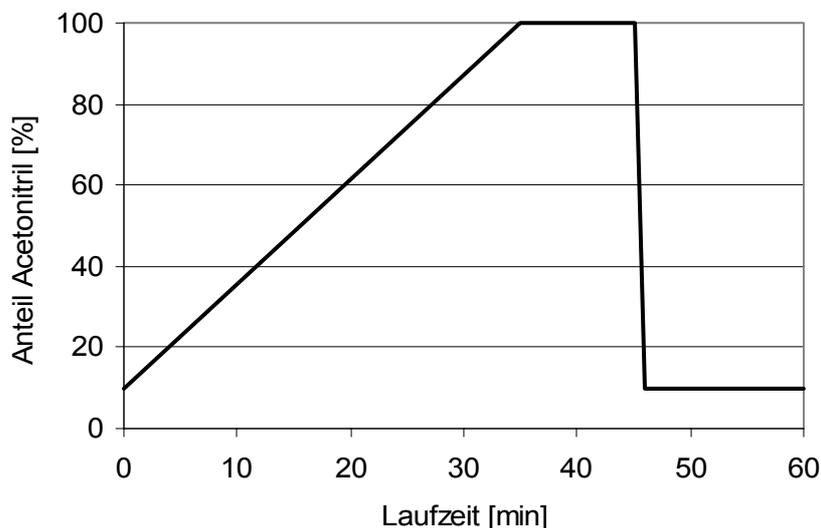


Abb. 2-2: Verlauf des Gradienten der analytischen HPLC – MS – Analyse (Eluenten: 0,15%ige Ameisensäure und Acetonitril); Fluss:  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$

Anhand des Peakmusters im UV – Chromatogramm konnten die Signale den Peaks in den UV – Chromatogrammen, die mit dem Dionex – HPLC – System (Abschnitt 2.2.1.) aufgenommen worden waren, zugeordnet werden. Über einen Retentionszeitvergleich der Signale erfolgte dann eine Zuordnung zu den jeweiligen Massenpeaks.

### 2.2.3. Ermittlung der Eichgeraden für die Quantifizierung von *Aplysina* – Metaboliten in Gewebeproben

Zur Erstellung der Eichgerade wurden isolierte Reinsubstanzen aus den Schwämmen *Aplysina aerophoba* und *Aplysina cavernicola* verwendet. Diese wurden jeweils in verschiedenen, definierten Konzentrationen in das HPLC – UV – System injiziert. Die Analyse erfolgte nach der in Abschnitt 2.2.1. beschriebenen Methode. In den erhaltenen Chromatogrammen wurden dann die Flächen unter dem Signal der Reinsubstanz mit Hilfe einer automatische Funktion der HPLC – Software integriert. Die aus den unterschiedlichen Konzentrationen resultierenden Integrale wurden in einem Diagramm gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Durch lineare Regression dieser Daten wurde dann die Gleichung der Eichgeraden bestimmt. Die errechneten Eichgeraden sind im Anhang aufgelistet.

Die Integration der Signale erfolgte stets bei Wellenlängen, bei denen die UV – Spektren der zu quantifizierenden Metabolite Plateaus aufwiesen. Auf diese Weise wird vermieden, dass durch eventuelle systembedingte Ungenauigkeiten bei der Wellenlänge, in der die UV- Absorption gemessen wird, größere Fehler bei der Peak – Integration auftreten. Die Signale der Metabolite Dienon, Aplysinamisin-1 und Aerothionin wurden deshalb in HPLC – Chromatogrammen integriert, die bei einer UV – Wellenlänge von 254 nm aufgenommenen worden waren. Die Peaks von Aeroplysinin-1, Aerophobin-2 und Isofistularin-3 wurden dagegen bei 280 nm vermessen.

### 2.2.4. Quantitative Bestimmung der Metabolitengehalte in den Gewebeproben

Für die Bestimmung des Gehaltes von *Aplysina* – Metaboliten in einer Gewebeprobe wurde ein Aliquot des Extraktes aus einer definierten Menge des Gewebes mittels HPLC analysiert. Die HPLC – Analyse erfolgte dabei nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methode. Anschließend wurde im Chromatogramm das Signal des zu quantifizierenden Metaboliten identifiziert. Die Berechnung des Peakintegrals erfolgte bei der gleichen Wellenlänge, bei der die Eichgerade für den Metaboliten erstellt worden war (siehe Abschnitt 2.2.3.). Aus dem auf diese Weise ermittelten Gehalt des

Metaboliten in der HPLC – Probe wurde dann sein Gehalt im untersuchten Gewebe berechnet.

## **2A. Untersuchungen zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung *Aplysina***

### **2A.1. Sammlung des Schwammmaterials**

#### **2A.1.1. Sammlung der *Aplysina* – Schwämme vor Rovinj, Kroatien**

Im August 2003 wurden im Küstenbereich vor der kroatischen Stadt Rovinj zahlreiche Individuen des Schwammes *A. aerophoba* gesammelt. Mehrere Bootsausfahrten führten entweder in den nahegelegenen Limski – Kanal oder zu der der Stadt vorgelagerten „Banjole – Insel“. Die Schwämme wurden hier schnorchelnd in einer Tiefe bis zu 5 m an sonnenexponierten Standorten gesammelt. Hierbei wurden die Substratbrocken, auf denen die Schwämme gewachsen waren, vorsichtig aus dem Untergrund herausgelöst. Die vollständigen Schwammindividuen wurden dann mitsamt dem Substrat unter Wasser in große Kunststofftüten verpackt und direkt auf das Forschungsboot „Burin“ gehoben. Bis zur Ankunft am Ruder Boscovic Institut, Rovinj wurden sie in großen, seewassergefüllten Kanistern gelagert.

Im Rahmen der gleichen Expedition wurden zusätzlich Vergleichsproben von weiteren *Aplysina* – Individuen an anderen Standorten mit geringerem Lichteinfall genommen:

Ein Schwammindividuum entstammte einer halboffenen, teilweise sonnenbeschiene Grotte der Banjole – Insel (Tiefe: 5 m). Ein weiterer wurde während eines Tauchganges von der Decke einer etwa 10 m tief in den Fels der Banjole – Insel hineinragenden Höhle in ca. 7 m Wassertiefe entnommen.

Zwei weitere *Aplysina* – Schwämme entstammten einer Tiefe von 26,5 m aus dem Freiwasser im Bereich vor der Küste von Rovinj. Die Proben aus dieser Tiefe wurden mit einem Dretsch – Netz genommen. Sofort nachdem das Netz aus dem Wasser gezogen worden war, wurden die Schwämme in Seewasserkannister gegeben.

Alle gesammelten Schwämme wurden anschließend am Ruder Boscovic Institut in ein Seewasserbecken überführt und hier bis zur weiteren Bearbeitung (in der Regel innerhalb der nächsten zwei Tage) gelagert. Die Schwämme befanden sich in dem Becken ständig in einem Strom von frischem Seewasser. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente und für die t<sub>0</sub> – Proben (Kontrollen) wurden ausschließlich Schwämme verwendet, die anhand ihrer Pumpaktivität (zu erkennen am Wasserausstrom aus den Osculi) als lebend und intakt identifiziert werden konnten.

### **2A.1.2. Sammlung von Gewebe des Schwammes *Crambe crambe* (THIELE)**

Der leuchtend rote Schwamm *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida, Myxillidae) wurde im flachen Wasser um die Banjole – Insel vor Rovinj gesammelt. Der Schwamm ließ sich nur in kleinen Stücken von dem Substrat, auf dem er gewachsen war, ablösen. Die Gewebestücke wurden unter Wasser in eine verschließbare Kunststofftüte verpackt und in dieser zum Ruder Boscovic Institut in Rovinj transportiert. Ein Teil der Proben wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren, nach Deutschland transportiert und dort gefriergetrocknet. Ein weiterer Teil wurde wie in Abschnitt 2A.5.3. beschrieben direkt vor Ort, in Rovinj, bearbeitet.

### **2A.2. Bearbeitung der t0 - Proben für die Experimente mit *A. aerophoba* und der Proben vom *Aplysina* - Schwämmen, gesammelt an Standorten mit geringerer Lichtintensität**

Zur Ermittlung der einer möglichst naturgetreuen Naturstoff – Zusammensetzung in nahezu unbeschadetem Schwammgewebe wurden von zehn im Flachwasser gesammelten *A. aerophoba* – Schwämmen Proben („t0 – Proben“) entnommen. Hierzu wurden von den Schwämmen mit einem Skalpell etwa 4 cm lange, 2 cm breite und 1 cm dicke Gewebestreifen abgeschnitten. Die Streifen wurden dann in 10 ml Falcon – Röhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden sie bei – 80 °C in einer Gefriertruhe gelagert. In gleicher Weise wurde bei der Beprobung von Gewebe der Schwämme von Standorten mit geringerer Lichtintensität (aus den Höhlen und aus 26,5 m Tiefe stammende *Aplysina* – Schwämme) vorgegangen.

Alle Proben wurden auf Trockeneis gekühlt nach Deutschland transportiert und dort gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Gewebeproben nach der in Abschnitt 2A.9. beschriebenen Methode extrahiert. Daraufhin erfolgte eine HPLC – Analyse und die Quantifizierung der Metabolite im Gewebe, wie im Abschnitt 2.2. beschrieben.

### 2A.3. Behandlung von Gewebestücken des Schwammes *A. aerophoba* mit organischen Lösungsmitteln

Mit einem Korkbohrer (12 mm Durchmesser) wurden aus den Schloten von *A. aerophoba* – Schwämmen Bohrkerne ausgestanzt. Diese wurden in Stücke à 1,5 cm Länge geschnitten. Jeweils vier dieser Stücke wurden zusammen in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß, welches zuvor mit 30 ml Lösungsmittel befüllt worden war, gegeben. Nach einem definierten Zeitraum wurden die Stücke wieder entnommen. Sie wurden mit einem Papiertuch trocken getupft, in einem 10 ml Falcon Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei – 80°C gelagert.

Diese Vorgehensweise wurde pro Experiment insgesamt fünfmal durchgeführt, wobei die Schwammstücke über die Zeiträume 2, 5, 10, 30 oder 120 min Minuten im Lösungsmittel belassen wurden. Die Gewebestücke aller Proben einer Zeitserie wurden stets von einem *A. aerophoba* – Individuum entnommen.

Das Zeitserien – Experiment wurde insgesamt dreimal wiederholt, wobei die Vorgehensweise beibehalten, jedoch jedes Mal ein anderes Lösungsmittel (Aceton, Ethanol und Methanol) verwendet wurde.

Am Ende des Experimentes wurden die eingefrorenen Schwammstücke in einer – 80 °C Tiefkühltruhe zwischengelagert, bevor sie auf Trockeneis nach Deutschland transportiert wurden. Die Lösungsmittelproben, in denen die Schwammstücke eingelegt worden waren, wurden im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert, bevor sie mit handelsüblichen Kühl - Akkus gekühlt nach Deutschland transportiert wurden.

Am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf wurden die Schwammstücke dann gefriergetrocknet und anschließend gewogen. Die Extraktion erfolgte wie in Abschnitt 2A.9. beschrieben. Die Analyse der Extrakte und die Quantifizierung der darin vorhandenen Metabolite in den Gewebestücken wurde entsprechend der Beschreibung im Abschnitt 2.2. durchgeführt.

Die Lösungsmittelproben wurden mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Daraufhin wurden die auf diese Weise erhaltenen trockenen Extrakte in 5 ml HPLC – Methanol angelöst. Die Extraktkonzentrationen wurden durch Tüpfeln auf eine Kieselgelplatte und anschließender Kontrolle unter UV – Licht abgeschätzt und bei Bedarf mit definierten Volumina an HPLC – Methanol verdünnt. Diese

Extrakte wurden dann, wie im Abschnitt 2.2.1. beschrieben mittels HPLC analysiert. Anschließend wurden die Gehalte der in den Extrakten vorhandenen bromierten Alkaloide in den Proben quantifiziert (siehe Abschnitt 2.2.4.).

Für das Experiment waren Schwammstücke gleicher Volumina verwendet worden. Beim Wiegen der gefriergetrockneten Gewebestücke zeigten sich jedoch trotzdem deutliche Unterschiede im Trockengewicht. Der quantifizierte Alkaloidgehalt in den Schwammstücken wurde deshalb einheitlich auf 1 g ihres Trockengewichtes bezogen. Ebenso wurde mit den Lösungsmittelproben verfahren: Der Alkaloid – Gehalt in diesen Proben wurde pro Gramm der in den Lösungsmittelproben extrahierten Schwammstücke berechnet. Auf diese Weise wurde für die Alkaloid – Quantifizierung in den Lösungsmittelproben und den Schwammstücken eine einheitliche Basis geschaffen und die beiden Werte konnten addiert werden. Anhand der Summen dieser beiden Werte wurden dann die Alkaloidzusammensetzungen der verschiedenen Proben des Experimentes quantitativ miteinander verglichen.

#### 2A.4. Untersuchung zum Einfluss von Gewebszersetzung auf das Alkaloidmuster in *A. aerophoba*

Vier *A. aerophoba* – Individuen wurden verpackt in seewassergefüllten Kunststofftüten und gekühlt mit handelsüblichen Kühl - Akkus von Kroatien nach Deutschland transportiert. Hier wurden sie am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf in ein Aquarium eingesetzt. Während der ersten beiden Wochen im Aquarium zeigten die Schwämme noch Pumpaktivität und hatten ihre natürliche Färbung. Im Laufe der nächsten Wochen wiesen sie aber zunehmend Anzeichen von Gewebsverfall auf. Nach sechs Wochen war ihr Gewebe größtenteils schwarz. Von allen vier Schwämmen wurden mit einem Skalpell sowohl von gelben als auch von schwarzen Gewebebereichen Proben entnommen und sofort bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend nach der unter 2A.9. beschriebenen Methode extrahiert. Ihr Inhaltsstoffmuster wurde wie im Abschnitt 2.2. beschrieben analysiert und quantifiziert.

## 2A.5. Experimente zum Einfluss mechanischer Beschädigung auf die Alkaloide von *A. aerophoba*

### 2A.5.1. Mechanische Schädigung des Gewebes von *A. aerophoba* unterschiedlicher Intensität

Fünf etwa 4 cm lange, 2 cm breite und 1 cm dicke Gewebestücke wurden von den Schloten eines Schwammindividuums abgeschnitten und in unterschiedlicher, im Folgenden beschriebener Weise, bearbeitet:

Eine Kontrollprobe wurde direkt nach dem Abtrennen vom Schwamm in ein 5 ml Cryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die zweite Probe wurde in einen mit Seewasser gefüllten Mörser gegeben und über 15 sec mit einem Skalpell angeschnitten. Anschließend wurde die Probe weitere 4 min 45 sec in dem Mörser belassen, bevor sie in einem Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde.

Eine dritte Probe wurde in einen Mörser gegeben und im Verlauf von 15 sec gemörsert. Nach 4 min 45 sec Wartezeit wurde sie dann schockgefroren.

Das vierte Gewebestück wurde in gleicher Weise behandelt. Allerdings wurde hier über 5 min gemörsert bevor das Gewebe eingefroren wurde.

Bei der fünften Probe wurden dem Gewebe zusätzlich 1,5 ml Ethanol zugesetzt, bevor es über 5 min gemörsert und anschließend eingefroren wurde.

Das gesamte Experiment wurde in vier Parallelansätzen mit Gewebe von vier verschiedenen *A. aerophoba* – Individuen durchgeführt. Zusätzlich wurde von den Schwämmen noch je eine Probe entnommen, die vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff ohne weitere Beschädigung über 5 min im Wasser gelagert wurde. Weitere zwei Proben wurden vor dem Schockgefrieren über 5 min an der Luft gelagert.

Sämtliche Proben des Experimentes wurden anschließend entweder in einer - 80 °C – Gefriertruhe oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Transport der Proben nach Deutschland fand teilweise auf Trockeneis, teilweise in flüssigem Stickstoff statt. Hier wurden die Schwammstücke dann gefriergetrocknet und nach der unter 2A.9. beschriebenen Methodik extrahiert. Die HPLC – Analyse und die Quantifizierung der Metabolite in den Gewebestücken erfolgte nach den im Abschnitt 2.2. beschriebenen Methoden.

### **2A.5.2. Experiment zum Zeitverlauf der Veränderungen im Alkaloidmuster von *A. aerophoba***

Gewebestücke in einer Größe von etwa 4 cm Länge, 2 cm Breite und 1 cm Dicke wurden von einem *A. aerophoba* – Schwamm mit einem Skalpell abgeschnitten. Die Stücke wurden über einen Zeitraum von 20 sec gemörsert. Anschließend wurde in einer Zeitserie je eines dieser Gewebestücke über eine Dauer von 5, 30, 60, 90, 120 oder 150 sec im Mörser belassen, bevor es zur Schockgefrierung in ein mit flüssigem Stickstoff befülltes, auf halber Höhe abgeschnittenes 50 ml Falcon - Röhrchen gegeben wurde. Diese Technik ermöglichte ein sehr zeitgenaues Einfrieren der Proben, da das gesamte gemörserte Schwammmaterial gleichzeitig direkt in den flüssigen Stickstoff geworfen werden konnte. Da sich hierbei jedoch wieder größere Klumpen aus dem gemörserten Material bildeten, mussten diese in gefrorenem Zustand in einem stickstoffgekühlten Mörser nochmals zerkleinert werden. Dann wurden sie in ein 5 ml Cryoröhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Experiment wurde mit Gewebe von fünf *A. aerophoba* - Schwämmen durchgeführt.  $t_0$  – Proben (ungemörsertes Schwammgewebe) und Proben für die Auswertung 150 sec nach dem Mörsern wurden dabei von allen fünf Individuen genommen. Die Messung nach 5 sec wurde nur mit Gewebe zweier Schwämme durchgeführt. Die Probenahmen für die Messzeitpunkte von 30 bis 120 sec fanden an vier der fünf Schwämme statt.

Die Proben wurden anschließend in einer  $-80\text{ °C}$  – Gefriertruhe gelagert. Der Transport nach Deutschland fand auf Trockeneis statt. Hier wurde das Schwammgewebe dann gefriergetrocknet und nach der unter 2A.9. beschriebenen Methodik extrahiert. Die HPLC – Analyse und die Quantifizierung der *Aplysina* – Metabolite in den Gewebeproben erfolgte nach den in den Abschnitten 2.2.1. – 2.2.4. beschriebenen Methoden.

### **2A.5.3. Kontrollexperiment mit Gewebe des Schwammes *Crambe crambe***

Für jede Probe des Kontrollexperimentes mit *C. crambe* wurden Stücke des Schwammes verwendet, die zusammen ein Volumen von ca. 4 cm x 2 cm x 1 cm ergaben. Damit entsprach das Gewebsvolumen einer Probe des Kontrollexperimentes dem Volumen eines Gewebsstückes von *A. aerophoba*, das für die in Abschnitt 2A.5.1. beschriebenen Versuche verwendet worden war. Eine solche Probe des *C. crambe* – Gewebes wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und diente der Untersuchung des unveränderten Naturstoffmusters in diesem Schwamm. Weiteren drei *C. crambe* - Proben entsprechenden Volumens wurden jeweils einer der *A. aerophoba* – Metabolite Aeroplysinin-1 (zugesezte Menge: 15 µmol), Aerophobin-2 (10 µmol) und Isofistularin-3 (10 µmol) zugesezt. Anschließend wurden diese Probengemische, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2A.5.1., jeweils über einen Zeitraum von 5 min ohne Übersichtung mit Wasser gemörsert. Nach dieser Behandlung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis nach Deutschland transportiert. Hier wurden sie gefriergetrocknet, nach der unter Abschnitt 2A.9. beschriebenen Methode extrahiert und anschließend, wie in Abschnitt 2.2.1. beschrieben, mittels HPLC analysiert.

### 2A.6. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters in gefriergetrocknetem Gewebe verschiedener *Aplysina* – Arten nach Zugabe von Seewasser

#### **2A.6.1. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe der Schwämme *A. aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. fistularis* und *A. archeri***

Von den karibischen Schwämmen *Aplysina fistularis* und *A. archeri* stand gefriergetrocknetes Material zur Verfügung. Mehrere Individuen dieser beiden Arten waren von Arno Kunze im August 1995 im Atlantik im Bereich um die Bahamas gesammelt und in gefrorenem Zustand nach Deutschland gebracht worden. Darüber hinaus war Material des mediterranen Schwammes *A. cavernicola* (ebenfalls im gefriergetrockneten Zustand) vorhanden, das im Zusammenhang mit dem

Verpflanzungsexperiment (Kapitel C) im Mittelmeer bei Elba, Italien gesammelt worden war. Von *A. aerophoba* wurde gefriergetrocknetes Gewebe der t<sub>0</sub> – Proben der in den vorigen Abschnitten beschriebenen Experimente verwendet.

Je 100 mg des gefriergetrockneten, gemörserten und homogenisierten Gewebes von je drei Individuen der vier *Aplysina* – Arten (insgesamt zwölf Proben) wurden in 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Anschließend wurden alle Proben mit je 400 µl Seewasser (8:2 verdünnt mit vollentsalztem Wasser) versetzt. Die Suspensionen wurden mit einem Spatel kräftig verrührt und danach für eine Stunde stehen gelassen. Weitere 200 µl des verdünnten Seewassers wurden hinzugefügt, das Gemenge wiederum kräftig gerührt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben mit weiteren 200 µl Seewasser weiter verdünnt, gerührt und dann in einer Gefriertruhe bei -80°C eingefroren. Nach Gefriertrocknung wurde dem Schwammgewebe 1,5 ml Methanol zugegeben. Die Extraktion erfolgte einheitlich durch eine fünfminütige Behandlung im Ultraschallbad und zehneckündiges Schütteln mit einem Vortex - Schüttler bei 2500 Umdrehungen min<sup>-1</sup>. Anschließend wurden die Proben über 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 200 µl des Überstandes wurde entnommen. Dieser wurde mit 600 µl MeOH verdünnt und nach der unter Abschnitt 2.2.1. beschriebenen Methode mittels HPLC – UV analysiert. Anhand der HPLC – Daten wurden dann, wie unter 2.2.4. erläutert, die Metabolitengehalte im Schwammgewebe quantifiziert. Nicht für alle der in den verschiedenen *Aplysina* – Arten auftretenden Isoxazolinalkaloiden standen Eichgeraden zur Verfügung. Anhand der UV – Spektren und der Retentionszeiten konnten die dominanten Peaks in den HPLC – Chromatogrammen aber in die drei Klassen „Aerophobin-2 – ähnlich“, „Aerotionin – ähnlich“ und „Isostularin-3 – ähnlich“ eingeteilt werden. Entsprechend wurden diese Metabolite mit Hilfe der für Aerophobin-2, Aerotionin und Isostularin-3 erstellten Eichgeraden quantifiziert.

Von den je drei Individuen aller vier *Aplysina* – Arten wurde darüber hinaus jeweils Vergleichsproben ohne Zugabe von verdünntem Seewasser hergestellt. Hierzu wurde gefriergetrocknetes und gemörsertes Material nach der gleichen Methode wie oben beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert.

### **2A.6.2. Zeitverlauf der Alkaloidmusteränderung in *A. cavernicola***

Bei den unter 2A.6.1. beschriebenen Experimenten war das gefriergetrocknete und gemörserte Gewebe aller analysierten *Aplysina* – Schwämme über Nacht in verdünntem Seewasser inkubiert worden. Um einen Verlauf der dadurch induzierten Veränderungen im Alkaloidmuster beobachten zu können, wurde am Beispiel des Gewebes von *A. cavernicola* das Experiment mit sechs in gleicher Weise behandelten Ansätzen wiederholt. Für dieses Experiment wurde Unterproben einer gemörserten und homogenisierten Gewebeprobe eines *A. cavernicola* – Individuums verwendet. Der Ausgangszustand des Alkaloidmusters vor Behandlung mit Seewasser war damit in allen Proben des Experimentes identisch.

Die Ansätze wurden in einer Zeitserie nach 15 min, 1h, 2h, 4h, 8h und 20h bei –80 °C eingefroren. Alle Proben wurden anschließend gefriergetrocknet und nach der in Abschnitt 2A.6.1. beschriebenen Methode extrahiert und analysiert.

### **2A.6.3. Untersuchung zur Hitzestabilität der Isoxazolinalkaloide von *A. cavernicola***

Jeweils 20 mg des Methanolextraktes aus gefriergetrocknetem *A. cavernicola* – Gewebe wurden in zwei 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Eines der beiden Gefäße wurde zusätzlich mit 1 ml vollentsalztem Wasser befüllt. Dieses wurde in einem Heizblock auf 110° erhitzt und bei dieser Temperatur über 8 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Probe bei –80 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Beide Proben wurden in jeweils 1,5 ml HPLC – Methanol im Ultraschallbad angelöst und anschließend über 5 min bei 13000rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden jeweils 100 µl dieser Lösung entnommen, mit weiteren 700 µl HPLC – Methanol verdünnt und in der HPLC wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben analysiert.

#### **2A.6.4. Hemmung der Alkaloidmusteränderung in Gewebe von *A. cavernicola* durch Zugabe von Trichloressigsäure**

Jeweils 100 mg des gefriergetrockneten, gemörserten und homogenisierten Gewebes von *A. cavernicola* wurde in drei 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Eine dieser beiden Proben wurde mit 700 µl verdünntem Seewasser versetzt. Zu den beiden anderen Probe wurden je 700 µl Trichloressigsäurelösung (hergestellt mit verdünntem Seewasser; Gewichtsanteil der Trichloressigsäure: 10%) hinzugefügt. Alle drei Proben wurden über 8 Stunden inkubiert, bevor sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend erneut gefriergetrocknet wurden. Die gefriergetrockneten Proben wurden dann mit 1,5 ml HPLC – Methanol entsprechend der Beschreibung unter 2A.6.1. extrahiert. Die Extrakte wurden, wie in Abschnitt 2.2.1. beschrieben, mittels HPLC analysiert.

#### **2A.6.5. Hemmung der Alkaloidmusteränderung durch kurzzeitiges Aufkochen gefriergetrockneten Gewebes von *A. cavernicola***

Für dieses Experiment wurden Unterproben der selben, gefriergetrockneten und homogenisierten Probe von *A. cavernicola* verwendet, die auch in dem 2A.6.2. beschriebenen Experiment zum Einsatz gekommen war. In zwei 15 ml Falcon – Röhrchen wurden je 2 ml verdünntes Seewasser durch fünfminütiges Eintauchen in kochendes Wasser erhitzt. Dann wurde jeweils 200 mg gefriergetrocknetes Schwammgewebe zum Wasser hinzugegeben. Die Suspensionen wurde für weitere 7 min im kochenden Wasser belassen. Anschließend wurden die aufgekochten Gemisch über Nacht stehen gelassen.

Eine weitere Probe wurde zur Kontrolle entsprechend hergestellt, jedoch wurde das Wasser, zu dem das Schwammgewebe gegeben wurde nicht erhitzt.

Beide Proben wurden gefriergetrocknet, mit 3 ml HPLC – Methanol nach der unter 2A.6.1. beschriebenen Methode extrahiert und wie in 2.2.1. beschrieben mittels HPLC analysiert. Die Qualifizierung der Alkaloide im Gewebe erfolgte wie in 2.2.4.

### **2A.6.6. Hemmung der Alkaloidmusteränderung durch langes Kochen gefriergetrockneten Gewebes von *A. cavernicola***

Auch für dieses Experiment wurden Unterproben der selben gefriergetrockneten und homogenisierten Gewebeprobe von *A. cavernicola* verwendet. Vier Proben zu je 100 mg des gemörserten Schwammmaterials wurden eingewogen. Dann wurden drei 2 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 700 µl Seewasser (8:2 verdünnt mit vollentsalztem Wasser) befüllt, verschlossen und in einem Heizblock auf 110 °C erhitzt. Nach ausreichender Vorwärmzeit wurden drei der vier pulverisierten Gewebeproben in das kochende Seewasser in den Reaktionsgefäßen gegeben. Direkt im Anschluß daran wurde das Reaktionsgefäß wieder verschlossen, in den Heizblock gestellt und dort weiterhin bei 110 °C gekocht.

Die vierte Gewebeprobe wurde ebenfalls in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, hierin jedoch mit 700 µl Seewasser bei Raumtemperatur vermischt. Anschließend wurden alle angesetzten Proben über 8 Stunden unter den jeweiligen Bedingungen inkubiert. Dann wurden sie bei – 80 °C eingefroren. Nach Gefrier Trocknung wurden die Proben mit 1,5 ml HPLC – Methanol, entsprechend der in Abschnitt 2A.6.1. beschriebenen Methode, extrahiert und wie in 2.2.1. erläutert, mittels HPLC analysiert.

## 2A.7. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters im Mantelgewebe von *Tyrodina perversa*

Das für diesen Versuch verwendete Schneckenmaterial entstammte dem in Kapitel B beschriebenen Versuch und war bei Banylus-sur-mer in Südfrankreich gesammelt worden. Es handelte sich hierbei um das gefriergetrocknete Mantelgewebe einer frisch aus dem Mittelmeer beprobten *T. perversa* – Schnecke. Die Vorgehensweise entsprach der in Abschnitt 2A.6. für Schwammgewebe beschriebenen Methode: 100 mg gefriergetrocknetes Mantelgewebe der Schnecke *Tyrodina perversa* wurden gemörsert, mit verdünntem Seewasser versetzt, nochmals gefriergetrocknet und anschließend mit Methanol, in gleicher Weise wie in Abschnitt 2A.6. beschrieben, extrahiert. Der auf diese Weise erhaltene Extrakt wurde mittels HPLC nach der Methode in Abschnitt 2.2.1. analysiert. Das Chromatogramm des Extraktes wurde auf Veränderungen, vor allem hinsichtlich der Biotransformation der darin befindlichen Isoxazolinalkaloide in Dienon und Aeroplysinin-1, hin untersucht.

## 2A.8. Experimente zur Umsetzung zugesetzter *A. aerophoba* – Metabolite im Gewebe von *A. archeri* und *C. crambe*

### 2A.8.1. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von *Aplysina archeri*

In vier 2 ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 100 mg gefriergetrocknetes und gemörsertes Gewebe von *A. archeri* eingewogen. Zu zwei dieser Proben wurden je 15 µmol aus *A. aerophoba* isoliertes Aeroplysinin-1 hinzugegeben. Den beiden anderen wurden je 10 µmol des Isoxazolinalkaloides Aerophobin-2 zugesetzt, das ebenfalls aus *A. aerophoba* extrahiert worden war. Jeweils eine der mit Aeroplysinin-1 und eine der mit Aerophobin-2 versetzten Proben wurde dann, entsprechend der unter Abschnitt 2A.6. beschriebenen Vorgehensweise, mit verdünntem Seewasser verrührt. Die mit Seewasser vermischten Proben wurden dann ein weiteres Mal gefriergetrocknet. Anschließend erfolgte die Extraktion aller vier Proben wie in Abschnitt 2A.6. und die HPLC – Analyse wie in Abschnitt 2.2.1. beschrieben.

### **2A.8.2. Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von *Crambe crambe***

Die Vorgehensweise bei diesen Experimenten entsprach der in Abschnitt 2A.8.1. beschriebenen Methode. Statt des Gewebes von *A. archeri* wurde hier allerdings gefriergetrocknetes Material des Schwammes *Crambe crambe* verwendet.

Neben den *A. aerophoba* – Metaboliten Aeroplysinin-1 und Aerophobin-2 wurde weiteren Proben des *C. crambe* – Gewebes zusätzlich Isofistularin-3 zugesetzt. Auf diese Weise entstanden insgesamt sechs Proben, die wie in Abschnitt 2A.8.1. beschrieben extrahiert und analysiert wurden.

### **2A.9. Extraktion des gefriergetrockneten Schwammmaterials**

Zur Extraktion wurden 100 mg des gefriergetrockneten und gemörserten Schwammgewebes in einem 100 ml Erlenmeyer – Kolben eingewogen. Das pulverisierte Gewebe wurde unter Rühren über Nacht in 50 ml Methanol extrahiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml des auf diese Weise entstandenen Extraktes abpipettiert und in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Das Methanol wurde nun durch Vakuumzentrifugation in einem SpeedVac – Gerät verdampft. Anschließend wurden zum getrockneten Extrakt 450 µl HPLC – Methanol hinzugegeben und er wurde in einem Ultraschallbad angelöst. Unlösliche Bestandteile wurden bei 13000 rpm über 10 min abzentrifugiert. Eine definierte Menge des Überstandes wurde dann für die folgende HPLC – Analyse (Abschnitte 2.2.1. – 2.2.4.) in ein HPLC – Gläschen überführt.

## **2B. *Aplysina* – Alkaloide in der Meeresschnecke *Tylodina perversa* GMELIN**

### 2B.1. Sammlung der Schnecke *Tylodina perversa* und der Schwammproben

*Tylodina perversa* (Opisthobranchia, Notaspidea, Tylodinidae) und *Aplysina aerophoba* wurden im April 2002 vor der Küste von Banylus-sur-mer in Südfrankreich gesammelt. Die Schwämme wurden während mehrerer Tauchgänge in einer Tiefe von 5 bis 10 Metern vom Substrat abgeschnitten und unter Wasser luftdicht in Kunststoffbeutel verpackt. Häufig befanden sich einige Schnecken bereits auf den beprobten Schwämmen. Während der Tauchgänge wurden zusätzlich Schnecken von weiteren *A. aerophoba* – Individuen abgesammelt und mit in die Kunststoffüten gegeben. Nach Ankunft am Laboratoire Arago wurden die Schnecken und Schwämme sofort in einem mit frischem Seewasser durchströmten Becken untergebracht.

Drei Individuen des Schwammes *Aplysina cavernicola* wurden von Prof. Jean Vacelet (Centre d'Océanologie de Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Schwämme entstammten einer Höhle in ca. 10 m Meerestiefe in einer der Küste Marseilles vorgelagerten Insel. Sie wurden in einem Seewasserkarister, gekühlt mit handelsüblichen Kühl - Akkus, zum Laboratoire Arago in Banylus-sur-mer transportiert. Hier wurden sie getrennt von den Schnecken und *A. aerophoba*, in einem separaten Becken aufbewahrt.

Zwei verschiedene Arten der Schwammgattung *Axinella* (*A. damicornis* und *A. polypoides*) wurden vor der Küste von Banylus-sur-mer bei Tauchgängen auf einer Tiefe von ca. 15 m gesammelt. Sie wurden ebenfalls bis zur weiteren Bearbeitung in einem separaten, seewasserdurchströmten Becken untergebracht.

## 2B.2. Wahlfraßversuch

Die Wahlfraßversuche mit *T. perversa* wurden in fünf kleinen Aquarien durchgeführt (Größe: 20 x 20 x 10 cm). In jedes Becken strömte kontinuierlich Seewasser ein, das in einem dünnen Strahl von oben auf die Wasseroberfläche auftraf. Auf diese Weise wurden die Schnecken mit frischem Seewasser versorgt, wobei gleichzeitig vermieden wurde, dass Wasserströmungen ihr Verhalten während der Versuche beeinflussten. Die Außenflächen der Becken wurden mit schwarzer Folie abgedeckt, um zusätzlich externe Einflüsse zu verhindern.

Die Becken wurden jeweils mit drei ungefähr 10 cm großen Schwämmen bestückt. Hierbei handelte es sich um die beiden *Aplysina* – Arten *A. aerophoba* und *A.*



Abb. 2B-1: Wahlversuch mit *T. perversa*. Das Foto zeigt zwei parallele Versuchsansätze. Den Schnecken wurde jeweils ein *Axinella* – Schwamm (orange) und die zwei *Aplysina* – Arten *A. aerophoba* (dunkel) und *A. cavernicola* (hell) angeboten.

*cavernicola* und um einen Schwamm der Gattung *Axinella* (entweder *A. damicornis* oder *A. polypoides*). Sie wurden an der Rückwand der Becken in einer Reihe aufgestellt (siehe Abb. 2B-1). In jedes der fünf Becken wurde je eine Schnecke gesetzt. Der Startpunkt der Experimente wurde in gleichem Abstand zu allen drei Schwämmen, in etwa 15 cm Entfernung, gewählt. Die Bewegungen der Schnecken wurden ab diesem Zeitpunkt beobachtet, und sobald eine Schnecke vollständig auf

einen der drei Versuchsschwämme gekrochen war, wurde das Experiment beendet und ausgewertet. Für Wiederholungen wurden die Schnecken an die Ausgangsposition zurück gesetzt und die Aufstellungsreihenfolge der Schwämme nach dem Zufallsprinzip verändert.

### 2B.3. Langzeitfraßversuch mit den Schwämmen *A. aerophoba* und *A. cavernicola*

Drei *T. perversa* – Individuen wurden, kurz nachdem sie im Meer von *A. aerophoba* abgesammelt worden waren, nach der in Abschnitt 2B.4. beschriebenen Methode präpariert. Die Organe wurden separat in 2 ml Cryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gleicher Weise wurde mit Proben von Schneckenlaich verfahren, der auf den *A. aerophoba* – Schwämmen gefunden worden war.

Alle weiteren Schnecken wurden im Verlauf der darauffolgenden zwei Wochen in einem Seewasserbecken zusammen mit mehreren Exemplaren ihres Nahrungsschwammes *A. aerophoba* gehalten. Anschließend wurden sie zusammen mit den Schwämmen in seewasserbefüllte Kunststoffbeutel gesetzt. Die Beutel wurden im PKW in einer mit handelsüblichen Kühl - Akkus gekühlten Styroporkiste nach Deutschland transportiert. Hier wurden die Schnecken auf zwei Seewasseraquarien aufgeteilt. Acht Individuen wurden im Laufe der folgenden drei Wochen in einem 180 x 60 x 30 cm großen Aquarium weiterhin zusammen mit mehreren *A. aerophoba* – Schwämmen gehalten. Weitere drei Individuen wurden zusammen mit drei Exemplaren von *A. cavernicola* in ein 120 x 40 x 60 cm großes Becken gesetzt. Hier fraßen sie im Verlauf der darauffolgenden zwei Wochen von diesen Schwämmen.

Die Experimente wurden jeweils beendet, als die Schwämme deutliche Anzeichen von Gewebszersetzung aufwiesen. Bis auf zwei der acht Schnecken aus dem Aquarium mit *A. aerophoba* wurden alle Tiere nach der in Abschnitt 2B.4. beschriebenen Methode sezirt. Die zwei übrig gebliebenen Schnecken wurden über 14 weitere Tage ohne Nahrung gehalten, bevor sie sezirt wurden. Die Organe der Schnecken wurden schnellstmöglich nach der Sektion in 2 ml Cryoröhrchen gegeben und kurzfristig auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sie bei -80 °C eingefroren.

Während der Experimente hatten die Schnecken in den Aquarien immer wieder Laich produziert. Der von den Schnecken an den Schwämmen und am Aquarienglas befestigte Laich wurde regelmäßig entfernt und in einen separaten seewassergefüllten Kanister gegeben. Die letzten Laichproben, die im Verlauf der Experimente produziert worden waren, wurden für die HPLC – Analyse bei -80°C eingefroren.

Auch das übrig gebliebene Schwammmaterial wurde nach Beendigung der Experimente für eine spätere HPLC – Analyse des Inhaltsstoffmusters bei -80 °C eingefroren. Zusätzlich waren von *A. aerophoba* im Verlauf des Experiments einmal drei und einmal vier Wochen nach Versuchsbeginn Proben genommen worden.

#### 2B.4. Präparation der Schnecken

Die Schnecken wurden zur Präparation der Organe jeweils in ein mit Seewasser befülltes Glasschälchen gegeben. Durch einen tiefen Schnitt im Kopfbereich quer zur Längsachse wurden sie getötet. Ein flach angesetzter Längsschnitt an der Bauchseite der Schnecken legte die inneren Organe frei. Die Mitteldarmdrüse, der Verdauungstrakt und die Gonaden wurden einzeln herauspräpariert und in separaten Glasschälchen kurz mit sterilem Seewasser abgespült. Anschließend wurde mit einem Skalpell das gelbe Mantelgewebe aus der Schneckenschale herausgeschält und ebenfalls mit sterilem Seewasser gewaschen.

#### 2B.5. Extraktion und HPLC – Analyse der Schnecken – und Schwammgewebe

Zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe im Gewebe wurden die Schneckenorgane, der Laich und die Schwammproben getrennt gefriergetrocknet und anschließend zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gemörserte Gewebe wurde dann in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und, jeweils im gleichen Verhältnis zum eingewogenen Gewicht der Probe, 400 - 1000 µl HPLC – MeOH zugegeben. Jedes Reaktionsgefäß wurde zunächst über 5 Sekunden per Hand aufgeschüttelt. Anschließend wurden die Proben über 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die Konzentration der auf diese

Weise entstandenen Extrakte wurde überprüft, indem mit einer Glaskapillare eine kleine Menge der Probe auf eine DC – Platte gegeben wurde. Die UV – Absorption dieser Probe wurde dann unter einer UV – Lampe bei 254 und bei 340 nm kontrolliert. Daraufhin wurde dem Extrakt ein Aliquot entnommen und, wenn notwendig, mit einem definiertem Volumen an MeOH verdünnt. Sämtliche Verdünnungsschritte wurden notiert und in die späteren Berechnungen zur Quantifizierung mit einbezogen.

Die Identifizierung der Metabolite in den Proben mittels HPLC – Analyse und die Quantifizierung dieser Substanzen in den Geweben lief nach der in den Abschnitten 2.2.1. – 2.2.4. beschriebenen Methodik ab.

## 2B.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Schneckenorganen

Von zwei der drei Schnecken, die gleich nach der Sammlung aus dem Meer seziiert worden waren, wurden neben den HPLC – Proben auch Proben für die elektronenmikroskopische Analyse entnommen. Kleine Stücke des Mantels, der Mitteldarmdrüse, der Darmwand und der Gonaden wurden hierzu mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und anschließend dreimal mit sterilem Seewasser gewaschen. Darüber hinaus wurden Laichproben genommen. Die so erhaltenen Gewebeproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in einer 2,5%igen Lösung aus Glutaraldehyd in sterilem Seewasser bei 4 °C aufbewahrt. Am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg wurden die Gewebestücke nochmals zerteilt, so dass Stücke von wenigen mm<sup>2</sup> Größe entstanden. Diese wurden dreimal über einen Zeitraum von 10 min in 1 x PBS eingeweicht. Anschließend wurden sie über Nacht in 2%igem Osmiumtetroxid fixiert. Nach zwei weiteren Spülungen mit 1 x PBS wurden die Proben in Bädern mit steigendem Ethanol – Gehalt (30%, 50%, 70%, 100%) schrittweise dehydriert. Die dehydrierten Gewebestücke wurden dann dreimal über je 30 min in 1 x Propylenoxid inkubiert. Im nächsten Schritt wurden sie über Nacht in 1:1 (Vol/Vol) Propylenoxid / Epon 812 über Nacht inkubiert. Dann wurden die Stücke in Epon 812 – Harz eingelegt, das bei einer Temperatur von 60 °C aushärtete. Auf diese Weise eingebettet war es möglich, das Gewebe mit einem

Ultramikrotom zu schneiden. Anschließend folgte die elektronenmikroskopische Analyse.

Hierbei wurden die Gewebeproben bei 2000facher Vergrößerung entlang eines Rasters im elektronenmikroskopischen Bild systematisch nach Bakterien durchsucht. Interessante oder unklare Bereiche wurden bis zu 12500fach vergrößert, um Strukturen, die Ähnlichkeit mit Bakterien zeigten, eindeutig identifizieren zu können.

#### 2B.4. Anzuchtversuche mit Veliger – Larven von *Tylodina perversa*

Im Laufe der Langzeitfütterungsversuche waren aus dem Aquarium, in dem *A. aerophoba* als Nahrungsschwamm gedient hatte, immer wieder Laichproben entnommen worden. Die leuchtend gelben Gelege wurden in einem separaten, mit Seewasser befüllten Kanister aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen unter dem Binokular betrachtet. Zwei Tage nach Beendigung des Langzeitversuches wurden zudem mikroskopische Aufnahmen der Larven angefertigt.

## 2C. Das Verpflanzungsexperiment mit *Aplysina cavernicola*

### 2C.1. Verpflanzung der Schwämme und Probenahme der t0 – Proben vom Originalstandort

Das Verpflanzungsexperiment mit *Aplysina cavernicola* wurde Anfang Mai 2001 an der Südküste der italienischen Insel Elba begonnen. Vorbereitend für die Verpflanzung der Schwämme wurden zunächst sieben Zementfundamente von ca. 25 cm x 25 cm x 10 cm Größe gegossen. An zwei Enden eines stabilen Drahtes, die aus den Zementklötzen heraus ragten, sollten später die verpflanzten Schwämme festgebunden und somit sicher mit dem Untergrund verankert werden. Die Zementfundamente wurden mit einem Boot am Zielort der Verpflanzung (die Spitze der „Punta de Fetovaia“, 42°43'N; 10°17'E) ausgebracht. Dort wurden sie an geeigneten Standorten in unterschiedlichen Tiefen im Meer positioniert und in Felsspalten verkeilt.

Der Ursprungsort der Schwämme befand sich in ca. 40 m Meerestiefe vor dem „Capo di Fonza“ im Süden von Elba (42°43'N; 10°9'E). Hier wuchs eine Gruppe von *A. cavernicola* – Individuen an der Basis eines Felsüberhanges. Die Kolonie hatte einen Durchmesser von ungefähr 2 m und bestand aus etwa 50 unterschiedlich großen Schwämmen. Zunächst wurden Proben für die HPLC – Analyse von einigen Schwämmen mit einem Messer abgeschnitten und in 1l Schraubdeckelgefäße gegeben. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser 4 mm) aus drei Schwamm – Individuen Stücke ausgestanzt und in sterile Kunststoffbeutel verpackt. Zwei kleine Schlote der Schwämme wurden mit einem Skalpell abgetrennt und für die mikrobiologischen Experimente ebenfalls in die Kunststoffbeutel gegeben. Dann wurden sieben kleine Individuen des Schwammes *A. cavernicola* (ca. 10-15 cm im Durchmesser) mitsamt der Substratstücke, auf denen sie wuchsen, mit Hammer und Meißel aus dem felsigen Untergrund herausgeschlagen. Diese wurden dann einzeln in 50 l Kunststofftüten gegeben und so verpackt zur Wasseroberfläche gebracht. Hier wurden die Tüten in Eimern an Bord eines Motorbootes gehoben und anschließend zur Punta di Fetovaia transportiert. Die Proben für die mikrobiologischen Proben wurden direkt an Bord auf Trockeneis tiefgekühlt.

Am Zielort angekommen wurden die sieben Schwammindividuen zunächst auf ein Felsplateau in 8 m Meerestiefe gebracht. Bei dem Substrat, auf dem die Schwämme wuchsen, handelte es sich um brüchiges Corraligène – Gestein. Deshalb wurden die Substratstücke zunächst in Kunstharz eingegossen, um ihnen mehr Bruchfestigkeit zu verleihen. Pro Schwammindividuum wurden dazu 300 ml eines Polyesterharzes in Kunststoffbeuteln durch Injektion mit Einwegspritzen mit je 50 ml Härter versetzt. Nach einer Wartezeit von 3 min wurde dieses Gemisch in eine Aluschale (20 cm x 10 cm x 5 cm) gefüllt. Nach weiteren 3 min wurde das Substratstück mit einem darauf wachsenden Schwammindividuen in die Aluschale gepresst. In einigen Zentimetern Abstand wurde außerdem ein 10 ml Schnappdeckelglas in das Polyesterharz gedrückt. Etwa 20 min nach Zugabe des Härters war der Kunstharz ausgehärtet. Der darin aufgestellte Schwamm hatte auf diese Weise ein stabiles Fundament erhalten.

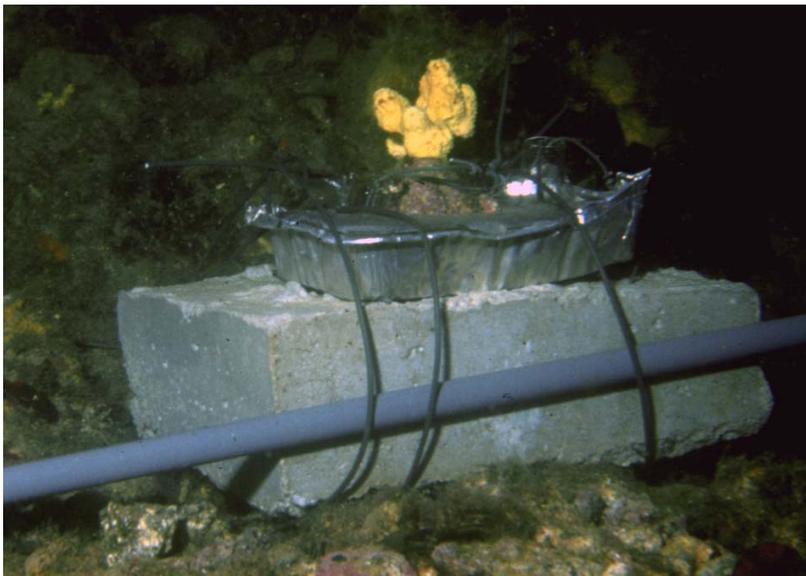


Abb. 2C-1: *A. cavernicola* – Individuum nach Verpflanzung

Die ebenfalls in den Kunstharz eingegossenen Schnappdeckelgläser wurden mit einer Eisenstange durchstoßen. Auf diese Weise entstanden Löcher im Kunstharz, durch die die aus den zuvor ausgebrachten Zementfundamenten ragenden Drahtenden hindurchgefädelt werden konnten. So wurden die verpflanzten Schwämme an den Fundamenten befestigt und an unterschiedlichen Standorten in Tiefen zwischen 7 und 15 m positioniert.

Zwei der sieben verpflanzten *A. cavernicola* - Individuen befanden sich daraufhin in sonnenexponierten Bereichen, auf der Oberfläche einer großen Felsplattform in 7 m Tiefe. Ein dritter Schwamm wurde ebenfalls in eine Tiefe von 7 m verpflanzt. Sein neuer Standort lag jedoch etwas geschützter, im Zwischenraum zwischen zwei mittelgroßen Felsbrocken.

Zwei Individuen wurden in etwa 1 m Abstand voneinander auf 12 m Tiefe an der Basis eines großen Felsens positioniert. Sie standen damit wesentlich sonnen- und strömungsgeschützter als die Schwämme, die an den Zementfundamenten auf 7 m befestigt worden waren.

Die übrigen beiden Individuen wurden in 15 m Tiefe positioniert. Einer der beiden stand daraufhin auf der Oberfläche eines großen Felsens während der andere unter einem Felsüberhang platziert wurde.

## 2C.2. Probenahme der verpflanzten Schwämme

Anfang Juli 2001 fand eine erste Kontrolle der verpflanzten *A. cavernicola* – Schwämme statt. Ende des Monats wurden die Schwämme schließlich zur Untersuchung ihrer Gewebe auf Veränderungen im Naturstoffmuster und in der Zusammensetzung der assoziierten Mikroorganismen – Gemeinschaft eingesammelt. Hierzu wurden die gesamten Individuen vom Substrat abgeschnitten und unter Wasser in sterile Kunststoffbeutel verpackt. Auf diese Weise wurde dafür gesorgt, dass der Transport ins Labor ohne Luftkontakt vonstatten ging. In gleicher Weise wurden von der *A. cavernicola* – Kolonie am Originalstandort vor dem Capo di Fonza nochmals von zwei Schwammindividuen Vergleichsproben genommen.

Sofort nach Rückkehr in das Labor des Hydra – Instituts für Meeresforschung in Fetovaia, Elba wurde in Teil des Schwammmaterials für die anschließende HPLC – Analyse eingefroren. Sowohl die Proben der verpflanzten Schwämme als auch der Schwämme vom Originalstandort wurden hierzu in 50 ml Falcon – Röhren gegeben und entweder auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Der Transport nach Deutschland erfolgte ebenfalls in gefrorenem Zustand.

### 2C.3. HPLC – Analyse der Schwämme

Am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf wurden die Schwammproben zunächst gefriergetrocknet. Das trockene Gewebe wurde dann im Mörser pulverisiert und homogenisiert. Zur Extraktion wurde jeweils 1 g dieser Proben mit je 50 ml Methanol versetzt und über 1 h gerührt. Der Überstand wurde über einen Papierfilter in einen Rundkolben dekantiert. Der Extraktionsvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Anschließend wurden die Extrakte aus den beiden Extraktionsdurchgängen vereinigt und im Rotationsverdampfer getrocknet. Der trockene Extrakt wurde dann in einer Mischung aus 35 ml MeOH und 15 ml NanoPur – Wasser im Ultraschallbad angelöst. 1 ml dieser Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und über 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde dann in ein HPLC – Gläschen transferiert. Die HPLC – Analyse und die Identifikation der Metabolitenpeaks in den erhaltenen Chromatogrammen erfolgte wie in Abschnitt 2.2. beschrieben. Die Alkaloid – Zusammensetzungen in den verschiedenen Proben des Verpflanzungsversuches wurden anhand der Peakmuster in den HPLC – Chromatogrammen verglichen.

### 2C.4. Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Proben des Originalstandortes, die zu Beginn des Verpflanzungsexperimentes im Mai 2001 genommen worden waren, waren direkt vor Ort, im Meer, mit einem Korkbohrer (4 mm Durchmesser) aus den Schwammindividuen ausgestanzt worden. Alle anderen Proben wurden im Labor des Hydra – Instituts für Meereswissenschaften, Fetovaia von den intakten Gesamtschwämmen genommen. Auch diese Proben wurden mit einem sterilen Korkbohrer (4mm Durchmesser) ausgestanzt. Anschließend wurden sämtliche Proben mit einem sterilen Skalpell in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten und dreimal mit sterilem Seewasser gewaschen. Die Konservierung erfolgte in 2,5%iger Glutaraldehyd – Lösung bei einer Temperatur von 4° C.

Am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg wurden die Gewebeproben nochmals zerteilt, so dass Stücke von wenigen  $\text{mm}^3$  Größe entstanden. Diese wurden dreimal über einen Zeitraum von 10 min in 1 x PBS eingeweicht. Anschließend wurden sie über Nacht in 2%igem Osmiumtetroxid fixiert. Nach zwei weiteren Spülungen mit 1 x PBS wurden die Proben in Bädern mit steigendem Ethanol – Gehalt (30%, 50%, 70%, 100%) schrittweise dehydriert. Die dehydrierten Gewebestücke wurden daraufhin dreimal über einen Zeitraum von je 30 min in 1 x Propylenoxid inkubiert. Im nächsten Schritt wurden sie über Nacht in 1:1 (Vol/Vol) Propylenoxid / Epon 812 inkubiert. Dann wurden die Stücke in Epon 812 – Harz eingelegt, das bei einer Temperatur von 60 °C aushärtete. Auf diese Weise eingebettet konnten die Gewebestücke mit einem Ultramikrotom geschnitten und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht werden.

## 2C.5. Extraktion genomischer Bakterien – DNA aus den Schwammproben

Für die 16S rDNA – Extraktion wurden von den verpflanzten Schwämmen und den Schwämmen des Originalstandortes jeweils auf zwei verschiedene Arten Proben genommen: einerseits wurde mit einem sterilen Skalpell Oberflächengewebe der Schwämme abgetragen, zum anderen wurden von den gleichen Schwämmen mit einem sterilen Korkbohrer (Durchmesser 4 mm) Stücke aus dem zentralen Bereich der Schlote ausgestanzt. Alle Proben wurden sofort in Cryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Der Transport nach Deutschland erfolgte ebenfalls unter Kühlung der Proben in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung in einer -80 °C – Tiefkühltruhe aufbewahrt. Sämtliche weiteren Arbeiten zur Charakterisierung der schwammassoziierten Bakteriengemeinschaft in den Proben des Verpflanzungsversuchs wurden am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Zur Extraktion der DNA aus den Schwammproben wurde ein Fertig – Kit der Firma Q – Biogene (Fast DNA SPIN Kit for Soil) verwendet (siehe Abschnitt 2.1.9.1.). Zunächst wurde ein Stück von etwa 2-3 mm Länge aus dem mittleren Bereich der Bohrkern abgeschnitten. In gleicher Weise wurde mit den Proben des

Oberflächengewebes der Schwämme verfahren. Die Gewebestücke wurden in einen mit Stickstoff gekühlten Mörser gegeben, gemörsert und homogenisiert. Der nächste Schritt diente der Lysierung der Zellen in der Probe. Hierzu wurde ein kleiner Teil des gemörserten Schwammmaterials in ein mit 978 µl Natriumphosphat – Puffer und mit 122 µl MT – Puffer befülltes Probenröhrchen („Matrix Tube“) gegeben. Neben dem Puffergemisch enthielt das Probenröhrchen ein Gemisch aus Keramik – und Silizium – Partikeln, die der mechanischen Zerstörung der Zellmembranen der Organismen in der Probe dienten. In einem FastPrep – Instrument wurde die Probe auf diese Weise bei der Geschwindigkeitsstufe 5,5 für 30 sec zermahlen. Die im Puffergemisch unlöslichen Bestandteile wurden anschließend bei 13000 rpm über 30 Sekunden abzentrifugiert.

Sowohl die Schwamm – und Bakterien – DNA als auch die Proteine aus den Zellen waren nun im Überstand des Puffergemisches gelöst. 1 ml dieser Lösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 250 µl PPS (Protein Precipitating Solution) wurden hinzugegeben, um die in der Probe vorhandenen Proteine zu fällen. Zur Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß 10 mal per Hand gewendet. Die ausgefallenen Proteine wurden nun durch 5minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm entfernt.

Eine weitere Aufreinigung der Nukleinsäuren wurde durch Binden der DNA an eine spezielle Matrix erreicht. Hierzu wurde zunächst der nach dem Zentrifugieren erhaltene Überstand in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 ml der DNA – Binding – Matrix Suspension versetzt. Eine Durchmischung der Probe durch zweiminütiges Wenden per Hand folgte. Während einer anschließenden dreiminütigen Wartezeit setzte sich die Matrix am Boden des Reaktionsgefäßes ab. 600 µl des Überstandes wurden abpipettiert und verworfen. Der verbliebene Rest diente der Resuspension des Matrixmaterials. Diese Suspension wurde dann auf einen speziellen SPIN – Filtereinsatz für 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und über 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Auf diese Weise blieb die Matrix (und die daran gebundene DNA) im Filtereinsatz zurück, während sich die Lösung im Reaktionsgefäß ansammelte und verworfen werden konnte. Die Reinigung und Trocknung der Matrix erfolgte durch Zugabe von 500 µl SEWS – M (Salt/Ethanol Wash Solution) und anschließendes zweimaliges Zentrifugieren (1 und 2 min bei 13000 rpm). Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Der SPIN –

Filtereinsatz wurde dann in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und über 5 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Um die DNA aus der Matrix herauszulösen, wurden 100 µl DES – Lösung (DNAse – und Pyrogen – freies Wasser) auf den Filter gegeben und die Matrix mit einer Pipettenspitze darin resuspendiert. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm befand sich so die Gesamt – DNA (zusammengesetzt aus der Schwamm – DNA und der DNA der assoziierten Mikroorganismen) aufgereinigt und in Lösung im Reaktionsgefäß. Diese Lösung wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

## 2C.6. Kontrolle der DNA – Extraktion und des PCR – Erfolgs mittels Gel – Elektrophorese

Mittels Gel – Elektrophorese wurde einerseits der Gehalt an DNA in den Proben nach Extraktion aus dem Schwammgewebe, zum anderen der Amplifikations - Erfolg nach PCR der Proben (siehe Abschnitt 2C.7.) überprüft.

Bei der Gel – Elektrophorese macht man sich zunutze, dass sich die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Gleichspannungsfeld auf die Anode zu bewegen. Trägt man ein Gemisch aus unterschiedlich großen DNA – Fragmenten auf ein Agarose – Gel auf und positioniert dieses in einem elektrischen Feld ausreichender Stärke, so bewegen sich die DNA – Moleküle durch das Gel auf die Anode zu. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe der DNA – Moleküle. Größere Fragmente interagieren stärker mit den Molekülen des Agarose – Gels und werden stärker abgebremst. Kleinere Moleküle wandern entsprechend schneller durch das Gel und befinden sich deshalb innerhalb eines kürzeren Zeitraums in der Nähe der Anode. Auf diese Weise wird eine Auftrennung des Nukleinsäuregemisches erreicht. Lässt man auf dem gleichen Gel zusätzlich zu den Proben einen Standard aus Nukleinsäurefragmenten bekannter Größe laufen, lassen sich die Laufweiten der DNA – Fragmente aus der Probe mit denen der Fragmente im Standard vergleichen. Auf diese Weise können Aussagen über die Größenverteilung der Fragmente in der untersuchten Probe gemacht werden. Im Fall

einer Gel- Elektrophorese nach PCR – Amplifikation lässt sich so überprüfen, ob das Fragment der gewünschten Größe vervielfältigt wurde.

Für die elektrophoretische Auftrennung der aus den Proben des Verpflanzungsversuchs gewonnenen DNA wurden 0,8%ige Agarose – Gele verwendet (siehe Abschnitt 2.1.9.2). Zur Herstellung dieser Gele wurden 1,2 g Agarose – Pulver mit 150 ml TAE – Lösung verrührt. Das Gemisch wurde über 3 min in einem Mikrowellenofen erhitzt und anschließend in eine Form gegossen. Mit Hilfe eines in das Gel gesteckten Kammes wurden 20 Aussparungen für die spätere Zugabe der DNA – Proben freigehalten. Nach Aushärten der Agarose wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TAE – Lösung befüllte Elektrophoresekammer gegeben.

4 µl der DNA-Proben wurden mit je 3 µl „Stopp – Puffer“ und 8 µl sterilem Wasser versetzt. Die DNA – Lösungen wurden dann in die Aussparungen im Agarose – Gel pipettiert. Eine der mittleren Aussparungen wurde mit dem Standard, einem Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Größe, beschickt.

An die Elektrophoresekammer wurde dann eine Spannung von 90 V angelegt. Mit Hilfe des zu den Proben zugegebenen, blau gefärbten Stopp – Puffers wurde daraufhin der Fortschritt der Elektrophorese beobachtet. Die Auftrennung der DNA – Fragmente auf dem Elektrophorese – Gel dauerte etwa 2 h.

Um die farblose DNA in den Gelen und damit das Ergebnis der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Ethidiumbromid entwickelt. Ethidiumbromid ist ein planares Molekül, das sich zwischen die Basen der DNA schiebt und bei Anregung mit UV – Licht fluoresziert. Auf diese Weise werden die Nukleinsäurebanden angefärbt. Die Gele wurden über 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromid – Lösung ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) entwickelt, anschließend mit Wasser abgewaschen und in einem GelDoc – System fotografiert (siehe Abschnitt 2.1.9.3.).

## 2C.7. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Ziel der PCR ist die Vervielfältigung einer ausgewählten DNA – Sequenz um auf diese Weise ausreichend Material für die weitere Bearbeitung (z.B. DGGE, Sequenzierung, etc.) verfügbar zu machen. Die PCR ist eine einfache, schnelle, spezifische und empfindliche Methode, die zum Nachweis von Mikroorganismen in

Umweltproben herangezogen werden kann. Die wesentlichen Vorteile der PCR – Technik sind:

- a) dass auch Organismen nachgewiesen werden können, die in den zu untersuchenden Proben nur in geringer Menge vorliegen (ohne dass eine Zwischenzüchtung notwendig ist) und
- b) dass auch unkultivierbare Organismen direkt nachgewiesen werden können.

Im Zusammenhang mit dem durchgeführten Verpflanzungsversuch hatte die PCR einen weiteren Vorteil: durch Anwendung dieser Methoden auf die Proben, die ein Gemisch aus Schwamm – und Bakterien – DNA darstellten, konnte selektiv die bakterielle DNA amplifiziert werden. Auf diese Weise trat diese gegenüber der eukaryotischen Schwamm – DNA hervor und konnte gezielt weiter bearbeitet werden.

In der PCR werden als Ansatzpunkte für den Prozess der DNA – Vervielfältigung spezifische Oligonukleotid – Paare (Primer) eingesetzt, die zu den 3' bzw. 5' – Enden der zu amplifizierenden Sequenzen (Templates) komplementär sind. Zur Identifizierung von Bakterienstämmen in einer unbekanntem Probe eignet sich die bakterielle 16S rDNA – Sequenz besonders gut, da sie sowohl in allen Bakterien identische (konservierte) als auch bakterienartspezifische (variable) Bereiche enthält. Darüber hinaus findet sich die 16S rDNA in hohen Kopienzahlen von  $10^3$  –  $10^5$  in den Bakterienzellen und es existiert bereits eine Datenbank mit mehr als 20000 Sequenzeinträgen, die zum Vergleich herangezogen werden kann. Deshalb wurden zur Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in den Schwämmen des Verpflanzungsversuches die beiden universellen Primer 341F (forward primer) und 907R (reverse primer) verwendet, deren Verwendung zur Amplifikation von 16S rDNA – Fragmenten führt.

Ein Aspekt, der für den Erfolg einer PCR wesentlich ist, ist die Wahl der richtigen Konzentration der DNA in der Ausgangsprobe. Bei zu geringer Konzentration liegt die DNA so verdünnt vor, dass es innerhalb der Reaktionszeit nicht ausreichend häufig zu einem Zusammentreffen der DNA - Templates mit den Primer – und Enzymmolekülen kommt. Ist die Konzentration zu hoch, führt dies zu einer gegenseitigen sterischen Hemmung der Moleküle und die Vervielfältigung kann ebenfalls nicht mit der nötigen Effizienz ablaufen. Die PCR – Reaktionen wurden deshalb für jede Probe stets in unterschiedlichen Verdünnungen (von 1:50 mit TE – Puffer verdünnt bis unverdünnt) durchgeführt.

Die Vervielfältigung der DNA in der PCR findet üblicherweise in drei Reaktionsschritten statt, die 30 mal wiederholt werden:

- 1) Hitzedenaturierung: hierbei wird der Template – DNA – Doppelstrang durch kontrollierte Wärmebehandlung der Probe in seine Einzelstränge aufgetrennt. Die DNA – Einzelstränge stehen so zur Hybridisierung mit komplementären Sequenzen zur Verfügung.
- 2) Annealing des Primer – Paares: Hierbei werden die beiden Primer, welche die Ausgangspunkte für die Hybridisierungen darstellen, an die DNA – Einzelstränge angeheftet. Diese Anheftung findet mit Hilfe einer hitzestabilen DNA – Polymerase statt. Hierbei handelt es sich meist um die sogenannte Taq – Polymerase, einem Enzym, das aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde (Saiki *et al.* 1988).
- 3) Primer extension: Während dieses Schrittes dienen die Primer als Startpunkte für die DNA – Polymerase (auch diese Reaktion wird durch die Taq – Polymerase bewerkstelligt). Indem enzymatisch die dem PCR – Ansatz zugegeben phosphatierten Nukleotide an die Primer angehängt werden, werden hierbei die komplementäre DNA – Stränge synthetisiert.

Da nach jedem Reaktionsdurchgang mehr Templates zur Verfügung stehen, wird durch die PCR ein exponentieller Anstieg der DNA – Kopien erreicht.

Die detaillierten PCR – Bedingungen sind in Abschnitt 2.1.9.4 beschrieben. Nach der PCR wurden die Probe zunächst auf 10 °C heruntergekühlt und anschließend bei 4 °C gelagert.

Um den Erfolg der DNA – Vervielfältigung zu überprüfen, fand nach jeder PCR eine Kontrolle aller Proben mittels Gelelektrophorese statt (siehe Abschnitt 2C.6.). Bei jedem PCR – Lauf wurde eine Positiv – und eine Negativkontrolle durchgeführt, die ebenfalls die Vervielfältigungsschritte in der PCR durchliefen und anschließend zusammen mit den anderen Proben auf das Elektrophorese – Gel aufgetragen wurden. Die Ansätze der Positiv – und Negativ – Kontrollen wurden in gleicher Weise wie die der zu vervielfältigenden Proben hergestellt. Statt der aus den Schwammproben extrahierten Bakterien – DNA wurde den Positiv – Kontrollen DNA des *E. coli* – Laborstammes DH5 alpha hinzugegeben. Die Negativkontrollen wurden nicht mit DNA versetzt.

## 2C.8. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese ermöglicht es, eine Übersicht über die Zusammensetzung und die Vielfalt einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft zu erstellen. Hierbei ist von entscheidendem Vorteil, dass diese Technik, ebenso wie die PCR, auf der sie basiert, unabhängig von der Kultivierbarkeit der zu untersuchenden Mikroorganismen ist. Einschränkend gilt dabei jedoch, dass aufgrund der geringen Größe der analysierbaren Sequenzen (200 - 500 Basenpaare) nur eine grobe phylogenetische Einordnung der Bakterienstämme möglich ist.

Das Prinzip der Auftrennung der DNA unterschiedlicher Bakterienstämme auf einem DGGE – Gel beruht auf einem Phänomen, das bereits 1979 von Fischer und Lerman beschrieben wurde. Demnach ist die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) (und damit auch die Denaturierungsanfälligkeit in Anwesenheit denaturierender Reagenzien) einer bestimmten DNA – Sequenz abhängig von ihrem Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin.

Mittels PCR wird aus einer heterogenen Probe von chromosomaler DNA (z. B. extrahiert aus der Mikroorganismen – Gemeinschaft eines Schwammes) ein bestimmter Bereich der 16S rDNA amplifiziert. Die dabei entstehenden gleich langen PCR Fragmente werden nun nicht, wie bei der herkömmlichen Gelelektrophorese, nach ihrer Größe, sondern nach ihrem GC – Gehalt aufgetrennt. Hierbei spielt das unterschiedliche Schmelzverhalten der DNA – Fragmente eine entscheidende Rolle. Die DNA bewegt sich beim Durchlaufen des Polyacrylamid – DGGE – Gels einem ansteigenden Gradienten aus Harnstoff und Formamid entgegen. Erreicht ein DNA – Fragment die für seine Denaturierung erforderliche Konzentration an Harnstoff und Formamid im Gel, so wird seine doppelsträngige Struktur nach dem Reißverschlussprinzip aufgetrennt. Aufgrund der sterischen Veränderung, die mit dieser Denaturierung einhergeht, bleibt das Fragment im Gel stecken und bildet dort eine Bande. Das dabei entstehende Bandenmuster innerhalb einer Spur des entwickelten DGGE – Gels stellt damit das Profil der mikrobiellen Gemeinschaft dar. Jede einzelne Bande repräsentiert im Idealfall die 16S rRNA eines Bakterienstammes. Auf diese Weise wird ein „Fingerprint“ der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb einer Probe erstellt. Der Vergleich der auf dem Gel

erhaltenen Bandenmuster unterschiedlicher Proben ermöglicht damit den Vergleich der Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften.

Um ein schärferes Bandenmuster im Gel zu erhalten, wurde die sogenannte „GC – Clamp“ eingeführt. Hierbei handelt es sich um einen GC – reichen Sequenzabschnitt einer Länge von 30 – 40 Basen, der in der PCR an die PCR Fragmente angehängt wird. Der hohe GC – Gehalt in der GC – Clamp sorgt für eine besonders hohe Schmelztemperatur in diesem Bereich. Damit werden die Einzelstränge der DNA auch bei hohen Konzentrationen an denaturierenden Reagenzien im DGGE – Gel zusammengehalten. Auf diese Weise wirkt die GC – Clamp wie eine Art Anker zwischen den beiden DNA – Strängen und verringert den sonst üblichen „Schmiereffekt“ auf dem Gel.

Im Anschluß an die Elektrophorese auf dem Acrylamid – Gel können die Banden ausgeschnitten, und die darin enthaltene DNA extrahiert und sequenziert werden. Auf diese Weise lassen sich die durch die DGGE aufgetrennten Bakterienstämme phylogenetisch einordnen und die Mikroorganismen – Gemeinschaft in der Probe charakterisieren.

Zur Probenvorbereitung für die DGGE wurde die bakterielle 16S rDNA aus den Schwammproben, wie in Abschnitt 2C.7. beschrieben, mittels PCR vervielfältigt. Hierbei wurde ein Forward – Primer mit GC – Clamp (341fGC) und der Reverse – Primer 907r verwendet.

Anschließend wurde das DGGE – Gel gegossen. Hierzu wurden die Glasplatten der BIORAD – Gussform zunächst mit 10%igem SDS, dann mit 96%igem Ethanol gereinigt und anschließend in der Gussapparatur montiert (siehe Abschnitt 2.1.9.6.). Zwei 40% Acrylamid / Bis – Lösungen wurden jeweils mit 40 µl 10%igem Ammoniumpersulfat und 16 µl TEMED versetzt. Diese Gemische wurden in 30 ml Spritzen vorgelegt. Eine der beiden Acrylamid – Lösungen enthielt eine hohe Konzentration an den denaturierenden Reagenzien Formamid und Harnstoff, in der anderen waren diese Substanzen in einer niedrigeren Konzentration bzw. gar nicht vorhanden. Über ein Schlauchsystem wurden die Spritzen mit einer Mischapparatur verbunden. Mit Hilfe eines Mischrades wurde nun im zunehmendem Maße der Lösung mit der niedrigeren Konzentration an denaturierenden Reagenzien die höher konzentrierte Lösung beigemischt. Die so entstandene Mischung wurde zwischen die zwei senkrecht stehenden Glasplatten in der Gussapparatur injiziert. Auf diese Weise

bildete sich zwischen den Glasplatten ein Acrylamid – Gel mit einem von unten nach oben ansteigenden Gradienten an Formamid und Harnstoff. Am oberen Ende des Gels wurde dann ein Kamm für Aussparungen zur späteren Beschickung mit den DNA – Proben eingeschoben. Das Aushärten des Gels durch Polymerisierung des Acrylamids lief bei Raumtemperatur über den Zeitraum einer Stunde ab. Anschließend wurde das Gel über Nacht bei 4 °C gelagert.

Vorbereitend für die DGGE wurden die Produkte der zuvor durchgeführten PCR mit je 10 µl DGGE – Ladepuffer vermischt. Der Puffertank, in dem die Elektrophorese stattfinden sollte, wurde mit TAE – Puffer befüllt und auf eine Temperatur von 63°C beheizt. Das Acrylamid – Gel wurde senkrecht im Puffertank positioniert und der Kamm für die Aussparungen wurde entfernt. Die dabei entstandenen Taschen im Gel wurden mit Puffer gespült und anschließend mit einer 50 µl Hamilton – Spritze mit PCR – Produkt / Ladepuffer – Gemisch befüllt. Um die Elektrophorese zu starten, wurde die Temperatur auf 60° C zurückgeregelt und eine Spannung von 150 V an die Elektrophoresekammer angelegt.

Nach 6 h wurde die DGGE beendet. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen und über 30 min in einer wässrigen Ethidiumbromid – Lösung ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) gefärbt. Anschließend wurde es mit Hilfe des GelDoc – Systems unter UV – Licht fotografiert.

## 2C.9. Ausschneiden der Banden aus dem DGGE – Gel und anschließende Sequenzierung der darin enthaltenen bakteriellen DNA

Das Gel wurde zum Ausschneiden der DGGE – Banden auf die Glasplatte einer UV – Durchlicht – Lampe gelegt. Interessante, gut aufgelöste Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und einzeln in Reaktionsgefäße gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden zusätzlich mit 20 µl ultrareinem ABI – Wasser befüllt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Extraktion der DNA aus den ausgeschnittenen Acrylamid – Stücken erfolgte durch Diffusion in das zugegebene Wasser.

Um die Menge der Ausgangstemplates für die Sequenzierung zu erhöhen, wurde die extrahierte DNA mittels PCR vervielfältigt (siehe Abschnitt 2C.7). Die Amplifikation fand dabei mit den bereits zuvor verwendeten Primern (341F und 907R) jedoch ohne GC – Clamp statt. Die Kontrolle des PCR – Erfolges erfolgte durch Elektrophorese

auf einem 2%igen Agarose – Gel (siehe Abschnitt 2C.6.). Anschließend wurden die PCR – Produkte mit dem PCR – Purification – Kit von Quiagen gereinigt. Hierzu wurden 250 µl PB – Lösung zum PCR – Produkt hinzu pipettiert. Die entstandene Suspension wurde in einen Filtereinsatz für Reaktionsgefäße gegeben und über 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Nach Zugabe von 750 µl PE - Lösung wurde dieser Vorgang wiederholt. Dann wurde der Filterrückstand durch einminütiges Zentrifugieren getrocknet. Der Filtereinsatz wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und 30 µl steriles Wasser wurden hinzugegeben. Erneut wurde der Filterrückstand durch einminütiges Zentrifugieren getrocknet und anschließend bei –20 °C eingefroren.

Zur Vorbereitung auf die Sequenzierung wurde die gereinigte DNA zwei verschiedenen ABI – Sequenzier – PCRs unterworfen. Hierbei wurde ein Teil der DNA – Probe ausschließlich mit dem Forward – Primer (341F) der andere Teil ausschließlich mit dem Revers – Primer (907R) amplifiziert. Anschließend erfolgte eine weitere Reinigung der erhaltenen Amplifikate mittels Ethanolfällung. Hierzu wurde ein Fällungsreagenz (bestehend aus 90 µl ABI – Wasser, 10 µl 3M NaAc pH 5,2 und 250 µl 100% ABI – Ethanol) zum PCR – Produkt in das Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde über 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Flüssigkeit wurde verworfen. Durch Zugabe von 250 µl 70%igem Ethanol und erneutes 5minütige Zentrifugieren bei 13000 rpm wurde das DNA – Pellet gewaschen und anschließend (nach Abgießen des Ethanols) über 5 min in der SpeedVac getrocknet. Dann wurde die DNA bei -20°C eingefroren.

Zur weiteren Bearbeitung wurde die Probe in 25 µl TSR angelöst und über 2 min auf 90 °C erhitzt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABI 377XL Automatik – Sequenzierer der Firma Applied Biosystems. Aus den erhaltenen Forward – und Revers – Sequenzen wurde mittels der ABI Prism Autoassembler Software von Perkin Elmer eine Konsensus – Sequenz errechnet. Eine erste phylogenetische Einordnung der Sequenzen erfolgte durch Eingabe der Sequenzen in das online auf der NCBI – Homepage frei zugängliche BLAST – Programm. Die Sequenzen wurden dann in die ARB 16S rDNA Sequenzdatenbank eingetragen. Anschließend erfolgte die phylogenetische Analyse mit Hilfe des ARB Software Paketes. Hierbei wurden die Baumberechnungsmethoden „Distance Matrix (Jukes – Cantor Correction)“, „Maximum – Parsimony“ und „Maximum – Likelihood“ verwendet (Olsen *et al.* 1994).

## 2C.10. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht es, Mikroorganismen am Ort ihres Vorkommens zu markieren und taxonomisch zu identifizieren (Amann *et al.* 1995). Auch hierbei handelt es sich um eine kultivierungsunabhängige Methode. Damit ist diese Technik besonders geeignet, um die mikrobielle Diversität von komplexen Bakteriengemeinschaften in Schwämmen zu erfassen. Als Zielsequenz für die Identifizierung der Bakterien hat sich die 16S rRNA als besonders gut geeignet erwiesen, da sie ubiquitär vorkommt und darüber hinaus in einer hohen Kopienzahl von  $10^3$  -  $10^5$  pro Zelle auftritt. Somit können auch Bakterienzellen, die nur in geringen Zahlen in der Probe vorkommen, nachgewiesen werden.

Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung basiert auf der spezifischen Bindung einer fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid – Sonde an den komplementären Sequenzbereich der in der Bakterienzelle vorliegenden rRNA. Auf diese Weise werden die Bakterien markiert und können daraufhin unter dem Fluoreszenzmikroskop in der Probe als Leuchtsignale beobachtet werden.

Ebenso wie die 16S rDNA enthält die 16S rRNA Sequenz sowohl Bereiche, die in allen Bakterien identisch sind (konservierte Bereiche), als auch artspezifische Abschnitte (variable Bereiche). Durch geschickte Wahl der Sequenz – Bindungsregion können Sonden konstruiert werden, die spezifisch für bestimmte taxonomische Gruppen sind. Zur Konstruktion dieser Sonden kann auf eine frei zugängliche Datenbank zurückgegriffen werden, die bereits über 20.000 16S rRNA Sequenzen umfasst. Je nachdem, wie weit die Basensequenz der zu markierenden Bakterien – RNA bereits entschlüsselt ist, können so auch sehr spezifische Sonden entwickelt werden.

Um Schwammgewebe unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können, wurden zunächst mikroskopische Schnitte angefertigt. Ein etwa 1 cm langes, auf Trockeneis eingefrorenes Schwammstück wurde hierzu mit einer „Freezing Agent“ - Lösung auf einem vorgekühlten Alu-Träger eines Gefriermikrotoms befestigt. Zunächst wurde mit groben Schnitten (Dicke 30 – 50  $\mu\text{m}$ ) eine geeignete Schnittfläche geschaffen. Dann wurden Gewebeschnitte mit 2 – 5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke angefertigt. Diese wurden mit einer Nadel auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Proben auf Trockeneis gelagert.

Die Schnitte wurden kurz an der Luft getrocknet, bevor sie anschließend über 45 min in Carnoy – Lösung fixiert wurden. Nachdem die Lösung verdampft war, wurde das Schwammgewebe über eine Ethanolreihe (50%, 70%, 100%; je 5 min) entwässert, erneut an der Luft getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

Für die Hybridisierungen wurden zwei unterschiedliche Sonden verwendet. Bei der Sonde EUB338mix handelte es sich um ein 1:1:1 – Gemisch der Sonden EUB338, EUB338II und EUB338III, welches typische Abschnitte der 16S rDNA von Eubakterien markiert (Daims *et al.* 1999). Es handelt sich dabei um eine generelle Eubakterien – Sonde.

Die Sonde TK66 wurde ursprünglich für Untersuchungen an Bakterien im Gewebe des Schwammes *A. aerophoba* konzipiert. Sie ist spezifisch für die Gruppe der Holophaga / Acidobakterien.

Die Sonden wurden mit einem Hybridisierungspuffer angesetzt, dem zusätzlich in unterschiedlicher Konzentration das denaturierende Reagenz Formamid zugesetzt wurde. Durch den Formamid – Zusatz können Stringenzen (Sequenzabschnitte die trotz einiger Fehler in der Übereinstimmung der Basensequenz (ungewollt) hybridisiert werden) verhindert werden. Je nach Spezifität der Sonde sind die Wahrscheinlichkeiten für Stringenzen unterschiedlich hoch, weswegen verschiedenen Sonden unterschiedliche Volumina an Formamid zugesetzt werden müssen. 6 µl Sonde (100 ng/µl) wurden dann mit 200 µl Hybridisierungspuffer vermischt. Ca. 50 µl des Gemisches wurden auf einen Gewebeschnitt gegeben. Zusätzlich wurden Kontrollen angefertigt, indem auf entsprechende Schwammgewebsschnitte reiner Hybridisierungspuffer ohne Sonde gegeben wurde.

Die Objektträger mit den Proben und den Kontrollen wurden dann auf einer Plexiglasplatte in einer Feuchtkammer platziert. Hierbei handelte es sich um eine mit Tüchern ausgelegte Kunststoffbox. Die Tücher waren zuvor mit Hybridisierungspuffer befeuchtet worden. Die Proben in den Feuchtkammern wurden daraufhin über 5 Stunden in einem Hybridisierungsofen bei 46 °C hybridisiert.

Anschließend wurden die Proben aus dem Ofen entnommen und der Hybridisierungspuffer vorsichtig abgetupft. Restlicher Hybridisierungspuffer musste abgewaschen werden. Hierzu wurde eine Waschlösung (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1.9.9.) in Falcon – Röhrchen gegeben und in einem Heizbad auf 48 °C vorgewärmt. Die Objektträger mit den Proben wurden für 15 min in die Waschlösung gestellt. Anschließend wurden sie mit sterilem Wasser abgewaschen, vorsichtig mit

einem Papiertuch abgetupft und für 15 min in einer abgedunkelten Kammer zum Trocknen auf einen Heizblock (Temperatur 38 °C) gelegt. Anschließend wurde je ein Tropfen Citifluor auf die Objektträger gegeben und die Proben mit Deckgläschen abgedeckt.

Die mikroskopischen Untersuchungen fanden mit einem Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop mit dem Zeiss Filtersatz 15 statt (siehe Abschnitt 2.1.9.9). Von den Objekten wurden mit einer Fluoreszenz – und Schwachlichtkamera digitale Aufnahmen gemacht, die anschließend mit der Software Adobe Photoshop bearbeitet wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3A. Untersuchungen zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung *Aplysina*

##### 3A.1. Unterschiede in den Alkaloidmustern von *Aplysina* – Schwämmen verschiedener Herkunft

###### 3A.1.1. Alkaloidmuster der im August 2003 in Rovinj, Kroatien gesammelten *A. aerophoba* – Schwämme

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* waren im August 2003 im Küstenbereich um die kroatische Stadt Rovinj mehrere *A. aerophoba* – Individuen gesammelt worden. Ein Großteil dieser Schwämme entstammte dem ufernahen Bereich im Limski – Kanal aus einer Tiefe bis 5 m. Weitere Individuen waren im Flachwasser am Ufer der „Banjole – Insel“ gesammelt worden. Die von diesen Schwämmen entnommenen Proben waren, um die Zusammensetzung ihres Sekundärstoffmusters möglichst naturnah zu erhalten, sofort nach der Probenahme schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet worden. Anschließend wurden die Extrakte aus diesen Proben mittels HPLC – UV analysiert.

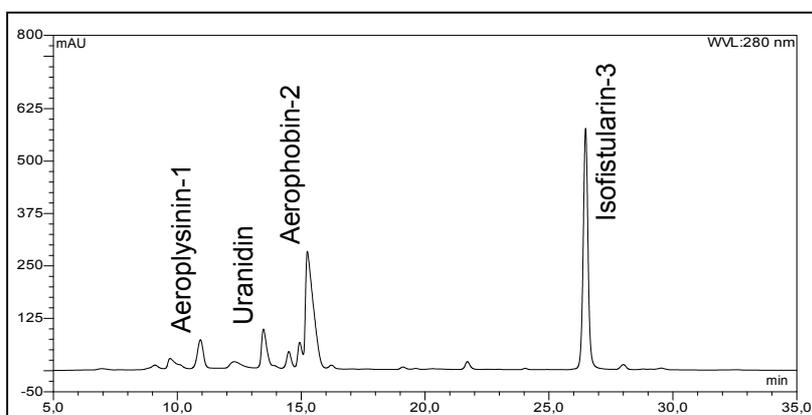


Abb. 3A-1: Typisches HPLC - Chromatogramm des Methanolextraktes eines bei Rovinj gesammelten *A. aerophoba* - Schwammes.

In den HPLC – Chromatogrammen (Abb. 3A-1) dominierten die Signale der Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2 und Isofistularin-3. Darüber hinaus war ein Peak des Schwammpigmentes Uranidin zu erkennen. Von den beiden von Teeyapant & Proksch (1993) als Biotransformationsprodukte beschriebenen niedermolekularen Alkaloiden Aeroplysinin-1 und Dienon war nur das Aeroplysinin-1 in detektierbaren Konzentrationen vorhanden. Aplysinamisin-1, ein weiteres Isoxazolinalkaloid, das in *A. aerophoba* häufig in hohen Konzentrationen auftritt, wurde nicht aufgefunden.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Alkaloide im Gewebe von *A. aerophoba* sind in Tabelle 3A-1 aufgelistet. Das Pigment Uranidin ist bei der Bearbeitung sehr instabil und reagiert sofort nach Luftkontakt zu einem schwarzen, unlöslichen Polymerisationsprodukt. Aus diesem Grund konnte es nicht in die Quantifizierung mit einbezogen werden.

Tab. 3A-1: Mittlerer Alkaloidgehalt in den zehn im Uferbereich bei Rovinj gesammelten und direkt gefriergetrockneten *A. aerophoba* – Individuen (n.d. = nicht detektierbare Konzentration).

<b>Alkaloid</b>	<b>Gehalt in 1 g TG Schwammgewebe</b>	<b>Gehalt in 1 ml frischem Schwammgewebe</b>
Aerophobin-2	134,4 ± 29,6 µmol	28,0 ± 6,2 µmol
Isofistularin-3	48,5 ± 9,0 µmol	10,1 ± 1,9 µmol
Aplysinamisin-1	n.d.	n.d.
Aeroplysinin-1	11,7 ± 8,2 µmol	2,4 ± 1,7 µmol
Dienon	n.d.	n.d.
Uranidin	nicht quantifizierbar	nicht quantifizierbar
„Gesamtalkaloidgehalt“	194,5 ± 37,9 µmol	40,5 ± 7,9 µmol

Der „Gesamtalkaloidgehalt“ wurde für dieses, wie auch für alle im Folgenden beschriebenen Experimente mit *A. aerophoba* als Summe der Gehalte an Isofistularin-3, Aerophobin-2, Aplysinamisin-1, Aeroplysinin-1 und Dienon definiert und errechnet. War einer dieser Metabolite in einer Probe nicht detektierbar, wurde sein Gehalt als 0 definiert. Auf diese Weise wurde für alle Experimente eine einheitliche Variable definiert, mit deren Hilfe die Proben aus unterschiedlichen Experimenten miteinander verglichen werden konnten.

Der mittlere Gesamtalkaloidgehalt der zehn Schwammproben aus Rovinj betrug  $194,5 \pm 37,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  (entsprechend  $125,8 \pm 24,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ TG}$ ). Die Schwankungen in den Absolutwerten des Gesamtalkaloidgehaltes sind hierbei groß. Die Werte liegen zwischen  $157,8$  und  $241,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ . Bei relativer Betrachtung

der Mengenverhältnisse der Alkaloide im Schwammgewebe zueinander ergeben sich für die zehn Schwammproben wesentlich konstantere Werte (Abb. 3A-2). Im Mittel hatte das Isofistularin-3 einen Anteil am Gesamtalkaloidgehalt von  $25,0 \pm 2,0$  %, das Aerophobin-2 von  $68,9 \pm 4,4$  %. Die größten relativen Schwankungen wies der Anteil des Aeroplysinin-1 mit einem Wert von  $6,1 \pm 4,2$  % auf.

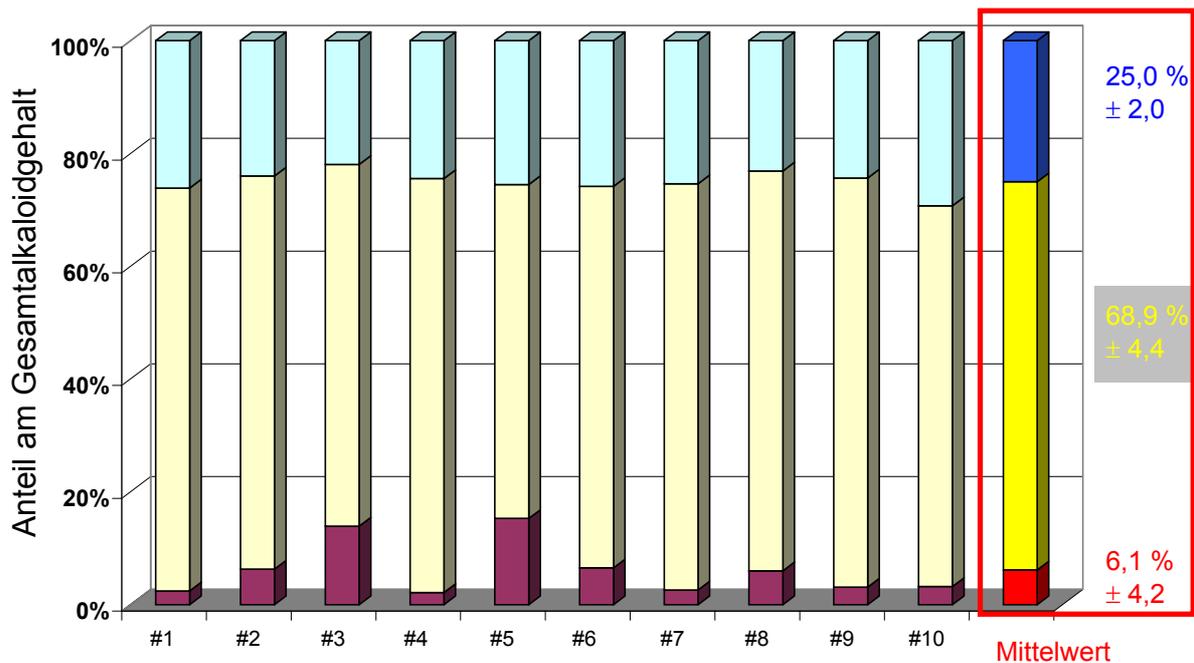


Abb. 3A-2: Anteile der Alkaloide Isofistularin-3 □, Aerophobin-2 □ und Aeroplysinin-1 □ an den Gesamtalkaloidgehalten von zehn in Rovinj, Kroatien gesammeltem und anschließend gefriergetrockneten *A. aerophoba* - Individuen. Rot eingrahmt und farblich anders dargestellt ist der Mittelwert aus den zehn Schwammproben.

Aufgrund der starken natürlichen Schwankungen in den Absolutwerten der Alkaloidgehalte in *Aplysina aerophoba* waren diese für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zu künstlich induzierten Änderungen im Alkaloidmuster nicht geeignet. Die großen Standardabweichungen in den Mittelwerten von mehreren parallel analysierten Schwammproben hätten Änderungsverläufe im Alkaloidmuster verschleiert. Die sehr konstanten relativen Mengenverhältnisse der Alkaloide in den *A. aerophoba* – Schwämmen aus dem Limski Kanal und vom Uferbereich der Banjole – Insel ermöglichten es dagegen, Mittelwerte mit sehr geringer Standardabweichung aus mehreren Parallelansätzen zu erhalten. Aus diesem Grund wurden für die Experimente zur verletzungsinduzierten Biotransformation der bromierten Alkaloide in *Aplysina* – Schwämmen die Veränderungen der relativen Anteile dieser Metabolite zueinander betrachtet.

### 3A.1.2. Alkaloidmuster der im April 2002 bei Banylus-sur-mer, Südfrankreich gesammelten *A. aerophoba* – Schwämme

Im April 2002 waren vor der südfranzösischen Mittelmeerküste bei Banylus-sur-mer ebenfalls mehrere Individuen von *A. aerophoba* gesammelt worden (siehe 2B.1.). Von drei dieser Individuen wurden, ebenso wie bei den im August 2003 bei Rovinj gesammelten Schwämmen, Gewebeproben entnommen, sofort eingefroren und anschließend vor der Extraktion gefriergetrocknet. Die HPLC – Analyse zeigte, dass im Unterschied zu den Proben aus Rovinj, im Gewebe dieser Schwämme eine hohe Konzentration an Aplysinamisin-1 im Schwammgewebe vorlag (Abb. 3A-3, Tab. 3A-2). In den in Abschnitt 3A.1.1. definierten Gesamtalkaloidgehalt mit einbezogen hatte das Aplysinamisin-1 im Gewebe dieser Schwämme einen Anteil von  $58,4 \pm 5,7\%$  (Aerophobin-2:  $25,5 \pm 3,3\%$ ; Isofistularin-3:  $16,0 \pm 2,6\%$ ; Aeroplysinin-1 und Dienon: keine detektierbaren Konzentrationen).

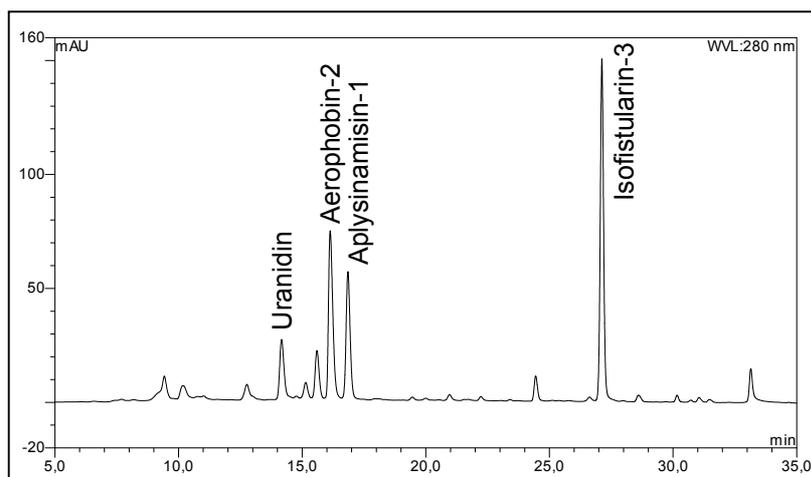


Abb. 3A-3: Typisches HPLC – Chromatogramm des Methanolextraktes eines bei Banylus-sur-mer, Südfrankreich gesammelten *A. aerophoba* – Schwammes.

Der Gesamtgehalt der genannten Alkaloide in den Schwämmen aus Banylus betrug  $114,8 \pm 26,7 \mu\text{mol g}^{-1}$  Trockengewicht ( $\cong 69,1 \pm 16,3 \text{ mg g}^{-1}$  TG) und lag damit deutlich unter dem Wert für die im August 2003 in Rovinj gesammelten Schwämme. Die absoluten Gehalte der in den Schwämmen quantifizierten Alkaloide sind Tab. 3A-2 zu entnehmen.

Tab. 3A-2: Mittlerer Alkaloidgehalt in den drei bei Banyuls, Südfrankreich gesammelten und anschließend gefriergetrockneten *A. aerophoba* – Individuen (n.d. = nicht detektierbare Konzentration).

<b>Alkaloid</b>	<b>Gehalt in 1 g TG Schwammgewebe</b>	<b>Gehalt in 1 ml frischem Schwammgewebe</b>
Aerophobin-2	29,2 ± 6,6 µmol	6,1 ± 1,4 µmol
Isofistularin-3	18,5 ± 5,2 µmol	3,9 ± 1,1 µmol
Aplysinamin-1	67,2 ± 17,9 µmol	14,0 ± 3,7 µmol
Aeropylsinin-1	n.d.	n.d.
Dienon	n.d.	n.d.
Uranidin	nicht quantifizierbar	nicht quantifizierbar
„Gesamtalkaloidgehalt“	114,8 ± 26, 7 µmol	23,9 ± 5,6 µmol

### 3A.1.3. Alkaloidmuster von *Aplysina* – Schwämmen, gesammelt in Höhlen und in 26,5 m Wassertiefe bei Rovinj

Die in Abschnitt 3A.1.1. und 3A.1.2. beschriebenen *Aplysina aerophoba* – Individuen entstammten allesamt sonnenexponierten Standorten in flachem Wasser. Zusätzlich waren im August 2003 in Rovinj *Aplysina* – Schwämme gesammelt worden, die an Standorten mit geringerer Lichtintensität gewachsen waren: Zwei Proben entstammten einer Tiefe von 26,5 m und waren vom Boot aus mit einem Dretsch – Netz gesammelt worden. Ein weiterer Schwamm war in etwa 4 m Tiefe in einer halboffenen Grotte gewachsen. Der vierte Schwamm entstammte der Decke einer tief in den Fels hineinragenden Höhle in etwa 7 m Tiefe. Alle diese Schwämme hatten eine wesentlich hellere und leuchtendere gelbe Färbung als die im Uferbereich gesammelten Individuen (Abb. 3A-4).



Abb. 3A-4 : Bei Rovinj gesammelte *Aplysina* – Schwämme mit unterschiedlicher Färbung. links: aus einer Höhle in 4 m Tiefe (der Schwamm aus der 7 m tief gelegenen Höhle sah diesem sehr ähnlich); Mitte: aus 26,5 m Tiefe; rechts: an einem flachen, sonnenexponierten Standort gesammelter Schwamm; Bildhöhe: ca. 25 cm

Die beiden im Freiwasser auf 26,5 m Tiefe gesammelten Schwämme wiesen hohe Konzentrationen an den Alkaloiden Aplysinamsin-1 und Aerothionin auf (Abb. 3A-5). Letzteres hatte bisher als charakteristisch für den Schwamm *A. cavernicola* gegolten. Im Unterschied zu *A. cavernicola* besaßen beide Schwämme jedoch das für *A. aerophoba* typische Pigment Uranidin, während in *A. cavernicola* statt dessen normalerweise die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure auftritt (siehe Abschnitt 3B.2.1.).

Der Schwamm, der von der Höhlendecke abgesammelt war, wies ähnliche Charakteristika in seinem Alkaloidmuster auf, wie die in 26,5 m Tiefe beprobten *Aplysina* – Schwämme (Abb. 3A-6). Der Schwamm aus der halboffenen Grotte hingegen besaß trotz seiner deutlich verschiedenen Färbung ein normales, für *A. aerophoba* typisches Naturstoffmuster, das denjenigen der im Uferbereich der Banjole – Insel und des Limski – Kanals gesammelten Schwämme entsprach (Abb. 3A-1, Seite 77).

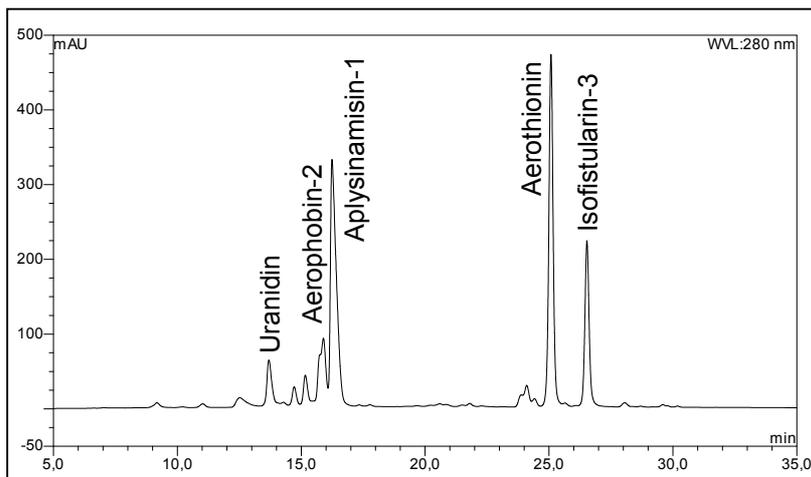


Abb. 3A-5: HPLC – Chromatogramm des Methanolextraktes eines der beiden auf 26,5 m Tiefe im Freiwasser vor Rovinj gesammelten Schwämme. Die Alkaloidmuster beider Schwämme waren nahezu identisch.

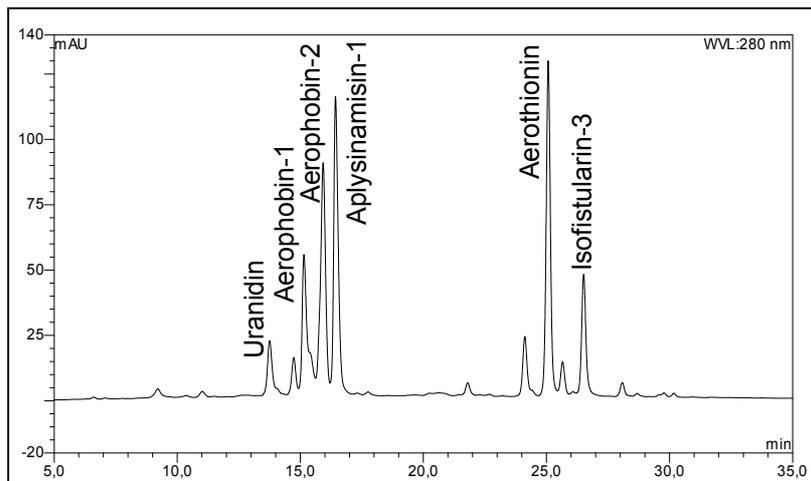


Abb. 3A-6: HPLC – Chromatogramm des Methanolextraktes des *Aplysina* – Schwammes der in 7 m Tiefe in einer Höhle der Banjole – Insel bei Rovinj gesammelt worden war.

## 3A.2. Experimente zu Veränderungen des Alkaloidmusters in Schwämmen der Gattung *Aplysina* durch eine verletzungsinduzierte Biotransformation

### 3A.2.1. Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf das Alkaloidmuster in frischem Gewebe von *A. aerophoba*

Die Wirkung von drei verschiedenen organischen Lösungsmitteln auf die Alkaloidzusammensetzung in frischem Gewebe von *A. aerophoba* wurde untersucht. Frische Stücke definierter Größe von einem intakten Schwamm (Wassergehalt: ca. 80%), der wie die in Abschnitt 3A.1.1. beschriebenen Individuen im Uferbereich bei Rovinj gesammelt worden war, waren hierzu über unterschiedliche Zeiträume den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol und Aceton ausgesetzt worden. Die in den Lösungsmittelüberständen und den Schwammstücken enthaltenen Gehalte der Alkaloide Isofistularin-3, Aerophobin-2, Aeroplysinin-1 und Dienon wurden quantifiziert und der jeweilige Anteil dieser Metabolite am Gesamtalkaloidgehalt (definiert wie in Abschnitt 3A.1.1.) wurde errechnet.

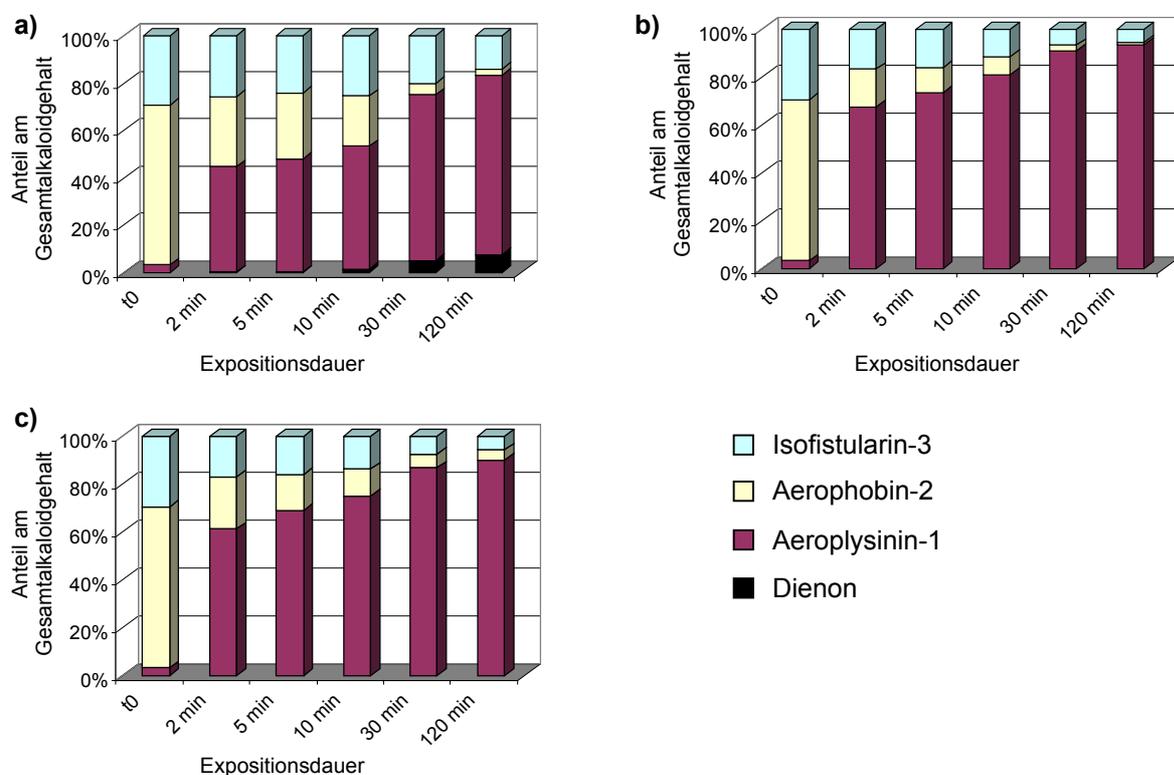


Abb. 3A-7 : Auswirkungen unterschiedlicher organischer Lösungsmittel [a) Methanol b) Ethanol c) Aceton] auf das Alkaloidmuster in frischem Gewebe von *A. aerophoba*. t0 = Kontrolle ohne Lösungsmittel – Exposition.

In allen Versuchsansätzen konnte mit steigender Expositionsdauer ein Absinken der Konzentrationen der Isoxazolinalkaloide und ein Anstieg des Gehaltes des von Teeyapant & Proksch (1993) als Biotransformationsprodukt identifizierten Aeroplysinin-1 beobachtet werden (Abb. 3A-7). In Tab. 3A-3 sind die Absolutwerte der Alkaloidgehalte in der t<sub>0</sub> – Probe und den Proben nach 120 min Lösungsmittlexposition angegeben. Die Werte der Proben sind jedoch aufgrund der großen Schwankungen im Gesamtalkaloidgehalt in den beprobten Schwammstücken untereinander nur begrenzt vergleichbar.

Tab. 3A-3: Absolutgehalte [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwammgewebe] in der t<sub>0</sub>-Probe (ohne Lösungsmittlexposition) und den Proben nach 120 min Lösungsmittlexposition. Aeroplysinin-1 und Dienon sind als „Produkte“ zusammengefaßt.

	<b>t<sub>0</sub> – Probe</b>	<b>120 min Methanol</b>	<b>120 min Ethanol</b>	<b>120 min Aceton</b>
Isoxazolinalkaloide	155,0	14,4	18,2	29,3
„Produkte“	5,3	172,8	270,7	276,0

Die durch die Lösungsmittel Ethanol und Aceton verursachten Änderungsverläufe waren einander sehr ähnlich. Der größte Teil der Veränderung lief hier bereits während der ersten 2 min nach Beginn der Lösungsmittlexposition ab. Ab dann näherte sich der Aeroplysinin-1 – Gehalt asymptotisch einem Wert von 100% an. Der Änderungsverlauf der Alkaloidzusammensetzung nach Methanol – Exposition unterschied sich zu einem gewissen Grad von den durch Ethanol und Aceton verursachten Verläufen (Abb. 3A-7). So lief das Absinken der Isoxazolinalkaloid – Gehalte zugunsten des Aeroplysinin-1 mit geringerer Geschwindigkeit ab. Während der Anteil der Isoxazolinalkaloide am Gesamtalkaloidgehalt beispielsweise nach 10 min in Aceton und Ethanol bereits auf 25,1% bzw. 19,0% abgefallen war, betrug er nach der gleichen Zeit in Methanol noch 46,7%. Darüber hinaus konnte nur im Lösungsmittel Methanol die Entstehung von Dienon beobachtet werden, das am Ende des Versuchs, nach 120 min, auf einen Anteil von 7,6% angestiegen war. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in den Verhältnissen der Umsatzgeschwindigkeiten von Isofistularin-3 und Aerophobin-2 zueinander. Während die Isofistularin-3-Konzentrationen in Aceton und Ethanol schon in den ersten Minuten der Lösungsmittlexposition im Verhältnis zu den anderen Alkaloiden zu sinken begannen, verringerte sich in Methanol zunächst nur der Gehalt an Aerophobin-2. Erst nach 30 min sank auch in Methanol der Gehalt an Isofistularin-3 erkennbar ab.

### **3A.2.2 Einfluss von Gewebszersetzung auf das Alkaloidmuster in *A. aerophoba***

Vier aus dem Uferbereich bei Rovinj stammende *A. aerophoba* – Schwämme, die über sechs Wochen im Aquarium gehalten worden waren, waren abgestorben und zeigten nach dieser Zeit deutliche Anzeichen von Gewebszersetzung. An mehreren Stellen hatten sich die Schwämme nekrotisch schwarz verfärbt und durch den Rückgang des Gewebes waren in verschiedenen Bereichen die Sponginfasern zutage getreten. Außerdem schwammen sie durch den Auftrieb entstandener Faulgase teilweise an der Wasseroberfläche. Durch Analyse des Gewebes dieser Schwämme sollten Informationen darüber erhalten werden, inwieweit sich die Zersetzung des Schwammgewebes auf das Alkaloidmuster im Gewebe auswirkt.

Nekrotisch schwarze und gelbe Gewebebereiche von allen vier Schwämmen wurden getrennt beprobt, gefriergetrocknet und nach Extraktion mittels HPLC – UV analysiert. Die Zusammensetzungen der bromierten Alkaloide unterschieden sich in keiner der Proben erkennbar von dem Alkaloidmuster in intaktem Gewebe lebender *A. aerophoba* – Schwämme (Abb.3A-1, Seite 77).

### **3A.2.3. Einfluss mechanischer Beschädigung auf das Alkaloidmuster in frischem Gewebe von *A. aerophoba***

#### 3A.2.3.1. Veränderungen im Alkaloidmuster in Abhängigkeit vom Grad der Gewebsverletzung

Anhand mechanischer Beschädigung des Gewebes von *A. aerophoba* und anschließender HPLC – Analyse sollte ermittelt werden, inwieweit diese Art der Verletzung Einfluss auf das Alkaloidmuster im Schwamm hat. Der Grad der Verletzung wurde hierzu stufenweise gesteigert:

Zunächst wurden Kontrollproben („t0 – Proben“) von Schwämmen, die im Uferbereich bei Rovinj gesammelt worden waren, abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Proben sollten Informationen über den ursprünglichen Zustand der Metabolitenzusammensetzung im Gewebe unverletzter Schwämme liefern. Die Verletzung durch Abschneiden der Schwammstücke für die Probenahme ließ sich dabei nicht vermeiden. Die HPLC – Analyse ergab in den t0 –

Proben einen Anteil des Aeroplysinin-1 von  $6,2 \pm 5,5\%$ , für die Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2 und Isofistularin-3 zusammen einen Anteil von  $93,8\%$  am Gesamtalkaloidgehalt (Abb. 3A-8, t0).

Die erste Stufe der Verletzung wurde durch Anschneiden von Gewebestücken der gleichen Schwämme mit einem Skalpell über einen Zeitraum von 15 sec erreicht. Die Schwammstücke blieben dabei unter Wasser. Um in den folgenden Abschnitten des Experimentes nur den Verletzungsgrad und nicht die Zeiträume nach Verletzung zu variieren, wurde eine Dauer von insgesamt 5 min ab dem Abtrennen der Stücke abgewartet, bevor die Proben schockgefroren wurden. Die relativen Gehalte der quantifizierten bromierten Alkaloide blieben nach diesem Versuch, verglichen mit den Gehalten in den t0-Proben, weitestgehend unverändert (Abb. 3A-8, b).

Eine dritte Gruppe Proben wurde von den Schwämmen abgeschnitten und (ohne Zugabe von Wasser) in einem Mörser über einen Zeitraum 15 sec zu einem Brei aus kleinen Gewebestücken zermahlen. Wieder wurden insgesamt 5 min (inklusive der 15 sec für das Mörsern) abgewartet, bis die Proben eingefroren wurden. Diese Behandlung führte zu einem Anstieg des Aeroplysinin-1 – Anteils auf  $33,2 \pm 11,9\%$ . Der Anteil der Isoxazolinalkaloide war damit auf  $66,8\%$  gefallen (Abb. 3A-8, c).

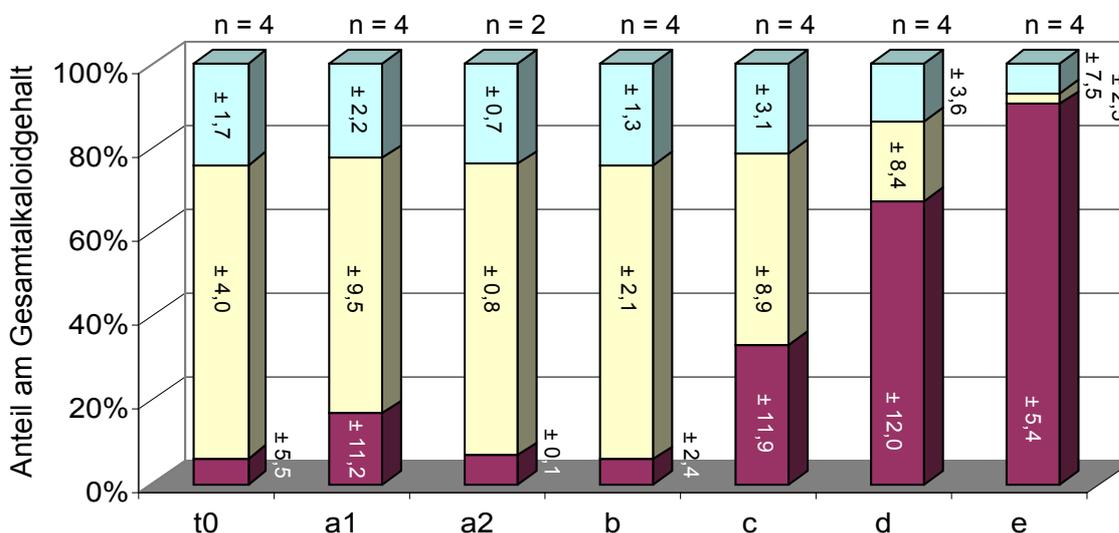


Abb. 3A-8: Veränderungen im Alkaloidmuster in *A. aerophoba* aufgrund unterschiedlicher Intensität der Gewebsbeschädigung. ■ – Aeroplysinin-1; □ – Aerophobin-2; □ – Isofistularin-3. t0 = nahezu unbeschädigtes Gewebe; a1 = Lagerung über 5 min im Wasser; a2 = Lagerung über 5 min an der Luft; b = 15 sec mit Skalpell geschnitten; c = 15 sec gemörsert; d = 5 min gemörsert; e = 5 min gemörsert + Ethanol. In den Experimenten b und c wurde vor dem Einfrieren der Proben noch weitere 4:45 min abgewartet um eine einheitliche Reaktionszeit von 5 min zu gewährleisten. Die Standardabweichungen sind in der Grafik angegeben.

Eine weitere Erhöhung der Intensität der Gewebsverletzung wurde durch Verlängerung der Mörserzeit auf 5 min erreicht. Hierbei entstand ein weitestgehend homogener, feinkörniger Brei. In Folge dieser Beschädigung des Gewebes stieg der Aeroplysinin-1 – Anteil auf  $67,3 \pm 12,0\%$  an. Der Absolutgehalt des Aeroplysinin-1 lag dabei in diesen Proben bei  $62,30 \pm 28,83 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG ( $4,4 \pm 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ) des Schwammgewebes.

Eine weitere Steigerung des Gehaltes an Aeroplysinin-1 auf  $90,4 \pm 7,5\%$  wurde durch Mörsern über eine Dauer von 5 min unter gleichzeitiger Zugabe von 1,5 ml Ethanol ( $\approx 16 \text{ Vol.}\%$  des Ansatzes) erreicht (Abb. 3-8, e). Damit war der Isoxazolinalkaloid – Anteil von ursprünglich  $93,8 \pm 5,5\%$  in den t0 – Proben auf einen Wert von  $9,6 \pm 7,5\%$  gefallen.

Während der Experimente waren die Proben, die zur Gewebsverletzung gemörsert wurden, ab dem Abschneiden vom Schwamm über einen Zeitraum von 5 min der Luft ausgesetzt. Die mit dem Skalpell bearbeiteten Proben lagen dagegen für die Dauer des Experimentes im Wasser. Um den Einfluss der unterschiedlichen Lagerung der Schwammstücke auf das Alkaloidmuster abschätzen zu können, wurden zusätzliche Kontrollproben genommen. Diese wurden ohne weitere Beschädigung für 5 min im Wasser, bzw. an der Luft gelagert. Nach Lagerung im Wasser ergab sich ein Aeroplysinin-1-Anteil von  $16,7 \pm 11,2\%$  während nach Lagerung an der Luft ein Wert von  $6,8 \pm 0,1 \%$  ermittelt wurde (Abb. 3A-8, a1 und a2).

#### 3A.2.3.2. Zeitverlauf der Veränderungen im Alkaloidmuster nach Verletzung des Gewebes

Um den Zeitverlauf der beobachteten Umsetzung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1 nach Gewebsverletzung analysieren zu können, wurden Schwammstücke zunächst für die Dauer von 15 sec gemörsert. Anschließend wurde das gemörserte Schwammmaterial über unterschiedliche Zeiträume im Mörser belassen, bevor es in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Abb. 3A-9 zeigt den Zeitverlauf der Veränderungen im Alkaloidmuster bis zu 165 sec nach Beginn der Gewebsbeschädigung.

Bereits nach 45 sec war der Anteil des Aerophobin-2 von seinem Ursprungswert von  $68,8 \pm 5,5\%$  in ungemörsertem Schwammgewebe auf einen Wert von  $52,6 \pm 2,6\%$  gefallen. Danach fiel der Wert nur noch geringfügig und näherte sich asymptotisch ca. 51% an.

Auch der Anteil des Aeroplysinin-1 am Gesamtalkaloidgehalt änderte sich vor allem in den ersten 45 sec nach Beginn des Mörserns. Er stieg in diesem Zeitraum von  $6,7 \pm 5,1\%$  (in ungemörsertem Gewebe) auf  $25,0 \pm 4,9\%$  an und näherte sich im Verlauf der folgenden 120 sec einem Wert von ca. 26%. Der Anteil des Isofistularin-3 blieb weitgehend unbeeinflusst von der mechanischen Beschädigung dieser Intensität. Er fiel von seinem ursprünglichen Wert von  $24,8 \pm 1,1\%$  lediglich auf  $22,6 \pm 2,6\%$  165 sec nach Beginn des Mörserns ab. Dieser Befund entspricht den Beobachtungen in dem unter 3A.2.3.1. beschriebenen Experiment (Abb. 3A-8). Auch hier hatte 15-sekündiges Mörsern nur Einfluss auf den Aerophobin-2 – Gehalt. Erst nach intensiverer Verletzung (5 min Mörsern) nahm auch der Anteil des Isofistularin-3 erkennbar ab.

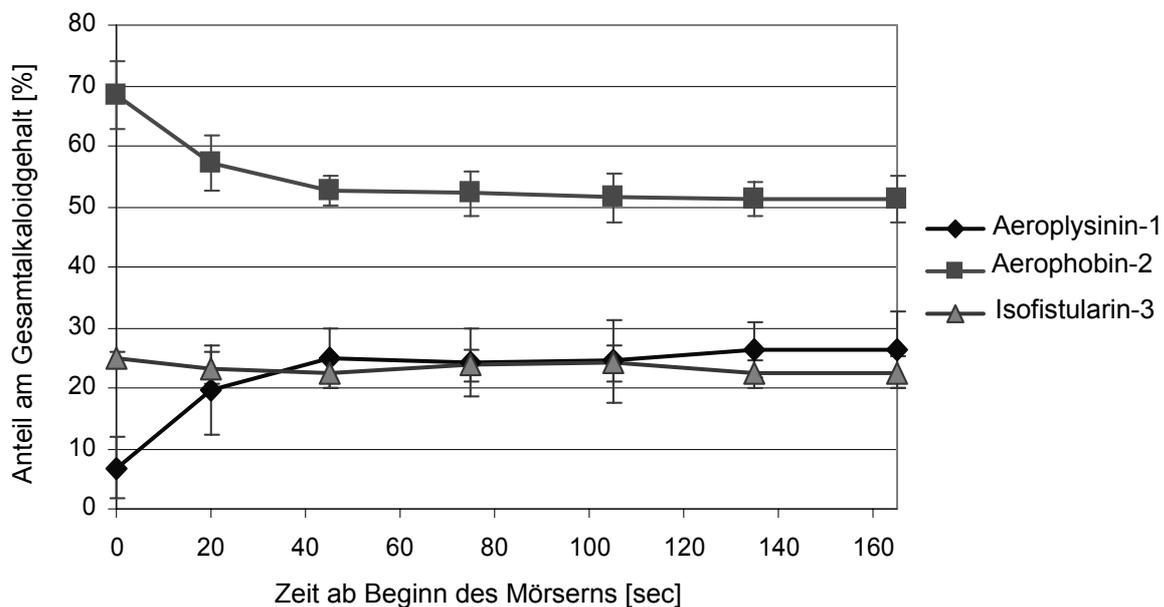


Abb. 3A-9 : Veränderungen im Alkaloidmuster des Schwammes *A. aerophoba* durch 15sekündiges Mörsern des Gewebes.

### **3A.2.4. Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in anderen Arten der Gattung *Aplysina***

#### 3A.2.4.1. Biotransformation in gefriergetrocknetem Schwammgewebe nach Zugabe von Seewasser

Die unter 3A.2.3.1. und 3A.2.3.2. aufgeführten Experimente hatten gezeigt, dass nach mechanischer Verletzung frischen Gewebes von *A. aerophoba* aus den ursprünglich im Gewebe enthaltenen Isoxazolinalkaloiden Aeroplysinin-1 gebildet wird. In dem im Folgenden beschriebenen Experiment sollte ermittelt werden, ob diese Umsetzung spezifisch für den Schwamm *A. aerophoba* ist, oder ob sie auch in anderen Arten der Gattung *Aplysina* auftritt. Von den Schwämmen *A. cavernicola*, *A. fistularis* und *A. archeri* lag nur gefriergetrocknetes Material vor. Deshalb wurde zunächst für Gewebe von *A. aerophoba* ermittelt, ob eine Umsetzung der Isoxazolinalkaloide auch noch nach Gefriertrocknung stattfindet. Ausgehend von der Hypothese, dass es sich bei der Biotransformation um einen enzymatischen Prozess handelt, wurde dem gefriergetrockneten Schwammgewebe wieder Seewasser zugesetzt, um so die darin vorhandenen Enzyme zu reaktivieren. Abb. 3A-10 a) oben zeigt das HPLC – Chromatogramm des methanolischen Extraktes von gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe von *A. aerophoba*. Die Abbildung darunter zeigt den Extrakt der gleichen Schwammprobe nach Zugabe von Seewasser. Aus den Chromatogrammen wird deutlich, dass die Zugabe von Seewasser zu einem deutlichen Anstieg der Konzentrationen von Aeroplysinin-1 und Dienon und zu einem Absinken der Isoxazolinalkaloid – Konzentrationen geführt hat. Tab. 3A-4 gibt die quantifizierten Alkaloidgehalte vor und nach Seewasserzugabe in den Proben an.

Im Anschluss an diesen Versuch wurde ein entsprechendes Experiment mit Gewebeproben des mediterranen Schwammes *A. cavernicola* und der karibischen Schwämme *A. fistularis* und *A. archeri* durchgeführt. In allen untersuchten *Aplysina* – Schwämmen fand die Umsetzung der Isoxazolinalkaloide in die von Teeyapant & Proksch (1993) beschriebenen Biotransformationsprodukte statt (Abb. 3A-10 b und Abb. 3A-11).

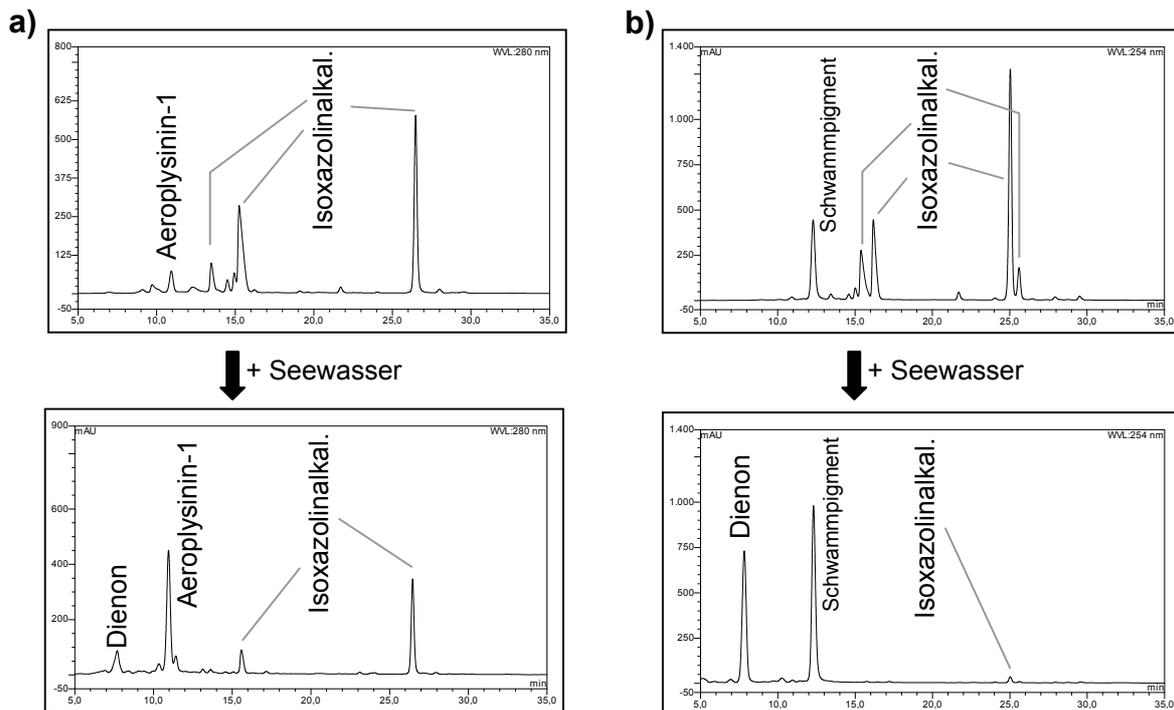


Abb. 3A-10 : Veränderungen im Alkaloidmuster in gefriergetrocknetem und gemörserterem Gewebe der mediterranen *Aplysina* – Schwämme [ a) *A. aerophoba*; b) *A. cavernicola* ] nach 24 h Inkubation in Seewasser. Die Chromatogramme vor und nach Seewasserzugabe sind jeweils einheitlich skaliert, um einen quantitativen Vergleich der Metaboliten – Zusammensetzungen zu ermöglichen.

Die Experimente wurden für jeden Schwamm jeweils in drei Parallelansätzen mit drei verschiedenen Individuen der Art durchgeführt (Tab. 3A-4; in den Abbildungen 3A-10 und -11 ist davon jeweils nur ein Ansatz exemplarisch dargestellt). Während in allen drei Proben von *A. aerophoba* sowohl Aeropylsinin-1 als auch Dienon entstanden waren, wurde in den jeweils drei Proben von *A. fistularis* und *A. cavernicola* nach Biotransformation fast nur das Dienon detektiert. In *A. archeri* gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben. In zwei der drei Proben war sowohl Aeropylsinin-1 als auch Dienon entstanden. Die dritte Probe (Abb. 3A-11 b) wies nach Zugabe von Seewasser Dienon in großen Mengen und die Isoxazolinalkaloide nur noch in sehr geringen Konzentrationen auf. Wie bei *A. cavernicola* und *A. fistularis* enthielt das Chromatogramm des Extraktes dieses *A. archeri* - Individuums nur einen kaum detektierbaren Peak des Aeropylsinin-1.

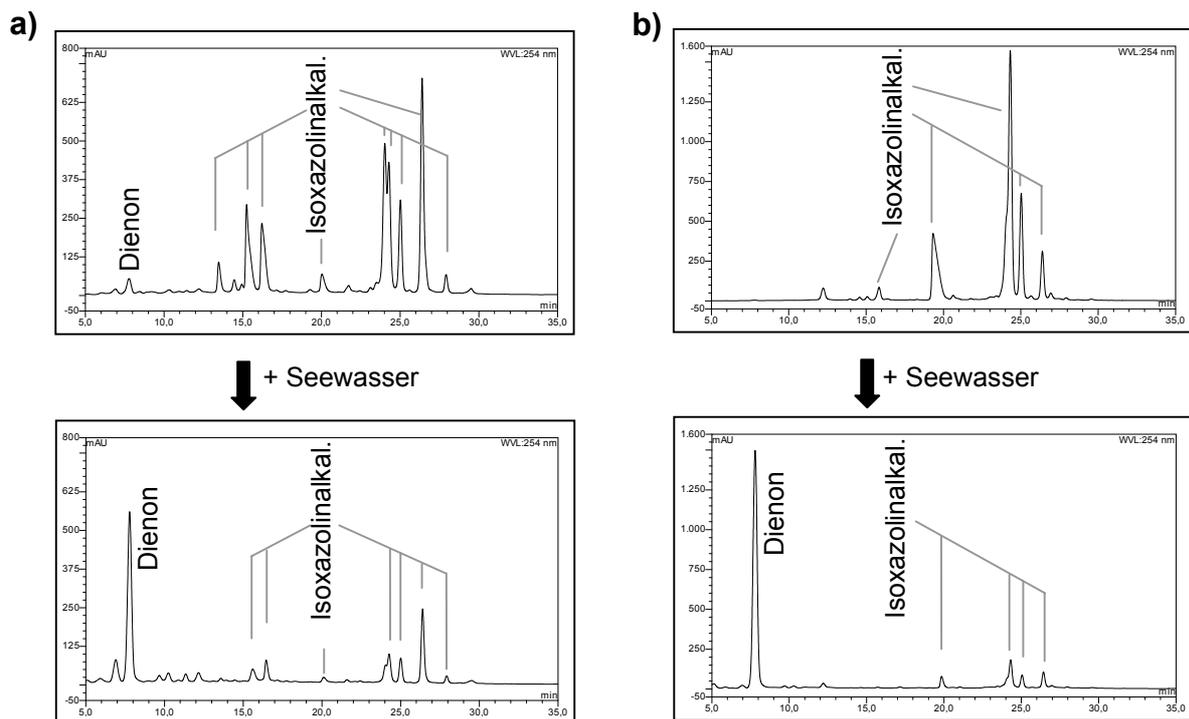


Abb. 3A-11.: Veränderungen im Alkaloidmuster in gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe der karibischer *Aplysina* – Schwämme [ a) *A. fistularis*; b) *A. archeri* ] nach 24h Inkubation in Seewasser. Die Chromatogramme vor und nach Seewasserzugabe sind jeweils einheitlich skaliert, um einen quantitativen Vergleich der Metaboliten – Zusammensetzungen zu ermöglichen

Tab. 3A-4: Metabolitengehalte [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  TG] in gefriergetrocknetem Gewebe von verschiedenen mediterranen und karibischen *Aplysina* – Arten vor und nach Zugabe von verdünntem Seewasser. Isoxazolinalkal. = Summe der Gehalte aller Isoxazolinalkaloide „Produkte“ = Summe der Gehalte von Aeroplysinin-1 und Dienon

Schwammart	Individuum (Probencode)	vor Zugabe von Seewasser		nach Zugabe von Seewasser	
		Isoxazolinalka.	„Produkte“	Isoxazolinalka.	„Produkte“
<i>A. aerophoba</i>	2/1/t0	184,7	26,7	43,1	150,3
	4/1/K	232,7	6,4	44,3	168,4
	4/3/K	214,9	7,9	72,8	45,1
<i>A. cavernicola</i>	OrgII	284,7	12,3	22,6	184,4
	OrgIII	223,3	9,4	11,9	128,8
	t0	115,1	10,9	2,4	78,3
<i>A. fistularis</i>	AK02	95,3	0,7	20,4	13,2
	AK44	67,0	2,5	6,9	23,9
	AK23	83,4	1,4	20,5	10,7
<i>A. archeri</i>	AK25	327,1	0,8	36,9	259,2
	AK46	173,8	11,7	90,0	133,2
	AK53	196,7	5,7	6,9	305,8

### 3A.2.4.2. Zeitverlauf der Biotransformation in Gewebe des Schwammes *A. cavernicola*

Exemplarisch wurde Gewebe des mediterranen Schwammes *A. cavernicola* verwendet um den Zeitverlauf der Alkaloidumsetzung in gefriergetrocknetem Material nach Zugabe von Seewasser zu untersuchen. Abb. 3A-12 zeigt den Verlauf innerhalb von 20 h nach Seewasserzugabe.

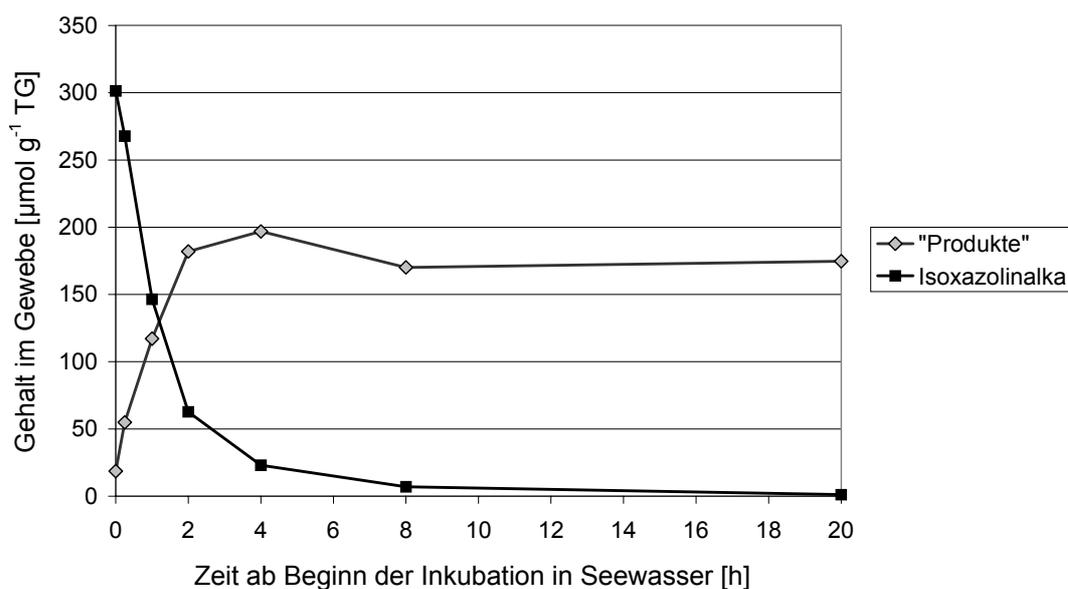


Abb. 3A-12: Zeitverlauf der Veränderungen in gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* nach Zugabe von verdünntem Seewasser.

Isoxazolinalka. = Summe der Gehalte aller Isoxazolinalkaloide  
 „Produkte“ = Summe der Gehalte an Aeroplysinin-1 und Dienon

### 3A.2.4.3 Hitzestabilität der Isoxazolinalkaloide von *A. cavernicola*

Um die thermische Stabilität der Isoxazolinalkaloide in *A. cavernicola* zu überprüfen, wurde ein getrockneter Methanolextrakt des Schwammgewebes mit Wasser versetzt und anschließend über 8 h auf 110 °C erhitzt. Nach Gefrier Trocknung wurde der Extrakt erneut in Methanol angelöst und mittels HPLC analysiert. Abb. 3A-13 zeigt die HPLC – Chromatogramme des Extraktes vor und nach der achtstündigen Hitzebehandlung.

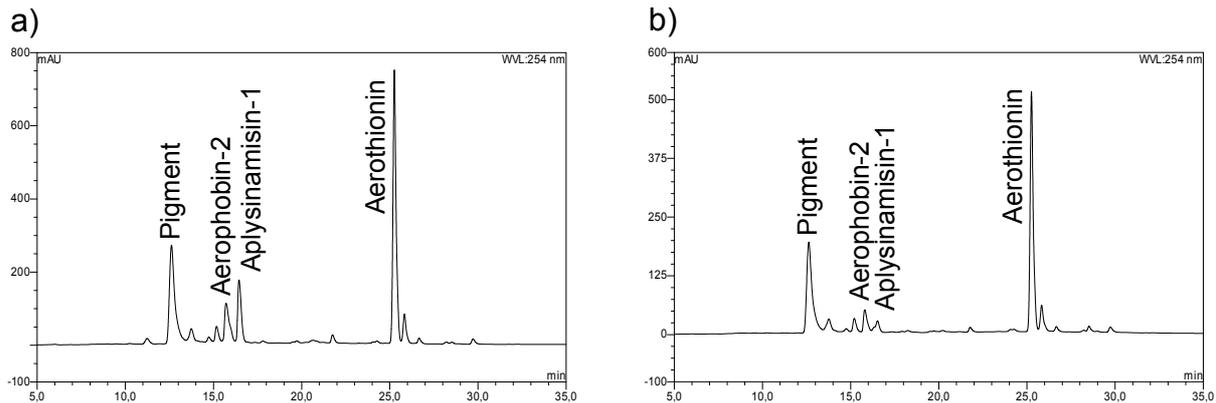


Abb. 3A-13: Hitzestabilität der *A. cavernicola* – Metabolite im Methanolextrakt:

- a) HPLC – Chromatogramm des Methanolextraktes vor dem Aufkochen
- b) HPLC – Chromatogramm des Methanolextraktes nach achtstündigem Kochen in Wasser

Die Zusammensetzung des Methanolextraktes von *A. cavernicola* hat sich durch die Hitzebehandlung nur wenig verändert. Die Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 waren in ihrem Gehalt zurückgegangen, der Peak des Aerothionins war jedoch weitgehend unverändert geblieben. Spaltprodukte der Isoxazolinalkaloide waren im HPLC – Chromatogramm des aufgekochten Extraktes nicht zu beobachten. Auch Aeroplysinin-1 und Dienon waren nicht entstanden.

#### 3A.2.4.4. Hemmung der Alkaloidmuster – Veränderungen durch Denaturierung der Enzyme im Schwammgewebe

Ausgehend von der Hypothese, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen im Alkaloidmuster der gefriergetrockneten Schwammgewebe um Enzymreaktionen handelt, wurde versucht die Enzyme in den Proben zu denaturieren um so die Reaktionen zu hemmen.

##### *Enzymhemmung durch Zugabe von Säure*

Im ersten Experiment dieser Reihe wurden zwei Proben von gefriergetrocknetem *A. cavernicola* – Gewebe mit 10%iger Trichloressigsäurelösung (hergestellt mit Seewasser) vermengt. Eine dritte Probe des gleichen Gewebes wurde mit Seewasser ohne Säure versetzt. Alle drei Proben wurden über 8 h im jeweiligen Medium inkubiert. Anschließend wurden sie bei -80 °C eingefroren, gefriergetrocknet und extrahiert. Im Extrakt der Proben wurden die Isoxazolinalkaloide sowie die

Biotransformationsprodukte quantifiziert. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 3A-14 im Vergleich mit dem Metabolitengehalt in gefriergetrocknetem Gewebe des gleichen Schwammes dargestellt.

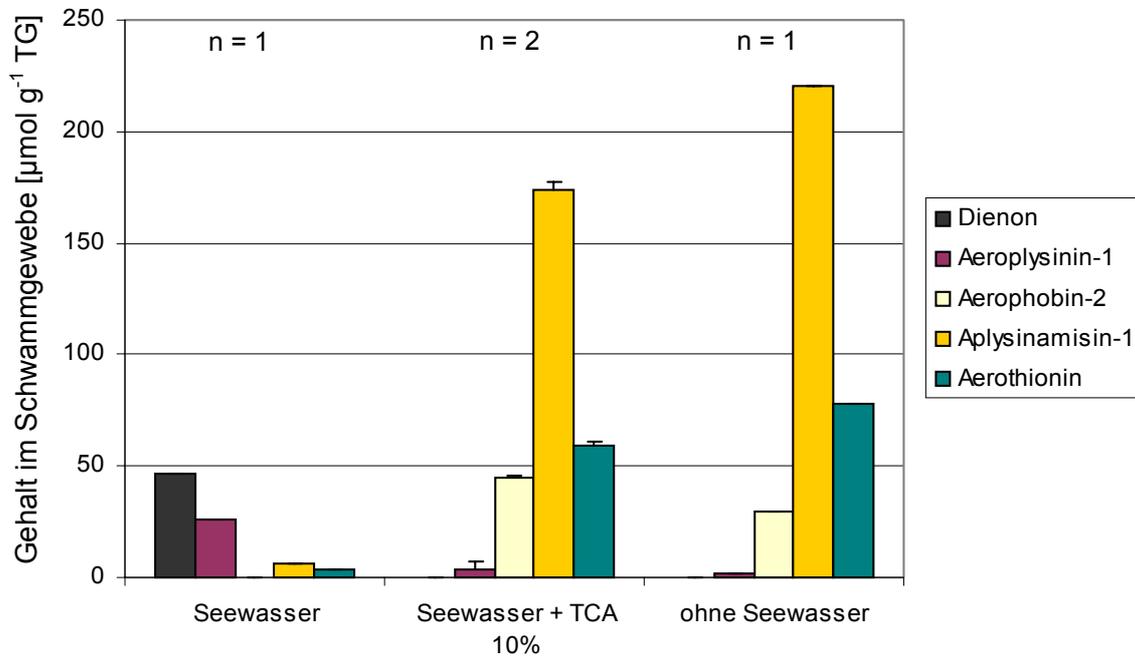


Abb. 3A-14: Einfluss von Säure auf die Alkaloidmuster – Veränderungen im gefriergetrockneten Gewebe von *A. cavernicola* nach achtstündiger Inkubation in Seewasser.

- „Seewasser“ = Zugabe von Seewasser bei Raumtemperatur
- „Seewasser + TCA 10%“ = Zugabe von 10 %iger Trichloressigsäurelösung (angesetzt mit Seewasser)
- „ohne Seewasser“ Ausgangszustand des Alkaloidmusters in gefriergetrocknetem Gewebe ohne Zugabe von Seewasser

Es wird deutlich, dass die zugegebene Trichloressigsäure die Transformationsreaktionen von den Isoxazolinalkaloiden zu Aeroplysinin-1 und Dienon stark gehemmt hat. Der Gehalt des Aeroplysinin-1 ist nur geringfügig gegenüber dem ursprünglichen Zustand („ohne Seewasser“) angestiegen. Dienon ist nicht entstanden. Die Gehalte der Isoxazolinalkaloide sind – im Vergleich mit dem Zustand nach Inkubation in Seewasser ohne Säure – weitgehend unverändert geblieben. Der Gehalt des Aerophobin-2 ist nach Säurezugabe etwas angestiegen.

#### *Enzymhemmung durch siebenminütiges Aufkochen des Schwammgewebes*

Im zweiten Experiment zur Enzymhemmung wurde eine Probe gefriergetrockneten Gewebes von *A. cavernicola* in kochendes Seewasser gegeben und anschließend

über 7 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde diese Probe über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurde eine Probe des gleichen Schwammgewebes ohne vorheriges Erhitzen über 24 h bei Raumtemperatur in Seewasser inkubiert. Die Proben wurden gefriergetrocknet und extrahiert. Anschließend wurden die Alkaloidgehalte in den Proben quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3A-15 im Vergleich mit einer nicht in Seewasser inkubierten Probe aus gefriergetrocknetem *A. cavernicola* – Gewebe dargestellt.

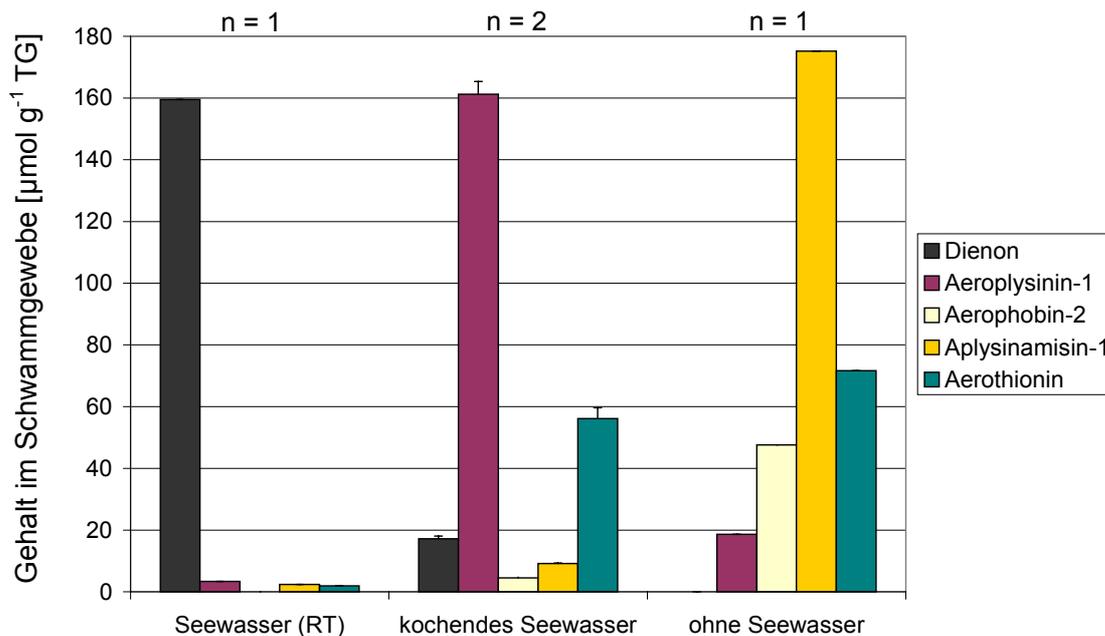


Abb. 3A-15: Alkaloidmuster – Veränderungen in gefriergetrocknetem, gemörsertem Gewebe von *A. cavernicola* nach Vermischung Seewasser.

- Seewasser (RT) = Zugabe von Seewasser bei Raumtemperatur zu Gewebe; Inkubation: 24h
- kochendes Seewasser = Zugabe von Gewebe zu kochendem Seewasser; 7 min gekocht; Inkubation bei Raumtemperatur: 24 h
- ohne Seewasser = Ausgangszustand des Alkaloidmusters in Gewebe ohne Seewasser

Während durch Zugabe von Seewasser bei Raumtemperatur zu *A. cavernicola* – Gewebe die Isoxazolinalkaloide darin nahezu vollständig umgesetzt worden waren, war nach Vermischung des Gewebes mit kochendem Seewasser ein Teil unverändert erhalten geblieben. Die Transformationsreaktionen beschränkten sich im letzteren Fall im Wesentlichen auf die polareren Alkaloide Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1. Die Konzentration des Aerothionins war nur geringfügig gesunken. Anders, als bei der Reaktion ohne voriges Aufkochen des Gewebes war nach siebenminütigem Kochen des Gewebes und anschließender 24stündiger Inkubation in Seewasser bei Raumtemperatur nur wenig Dienon, dafür aber viel Aeroplysinin-1 entstanden (Abb.3A-15).

### Enzymhemmung durch achtstündiges Aufkochen des Schwammgewebes

Im dritten Experiment zur Enzymhemmung wurden drei Proben von gefriergetrocknetem *A. cavernicola* – Material über 8 h in Seewasser gekocht. Anschließend wurde das Gewebe gefriergetrocknet und extrahiert. Abb. 3A-16 zeigt das Ergebnis der HPLC – Analyse einer dieser Proben im Vergleich mit einer Probe des selben Gewebes, das über 8 h in Seewasser bei Raumtemperatur inkubiert worden war.

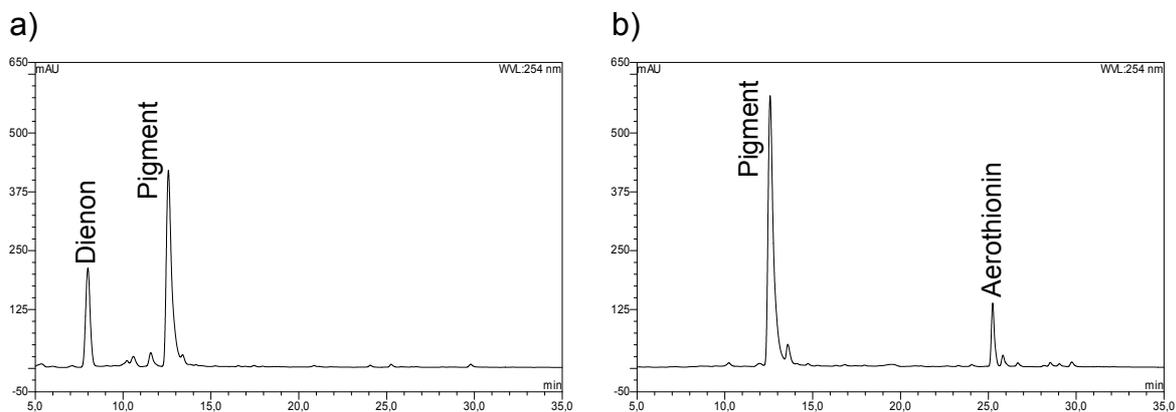


Abb. 3A-16: Einfluß von Hitze auf das Metabolitenmuster in gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* nach achtstündiger Inkubation in Seewasser.

- c) HPLC – Chromatogramm des Extraktes aus dem Schwammgewebe nach achtstündiger Inkubation in Seewasser bei Raumtemperatur.
- d) HPLC – Spektrum des Extraktes aus dem Schwammgewebe nach achtstündiger Inkubation in kochendem Seewasser. Die Abbildung zeigt exemplarisch eines der drei gleichen Ansätze, die zu nahezu identischen Ergebnissen geführt hatten.

Nach achtstündiger Inkubation des *A. cavernicola* – Gewebes in Seewasser bei Raumtemperatur waren die Isoxazolinalkaloide vollständig zu Dienon umgesetzt worden. Dagegen konnte im HPLC – Chromatogramm des Extraktes aus Schwammgewebe, das über 8 h aufgekocht worden war, keines der beiden Biotransformationsprodukte Aeroplysinin-1 und Dienon detektiert werden. Stattdessen war das Signal des Aerothionins noch deutlich zu erkennen. Die Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 lagen jedoch auch hierin nicht mehr vor.

### 3A.2.5. Kontrollexperimente zur Transformation von Isoxazolinalkaloiden aus *A. aerophoba* in anderen Schwämmen und in *Tylodina perversa*

#### 3A.2.5.1. Biotransformation von *A. aerophoba* – Alkaloiden in Gewebe von *A. archeri*

In Versuch 3A.2.4.1 waren in einer Probe des Schwammes *A. archeri* die Isoxazolinalkaloide nach Zugabe von Seewasser nahezu vollständig zu Dienon umgesetzt worden. Aeroplysinin-1, das nach Teeyapant & Proksch (2003) eine Zwischenstufe im Abbau der Isoxazolinalkaloide zu Dienon darstellt, war nur in kaum detektierbaren Konzentrationen entstanden. Zu gefriergetrocknetem und anschließend gemörsertem Gewebe dieses Schwammes wurde deshalb aus *A. aerophoba* isoliertes Aeroplysinin-1 hinzu gegeben. Durch Zugabe von Seewasser zu diesem Gemisch sollte nun ermittelt werden, ob der künstlich hinzugefügte Metabolit ebenfalls zu Dienon transformiert wird. Abb. 3A-17 a) zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Nach Zugabe des Seewassers zum Schwammgewebe findet sich im Extrakt ausschließlich das Dienon.

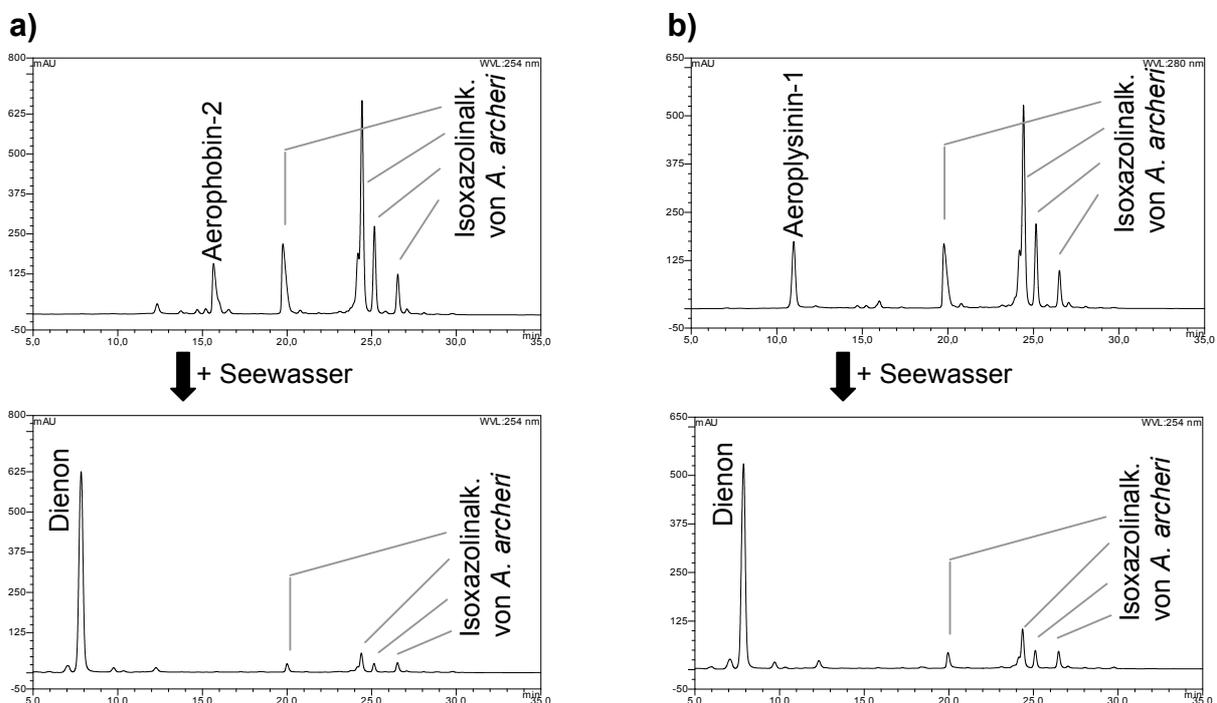


Abb. 3A-17.: Umsetzung von *A. aerophoba* – Alkaloiden im Gewebe von *A. archeri*.

Spalte a) *A. archeri* - Gewebe nach Zugabe Aerophobin-2; Spalte b) *A. archeri* – Gewebe nach Zugabe von Aeroplysinin-1.

obere Reihe: gefriergetrocknetes Gewebe; untere Reihe: gefriergetrocknetes Gewebe nach 24 h Inkubation in Seewasser. Die Chromatogramme vor und nach Seewasserzugabe sind jeweils einheitlich skaliert, um einen quantitativen Vergleich der Metaboliten – Zusammensetzungen zu ermöglichen.

Der Extrakt von *A. archeri* eignete sich auch gut für ein entsprechendes Experiment mit Aerophobin-2, da dieser Metabolit nicht, oder nur in sehr geringen Konzentrationen, in *A. archeri* vorkommt. Ein Abbau des künstlich zum Schwammgewebe hinzugefügten Metaboliten kann deshalb gut beobachtet werden. Aerophobin-2 wurde gefriergetrocknetem und gemörserten Gewebe von *A. archeri* hinzugegeben. Nach Vermischung mit Seewasser wurden die schwammeigenen Isoxazolinalkaloide sowie das künstlich hinzugefügte Aerophobin-2 vollständig zu Dienon umgesetzt (Abb.3A-17 b).

#### 3A.2.5.2. Kontrollexperimente mit Gewebe des Schwammes *Crambe crambe*

Die zuvor beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass es nach mechanischer Beschädigung des Gewebes in allen getesteten *Aplysina* – Schwämmen zu einer Biotransformation der darin enthaltenen Isoxazolinalkaloide in die typischen Biotransformationsprodukte Aeroplysinin-1 und/oder Dienon kommt. Darüber hinaus waren auch künstlich zu Gewebe von *A. archeri* hinzugegebene Isoxazolinalkaloide umgesetzt worden. Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die beobachtete Transformation der Isoxazolinalkaloide auch in anderen marinen Invertebraten abläuft.

Hierzu wurde die Vorgehensweise der in den Abschnitten 3A.2.3.1 und 3A.2.4.1. beschriebenen Versuche wiederholt. Jedoch wurden die Experimente nicht, wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, mit Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen, sondern mit Gewebe des Schwammes *Crambe crambe* durchgeführt, dem die aus *A. aerophoba* isolierten Alkaloide Aeroplysinin-1, Aerophobin-2 und Isofistularin-3 hinzugegeben worden waren. Im ersten Versuch wurden die *A. aerophoba* – Metabolite einzeln frischen Gewebestücken von *C. crambe* hinzugegeben. Wie in dem in Abschnitt 3A.2.3.1 beschriebenen Experiment wurden die auf diese Weise behandelten Schwammstücke jeweils über 5 min gemörsert. Im Anschluss daran wurde der Extrakt des Schwammes mittels HPLC analysiert. Die zugesetzten Metabolite waren von dem mechanischen Aufschluss des Gewebes unbeeinflusst geblieben und noch in unveränderter Weise vorhanden (Abb. 3A-18). Der zweite Versuchsansatz entsprach der in Abschnitt 3A.2.4.1. beschriebenen Vorgehensweise. Zu gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe von *C. crambe*

wurden die *A. aerophoba* – Metabolite einzeln hinzugegeben. Die Proben wurden jeweils mit Seewasser versetzt und anschließend vor Extraktion wieder gefriergetrocknet. Auch in den Extrakten dieser Proben ließ sich keine Umwandlung der zugesetzten *A. aerophoba* – Metabolite erkennen (Abb. 3A-18).

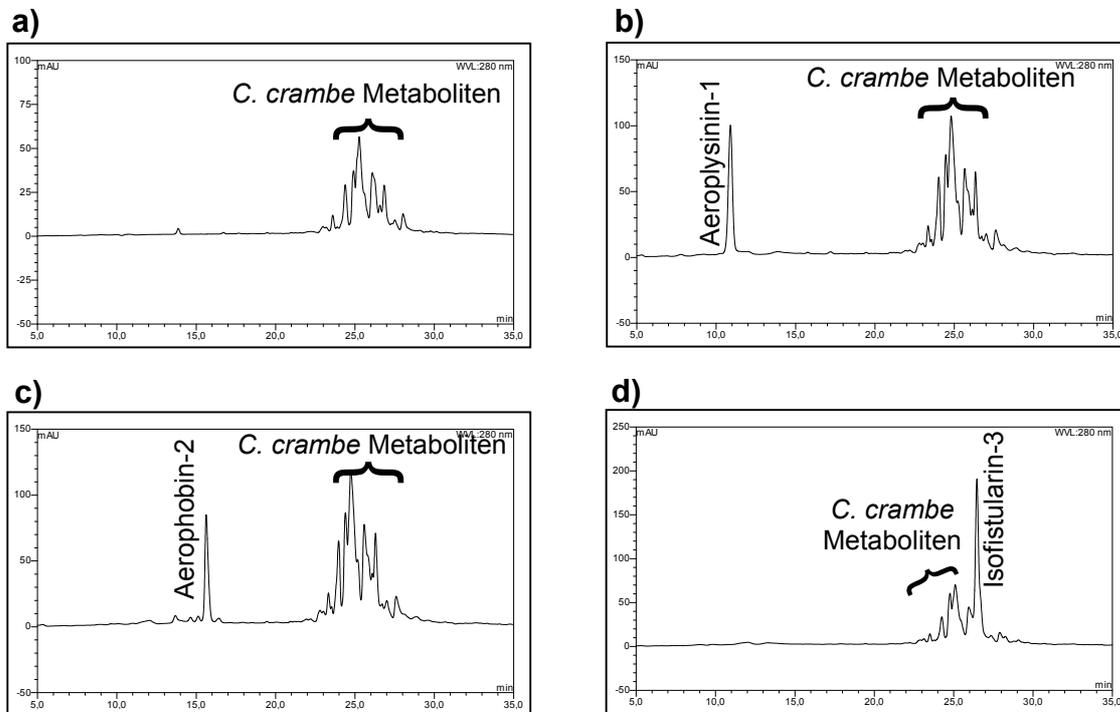


Abb.3A-18: Ergebnisse der Kontroll – Experimente mit Gewebe von *C. crambe* nach Zugabe von *A. aerophoba* – Metabolite. In beiden Fällen waren die zugesetzten Metabolite nach Behandlung des Gewebes unverändert erhalten geblieben. Die Ergebnisse beider Experimente sind identisch und deshalb nur einmal exemplarisch dargestellt.

a) HPLC – Chromatogramm des Rohextraktes von *C. crambe*.

b) – d) unveränderte *A. aerophoba* – Metabolite im Schwamm *C. crambe* nach Behandlung des Gewebes durch Mörsern (frisches Gewebe) bzw. durch 24 h Inkubation in Seewasser (gefriergetrocknetes Gewebe).

### 3A.2.5.3. Untersuchung zu Veränderungen des Alkaloidmusters im Gewebe von *Tylodina perversa*

Die Meeresschnecke *Tylodina perversa* ernährt sich ausschließlich von *Aplysina* – Schwämmen. Sie lagert dabei deren Isoxazolinalkaloide in ihrem eigenen Gewebe ein. Besonders hohe Konzentrationen befinden sich in ihrem Mantel (siehe Abschnitt 3B.2.2.). Das Mantelgewebe von *T. perversa* eignete sich deshalb besonders gut für Kontrollexperimente zum Verhalten von *Aplysina* – Alkaloiden in einem Organismus,

der diese Metabolite zwar in natürlicher Weise besitzt, jedoch nicht der Gruppe der *Aplysina* – Schwämme angehört.

In gleicher Weise, wie bei den Experimenten mit den *Aplysina* – Schwämmen durchgeführt (Abschnitt 3A.2.4.), wurde gefriergetrocknetem und gemörsertem Mantelgewebe der Schnecke Seewasser zugesetzt. Es zeigten sich keine Veränderungen im Alkaloidmuster des Schneckengewebes in Folge dieser Behandlung. Das HPLC - Chromatogramm des Methanolextraktes dieser Probe wies die gleichen Charakteristika auf, die in Schneckenproben ohne zusätzliche Seewasserzugabe aufgefunden worden waren (Abb. 3A-19).

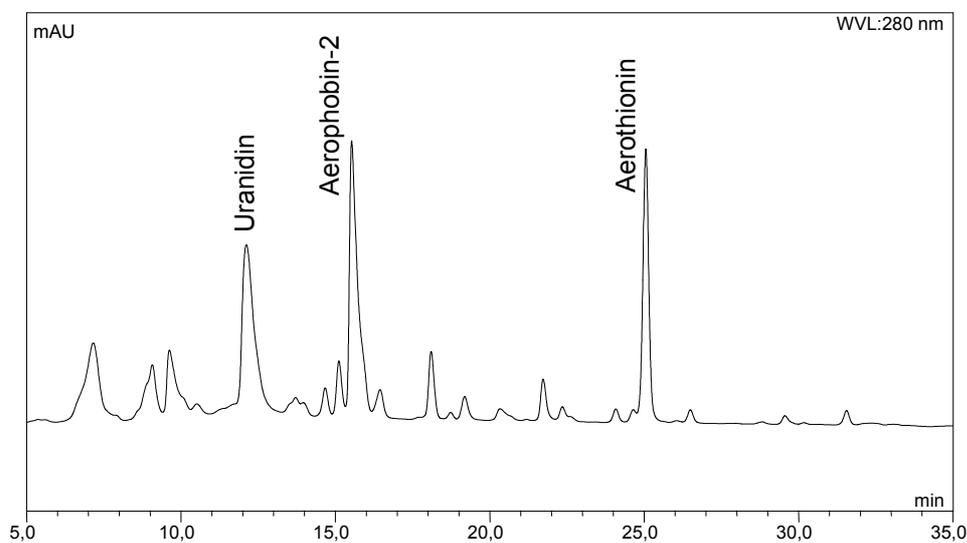


Abb. 3A-19: HPLC – Chromatogramm des Extraktes aus Mantelgewebe von *Tyrodina perversa*. Das gefriergetrocknete und gemörserte Gewebe war 24 h in Seewasser inkubiert worden, bevor es erneut gefriergetrocknet und anschließend extrahiert wurde. Eine Umwandlung der im Gewebe auftretenden Isoxazolinalkaloide wurde aufgrund dieser Behandlung nicht beobachtet.

### 3B. *Aplysina* – Alkaloide in der Meeresschnecke *Tylodina perversa*

#### 3B.1. Wahlfraßversuch

In einem Wahlversuch waren fünf Schnecken getrennt voneinander jeweils mit den zwei *Aplysina* – Schwämmen *A. aerophoba* und *A. cavernicola* und mit einem Schwamm der Gattung *Axinella* in ein Becken gesetzt worden. Anschließend wurde ihr Verhalten beobachtet. Sobald eine Schnecke vollständig auf einen der zur Verfügung stehenden Schwämme gekrochen war, wurde sie in ihre Ausgangsposition zurückgesetzt und ihre Wahl notiert. Die Schnecken zeigten bei der Wahl der Schwämme eine deutliche Präferenz für die *Aplysina* – Arten (Abb. 3B-1). In 44 der insgesamt 48 Versuchsdurchgänge (91,7%) krochen sie entweder auf *A. aerophoba* oder auf *A. cavernicola*. Zwischen den beiden *Aplysina* – Arten zeigten sie jedoch keine erkennbaren Präferenzen: Insgesamt krochen die Schnecken im Verlauf der Experimente 23 mal auf *A. aerophoba* (47,9%) und 21 mal auf *A. cavernicola* (43,8%).

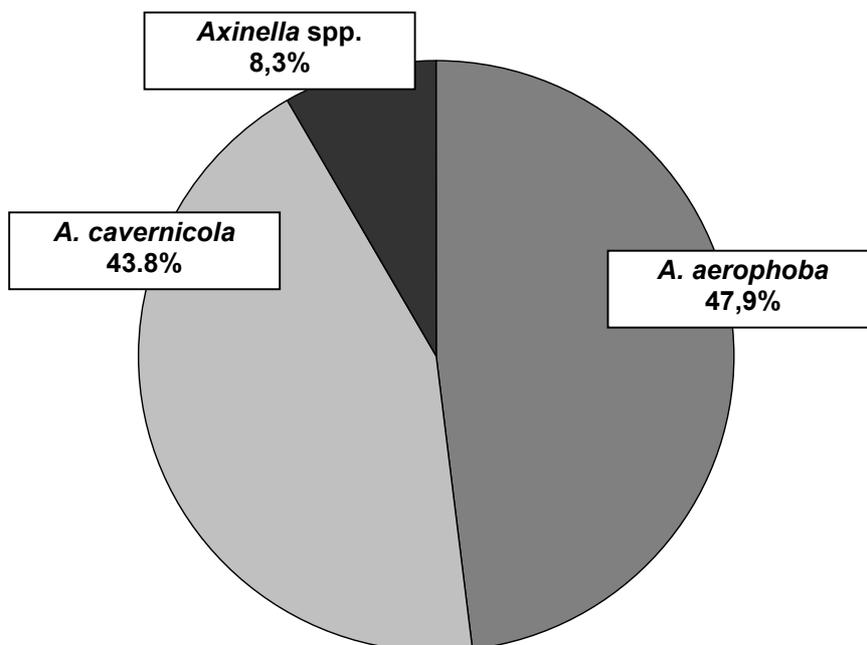


Abb. 3B-1: Ergebnis des Wahlfraßexperimentes mit *Tylodina perversa* nach 48 Versuchsdurchgängen.

## 3B.2. Langzeitfraßversuch mit den Nahrungsschwämmen *A. aerophoba* und *A. cavernicola*

### 3B.2.1. Alkaloidgehalte der Nahrungsschwämme

Die Schwämme *A. aerophoba* und *A. cavernicola* waren bei Banylus-sur-mer bzw. bei Marseille in Südfrankreich gesammelt worden und hatten während der Langzeitfraßversuche den Schnecken als Nahrung gedient. Im Verlauf der Experimente und nach deren Beendigung wurden Proben dieser Schwämme genommen und mittels HPLC analysiert (Abb. 3B-2 und 3B-5). Die in den Fraßversuchen verwendeten Individuen wiesen dabei Alkaloidmuster auf, wie sie auch in früheren Arbeiten (z.B. Ebel *et al.* 1997; Thoms 2000) und im Rahmen des Verpflanzungsexperimentes (Abb. 3C-2) in direkt aus dem Freiland beprobten Schwämmen der jeweiligen Arten gefunden worden waren.

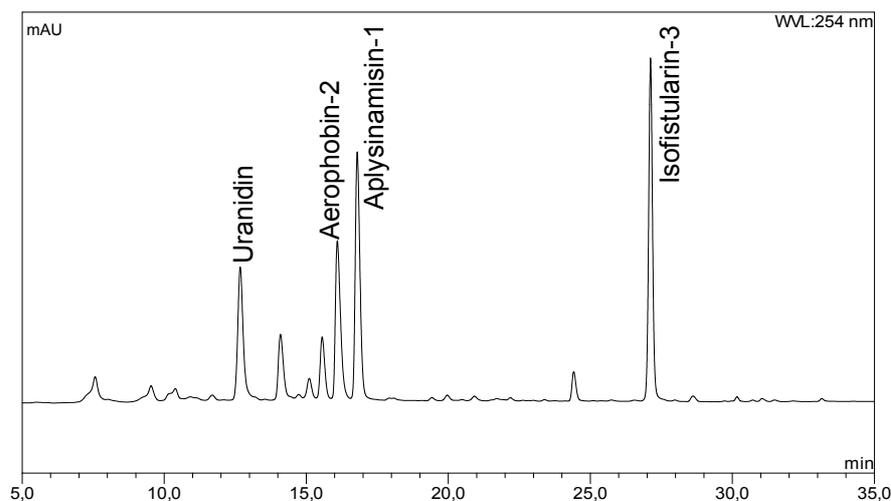


Abb. 3B-2: HPLC – Chromatogramm des Extraktes eines im Langzeitfütterungsversuch mit *T. perversa* verwendeten *A. aerophoba* – Schwammes.

*A. aerophoba* zeichnete sich durch einen hohen Anteil an Aplysinamsin-1 aus ( $67,2 \pm 17,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG). Daneben lagen die Isoxazolinalkaloide Isofistularin-3 ( $29,2 \pm 6,6 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) und Aerophobin-2 ( $18,5 \pm 5,2 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) in hohen Konzentrationen vor (Abb. 3B-3). Auch Reste des Schwammpigmentes Uranidin wurden in den HPLC – Chromatogrammen der Proben von *A. aerophoba* detektiert (Abb. 3B-2). Da dieses Pigment an der Luft sehr schnell polymerisiert, war nach der Herstellung der HPLC – Proben jedoch nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Konzentration des

Metaboliten in den Proben vorhanden. Deshalb wurde Uranidin im Schwammgewebe nicht quantifiziert. Aerothionin wurde in keinem der drei untersuchten *A. aerophoba* – Schwämme gefunden.

Alle drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experimentes genommenen Proben von *A. aerophoba* zeigten eine ähnliche Zusammensetzung an Alkaloiden (Abb. 3B-4). Es hatten sich keine nennenswerten Veränderungen im Alkaloidmuster dieser Schwämme durch die Haltung im Aquarium und den Fraß durch *T. perversa* ergeben.

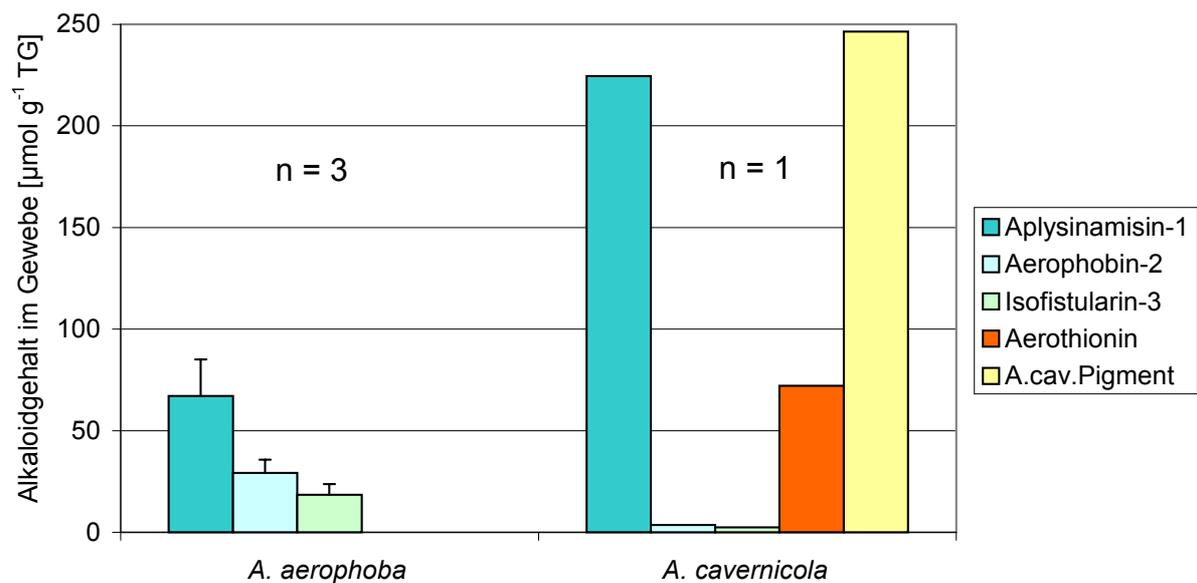


Abb. 3B-3: Vergleich der Alkaloidmuster der beiden *Aplysina* – Schwammarten, die den Schnecken im Langzeitfütterungsversuch als Nahrung dienten. Neben den bromierten Alkaloiden wurde auch die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure (A.cav.Pigment) quantifiziert. Die für *A. aerophoba* angegebenen Werte sind Mittelwerte der in Abb. 3B-2 dargestellten Daten.

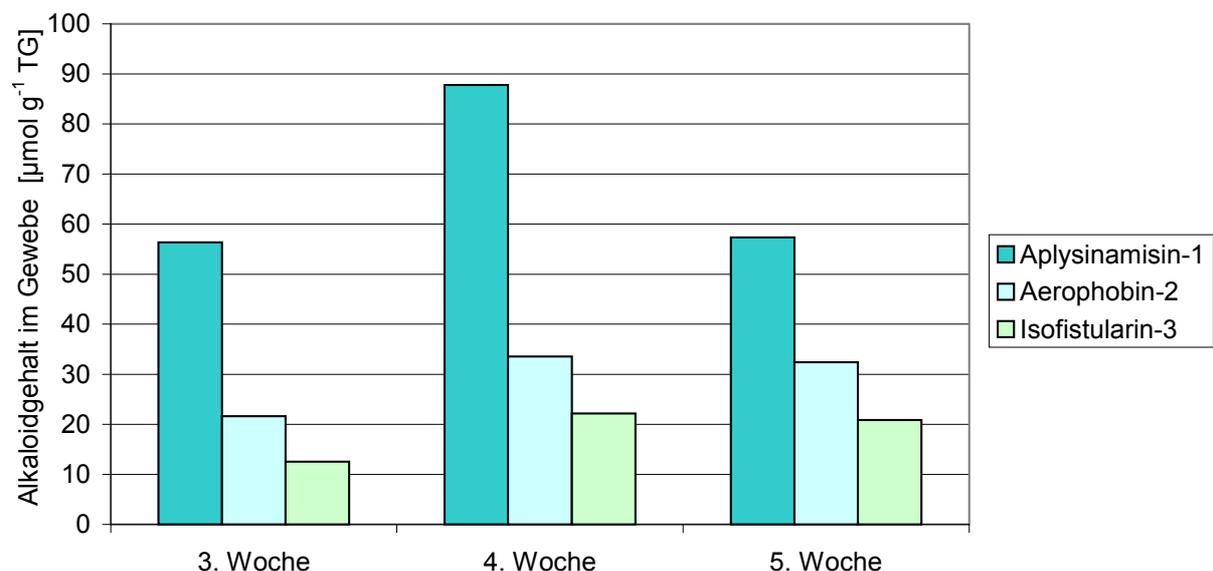


Abb. 3B-4: Ergebnis der HPLC – Analyse von drei *A. aerophoba* – Schwämmen, die fünf Individuen von *T. perversa* während des fünföchigen Fütterungsversuches als Nahrung gedient hatten. Die Proben wurden zu drei Zeitpunkten nach Beginn des Experimentes genommen.

Auch in der Probe, die nach dem Langzeitfraßversuch vom Nahrungsschwamm *A. cavernicola* entnommen worden war, machte Aplysinaminis-1 einen hohen Anteil aus (3B-5). Der absolute Gehalt dieses Metaboliten in *A. cavernicola* ( $224,5 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) lag dabei allerdings deutlich über dem in den *A. aerophoba* – Proben (3B-3). Daneben dominierten im Extrakt von *A. cavernicola* Aerothionin ( $72,1 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) und das Pigment 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure ( $264,4 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG).

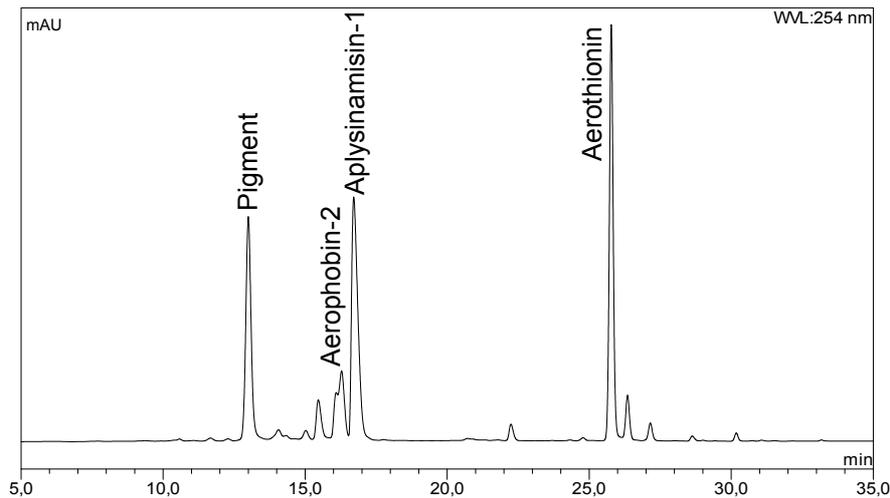


Abb. 3B-5: HPLC – Chromatogramm des Extraktes eines im Langzeitfütterungsversuch mit *T. perversa* verwendeten *A. cavernicola* – Schwammes.

### 3B.2.2. Alkaloidgehalte in den Schneckengeweben

Aus den Schnecken waren nach den Experimenten die Organe des Verdauungstraktes, die Mitteldarmdrüsen, die Gonaden und die Mäntel heraus präpariert worden. Alle diese Organe wurden daraufhin getrennt extrahiert und ihr Alkaloidmuster mittels HPLC analysiert.

Die bearbeiteten Schnecken wurden in vier Gruppen eingeteilt. Die **Gruppe 10** umfasste drei Schnecken, die direkt nach der Sammlung aus dem Meer sezirt worden waren. In **Gruppe 1** wurden drei Schnecken zusammengefasst, die über fünf Wochen ausschließlich von *A. aerophoba* gefressen hatten. **Gruppe 2** bestand aus drei Schnecken, die zunächst über zwei Wochen in einem Aquarium mit *A. aerophoba*, dann über zwei Wochen in einem Aquarium mit *A. cavernicola* gehalten worden waren. Schnecken der **Gruppe 3** (zwei Individuen) waren, nachdem sie unter kontrollierten Bedingungen über fünf Wochen auf *A. aerophoba* gelebt hatten, über zwei Wochen ohne Nahrung gehalten worden, bevor sie sezirt wurden.

Die Analyse der Verdauungstrakte der Schnecken aller Gruppen ergab stark schwankende Werte, je nachdem, ob eine größere oder eine kleinere Menge des Darminhaltes mit extrahiert wurde. Wurde ausschließlich Schneckengewebe des Verdauungstraktes extrahiert, fanden sich kaum Signale von Alkaloiden in den HPLC – Chromatogrammen der Extrakte. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen der Schwammalkaloide im Verdauungstrakt nicht in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

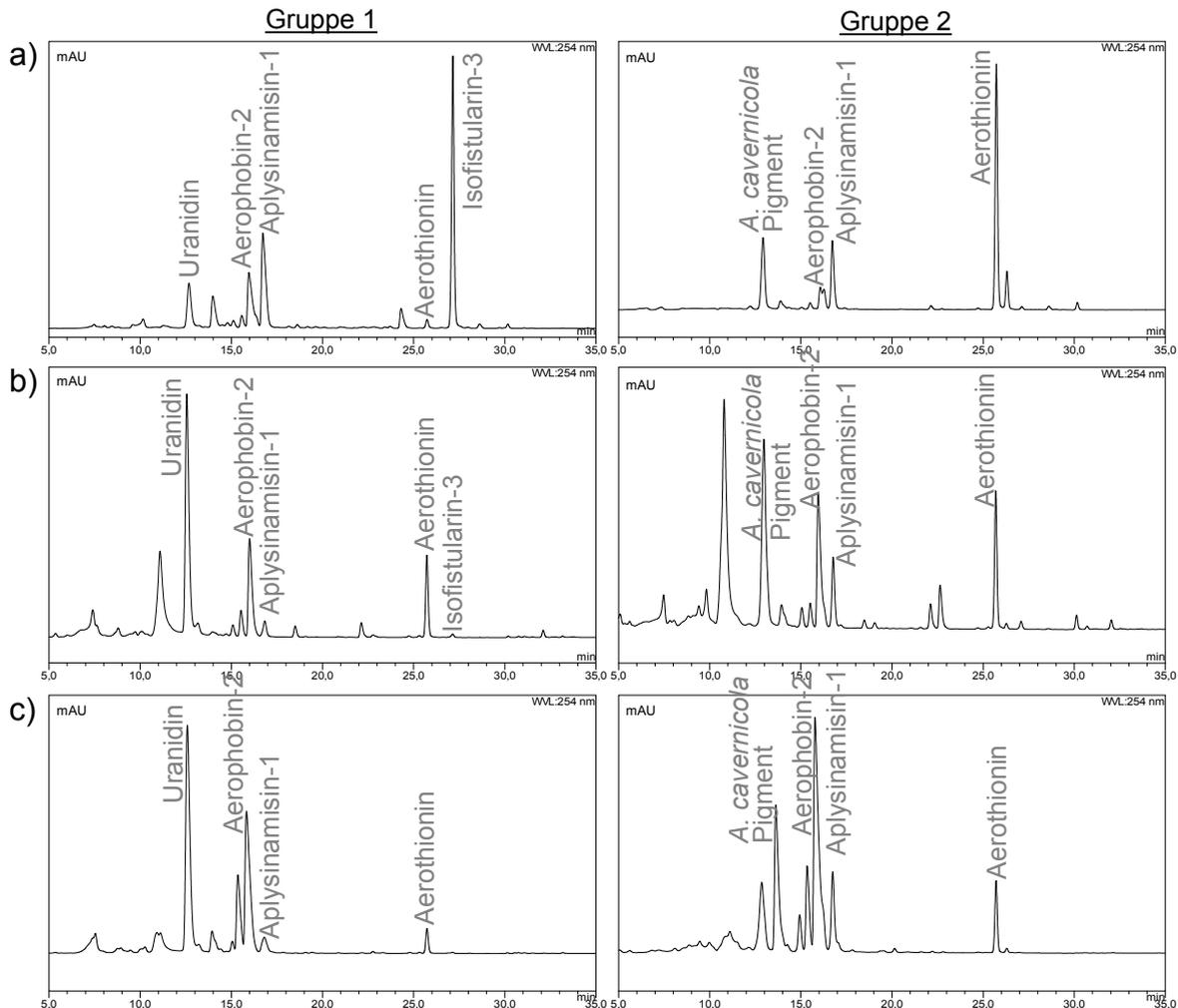


Abb. 3B-6: Beispiele von HPLC – Chromatogrammen der Extrakte aus Geweben von *T. perversa* aus den Langzeitfraßversuchen.

Gruppe 1 (linke Spalte): Schnecke, die über fünf Wochen von *A. aerophoba* gefressen hatte.

Gruppe 2 (rechte Spalte): Schnecke, die über zwei Wochen von *A. cavernicola* gefressen hatte.

Zeilen: a) Mitteldarmdrüse; b) Mantel; c) Laich

Auch in den Gonaden der Schnecken fanden sich nur sehr geringe Konzentrationen der bromierten Alkaloide. Darüber hinaus konnte das Gonadengewebe nur schwer von dem umliegenden Mantelgewebe abgetrennt werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die bromierten Alkaloide, die in diesen Proben gefunden

wurden, eher von Resten anhängenden Mantelgewebes stammten, als tatsächlich aus dem Gonadengewebe. Aus diesem Grund wurden auch diese Proben nicht in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

Im Mitteldarmdrüsen- und Mantelgewebe von *T. perversa* wurden dagegen hohe Konzentrationen der Schwammalkaloide aufgefunden (Abb. 3B-6; Tab. 3B-1). Daneben wies auch der Laich der Schnecken hohe Gehalte an diesen Metaboliten auf. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zu Veränderungen der Alkaloidmuster in *T. perversa* als Folge von Veränderungen in der Nahrung der Schnecken anhand dieser Gewebetypen durchgeführt.

In den Methanol – Extrakten der Schneckenproben dominierten die Isoxazolinalkaloide Isofistularin-3, Aerophobin-2, Aplysinamisin-1 und Aerothionin sowie die Pigmente der Schwämme. Wie bereits in Abschnitt 3B.2.1. beschrieben, war jedoch das Pigment des Schwammes *A. aerophoba* aufgrund seiner Instabilität bei der Bearbeitung nicht quantifizierbar. Damit war nur in den Schnecken, die von *A. cavernicola* gefressen hatten (Gruppe 2), Schwammpigment quantifizierbar. Um die Ergebnisse der Gruppe 2 – Schnecken mit denen der anderen Gruppen vergleichbar zu machen, wurde deshalb der „Gesamtalkaloidgehalt“ in den Geweben ausschließlich als Summe der aufgezählten Isoxazolinalkaloide definiert (Tab. 3B-1). Die Schwammpigmente wurden hierbei nicht mit einbezogen. Der Gehalt des *A. cavernicola* – Pigmentes 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure ist jedoch im Text und in den Abbildungen zu Gruppe 2 mit aufgeführt.

Tab. 3B-1: Gesamtalkaloidgehalte in den Geweben der Schnecken des Langzeitfütterungsversuches. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1 g Trockengewicht des Schneckenmaterials.

	Mitteldarmdrüsen	Mäntel	Laich
Gruppe t0 (n = 3)	90,2 ± 14,2 µmol	29,4 ± 21,4 µmol	16,5 ± 6,1 µmol (n = 3)
Gruppe 1 (n = 3)	110,5 ± 36,5 µmol	13,1 ± 7,7 µmol	15,2 ± 3,6 µmol (n = 2)
Gruppe 2 (n = 3)	38,0 ± 21,7 µmol	11,9 ± 6,5 µmol	22,8 µmol (n = 1)
Gruppe 3 (n = 2)	0,6 ± 0,2 µmol	25,1 ± 0,2 µmol	nicht vorhanden

In den Mitteldarmdrüsen der Schnecken der **Gruppe t0** dominierte, ähnlich wie in den Schwämmen selbst, der Schwammmetabolit Aplysinamisin-1 mit  $53,5 \pm 15,0 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG (Abb. 3B-7). Darüber hinaus lagen hohe Konzentrationen von Aerophobin-2 ( $21,6 \pm 2,6 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) und Isofistularin-3 ( $15,1 \pm 1,8 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) vor.

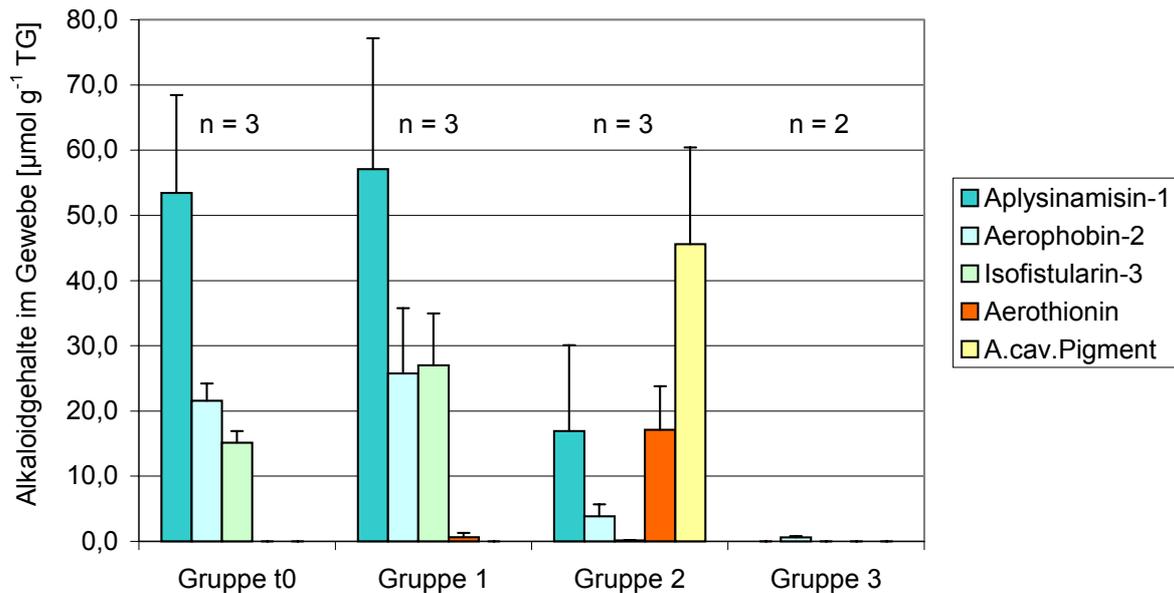


Abb. 3B-7: Alkaloidgehalte in den Mitteldarmdrüsen der Schnecken aus dem Langzeitfütterungsexperiment.

Eine ähnliche relative Verteilung der Alkaloide wie in den Mitteldarmdrüsen zeigte sich auch in den Mänteln der Schnecken der Gruppe t0 (3B-8). Auch hier erwies sich das Aplysinaminin-1 ( $21,2 \pm 16,8 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) als der dominante Metabolit, gefolgt von Aerophobin-2 ( $8,2 \pm 4,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG). Das Isoxazolinalkaloid Isofistularin-3 wurde nicht detektiert. Der Gesamtalkaloidgehalt in den Mänteln ( $29,4 \pm 21,4 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) war deutlich geringer als der in den Mitteldarmdrüsen (Tab. 3B-1).

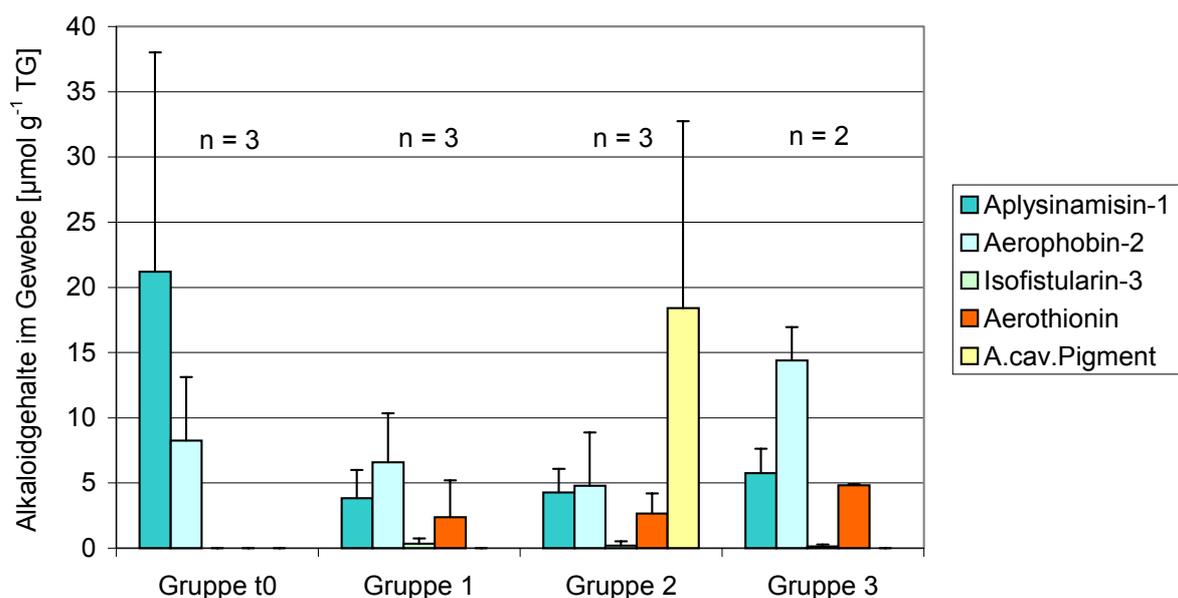


Abb.3B-8: Alkaloidgehalte in den Mänteln der Schnecken aus dem Langzeitfütterungsexperiment.

Deutliche Unterschiede in der Verteilung der bromierten Alkaloide zeigte dagegen der Laich der t0-Schnecken (Abb. 3B-9): hier dominierte Aerophobin-2, das mit  $11,9 \pm 7,4 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG trotz des geringeren Gesamtalkaloidgehaltes des Laiches (Tab. 3B-1), sogar eine höhere Konzentration als im Mantelgewebe hatte (Abb. 3B-8). Aplysinamisin-1 dagegen war nur in einem Gehalt von  $4,0 \pm 1,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG vorhanden. Daneben traten im Laich Isofistularin-3 ( $0,1 \pm 0,0 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) und der *A. cavernicola* – Metabolit Aerothionin ( $0,6 \pm 0,5 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) auf.

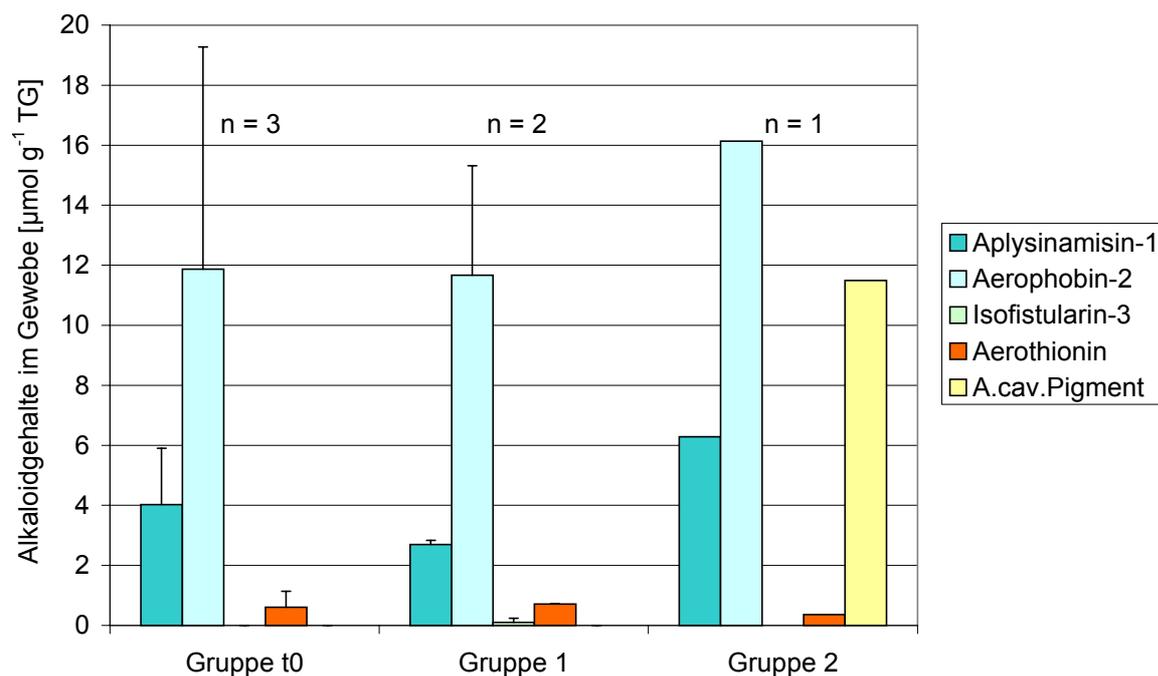


Abb. 3B-9: Alkaloidgehalte im Laich der Schnecken aus dem Langzeitfütterungsexperiment.

Wie in den Schnecken der Gruppe t0 hatte das Aplysinamisin-1 in den Mitteldarmdrüsen der **Gruppe 1** – Schnecken einen hohen Anteil mit einem Gehalt von  $57,1 \pm 20,1 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG (Abb. 3B-7). Jedoch nahm Isofistularin-3 mit einem Wert von  $27,0 \pm 7,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG den zweithöchsten Wert ein, während Aerophobin-2 nur einen Gehalt von  $25,7 \pm 10,0 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG hatte. Während weder im Nahrungsschwamm *A. aerophoba* (Abb. 3B-2 und 3B-3) noch in den Mitteldarmdrüsen (Abb. 3B-7) der t0-Schnecken Aerothionin detektiert worden war, konnten in den Mitteldarmdrüsen der Gruppe 1 – Schnecken zweifelsfrei kleinere Mengen ( $0,7 \pm 0,6 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG) dieses Metaboliten gefunden werden (Abb. 3B-7). Der Gesamtalkaloidgehalt lag bei  $110,5 \pm 36,5 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG und nahm damit den höchsten Wert sämtlicher untersuchter Gewebe in allen Gruppen des Experimentes ein (Tab. 3B-1).

Auch die Mäntel der Schnecken der Gruppe 1 wiesen Aerothionin auf ( $2,4 \pm 2,8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) (Abb. 3B-8). Dominiert wurde der Extrakt der Mäntel, anders als bei den Schnecken der Gruppe t0, durch Aerophobin-2 ( $6,6 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ). Aplysinamsin-1 lag dagegen nur in einer Konzentration von  $3,8 \pm 2,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  vor. Geringe Mengen an Isofistularin-3 ( $0,3 \pm 0,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) wurden ebenfalls detektiert. Anders als in den Mitteldarmdrüsen lag der Gesamtalkaloidgehalt in den Mänteln der Schnecken der Gruppe 1 mit  $13,1 \pm 7,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  deutlich unter dem Wert der Gruppe t0 (Tab. 3B-1).

Der Laich der Gruppe 1 – Schnecken wies sowohl bei absoluter als auch bei relativer Betrachtung des Alkaloidgehaltes große Übereinstimmung mit dem der t0 – Schnecken auf (Abb. 3B-9). Die Konzentration des Aplysinamisin-1 lag bei  $2,7 \pm 0,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ , des Aerophobin-2 bei  $11,7 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  und des Isofistularin-3 bei  $0,1 \pm 0,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ . Auch in diesen Proben wurde Aerothionin detektiert ( $0,7 \pm 0,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ). Der Gesamtalkaloidgehalt lag mit  $15,2 \pm 3,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  in einem ähnlichen Bereich, wie der des Mantelgewebes dieser Schnecken (Tab. 3B-1).

Die Schnecken der **Gruppe 2** waren über zwei Wochen auf dem Schwamm *A. cavernicola* gehalten worden. Die Mitteldarmdrüsen der Schnecken dieser Gruppe wiesen im Vergleich zu den beiden zuvor beschriebenen Gruppen ein deutlich verschiedenes Alkaloidmuster auf (Abb. 3B-7). Aerothionin war hier das in der höchsten Konzentration aufgefundene Isoxazolinalkaloid ( $17,1 \pm 6,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ). Der Gehalt an Aplysinamisin-1 ( $16,9 \pm 13,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) lag zwar nur knapp unter dem des Aerothionins, spiegelte aber in keiner Weise den hohen Gehalt dieses Metaboliten im Gewebe des Nahrungsschwammes *A. cavernicola* wider. Aerophobin-2 ( $3,8 \pm 1,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) und Isofistularin-3 ( $0,2 \pm 0,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) waren ebenfalls enthalten. Der Gesamtalkaloidgehalt (ohne *A. cavernicola* – Pigment) in den Mitteldarmdrüsen der Schnecken der Gruppe 2 lag mit  $38,0 \pm 21,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  deutlich unter den Werten der Schnecken aus Gruppe t0 und 1 (Tab. 3B-1).

Der Gesamtalkaloidgehalt in den Mänteln der Gruppe 2 – Schnecken unterschied sich dagegen von den in den Schnecken der Gruppe t0 und 1 gemessenen Werten in einem wesentlich geringeren Umfang (Tab. 3B-1). Die Gehalte der Isoxazolinalkaloide waren auch bei getrennter Betrachtung den in den Gruppe 1 –

Schnecken ermittelten Werten sehr ähnlich (Abb. 3B-8). So unterschieden sich die Aerothionin – Gehalte in den Mänteln der Schnecken der Gruppen 1 ( $2,4 \pm 2,8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) und 2 ( $2,7 \pm 1,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) kaum. Ein wesentlicher Unterschied zeigte sich lediglich im Vorhandensein des *A. cavernicola* – Pigmentes, das nur in den Mantelproben der Gruppe 2 – Schnecken, die von *A. cavernicola* gefressen hatten, auftrat ( $18,4 \pm 14,3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ).

Die HPLC – Analyse des Laiches ergab, dass das Pigment des Schwammes *A. cavernicola* nicht nur in die Gewebe der Schnecke selbst, sondern auch in ihr Gelege eingelagert wird (Abb. 3B-9). Die ermittelte Konzentration des *A. cavernicola* – Pigmentes im Laich der Schnecke lag bei  $11,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ . Auch Aerothionin wurde in dieser Probe gefunden. Der Aerothionin – Gehalt lag mit  $0,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  in einem ähnlichen Bereich wie im Laich der Schnecken aus Gruppe t0 und 1, obwohl die Schnecken der Gruppe 2, im Gegensatz zu denen der beiden anderen Gruppen, vom aerothioninhaltigen *A. cavernicola* gefressen hatten. Der Gesamtalkaloidgehalt im Laich betrug  $22,8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  und lag damit über den Gehalten in den Gelegen der Gruppe t0 und 1 – Schnecken (Ta. 3B-1).

**Gruppe 3** umfasste zwei Schnecken, die nach zuvor fünfwöchiger kontrollierter Haltung auf *A. aerophoba* über zwei Wochen ausgehungert worden waren. Dieser Aushungerungszustand wurde an den Alkaloidgehalten in den Mitteldarmdrüsen am deutlichsten. In diesem Gewebe konnte nur noch Aerophobin-2 in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden, die anderen Metabolite waren vollständig verschwunden (Abb. 3B-7). Der Gesamtalkaloidgehalt der Mitteldarmdrüsen (bestehend ausschließlich aus dem Gehalt an Aerophobin-2) war auf einen Wert von  $0,6 \pm 0,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$  abgefallen und lag damit bei unter 1% des in den t0 – Schnecken gefundenen Wertes (Tab. 3B-1).

Dagegen hatte das Aushungern der Schnecken über zwei Wochen keine erkennbaren Auswirkungen auf das Alkaloidmuster in den Mänteln gehabt: der Gesamtalkaloidgehalt ( $25,1 \pm 0,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) lag hier sogar über den Werten der Schnecken der anderen Gruppen (Tab. 3B-1). Auch nach zweiwöchigem Aushungern wurden im Mantelgewebe der Gruppe 3 – Schnecken noch deutlich detektierbare Konzentrationen an Aerothionin gefunden ( $4,9 \pm 0,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ) (Abb. 3B-8). Die Schnecken hatten in der zweiwöchigen Aushungerungszeit keinen Laich produziert.

### 3B.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Schneckenorganen

Von den Mänteln, Mitteldarmdrüsen, Darmwänden und Gonaden zweier *T. perversa* – Schnecken, die direkt nach der Probennahme vor der südfranzösischen Küste bei Banylus-sur-mer seziiert worden waren, waren EM – Proben hergestellt worden. Zusätzlich waren drei Proben von unterschiedlichen Gelegen des Schneckenlaichs genommen worden. Außerdem wurden zum Vergleich Gewebeproben des Schwammes *A. aerophoba* untersucht. Ziel der EM – Untersuchung war es, das Gewebe auf assoziierte Bakterien zu untersuchen, wie sie in den *Aplysina* – Schwämmen, der Nahrung von *T. perversa*, zu finden sind.

Von allen Geweben waren mehrere Schnitte angefertigt worden. Die Schnitte befanden sich auf Metallgittern, die im elektronenmikroskopischen Bild ein Raster ergaben. Das Objekt wurde bei einer 2000fachen Vergrößerung entlang dieses Rasters systematisch von links nach rechts und von oben nach unten durchfahren. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass alle Bereiche innerhalb des Schnittes untersucht wurden. Unklare Strukturen wurden zur Identifizierung bis zu 12500fach vergrößert. Gelegentlich wurden von Strukturen Bilder angefertigt, um eine nachträgliche Bestimmung zu ermöglichen.

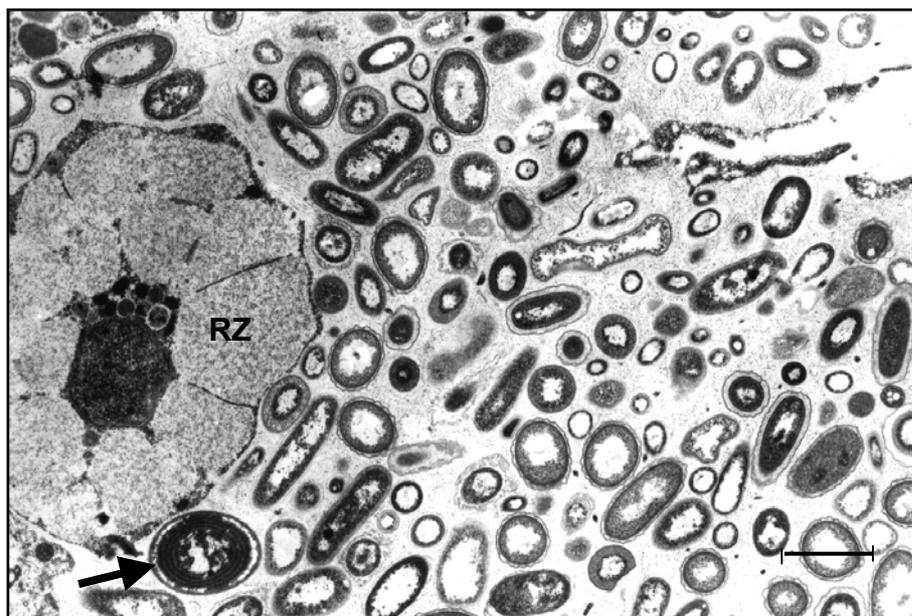


Abb. 3B-10: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnittes von *A. aerophoba*. Im Gewebe befinden sich zahlreiche Bakterien unterschiedlicher Struktur. Links im Bild ist eine Rosetten – Schwammzelle (RZ) zu erkennen. Der Pfeil markiert ein Cyanobakterium. Markierung: 2 µm

Im Gewebe von *A. aerophoba* wurden, wie schon in früheren Untersuchungen, zahlreiche Mesohylbakterien gefunden (Abb. 3B-10). Es konnten die von Friedrich *et al.* (1999) beschriebenen fünf Bakterientypen identifiziert werden.

In den Proben der Darmwände der Schnecken wurden hingegen nur sehr vereinzelt Bakterien gefunden. Es ist zu vermuten, dass diese Bakterien nicht aus dem Schneckengewebe selbst, sondern aus dem Darmlumen und damit aus dem gefressenen Schwammgewebe stammten, und somit nicht zu schneckenassoziierten Bakterien gerechnet werden können. In allen anderen Geweben der Schnecken wurden keine Bakterien gefunden. Die Abbildungen 3B-11 a bis d geben beispielhaft die aufgenommenen Übersichten über die unterschiedlichen Gewebe wieder.

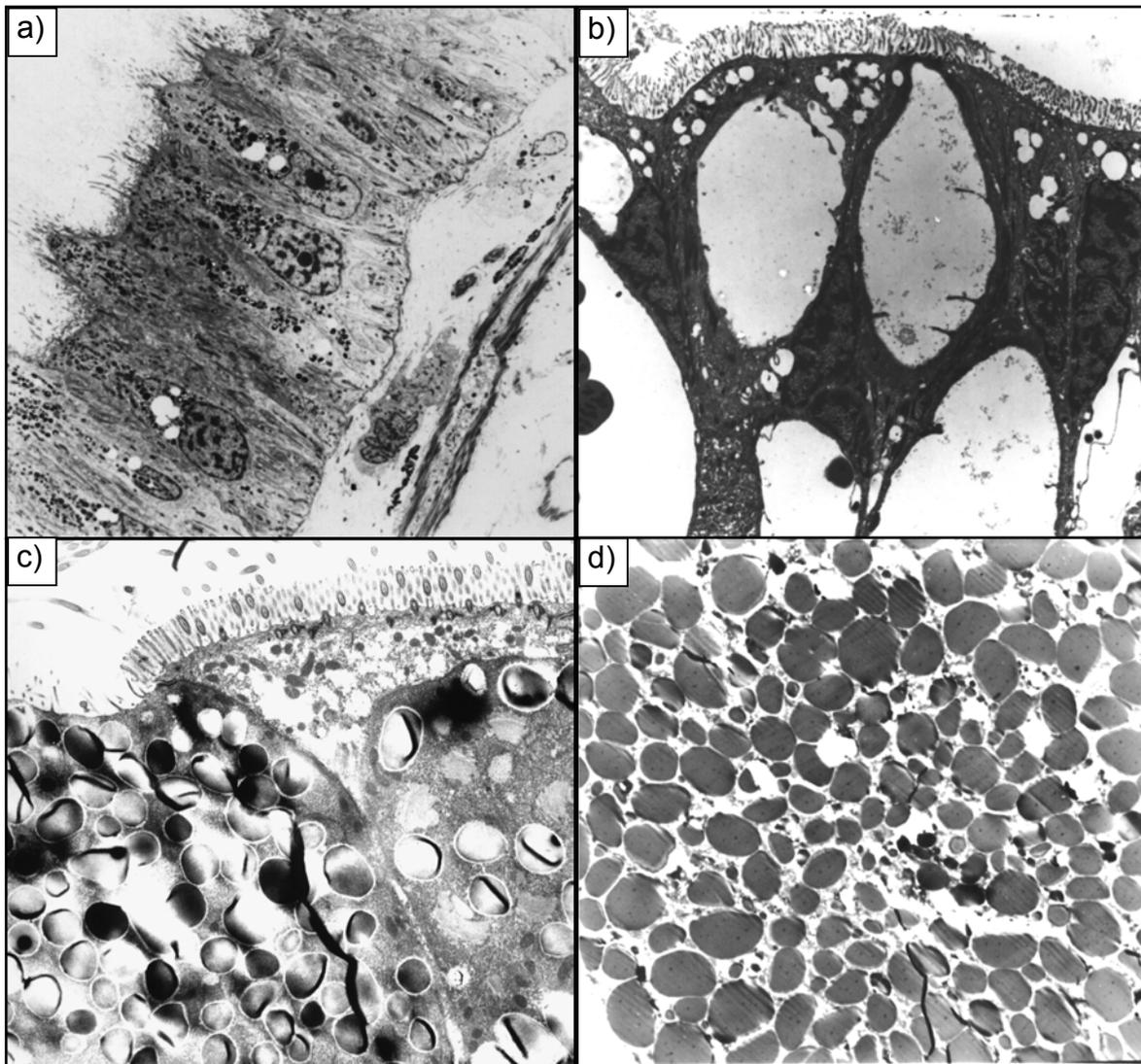


Abb.3B-11: Beispiele elektronenmikroskopischer Aufnahmen unterschiedlicher Gewebe von *T. perversa*. a) Darmwand (3150x); b) Mantel (3000x); c) Gonaden (3150x); d) Laich (2000x)

### 3B.4. Anzuchtversuche mit Veliger – Larven von *Tylodina perversa*

Der Laich der Schnecken, die ausschließlich von *A. aerophoba* gefressen hatten war in regelmäßigen Abständen aus dem Aquarium entnommen und in einen separaten, seewasserbefüllten Kunststoffbehälter gegeben worden. Die Gelege wurden daraufhin mehrfach unter dem Binokular beobachtet.

Innerhalb der ersten beiden Wochen nach Eiablage zeigte sich an den Gelegen eine Farbänderung von leuchtend gelb nach bräunlich gelb. Bei Betrachtung unter dem Binokular konnten in einer zunehmenden Anzahl an Eiern Veliger – Larven beobachtet werden. Nach etwa drei Wochen begannen diese sich zu bewegen und durch Wimpernschlag innerhalb der Eier zu rotieren (Abb. 3B-12). Im Laufe der folgenden Tage schlüpfen nach und nach immer mehr Larven und begannen sich frei im Wasser zu bewegen. Zu diesem Zeitpunkt stand jedoch schon kein Nahrungsschwamm mehr zur Verfügung, bzw. es war unklar, von was sich die Schneckenlarven in diesem Stadium ernähren. Zudem konnten sie nicht mit frischem Seewasser versorgt werden. Wohl vor allem deshalb gingen sie an den darauffolgenden Tagen ein.

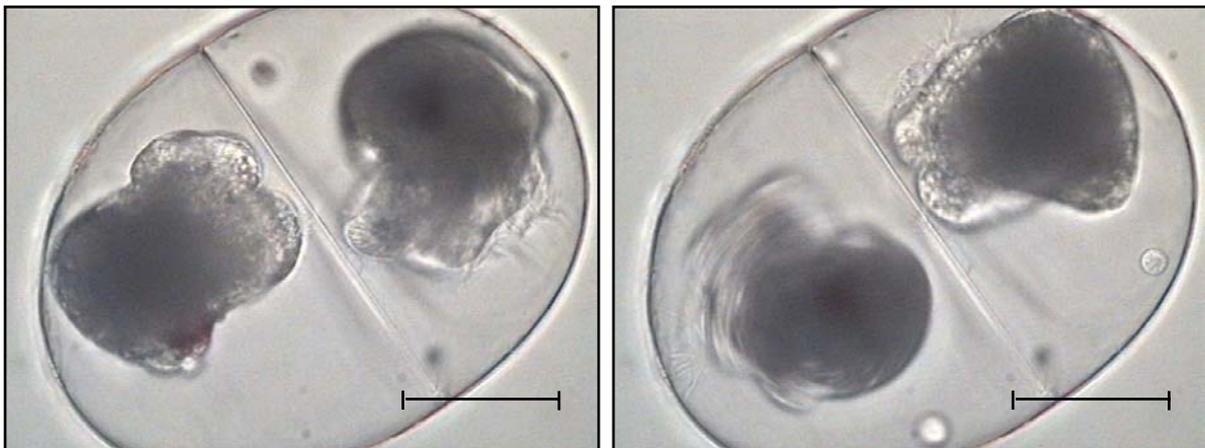


Abb. 3B-12: Veliger – Larven von *Tylodina perversa* unter dem Mikroskop. In einer Eizelle befinden sich jeweils zwei Larven. In der rechten Aufnahme ist die Rotationsbewegung der linken Larve zu erkennen. Markierung: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3C. Das Verpflanzungsexperiment mit *A. cavernicola*

#### 3C.1. Zustand der verpflanzten Schwämme

Anfang Mai 2001 waren sieben *A. cavernicola* – Individuen vor der Küste von Elba von ihrem natürlichen Standort auf 40 m Meerestiefe in flachere Küstenbereiche verpflanzt worden. Acht Wochen später wurde ihr Zustand erstmals kontrolliert. Ende Juli 2001 wurden die überlebenden Individuen schließlich für die mikrobiologische und chemische Analyse eingesammelt.

Die drei auf eine Wassertiefe von 7 m verpflanzten Schwämme waren vollständig verschwunden. Zurückgeblieben waren lediglich die Betonfundamente und die in Kunstharz eingegossenen Substratstücke, auf denen die Schwämme gewachsen waren. Bereits bei der Kontrolle vier Wochen zuvor hatten die Gewebe dieser Individuen deutliche Anzeichen von Degeneration und einen starken Bewuchs durch Algen aufgewiesen.

Die zwei Schwämme, die im Schutz eines großen Felsens in 12 m Tiefe gestanden hatten, befanden sich bei der Probenahme dagegen, soweit dies optisch erkennbar war, in einem sehr guten Zustand. Ihr Äußeres hatte sich im Verlauf der drei Monate seit ihrer Verpflanzung nicht erkennbar verändert (Abb.3C-1 a und b).



Abb. 3C-1: Verpflanzte *A. cavernicola* – Individuen am Ende des Experimentes.

a) und b) Schwämme, die auf 12m Tiefe an einen geschützten Standort verpflanzt worden waren.  
c) Schwamm, der auf 15m Tiefe an einen exponierten Standort verpflanzt worden war (der Schwamm ist stark mit Algen bewachsen). Bildhöhe: ca. 20 cm

Fotos: Miriam Weber

Ein Schwamm war im Mai 2001 exponiert auf einem Felsen in 15 m Tiefe verpflanzt worden. Drei Monate später wies er einen starken Algenbewuchs auf (Abb.3C-1 c). Die Farbe seines Gewebes hatte sich von dem sonst für *A. cavernicola* üblichen hellgelb in ockergelb gewandelt. Bei der späteren Bearbeitung dieses Schwammes fiel auf, dass sich zudem auch die Beschaffenheit des Gewebes verändert hatte. Es war im Vergleich mit den Geweben der anderen beprobten Individuen brüchiger geworden und trübte deutlich das Wasser, in dem es bearbeitet wurde.

Der siebte Schwamm war auf 15 m Tiefe unter einem niedrigen Felsüberhang aufgestellt worden. Bei der Kontrolle acht Wochen nach der Verpflanzung hatte er sich noch in einem sehr guten Zustand befunden. Als er Ende Juli jedoch eingesammelt werden sollte, war er vollständig verschwunden.

### 3C.2. Vergleich der Alkaloidmuster in den Schwammproben mittels HPLC – Analyse

Von *A. cavernicola* – Individuen des Verpflanzungsversuches wurden Gewebeproben für die Inhaltsstoffanalyse gefriergetrocknet, mit MeOH extrahiert und anschließend mittels HPLC – UV analysiert.

Die HPLC – Chromatogramme sämtlicher Proben des Verpflanzungsexperimentes wiesen ein für den Schwamm *A. cavernicola* typisches Alkaloidmuster auf: Die dominierenden Peaks in den Chromatogrammen wurden als Signale der Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2, Aplysinamisin-1 und Aerothionin sowie des Schwammpigmentes 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure identifiziert. Die Extraktion der Gewebestücke war in einheitlicher Weise mit jeweils der gleichen Menge an Schwammmaterial und Lösungsmittel durchgeführt worden. Deshalb war es möglich, die Integrale der Peakflächen für den quantitativen Vergleich der Metabolitengehalte zwischen den verschiedenen Proben des Experimentes zu verwenden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Proben (Abb. 3C-2). Die Verpflanzung von *A. cavernicola* aus dem natürlichen Habitat in eine Umgebung mit deutlich veränderten Bedingungen hatte also weder in quantitativer noch in qualitativer Hinsicht zu Veränderungen des Alkaloidmusters geführt. Auch im jahreszeitlichen Vergleich zwischen den Proben, die im Mai und im Juli am Originalstandort gesammelt worden waren, zeigten sich keine Unterschiede.

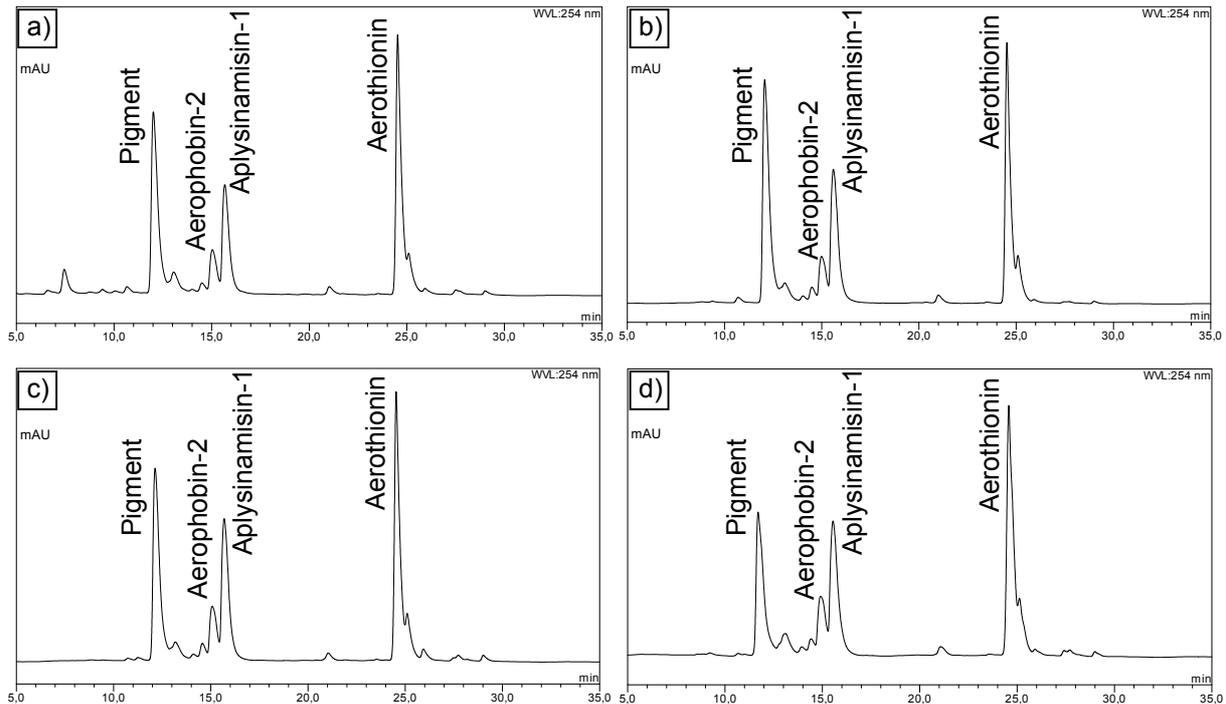


Abb. 3C-2: Beispiele für HPLC - Chromatogramme der Extrakte von *A. cavernicola* – Schwämmen des Verpflanzungsversuches.

a) Originalstandort 40 m März 2001; b) Originalstandort 40 m Juni 2001; c) verpflanzt an exponierten Standort in 15 m Tiefe; d) verpflanzt an geschützten Standort in 12 m Tiefe.

### 3C.3. Elektronenmikroskopische Analyse der Schwammgewebe

Sowohl von den verpflanzten Schwämmen als auch von den Schwämmen des Originalstandortes zu Beginn und am Ende des Verpflanzungsexperimentes waren elektronenmikroskopische Präparate hergestellt worden. Bei der Präparation wurde jeweils zwischen Mesohylgewebe aus dem zentralen Bereich der Schlote und Schwammoberflächengewebe unterschieden. Von jeder Probe wurden zahlreiche Schnitte angefertigt. Diese wurden dann auf spezielle Metallgitter gelegt, auf denen sie unter dem Elektronenmikroskop untersucht wurden. Die Gitter erzeugten ein Raster im elektronenmikroskopischen Bild, entlang dessen die Schnitte systematisch von links nach rechts und von oben nach unten durchsucht wurden.

In allen untersuchten Proben waren Bakterien sehr zahlreich (Abb. 3C-3). Ihre Anzahl überstieg die der Schwammzellen um ein Vielfaches. Vereinzelt wurden Bakterien in Stadien der Teilung beobachtet. Häufig befanden sie sich auch in Verdauungsvesikeln im Inneren von Schwammzellen.

Die Verteilung der Bakterien innerhalb des untersuchten Mesohyls erwies sich als weitgehend homogen. Nur im Bereich der Kragengeißelkammern lagen sie in geringerer Dichte vor. Der Vergleich von verschiedenen Proben des Verpflanzungsexperimentes miteinander ergab keine erkennbaren Unterschiede in der Abundanz der Bakterien (Abb. 3C-3). Auch zwischen den Proben der Schwammoberfläche und des inneren Mesohyls konnten keine Abweichungen in der Häufigkeit ihres Auftretens festgestellt werden.

Als Indikator für Veränderungen in der Artenzusammensetzung diente die Klassifizierung von Bakterien – Morphotypen nach Vacelet (1975) die von Friedrich *et al.* (1999) modifiziert wurde. Diese Studien teilen die mit *Aplysina* – Schwämmen assoziierten Bakterien anhand ihrer Membrancharakteristika in fünf Gruppen ein. Die Morphotypen wurden, der Beschreibung von Friedrich *et al.* (1999) für *A. cavernicola* entsprechend, in allen Proben des Verpflanzungsexperimentes aufgefunden. Unterschiede in ihrer relativen Verteilung wurden beim Vergleich der verpflanzten Schwämme mit den Proben des Originalstandortes nicht beobachtet.

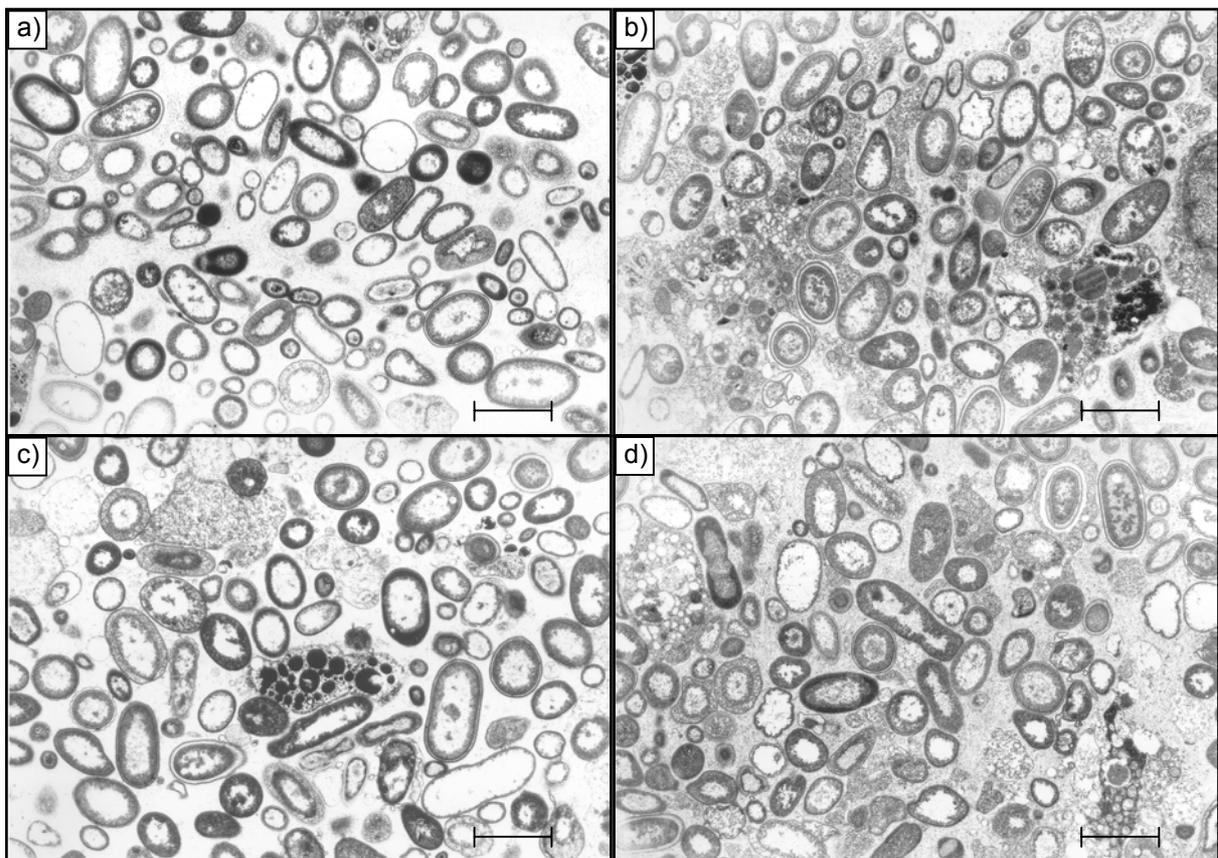


Abb. 3C-3: Beispiele elektronenmikroskopischer Aufnahmen des inneren Mesohyls von *A. cavernicola*.

a) Gewebe eines Schwammes vom Originalstandort zu Beginn des Experimentes;

b) Originalstandort am Ende des Experimentes; c) auf 15 m Meerestiefe verpflanzter Schwamm am Ende des Experimentes;

d) auf 12 m Tiefe verpflanzter Schwamm am Ende des Experimentes.

Balken: 1  $\mu\text{m}$

Die Oberflächenproben der verpflanzten Schwämme wurden zusätzlich gezielt auf das Auftreten von Cyanobakterien hin untersucht. Diese finden sich normalerweise in großer Zahl im Oberflächengewebe des mit *A. cavernicola* eng verwandten Schwammes *A. aerophoba*. Sie lassen sich leicht durch ringförmige Membranstrukturen in ihrem Zellinneren von anderen Bakterien unterscheiden (Abb.3B-10). In keinem der verpflanzten *A. cavernicola* – Schwämme wurden Cyanobakterien gefunden.

### 3C.4. DGGE und phylogenetische Analyse der bakteriellen 16S rDNA

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen hatten einen Vergleich der Schwammproben des Verpflanzungsexperimentes hinsichtlich der Besiedlungsdichte mit Bakterien ermöglicht. Darüber hinaus konnten, durch Abschätzen der relativen Verteilung von Bakterien - Morphotypen in den Schwammgeweben, vorläufige Aussagen über Veränderungen in der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft gemacht werden. Die DGGE und die anschließende phylogenetische Analyse der aus den Schwammproben isolierten bakteriellen 16S rDNA ermöglichten detailliertere Aussagen über die Bakterienzusammensetzungen in den Schwammproben. Auf diese Weise konnte zwischen in allen Proben des Experimentes vorkommenden („konstanten“) und nur in einzelnen Proben auftretenden („variablen“) Bakterienspezies unterschieden werden. Wie bei der Elektronenmikroskopie wurde zwischen zwei verschiedenen Gewebebereichen unterschieden: Zunächst wurden die aus den inneren Mesohyl – Bereichen der Schwämme isolierten und anschließend PCR – amplifizierten 16S rDNA – Fragmente auf einem DGGE – Gel (Gel 1) aufgetrennt. Die Auftrennung der 16S rDNA aus den Oberflächenschichten der verpflanzten Schwämme wurde anschließend auf einem separaten DGGE – Gel (Gel 2) durchgeführt.

Mit jeder Probe wurden drei unabhängige PCR – Ansätze durchgeführt, die zur Kontrolle direkt nebeneinander auf den DGGE – Gelen aufgetrennt wurden (Abb. 3C-4). Proben des Originalstandortes liefen jeweils parallel mit Proben der verpflanzten Schwämme auf den Gelen. Auf diese Weise wurde ein direkter Vergleich der resultierenden Bandenmuster vor und nach der Verpflanzung möglich. Darüber hinaus wurde auf Gel 1 ein Vergleich zwischen Proben, die am Originalstandort zu

Beginn und am Ende des Verpflanzungsexperimentes genommen wurden, angestellt.

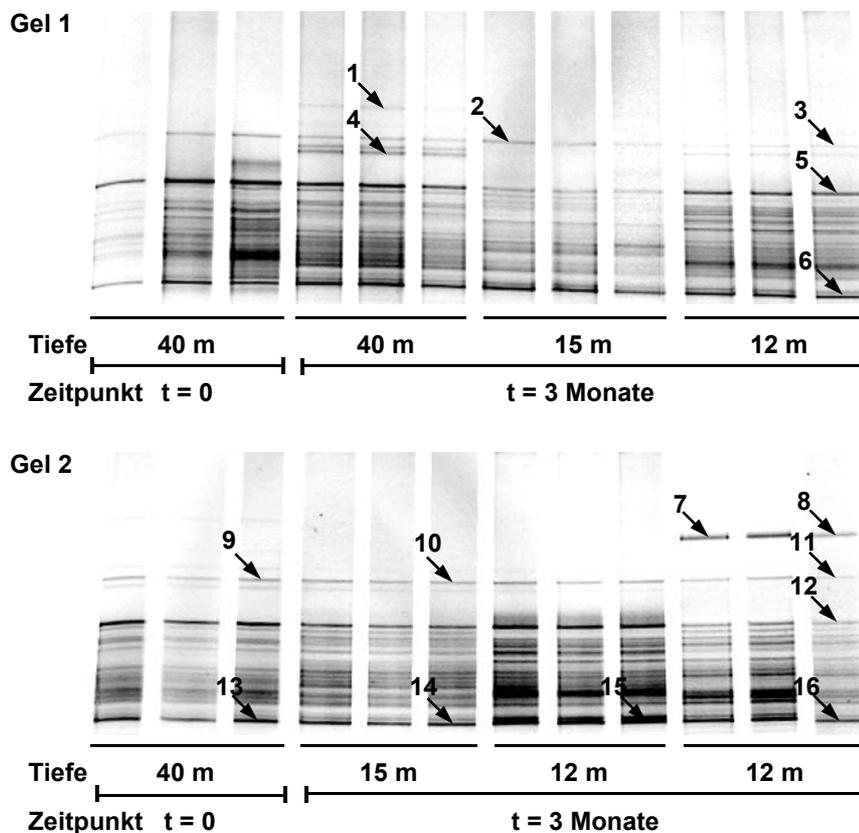


Abb. 3C-4: DGGE der 16S rDNA – Fragmente aus den Schwammproben des Verpflanzungsexperimentes. Für jede Probe wurden drei unabhängige PCR-Läufe durchgeführt und nebeneinander auf dem Gel aufgetrennt. Zu jeder Probe sind Probenahmetiefe und –zeitpunkt angegeben. Die Pfeile markieren die zur Sequenzierung ausgeschnittenen Banden.

Gel 1: Proben aus dem inneren Mesohyl der Schwämme.

Gel 2: Proben des Oberflächengewebes der Schwämme.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie wiesen alle mittels DGGE analysierten Proben sehr ähnliche Bandenmuster auf (Abb. 3C-4). Auch die Resultate der DGGE – Untersuchung wiesen also darauf hin, dass der Großteil der mikrobiellen Gemeinschaft in *A. cavernicola* auch drei Monate nach der Verpflanzung unverändert geblieben war. Entsprechend stimmten die Bandenmuster der Proben, die im Mai und im Juli von der gleichen Kolonie am Originalstandort entnommen worden waren, ebenfalls größtenteils überein. Zudem gab es, wie bereits aus den elektronenmikroskopischen Ergebnissen geschlossen, zwischen den inneren Schichten und dem Oberflächenbereich der Schwammgewebe nur geringe Unterschiede.

Verschiedene Banden in den DGGE – Gel – Spuren lagen auch nach beendeter Elektrophorese sehr dicht beieinander. Durch Veränderung des Gradienten an denaturierenden Reagenzien wurde versucht, die Auflösung zu erhöhen. Statt des ursprünglichen Gradienten zwischen 0 und 100% denaturierenden Reagenzien wurden Gradienten zwischen 20 und 80% und 30 und 70% ausprobiert. Da dies aber einen verstärkten Schmiereffekt mit sich brachte, führte dieser Ansatz nicht zu einer Verbesserung.

Drei Reihen von Banden lagen dennoch gut getrennt von den jeweils benachbarten Banden vor und waren zudem konstant in allen Proben auf beiden DGGE – Gelen vorhanden (Abb. 3C-4). Jeweils mehrere Banden dieser drei Banden wurden für die darauffolgende Sequenzierung der darin vorhandenen 16S rDNA ausgeschnitten. Auf diese Weise sollte abgesichert werden, dass die Übereinstimmung in der Laufweite der Banden auf dem Gel tatsächlich auf eine Übereinstimmung der Basensequenzen in den Banden rückschließen lässt.

Der Vergleich der Sequenzen der Banden einer konstanten Reihe auf Übereinstimmung wurde anhand des GC – Gehaltes durchgeführt (Tab. 3C-1). Der maximale Unterschied zwischen den Banden 2 – 3 auf Gel 1 und 9 – 11 auf Gel 2 (Abb. 3C-4) lag hierbei bei 0,91%. Die Banden 5 (Gel 1) und 12 (Gel 2) unterschieden sich um 0,40% in ihrem GC-Gehalt. Von der dritten auf den Gelen 1 und 2 konstant erkennbaren Bandenreihe wurden die mit den Nummern 6 und 13 – 16 markierten Banden ausgeschnitten. Die darin enthaltenen 16S rDNA – Sequenzen hatten einen Unterschied im GC-Gehalt von maximal 1,14%.

Die DNA-Sequenzen in den Banden 6 und 13-16 zeigten laut BLAST – Analyse Homologiewerte zwischen 90,9 und 91,7% zu einer in der Arbeit von Hentschel *et al.* (2002) aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* isolierten und klonierten 16S rDNA – Sequenz (Tab. 3C-1). Die Berechnung des phylogenetischen Stammbaumes ergab die Bildung eines Clusters mit diesem und mit einem aus *Aplysina aerophoba* isolierten Bakterienklon. Das Cluster konnte der Klasse der *Acidobacteria* zugeordnet werden (Abb. 3C-5).

Auch die Sequenzen aus den Banden 5 und 12 wiesen eine hohe Homologie (98,6% bzw. 98,2%) zu einer aus einem marinen Schwamm stammenden 16S rDNA – Klon-Sequenz auf. Hierbei handelte es sich um ein Bakterium, das in der Studie von Webster *et al.* (2001) aus dem Schwamm *Rhopaloeides odorabile* isoliert und kloniert worden war (Tab. 3C-1). Wieder ergab sich ein Cluster mit ausschließlich

aus marinen Schwämmen stammenden Bakterienklonen, dem zudem noch ein Bakterienklon aus dem Schwamm *Theonella odorabile* angehörte (Abb. 3C-5). Interessanterweise ist eine Zuordnung der Sequenzen dieses Clusters zu einem Bakterienstamm nicht möglich.

Tab. 3C-1: Ergebnisse der GenBank (BLAST) – Analyse der aus den Banden der DGGE – Gele extrahierten bakteriellen 16S rDNA. Die Nummerierung der Sequenzen in der Tabelle entspricht der Bandennummerierung in Abb. 3C-4.

Nr.	GC – Gehalt	Auftreten in den Proben	Sequenz in der Genbank (BLAST) höchster Übereinstimmung	Homologie [%]	Phylogenetische Einordnung
1	48,64%	variabel	hydrothermal vent clone ML-1f (AF208990)	89,2%	<i>Bacteroidetes</i>
2	52,86%	konstant	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF335494.1)	97,0%	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
3	52,72%	konstant	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF097533)	91,2%	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
4	52,60%	variabel	marine $\alpha$ -proteobacterium MBIC3368 (AF218241)	98,8%	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>
5	55,99%	konstant	<i>Rhopaloeides odorabile</i> clone R25 (AF333537)	98,6%	Zuordnung unklar
6	61,19%	konstant	<i>Theonella swinhoei</i> clone PAUC26 (AF186410)	92,8%	<i>Acidobacteria</i>
7	50,76%	variabel	sulfur-oxidizing bacterium OAI2 (AF170423)	90,6%	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>
8	49,81%	variabel	sulfur-oxidizing bacterium OAI2 (AF170423)	91,0%	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>
9	53,35%	konstant	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF335494.1)	95,8%	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
10	53,55%	konstant	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF335494.1)	98,4%	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
11	53,63%	konstant	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF335494.1)	97,1%	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
12	56,39%	konstant	<i>Rhopaloeides odorabile</i> clone R25 (AF333537)	98,2%	Zuordnung unklar
13	60,85%	konstant	<i>Theonella swinhoei</i> clone PAUC26 (AF186410)	91,7%	<i>Acidobacteria</i>
14	61,42%	konstant	<i>Theonella swinhoei</i> clone PAUC26 (AF186410)	90,9%	<i>Acidobacteria</i>
15	61,99%	konstant	<i>Theonella swinhoei</i> clone PAUC26 (AF186410)	91,1%	<i>Acidobacteria</i>
16	61,32%	konstant	<i>Theonella swinhoei</i> clone PAUC26 (AF186410)	91,7%	<i>Acidobacteria</i>

Die dritte konstante Bandenreihe wird u.a. von den ausgeschnittenen Banden 2 – 3 und 9 – 11 repräsentiert. Die Sequenzen der aus diesen Banden extrahierten 16S rDNA wiesen eine große Übereinstimmung (97,0-98,4%) mit dem  $\beta$ -Proteobakterium *Burkholderia cepacia* auf (Tab. 3C-1 und Abb. 3C-5).

Der variable Teil der Bakteriengemeinschaften in den Schwämmen des Verpflanzungsversuches wird von den Banden 1, 4, 7 und 8 repräsentiert. Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung der aus DGGE – Bande 1 extrahierten 16S rDNA ergab eine nahe Verwandtschaft zu einem bisher unkultivierten Bakterium der Klasse Bacteroidetes, das aus der Umgebung einer unterseeischen Hydrothermalquelle isoliert worden war (Sievert *et al.* 2000). Die Sequenzen in den Banden 7 und 8 zeigten hohe Übereinstimmung mit der 16S rDNA des schwefeloxidierenden  $\gamma$ -Proteobakteriums OAlI2. Auch hier handelte es sich um ein aus dem Bereich einer marinen Hydrothermalquelle isoliertes Bakterium (S.M. Sievert und J. Kuever, GenBank, nicht publiziert). Aus Bande 4 wurde eine Sequenz extrahiert, die einen sehr engen Verwandtschaftsgrad zum  $\alpha$ -Proteobakterium MBIC3368 zeigt. Dieses Bakterium wurde erstmals aus einem marinen Schwamm isoliert (T. Hamada, GenBank, nicht publiziert) und inzwischen in verschiedenen Schwämmen aufgefunden.

Wie die Elektronenmikroskopie lässt sich die DGGE – Analyse nutzen, um Schwammgewebe auf das Vorhandensein von Cyanobakterien zu überprüfen. Diese lassen sich, wenn vorhanden, nach der Elektrophorese leicht anhand einer dicken Bande im oberen Bereich des DGGE – Gels identifizieren (Hentschel, nicht publiziert). Entsprechend den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Analyse trat eine solche Bande auf keinem der beiden DGGE – Gele auf.

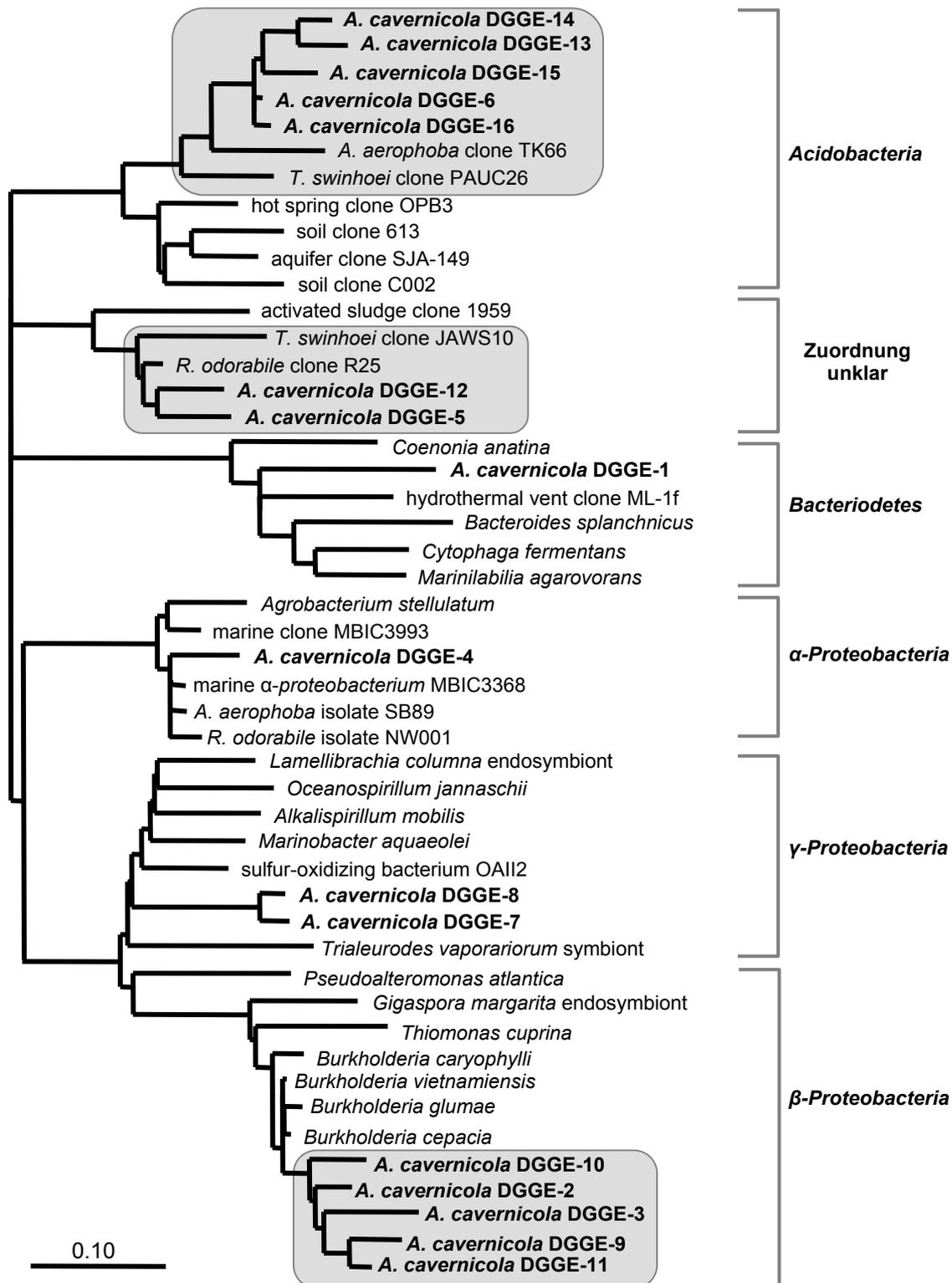


Abb. 3C-5: Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA – Fragmente, die aus den Banden der in Abb. 3C-4 dargestellten DGGE – Gele extrahiert wurden. Die Nummerierung der Sequenzen entspricht der Bandennummerierung auf den DGGE – Gelen in Abb. 3C-4. Die Länge der analysierten Sequenzen beträgt etwa 500 Basenpaare. Der Längen des Skalenbalkens gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

### 3C.5. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Wie die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung ließen auch die Resultate der FISH – Analyse auf eine hohe Anzahl und Dichte der Mesohylbakterien in den *A. cavernicola* – Proben schließen: Nach Hybridisierung der Schwammgewebe mit der generellen Eubakterien – Sonde EUB338mix waren unter dem Mikroskop zahlreiche Fluoreszenzsignale zu erkennen (Abb. 3C-6, linke Seite). Es ergaben sich keine erkennbaren Unterschiede in der Signaldichte zwischen den verschiedenen Proben des Verpflanzungsexperimentes. Die Gesamtzahl der Eubakterien im Gewebe der Schwämme war also nach Veränderung der Umgebungsbedingungen durch Verpflanzung stabil geblieben.

Anhand der DGGE - Analyse und der anschließenden Sequenzierung der isolierten 16S rDNA war in allen Proben des Verpflanzungsversuches ein konstantes Auftreten von Vertretern der Gruppe der Acidobacteria beobachtet worden (DGGE – Banden 6; 13 – 16; Abb. 3C-4 und Abb. 3C-5 und Tab. 3C-1). Die phylogenetische Analyse hatte ergeben, dass diese mit zuvor aus den Schwämmen *Theonella swinhoei* und *Aplysina aerophoba* isolierten und klonierten Bakterien – Sequenzen ein Cluster bilden. In einer früheren Studie an *A. aerophoba* war für dieses Cluster die spezifische Sonde TK66 hergestellt worden. Die Hybridisierung der Gewebeproben des Verpflanzungsexperimentes mit dieser Sonde sollte nun dazu dienen, das Vorhandensein der Bakterien des Acidobakterien - Clusters im Gewebe der Schwämme *in situ* zu verifizieren. Darüber hinaus sollte durch Verwendung dieser Sonde der zahlenmäßige Anteil der Bakterien dieses Clusters an der gesamten Bakteriengemeinschaft abgeschätzt werden.

Die Hybridisierung mit TK66 ergab eine deutlich geringere Anfärbung als dies nach Hybridisierung mit der generellen Eubakteriensonde der Fall gewesen war (Abb. 3C-6, rechte Seite). Es ließen sich nur vereinzelt unregelmäßig verteilte Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen. Zwischen den verschiedenen Proben des Verpflanzungsexperimentes konnte kein Unterschied ausgemacht werden. Die Abundanz der Bakterien des Acidobakterien – Clusters in *A. cavernicola* war also gering. Die Bakterien traten jedoch konstant in diesem Schwamm auf und ihre Zahl wurde nicht durch die im Verpflanzungsversuch veränderten Umgebungsbedingungen beeinflusst.

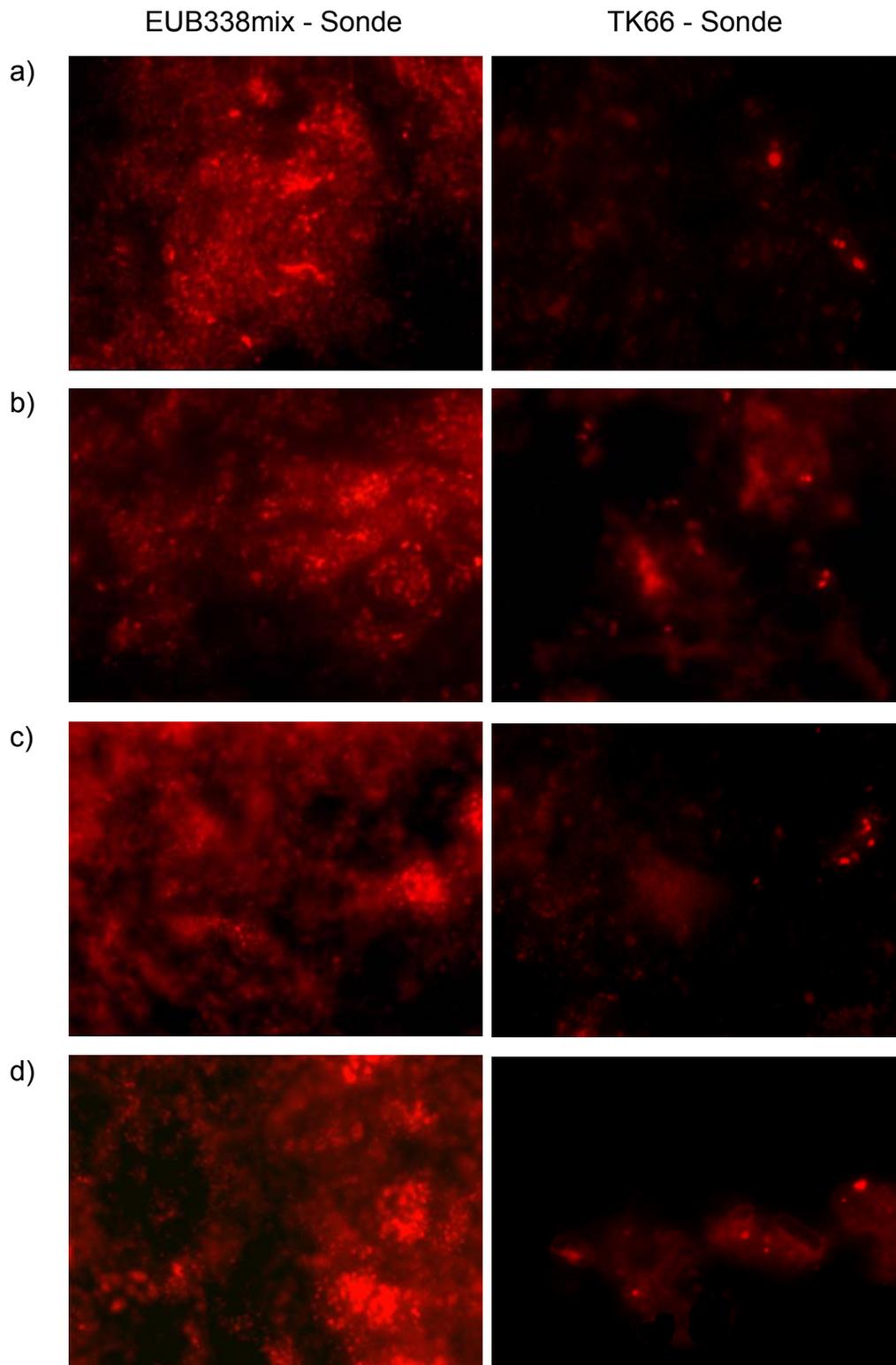


Abb. 3C-6: Signale fluoreszenzmarkierter bakterieller 16S rRNA in Gewebeproben von Schwämmen des Verpflanzungsexperimentes. Die mikroskopischen Aufnahmen sind repräsentative Beispiele für alle untersuchten Proben des Experimentes. Vergrößerung: x 1729

Linke Reihe: Hybridisierung mit der Sonde EUB338mix (generelle Eubakterien – Sonde)

Rechte Reihe: Hybridisierung mit der Sonde TK66 (spezifisch für Acidobakterien – Cluster)

a) Probe vom Originalstandort in 40 m Tiefe; Probenahme: Anfang Mai 2001

b) Probe vom Originalstandort in 40 m Tiefe; Probenahme: Ende Juli 2001

c) Probe eines auf 15 m Tiefe verpflanzten Schwammes; Probenahme: Ende Juli 2001

d) Probe eines auf 12 m Tiefe verpflanzten Schwammes; Probenahme: Ende Juli 2001

## 4. Diskussion

### 4A. Unterschiede und Veränderungen im Alkaloidmuster von Schwämmen der Gattung *Aplysina*

#### 4A.1. Unterschiede in den Alkaloidmustern von mediterranen *Aplysina* – Schwämmen verschiedener Herkunft

Die Ordnung Verongida umfasst marine Hornschwämme (Demospongiae), die sich durch eine einzigartige Biochemie auszeichnen. Sie akkumulieren eine Reihe von bromierten Sekundärmetaboliten in hohen Konzentrationen (bis über 10% des Trockengewichtes), die sich vom 3,5-Dibromtyrosin ableiten (De Rosa *et al.* 1973, Tymiak & Rinehart 1981, Carney & Rinehart 1995). Weit mehr als hundert solcher Verbindungen sind bis heute bekannt. Lediglich in zwei Fällen wurden strukturell verwandte Derivate in Schwämmen gefunden, die nicht der Ordnung Verongida angehören (König & Wright 1993, Costantino *et al.* 1994)

Eine weitere typische Eigenschaft der Verongidae ist die hohe Variabilität der Morphologie innerhalb einer Spezies. Dies führt häufig zu Unklarheiten in der taxonomischen Einordnung der Verongida – Arten, zumal sich die Arten untereinander oft nur geringfügig unterscheiden. Aus diesem Grund wurde mehrfach versucht, die Sekundärstoffmuster der Schwämme als chemische Marker zur Klassifizierung der Arten zu verwenden (z.B. Ciminiello *et al.* 1994a; Ciminiello *et al.* 1997).

Im Mittelmeer sind bisher zwei Arten aus der Ordnung der Verongida bekannt. Es handelt sich dabei um zwei Vertreter der Gattung *Aplysina*: *A. aerophoba* und *A. cavernicola*. Auch bei diesen beiden Schwämmen ist bisher nicht zufriedenstellend geklärt, ob es sich tatsächlich um zwei getrennte Arten, oder aber um Morphotypen der selben Art, verschieden gestaltet durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen im Lebensraum, handelt. Während *A. aerophoba* im flachen Wasser in Tiefen zwischen 1 und 15 Meter meist an stark sonnenexponierten Standorten wächst, ist *A. cavernicola* dagegen nur in größerer Tiefe (um 40 m) oder

in Höhlen zu finden. Die Unterschiede in der Morphologie der beiden Schwämme sind gering. *A. aerophoba* weist meist eine eher gedrungene, massivere äußere Form auf. Bei *A. cavernicola* sind die Schlote im Normalfall dagegen etwas langgestreckter. Zudem zeigen sich häufig Unterschiede in der Struktur der Schwammoberfläche. So besitzt *A. aerophoba* beispielsweise häufig über den gesamten Schwammkörper verteilt Auswüchse, die vermutlich der vegetativen Vermehrung dienen. Bei *A. cavernicola* sind diese, wenn überhaupt, nur basal, nahe der Substratoberfläche, vorhanden.

Häufig finden sich jedoch morphologische Zwischenformen der beiden Schwämme, die vom äußeren Erscheinungsbild schwer einer der beiden Spezies zuzuordnen sind. Aus diesem Grund wurde auch bei den mediterranen *Aplysina* – Arten versucht, mit Hilfe der Chemotaxonomie Klarheit bei der Zuordnung gesammelter Individuen zu schaffen.

Nach Ciminiello *et al.* (1997) eignet sich hierzu das Isoxazolinalkaloid Aerothionin, das nach Ergebnissen dieser Studie ausschließlich in *A. cavernicola* auftritt. *A. aerophoba* besitzt stattdessen das Isofistularin-3 in großen Mengen. Dieser Metabolit kommt in *A. cavernicola* nur in sehr geringen Konzentrationen oder in Form von (ebenfalls nur in Spuren auftretenden) Derivaten vor. Ein weiteres chemisches Unterscheidungsmerkmal ist das Pigment der beiden Schwämme. Die gelbe Farbe von *A. aerophoba* wird von dem Pigment Uranidin verursacht (Cimino *et al.* 1984), das nach Kontakt mit Luft sehr schnell zu einem schwarzen, unlöslichen Polymerisationsprodukt reagiert (und damit namensgebend für den Schwamm ist). Dagegen besitzt *A. cavernicola* die wesentlich stabilere 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure (Fattorusso *et al.* 1971).

Aus diesem Unterschied resultieren auch leichte Unterschiede in der Färbung der Schwämme, die *A. aerophoba* zu dem deutschen Namen Goldschwamm verholfen haben, während *A. cavernicola* im Deutschen Schwefelschwamm heißt. Auch am Beispiel der Pigmente der Schwämme zeigen sich die Schwierigkeiten, die bei der taxonomischen Einordnung der mediterranen *Aplysina* – Arten auftreten. Die Arbeit von Fattorusso *et al.* (1971) beschreiben die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure zunächst als einen Metaboliten von *A. aerophoba*. Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei den untersuchten Schwämmen um *A. cavernicola* – Individuen gehandelt hatte (Cimino *et al.* 1984). Darüber hinaus wird die Färbung von *A.*

*aerophoba* – Schwämmen häufig durch die Präsenz von Cyanobakterien im Oberflächengewebe variiert (Vacelet 1971, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen Experimenten die Stabilität der Naturstoffmuster der Schwämme *A. aerophoba* und *A. cavernicola* untersucht. Hiermit sollte die Eignung der Sekundärmetabolite als taxonomische Marker überprüft und gleichzeitig der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei den im Mittelmeer wachsenden *Aplysina* – Schwämmen um eine oder mehrere Arten handelt.

#### Aplysinamisin-1 in mediterranen *Aplysina* - Schwämmen

Die im Rahmen meiner Arbeit in ufernahen Flachwasserbereichen bei Rovinj, Kroatien und bei Banyuls-sur-mer, Südfrankreich beprobten *A. aerophoba* – Schwämme wiesen durchgängig hohe Konzentrationen der Metabolite Isofistularin-3, Aerophobin-2 und Uranidin auf (Tab. 3A-1 und Abb.3A-2). Dieser Befund deckt sich mit Daten aus früheren Studien, die diese Metabolite ebenfalls als dominant im organischen Extrakt von *A. aerophoba* beschreiben (z.B. Cimino *et al.* 1984; Teeyapant *et al.* 1993a; Ciminiello *et al.* 1997; Ebel *et al.* 1997). Unterschiede zeigten sich jedoch hinsichtlich des Metaboliten Aplysinamisin-1: während die Proben aus Südfrankreich (Probenahme im April 2002) Aplysinamisin-1 in hohen Konzentrationen beinhalteten, lag dieser Metabolit in meinen Proben aus Kroatien (gesammelt im August 2003) nicht in detektierbaren Konzentrationen vor. Entsprechende Unterschiede wurden auch schon in früheren Studien beschrieben: Ebel *et al.* (1997) fanden Aplysinamisin-1 in hohen Konzentrationen (30% des Gesamtalkaloidgehaltes) in *A. aerophoba* – Individuen die vor der Küste der kanarischen Inseln gesammelt worden waren. Ciminiello *et al.* (1997) fanden diesen Metaboliten in Individuen, die bei Sardinien beprobt worden waren, dagegen nicht. Anhand dieser Daten wären regionale oder jahreszeitliche Schwankungen in der Aplysinamisin-1 – Biosynthese in *A. aerophoba* zu vermuten. Arbeiten der Arbeitsgruppe von Dr. Brümmer von der Universität Stuttgart zeigten jedoch entsprechende Schwankungen im Gehalt von Aplysinamsin-1 auch innerhalb des Habitates bei Rovinj, aus dem auch meine Proben stammten. Diese Proben wurden zudem zum gleichen Zeitpunkt genommen. Selbst von zwei *A. aerophoba* –

Individuen, die nur wenige Zentimeter voneinander entfernt im Limski – Kanal bei Rovinj gewachsen waren, wies einer der beiden sehr hohe Konzentrationen an Aplysinamisin-1 auf, während der andere diesen Metaboliten nicht enthielt (pers. Mitteilung F. Brümmer).

Aplysinamisin-1 ist dem Aerophobin-2, das ebenfalls in *A. aerophoba* auftritt, in seiner chemischen Struktur sehr ähnlich. Die Metabolite unterscheiden sich lediglich durch eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 11 und 12 in der aliphatischen Seitenkette des für alle Alkaloide dieser Klasse einheitlichen Spirocyclohexadienisoxazolin – Ringsystems. Diese Doppelbindung ist ausschließlich beim Aplysinamisin-1 vorhanden.

Der geringe Unterschied zwischen den Strukturen von Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 lässt vermuten, dass sich die Biosynthesewege der beiden Metabolite nicht wesentlich unterscheiden. Welcher der beiden Synthesewege eingeschlagen wird, ist also vermutlich nur von geringfügigen Abweichungen in der Chemie, bzw. in der Enzymausstattung der Schwämme abhängig.

In allen von mir und der Arbeitsgruppe Brümmer beprobten *A. aerophoba* - Individuen lag Aplysinamisin-1 entweder in sehr hohen Konzentrationen, als einer der dominanten Metabolite im organischen Extrakt, oder aber gar nicht vor. Übergänge zwischen diesen beiden Extremen wurden nicht beobachtet. Ob die Biosynthese von Aplysinamisin-1 stattfindet oder ausschließlich Aerophobin-2 gebildet wird, scheint innerhalb eines Individuums also nicht variabel, sondern eher genetisch festgelegt zu sein. Entsprechend ist zu vermuten, dass es verschiedene chemische Rassen von *A. aerophoba* gibt, die, wie die Arbeiten der Arbeitsgruppe Brümmer zeigen, auch innerhalb eines Habitates nebeneinander auftreten können.

Während Aplysinamisin-1 in *A. aerophoba* fakultativ auftritt, war es in den im Rahmen meiner Diplomarbeit (Thoms 2000, Thoms *et al.* 2004) und Promotion bei Elba und bei Marseille gesammelten Proben des Schwammes *A. cavernicola* immer vorhanden.

#### Aerothionin in mediterranen *Aplysina* - Schwämmen

Aerothionin wurde von Ciminiello *et al.* (1997) als chemotaxonomischer Marker zur Unterscheidung zwischen den beiden mediterranen Schwammarten *A. cavernicola*

und *A. aerophoba* vorgeschlagen. Übereinstimmend mit der Aussage dieser Studie ließ sich in zahlreichen früheren Arbeiten Aerothionin nie im Gewebe des üblicherweise an flachen, sonnenexponierten Standorten wachsenden *A. aerophoba* detektieren (Teeyapant *et al.* 1993a; Weiss *et al.* 1996; Ebel *et al.* 1997,1999; Friedrich *et al.* 2001). Auch die im Rahmen meiner Arbeit bei Banyuls, Südfrankreich (Abb. 3A-3 und Tab. 3A-2) und im ufernahen Flachwasserbereich bei Rovinj, Kroatien gesammelten Individuen wiesen diesen Metaboliten nicht auf (Abb. 3A-1 und Tab. 3A-1)

Brenzinger (1996) berichtet übereinstimmend mit Ciminiello *et al.* (1997) über hohe Konzentrationen von Aerothionin in *A. cavernicola*. Auch meine Analysen von Individuen dieses Schwammes, die der Küste vor Elba, Italien und vor Marseille, Südfrankreich entstammten, bestätigten diesen Befund (Abb.3B-5 und Abb.3C-2). Erstere waren in einer Meerestiefe von 40 m gewachsen, während letztere aus einer Höhle in einer Marseille vorgelagerten Insel entnommen worden waren.

Zusätzlich habe ich jedoch auch bei Rovinj *Aplysina* – Schwämme von Standorten mit geringer Lichtexposition beprobt. Zwei Individuen entstammten einer Tiefe von 26,5 m während ein drittes in einer 7 m tief gelegenen Höhle gesammelt worden war. Diese Exemplare unterschieden sich in ihrem Naturstoffmuster wesentlich von allen anderen zuvor analysierten mediterranen *Aplysina* - Schwämmen. Sie enthielten sowohl die für *A. aerophoba* charakteristischen Metabolite Uranidin und Isofistularin-3 (Cimino *et al.* 1984; Ciminiello *et al.* 1997) in hohen Konzentrationen, als auch das *A. cavernicola* – typische Aerothionin (Abb. 3A-5 und 3A-6). Aus chemischer Sicht stellten diese Individuen eine Mischform zwischen den beiden bisher bekannten mediterranen *Aplysina* – Arten dar. Auch nach morphologischen Gesichtspunkten ließen sie sich nicht eindeutig einer der beiden Arten zuordnen.

Da der augenfälligste Unterschied zwischen den Standorten von *A. cavernicola* und *A. aerophoba* die Lichtbedingungen sind und auch die aerothioninhaltigen Mischformen aus Rovinj an Standorten mit geringer Lichtintensität beprobt worden waren, könnte ein Zusammenhang zwischen der Lichtexposition der Schwämme und dem Auftreten von Aerothionin in ihrem Gewebe vermutet werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass die Präsenz von Cyanobakterien, die ihrerseits nur bei ausreichenden Lichtintensitäten in den Schwämmen auftreten, Auswirkungen auf das Vorhandensein von Aerothionin hat. Jedoch besitzt eine Reihe von karibischen *Aplysina* – Schwämmen sowohl Aerothionin (Acosta *et al.* 1992, Ciminiello *et al.*

1994) als auch Cyanobakterien (Rützler 1985). Viele von ihnen wachsen zudem in Tiefen unterhalb 20 m an exponierten Standorten, was zumindest einen direkten Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und dem Vorhandensein von Aerothionin ausschließt.

Der Fund von Schwämmen im Mittelmeer, deren Naturstoffmuster eine Mischform zwischen *A. aerophoba* und *A. cavernicola* zu sein scheint, stellt nicht nur die Verwendbarkeit des Aerothionins als chemotaxonomischer Marker in Frage. Gleichzeitig wird dadurch auch die bereits viel diskutierte Frage (Ciminiello *et al.* 1997; Pansini 1997) neu aufgeworfen, ob es sich bei den mediterranen *Aplysina* – Schwämmen tatsächlich um getrennte Arten oder aber vielmehr um Morphotypen der gleichen Art unter unterschiedlichen Standortbedingungen handelt. Tabelle 4.1. fasst die Daten aus meiner Arbeit und der Studie der Arbeitsgruppe Brümmer zusammen. Für die im Rahmen beider Untersuchungen gesammelten *Aplysina* – Individuen sind jeweils die im organischen Extrakt dominierenden Alkaloide angegeben.

Tab. 4.1. Sekundärmetabolite in verschiedenen mediterranen *Aplysina* – Schwämmen.

X – in hohen Konzentrationen vorhanden; A.cav P – 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure; Aeroph2 – Aerophobin-2; Isofist3 – Isofistularin-3; Aplysin1 – Aplysinamisin-1; Aeroth – Aerothionin

Sammeldaten	Pigment	Aeroph2	Isofist3	Aplysin1	Aeroth
Flachwasser Limski – Kanal und Banjole – Insel, Rovinj	Uranidin	X	X		
Flachwasser Banyuls und Flachwasser Limski – Kanal, Rovinj	Uranidin	X	X	X	
Höhle in der Banjole – Insel (7 m) und Tiefenproben (26,5 m), Rovinj	Uranidin	X	X	X	X
40m Tiefe bei Elba und Höhle bei Marseille	A.cav P	X		X	X

Aus der Tabelle wird deutlich, wie fließend die Übergänge zwischen den Alkaloidmustern der analysierten Schwämme sind. Hält man an der Unterteilung der Arten anhand der Naturstoffe fest, so muss es sich bei den an lichtarmen Standorten bei Rovinj gefundenen Individuen entweder um eine dritte Spezies oder um einen Hybriden der beiden Arten handeln. Im ersten Fall erscheint jedoch bei Betrachtung der Tabelle 4.1. die Artentrennung willkürlich, da ebenso eine weitere Unterteilung in eine Aplysinamisin-1 – haltigen und eine Aplysinamisin-1 – freie Art (siehe erste beiden Zeilen in der Tabelle) vorgenommen werden könnte.

Möglicherweise muss Aerothionin als chemotaxonomischer Marker verworfen werden. Eventuell lassen sich stattdessen die Pigmente der Schwämme dafür

verwenden. Inwieweit eine chemotaxonomische Herangehensweise an die Klassifizierung von *Aplysina* – Arten überhaupt sinnvoll ist, muss durch Vergleich mit Ergebnissen anderer Ansätze, wie z.B. molekularbiologischen Methoden, geklärt werden. Solche Arbeiten finden derzeit an der Universität Stuttgart in der Arbeitsgruppe von Dr. Brümmer statt.

#### Die Konstanz der Alkaloidmuster in den im flachen, ufernahen Bereichen bei Rovinj gesammelten *A. aerophoba* - Individuen

Der Vergleich der Naturstoffmuster der im Rahmen meiner Arbeit analysierten *A. aerophoba* – Individuen ergab deutliche Schwankungen in den Absolutgehalten der quantifizierten Alkaloide (Tab. 3A-1). Selbst die zehn Individuen, die in Tiefen unterhalb 4 m bei Rovinj gesammelt worden waren und die in ihrer qualitativen Alkaloidzusammensetzung weitgehend übereinstimmten, wiesen Absolutwerte der Gesamtalkaloidgehalte zwischen 157,8 und 241,1  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwammgewebe auf. Selbst bei Vergleich verschiedener Proben eines einzigen *Aplysina* – Individuums hatte sich bereits in früheren Untersuchungen eine ähnliche Schwankungsbreite gezeigt (z.B. Teeyapant & Proksch 1993; Puyana *et al.* 2003). Weit einheitlichere Werte ergeben sich jedoch bei relativer Betrachtung der Daten (Abb. 3A-2). In den aus geringer Tiefe bei Rovinj stammenden *A. aerophoba* – Schwämmen nimmt Isofistularin-3 einen Anteil von  $25,0 \pm 2,0\%$  und Aerophobin-2 einen Anteil von  $68,9 \pm 4,4\%$  am Gesamtalkaloidgehalt ein. Die geringen Standardabweichungen zeigen, dass die relative Zusammensetzung der Isoxazolinalkaloide in den zehn beprobten Schwammindividuen weitestgehend konstant ist.

Eine mögliche Erklärung für die große Variabilität in den Absolutwerten der Metabolitengehalte bei gleichzeitiger Konstanz ihrer relativen Mengenverhältnisse ergibt sich aus Ergebnissen der Arbeiten von Thompson *et al.* (1983) und Turon *et al.* (2000). Diese Studien zeigten anhand von Röntgenanalysen, dass die bromierten Alkaloide im Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen in spezialisierten Zellen, sogenannten Rosettenzellen, gelagert werden. In eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen konnte ich beobachten, dass die Rosettenzellen sehr heterogen

innerhalb des Schwammgewebes verteilt sind. Häufig gibt es dichte Ansammlungen dieser leicht zu identifizierenden Zellen, während sie in manchen elektronenmikroskopischen Schnitten fast vollständig fehlen. Sind die absoluten Gehalte der Alkaloide einer chemischen Rasse, bzw. einer *Aplysina* - Art (je nach Definition, siehe Abschnitt 4.1.) in den Rosettenzellen konstant, so erhält man bei Beprobung des Schwammes in Abhängigkeit von der Zahl der dabei beprobten Rosettenzellen stets ein Vielfaches der immer gleichen Alkaloidkomposition und somit konstante relative Gehalte der Alkaloide.

#### 4A.2 Verletzungsinduzierte Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in *Aplysina* - Schwämmen

Weitaus größere relative Schwankungen als die Anteile der Isoxazolinalkaloide am Gesamtalkaloidgehalt wies hingegen der Anteil des Aeroplysinin-1 in den zehn in Flachwasserbereichen bei Rovinj gesammelten *A. aerophoba* – Individuen auf (Abb. 3A-2). In den Proben aus Banyuls trat dieser Metabolit dagegen gar nicht in detektierbaren Konzentrationen auf (Tab. 3A-2). Ähnliche Beobachtungen waren auch schon in früheren Untersuchungen an *Aplysina* - Schwämmen gemacht worden: Aeroplysinin-1 und auch das strukturell ähnliche Dienon zeigten stets eine erhebliche Variabilität in ihrem Anteil am Gesamtalkaloidgehalt (Teeyapant & Proksch 1993). Während diese Metabolite in manchen Proben überhaupt nicht auftraten, dominierten sie in anderen deutlich den Extrakt eines Schwammgewebestückes. Eine sehr große Schwankungsbreite zeigte sich hierbei auch innerhalb von mehreren Proben eines Individuums. Hierfür gibt es in der Literatur zwei unterschiedliche Erklärungsansätze:

Puyana *et al.* (2003) gehen davon aus, dass es sich auch hierbei, ähnlich wie bei den Schwankungen im Gehalt der Isoxazolinalkaloide, um eine natürliche Variabilität des Alkaloidmusters in *Aplysina* – Schwämmen handelt. Teeyapant & Proksch (1993) kommen dagegen zu dem Schluss, dass es sich bei Aeroplysinin-1 und Dienon um Biotransformationsprodukte handelt, die nach Verletzung des Gewebes von Schwämmen der Gattung *Aplysina* aus den Isoxazolinalkaloiden gebildet werden. Letzterer Erklärung zufolge ist das beobachtete Auftreten von Aeroplysinin-1 und Dienon in *Aplysina* - Schwämmen also eine Folge von Gewebsverletzung bei der

Beprobung. Ziel meiner Untersuchungen war es zu überprüfen, ob das Auftreten von Aeroplysinin-1 und Dienon in *Aplysina* – Schwämmen in Zusammenhang mit einer Verletzung des Gewebes dieser Schwämme steht.

Für die Untersuchungen hierzu wurden ebenfalls die zehn Individuen, die in Rovinj in Tiefen bis 4 m in ufernahem Bereich gesammelt worden waren, verwendet. Wie oben beschrieben wiesen diese jedoch deutliche Schwankungen im Absolutgehalt ihrer Alkaloide auf (Tab. 3A-1). Diese Schwankungen hätten es nicht erlaubt, feine Abstufungen von Veränderungen in ihrem Alkaloidmuster in Experimenten mit mehreren Parallelansätzen zu beobachten. Die Standardabweichungen, die bei der Berechnung von Mittelwerten aus den parallelen Proben entstanden wären, hätten die experimentell verursachten Veränderungen in der Metabolitenzusammensetzung deutlich überlagert. Aus diesem Grund wurden für die im Folgenden beschriebenen Experimente die wesentlich konstanteren relativen Mengenverhältnisse der Alkaloide in den Gewebestücken der Schwammindividuen verwendet.

Ausgangswerte („t0 – Proben“) für die Experimente waren jeweils die Alkaloidmuster in Gewebestücken, die direkt nach der Beprobung der Schwämme eingefroren und anschließend gefriergetrocknet worden waren (Abb. 3A-2). Wie oben beschrieben fand sich in allen diesen Proben bereits Aeroplysinin-1. Nach Puyana *et al.* (2003) ist Aeroplysinin-1 ein konstitutiver Bestandteil des Alkaloidmusters mancher *Aplysina* – Individuen. Die Konzentration dieses Metaboliten ist demnach lediglich natürlichen Schwankungen unterworfen und unabhängig vom Zustand des Schwammgewebes. Der Argumentation von Teeyapant & Proksch (1993) folgend ist das Vorhandensein von Aeroplysinin-1 in den Proben aus Rovinj Folge der bei der Probenahme verursachten Beschädigung des frischen Gewebes. Tatsächlich wurden die in Rovinj genommenen Proben von lebenden Schwämmen abgeschnitten und anschließend in Probenröhrchen hineingedrückt. Dies war für die Durchführung der Experimente mit lebendem Schwammgewebe unter den gegebenen Arbeitsbedingungen unumgänglich. Die Schwämme aus Banyuls, in denen kein Aeroplysinin-1 (Tab. 3A-2) gefunden wurde, waren als Ganzes bei –80 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet worden. Erst danach waren von dem gefriergetrockneten Gewebe Proben für die chemische Analyse entnommen worden.

### Die Biotransformation in Gewebe von *A. aerophoba* nach Lagerung in organischen Lösungsmitteln

Die Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in *A. aerophoba* war von Teeyapant & Proksch (1993) erstmals beobachtet worden, als man das Inhaltsstoffmuster von gefriergetrocknetem Schwammgewebe mit dem von in feuchtem Zustand in organischen Lösungsmitteln konserviertem Schwammmaterial verglich. Während in gefriergetrocknetem Gewebe die Isoxazolinalkaloide dominierten, lagen in den im Lösungsmittel/Seewasser-Gemisch aufbewahrten Schwammstücken hauptsächlich Aeroplysinin-1 und Dienon vor. Meine Experimentreihe habe ich deshalb damit begonnen, den Einfluss der organischen Lösungsmittel Aceton, Ethanol und Methanol auf das Alkaloidmuster in den *A. aerophoba* – Individuen aus Rovinj zu beschreiben. Anhand einer Zeitserie wollte ich überprüfen, ob ein Verlauf der Veränderungen in der Sekundärmetaboliten – Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Dauer der Lösungsmittlexposition zu beobachten ist.

Ein solcher Verlauf war in den Experimenten mit allen drei Lösungsmitteln deutlich zu erkennen (Abb. 3A-7). Während in der  $t_0$ -Probe (ohne Lösungsmittlexposition) der Anteil des Aeroplysinin-1 noch bei 3,2% am Gesamtalkaloidgehalt (definiert als Summe der Gehalte an Isofistularin-3, Aerophobin-2, Aplysinamin-1, Aeroplysinin-1 und Dienon) lag, befand sich nach 120 min Lösungsmittlexposition fast ausschließlich Aeroplysinin-1 in den Proben. Die Isoxazolinalkaloide, anfangs noch mit einem Anteil von 96,8% deutlich dominierend, waren am Ende des Experimentes nur noch zu einem Bruchteil ihres ursprünglichen Gehaltes vorhanden. Die Veränderungen im Alkaloidmuster zeigten einen graduellen Verlauf, wobei sich der Aeroplysinin-1 Anteil asymptotisch 100% annäherte. Dass diese Verschiebung in den prozentualen Anteilen nicht nur auf Veränderungen einer der Komponenten zurückzuführen ist, wird durch einen Vergleich der Absolutgehalte in den Proben vor und nach dem Experiment deutlich. Während die Isoxazolinalkaloide in den  $t_0$ -Proben zusammen einen Gehalt von  $155,0 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwammgewebe besaßen, war ihr Gehalt nach 120 minütiger Lösungsmittlexposition, abhängig von der Art des Lösungsmittels, auf Werte zwischen  $14,4$  und  $29,3 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwamm abgefallen. Die von Teeyapant & Proksch (1993) als Biotransformationsprodukte beschriebenen Metaboliten Aeroplysinin-1 und Dienon waren in der Summe von einem ursprünglichen Wert von  $5,3 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG auf Werte zwischen  $172,8$  (Methanol) und  $276,0 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwammgewebe angestiegen. Diese

Werte sind, wie oben beschrieben, aufgrund der stark schwankenden Gesamtalkaloidgehalte in den beprobten Schwammstücken nur sehr bedingt miteinander vergleichbar. Sie geben aber dennoch einen Eindruck von den deutlichen Veränderungen im Alkaloidmuster der Proben und lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass die Isoxazolinalkaloide im Schwamm, wie von Teeyapant & Proksch (1993) beschrieben, nach Lösungsmittlexposition in die niedermolekularen Alkaloide Aeroplysinin-1 und Dienon umgewandelt werden.

Darüber, weshalb sich der Verlauf der Alkaloidmusteränderungen in den in Methanol inkubierten Proben etwas von den Verläufen in Aceton und Ethanol unterschied lässt sich nur spekulieren. Chemische oder biologische Unterschiede in den für die Experimente verwendeten Schwammstücken wären denkbar. Da jedoch für alle Experimente Stücke des gleichen Individuums verwendet worden waren, ist wahrscheinlicher, dass die beobachteten Abweichungen in den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Lösungsmittel (z.B. Polarität) begründet sind. Unabhängig von den Lösungsmitteln wurde dennoch in allen Experimentansätzen die Verringerung der Isoxazolinalkaloid – Konzentrationen bei gleichzeitigem Anstieg der von Teeyapant & Proksch (1993) beschriebenen Biotransformationsprodukte in Abhängigkeit von der Dauer der Lösungsmittlexposition deutlich (Abb. 3A-7).

#### Die Biotransformation nach mechanischer Gewebsverletzung

In verschiedenen Publikationen der Arbeitsgruppe Proksch (z.B. Teeyapant & Proksch 1993; Teeyapant *et al.* 1993 a, b; Weiss *et al.* 1996; Ebel *et al.* 1997 und Thoms *et al.* 2004) war über einen ökologischen Nutzen der Biotransformation für die *Aplysina* – Schwämme nachgedacht worden. Mit dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Experiment konnte ich die Entstehung von Aeroplysinin-1 und Dienon in Schwammgewebe nach Lösungsmittlexposition zeigen. Dass diese experimentellen Bedingungen wenig mit natürlichen Gegebenheiten gemeinsam haben, ist offensichtlich. Somit lässt dieses Experiment alleine kaum Rückschlüsse auf ökologische Zusammenhänge zu. Ein möglicher natürlicher Auslöser der Biotransformation in Schwämmen der Gattung *Aplysina* wäre die mechanische Verletzung des Gewebes, beispielsweise durch Fraßfeinde. Ist dies der Fall, so ist ein Zusammenhang zwischen der Verletzungsintensität und dem Ausmaß der

Veränderungen des Alkaloidmusters im Schwammgewebe zu erwarten. Um einen solchen Zusammenhang zu überprüfen, fügte ich Gewebestücken von *A. aerophoba* Verletzungen unterschiedlicher Intensität zu. Diese Proben wurden anschließend extrahiert und mittels HPLC – UV analysiert um resultierende Veränderungen im Alkaloidmuster zu beobachten.

Das Anschneiden des Schwammgewebes mit einem Skalpell über einen Zeitraum von 15 sec bewirkte noch keine erkennbare Veränderung der Alkaloidzusammensetzung im Vergleich zu den nahezu unbeschädigten Kontrollen (Abb. 3A-8). Erst durch Mörsern des Gewebes ergaben sich deutliche Unterschiede: Nach 15sekündigem Mörsern war das Gewebe in kleinere Stücke zerteilt worden. Der Aeroplysinin-1 – Anteil war hierdurch auf  $33,2 \pm 11,9\%$  am Gesamtalkaloidgehalt angestiegen. Die Beschädigung, die durch fünfminütiges Mörsern erreicht wurde (das Schwammgewebe wurde hierbei zu einem feinkörnigen Brei zermahlen), bewirkte schließlich einen Anstieg des Aeroplysinin-1 – Anteils von ursprünglich  $6,2 \pm 5,5\%$  (in den Kontrollen) auf  $67,3 \pm 12,0\%$ . Der erwartete Zusammenhang zwischen der Verletzungsintensität und dem Ausmaß der Umsetzung der Isoxazolinalkaloide zu den Biotransformationsprodukten konnte in frischem Gewebe von *A. aerophoba* also beobachtet werden (Abb. 3A-8).

Durch Zugabe von Ethanol zum Gewebe wurde eine zusätzliche Steigerung der Ausbeute an Biotransformationsprodukten nach dem Mörsern erzielt (Abb. 3A-8). Dies hat vermutlich zwei Gründe: Erstens führt der Kontakt der Rosettenzellen mit Ethanol ebenfalls zu einer Induktion der Biotransformation, wie meine Experimente zu den Auswirkungen von Lösungsmittelexposition auf das Alkaloidmuster in *A. aerophoba* gezeigt haben (siehe voriger Abschnitt). Zweitens liegen vermutlich einige der Isoxazolinalkaloide in den Rosettenzellen in kristalliner Form vor, da sie nur begrenzt wasserlöslich sind. Dies trifft in *A. aerophoba* wahrscheinlich vor allem für das Isofistularin-3 zu, da dieses Molekül im Vergleich mit den anderen Schwammalkaloiden die geringste Polarität aufweist. Reaktionen in wässrigem Medium stehen diese Alkaloidkristalle wahrscheinlich nicht unmittelbar zur Verfügung. Zugegebener Ethanol wirkt hier vermutlich als Lösungsvermittler und beschleunigt so Transformationsreaktionen.

Weitere Hinweise darauf, dass die Geschwindigkeit der Umsetzung der Isoxazolinalkaloide abhängig von der Polarität dieser Metabolite ist, zeigten sich in allen meinen Experimenten zur Biotransformation. Stets waren die unpolaren

Isoxazolinalkaloide (mit Retentionszeiten in den HPLC – Läufen zwischen 25 und 30 min) gegen Ende der Experimente noch in einer vergleichsweise höheren Restkonzentration vorhanden, während die polareren (mit Retentionszeiten zwischen 15 und 20 min) sehr schnell vollständig umgesetzt worden waren (z.B. Abb. 3A-9, 3A-10, 3A-11).

Bereits in Studien von Ebel *et al.* (1997) war der Zeitverlauf der Biotransformation nach mechanischer Beschädigung des Gewebes von *A. aerophoba* untersucht worden. Ein entsprechendes Experiment habe ich auch im Rahmen meiner Untersuchungen zur Biotransformation in *A. aerophoba* durchgeführt. Während die experimentellen Vorgehensweisen weitgehend übereinstimmten, unterschieden sich die Alkaloidzusammensetzungen in den für die Experimente verwendeten Individuen: Der von Ebel *et al.* (1997) verwendete *A. aerophoba* – Schwamm besaß zusätzlich zu den Isoxazolinalkaloiden Aerophobin-2 und Isofistularin-3 auch Aplysinamin-1, das etwa 30% am Gesamtalkaloidgehalt ausmachte.

Unabhängig von diesem Unterschied im Metabolitenmuster lief die Biotransformations – Reaktion in beiden Studien übereinstimmend innerhalb von ca. 40 sec nach Gewebsverletzung ab (Abb.3A-9). Während die Isoxazolinalkaloide in meinen Experimenten jedoch ausschließlich zu Aeroplysinin-1 transformiert wurden, entstand in der Untersuchung von Ebel *et al.* (1997) hauptsächlich Dienon. Außerdem fand die Umsetzung der Isoxazolinalkaloide in dieser Studie in einem wesentlich größeren Umfang statt, als das in meinen Experimenten der Fall war: nach dem Mörsern des Schwammgewebes hatten die Biotransformationsprodukte (in diesem Fall Aeroplysinin-1 und Dienon) gemeinsam einen Anteil von etwa 90% des Gesamtalkaloidgehaltes (Ebel *et al.*, 1997). In meinen Experimenten wurde dagegen selbst nach 5minütigem Mörsern der Proben lediglich ein Anteil von  $67,3 \pm 12,0\%$  am Gesamtalkaloidgehalt erreicht (Abb.3A-8). Es scheint also, dass neben Unterschieden in der Alkaloidzusammensetzung in verschiedenen *A. aerophoba* – Individuen auch Unterschiede in der Effizienz der verletzungsinduzierten Umsetzung ihrer Alkaloide bestehen. Diese machen sich sowohl quantitativ (im unterschiedlichen Ausmaß der Umsetzung), als auch qualitativ (hinsichtlich der Entstehung des Dienons) bemerkbar.

Durch die starken Schwankungen der absoluten Alkaloidgehalte im Gewebe eines *Aplysina* – Individuums lassen sich, wie oben beschrieben, experimentell induzierte

Veränderungen im Alkaloidmuster nur schwer erkennen. Bei Experimenten mit frischem Schwammgewebe habe ich dieses Problem umgangen, indem ich die konstantere relative Alkaloidzusammensetzung der Proben miteinander verglichen habe. Zusätzlich habe ich jedoch auch Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen durchgeführt. Hierbei ist es, im Gegensatz zu frischem Schwammmaterial möglich, das Gewebe vor Beginn der Experimente zu mörsern und das entstehende Pulver zu homogenisieren. Die chemische Analyse des gefriergetrockneten und gemörserten Materials ergab, dass hierbei keine Biotransformationsprodukte entstehen. Erst durch Zugabe von Seewasser zu solchen Proben findet die Biotransformation der Isoxazolinalkaloide (meist in sehr deutlichem Umfang) statt. Ähnlich wie durch Mörsern von frischem Material werden beim Mörsern des gefriergetrockneten Schwammgewebes sehr wahrscheinlich die darin vorhandenen Rosettenzellen zerstört. Die Zugabe von Seewasser ermöglicht dann die anscheinend in Anwesenheit von Wasser stattfindenden Transformationsreaktionen, die auch im frischen Gewebe nach Dekompartimentierung der Rosettenzellen beobachtet werden.

Die Experimente an homogenisiertem, gefriergetrockneten Schwammmaterial bringen im Vergleich mit Untersuchungen an frischem Gewebe einen wesentlichen Vorteil: Wird ein Experiment mit Unterproben der selben homogenisierten Schwammprobe durchgeführt, so ist die Ausgangs – Alkaloidzusammensetzung auch hinsichtlich der absoluten Gehalte der Alkaloide immer übereinstimmend. Somit sind, anders als bei Experimenten mit frischem Schwammgewebe, die unterschiedlichen Proben eines Experimentes auch hinsichtlich der Absolutwerte ihrer Alkaloidkonzentrationen uneingeschränkt vergleichbar.

Durch Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von *Aplysina* - Schwämmen konnte ich eindeutig belegen, dass die Entstehung der Biotransformationsprodukte parallel mit einem Rückgang der Isoxazolinalkaloid - Konzentrationen verläuft: So wiesen beispielsweise in den ursprünglich identischen Unterproben der *A. aerophoba* – Probe 4/1/K die Isoxazolinalkaloide vor Seewasserzugabe einen Gehalt von  $232,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ , die Biotransformationsprodukte einen Gehalt von  $6,4 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG Schwamm auf (Tab. 3A-4). Nach Inkubation in Seewasser über Nacht lag der Gehalt der Isoxazolinalkaloide nur noch bei  $44,3 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG, während die Biotransformationsprodukte auf  $168,4 \mu\text{mol g}^{-1}$  TG angestiegen waren.

Da alle in einem Experiment verwendeten Proben ursprünglich eine identische Alkaloidzusammensetzung gehabt hatten, wurde zudem klar, dass die beobachteten Unterschiede in den Proben vor und nach Seewasserzugabe nicht durch die natürliche Variabilität der Alkaloidzusammensetzung in den für das Experiment verwendeten Gewebestücken erklärbar ist.

Vorteil der Experimente mit frischem Material ist dagegen, dass die experimentellen Bedingungen näher an den Gegebenheiten in der Natur liegen. Durch Kombination der Ergebnisse beider Ansätze wird jedoch klar, dass auch in frischem Schwammgewebe die Konzentrationsveränderungen der Isoxazolinalkaloide, des Aeroplysinin-1 und des Dienons nicht unabhängig voneinander ablaufen. Alle Daten gemeinsam weisen darauf hin, dass in Folge der Verletzung eines lebenden *A. aerophoba* – Schwammes die ursprünglich im Gewebe vorhandenen Isoxazolinalkaloide zu den niedermolekularen Substanzen Aeroplysinin-1 und/oder Dienon abgebaut werden.

Puyana *et al.* (2003) haben Untersuchungen an lebenden Individuen von karibischen *Aplysina* – Arten an deren natürlichen Standorten im Meer und im Aquarium durchgeführt. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass in diesen Arten keine verletzungsinduzierte Biotransformation der Isoxazolinalkaloide abläuft und schließen daraus, dass wahrscheinlich auch in mediterranen *Aplysina* – Arten die Konzentrationen an Aeroplysinin-1 und Dienon unabhängig vom verletzungsinduzierten Reaktionen sind, Wie kommt es, dass Puyana *et al.* (2003) zu solch einem gegensätzlichen Ergebnis kommen?

Hierfür sind vermutlich vor allem Unterschiede in der experimentellen Herangehensweise verantwortlich:

- 1) In allen Experimenten, die in dieser Studie durchgeführt wurden, wurde das Schwammgewebe lediglich durch 15sekündiges Einschneiden mit einem Skalpell verletzt. Eine entsprechende Beschädigung des Gewebes von *A. aerophoba* hatte in meinen Experimenten zu keinen erkennbaren Veränderungen des Alkaloidmusters geführt. Erst bei einer Erhöhung der Verletzungsintensität (durch Mörsern des Gewebes) war es zu der Biotransformation in erkennbarem Ausmaß gekommen. Es ist anzunehmen, dass es durch Skalpellschnitte nur zu einer Dekompartimentierung der an der Schnittoberfläche liegenden Rosettenzellen kommt. Die daraus sehr lokal auftretenden Biotransformationsreaktionen reichen vermutlich nicht aus, um

sehr deutliche Veränderungen im Alkaloidmuster einer Gewebeprobe zu erzeugen.

- 2) Bei einem Großteil der Zeitserien, die in der Arbeit von Puyana *et al.* (2003) zur Untersuchung der Veränderungen des Alkaloidmusters in *A. insularis* nach Gewebsverletzung durchgeführt wurden, wurde die erste Probe erst 5 min nach der Verletzung genommen. Meine Experimente, wie auch die Studie von Ebel *et al.* (1997) haben gezeigt, dass die Biotransformation in *A. aerophoba* bereits innerhalb von ca. 40 sec nach Beschädigung des Gewebes abläuft. Spätestens nach einer Minute zeigen sich keine weiteren Änderungen im Alkaloidmuster. Geht man davon aus, dass der Verlauf der Reaktion in den karibischen *Aplysina* – Arten ähnlich ist, ist auch in den von Puyana *et al.* (2003) durchgeführten Zeitserien zwischen 5 und 30 bzw. 120 min keine weitere Änderung zu erwarten.

Dennoch gibt es in der Arbeit von Puyana *et al.* (2003) einige Daten, die auf die Entstehung von Aeroplysinin-1 und Dienon in den beprobten Schwämmen aufgrund einer Beschädigung ihres Gewebes hinweisen. So wurden Proben von *A. insularis* bei den Bahamas und an den Florida Keys gesammelt und direkt im Anschluß eingefroren. Während die Bahamas – Proben vor der Extraktion gefriergetrocknet wurden, wurde das bei Florida gesammelte Material zur Extraktion direkt in Aceton gegeben und taute dabei im Lösungsmittel/Wasser – Gemisch auf. Meine Experimente hatten gezeigt, dass in *A. aerophoba* aufgrund letzterer Behandlung Aeroplysinin-1 und / oder Dienon entstehen (Abb. 3A-7). Tatsächlich fand sich in den feucht extrahierten *A. insularis* – Proben aus Florida Aeroplysinin-1 in Konzentrationen von im Schnitt über  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  und Dienon in Konzentrationen um  $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$  Schwammgewebe. In den Bahamas – Proben, die abgesehen von der Gefriertrocknung vor der Extraktion gleich behandelt worden waren, hatte Dienon lediglich einen Gehalt von ca.  $0,04 \text{ mg ml}^{-1}$  Schwammgewebe. Aeroplysinin-1 trat hier nicht auf. Die Gehalte der Biotransformationsprodukte in den feucht extrahierten Proben aus Florida lagen somit in der Summe 20fach höher als im gefriergetrockneten Material, das bei den Bahamas gesammelt worden war. Puyana *et al.* (2003) stellen für das Fehlen des Aeroplysinin-1 in den Bahamas - Proben drei mögliche Erklärungen zur Auswahl:

*(1) Aeroplysinin-1 ist kein Bestandteil des Alkaloidmusters der Schwämme von den Bahamas, während es in den bei Florida gesammelten Schwämmen konstitutiv auftritt.*

Dass es sich bei den Unterschieden zwischen den Alkaloidmustern der *A. insularis* – Proben, die unterschiedlichen Habitaten entstammten, um natürliche Schwankungen handelt, kann selbstverständlich nicht vollständig ausgeschlossen werden. Große Schwankungen im Alkaloidmuster und in der Effizienz der Umsetzung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1 und Dienon zeigten sich ebenfalls in meinen Untersuchungen und bei Vergleich meiner Daten (Tab. 3A-4) mit den Ergebnissen von Ebel *et al.* (1997). Dass aber auch in ursprünglich identischen Proben von *Aplysina* – Schwämmen ein deutlicher Anstieg im Aeroplysinin-1 - und Dienon – Gehalt bei gleichzeitigem Absinken der Isoxazolinalkaloid – Gehalt induzierbar ist, konnte ich anhand von Experimenten mit homogenisiertem, gefriergetrocknetem Gewebe zeigen (z.B. Abb.3A-10, 3A-11, 3A-12, 3A-13; Tab. 3A-4). Darüber hinaus zeigten meine Experimente zur Wirkung von Lösungsmitteln auf das Alkaloidmuster in *A. aerophoba*, dass nach ausreichend langer Aceton - Exposition (120 min) der Anteil des Aeroplysinin-1 am molaren Gesamtalkaloidgehalt von ursprünglich 3,2 auf 90,1% ansteigt (Abb.3A-7). Diese große Differenz ist mit natürlichen Schwankungen nicht mehr zu erklären.

*(2) Durch Extraktion des gefriergetrockneten Materials wurde Aeroplysinin-1 aus den Bahamas – Proben nicht so effizient herausgelöst, wie aus dem frischen Material, das bei Florida gesammelt worden war.*

Basierend auf ihren kürzeren Retentionszeiten in der HPLC ist zu vermuten, dass Aeroplysinin-1 und Dienon eine höhere Polarität als die in den *Aplysina* – Schwämmen auftretenden Isoxazolinalkaloide aufweisen. Entsprechend ist eine unterschiedliche Effizienz der Extraktion der jeweiligen *Aplysina* - Alkaloide in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel denkbar, die je nach Extraktionsmethode zu unterschiedlichen relativen Anteilen der Alkaloide führen kann. Meine Experimente, in denen solche Lösungsmiteleinflüsse nicht zum Tragen kamen, in denen aber dennoch Proben mit sehr unterschiedlicher Alkaloid – Zusammensetzung auftraten, zeigen dass dies als Erklärung für die beobachteten Unterschiede im Alkaloidmuster von *Aplysina* – Schwämmen nicht ausreichen kann. Zu diesen Experimenten gehörte die mechanische Verletzung von frischem Gewebe

in unterschiedlicher Intensität (Abb. 3A-8). Diese Behandlung hatte abhängig vom verursachten Verletzungsgrad zu deutlichen Veränderungen im Alkaloidmuster der Gewebeproben geführt. Der Anteil des Aeroplysinin-1 war hierbei von ursprünglich  $6,2 \pm 5,5\%$  in unverletztem Gewebe auf  $90,4 \pm 7,5\%$  angestiegen. Die Extraktionsmethode war in allen Ansätzen identisch. Weiterhin zeigte sich in meinen Experimenten mit gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen eine in manchen Proben nahezu vollständige Umsetzung der ursprünglich vorhandenen Isoxazolinalkaloide in die Biotransformationsprodukte (z.B. Tab. 3A-4). Das Gewebe wurde nach Inkubation in Seewasser erneut gefriergetrocknet, so dass auch hier die Extraktionsbedingungen identisch mit denen der Kontrollproben waren.

*(3) Aeroplysinin-1 wird nur bei Kontakt des Lösungsmittels mit feuchtem Schwammgewebe gebildet; einen solchen Kontakt hatte es nur bei den Proben aus Florida gegeben.*

Einen Großteil meiner Experimente zur Biotransformation hatte ich so gestaltet, dass frisches Schwammgewebe zunächst gefriergetrocknet wurde, bevor es zur Extraktion in mit Lösungsmittel Kontakt kam. Dennoch lagen auch in solchen Proben, abhängig von der experimentellen Behandlung, Aeroplysinin-1 und Dienon in Konzentrationen vor, die mehr als 90% am Gesamtalkaloidgehalt im Gewebe ausmachten (z.B. Abb. 3A-8). Entsprechend ist es ausgeschlossen, dass es sich bei Aeroplysinin-1 und Dienon lediglich um Artefakte handelt, die bei Kontakt von frischem Schwammgewebe mit organischem Lösungsmittel entstehen.

Ebenso traten in meinen Experimenten, wiederum abhängig von der experimentellen Behandlung, auch zahlreiche gefriergetrocknete Proben auf, die nach Extraktion mit Lösungsmitteln nahezu frei von Aeroplysinin-1 und Dienon waren (z.B. Abb. 3A-3; Tab. 3A-4). Damit ist auch ausgeschlossen, dass sich diese Alkaloide als Artefakte nach Kontakt von gefriergetrocknetem Schwammgewebe mit organischen Lösungsmitteln bilden.

Puyana *et al.* (2003) analysierten in der Mehrzahl ihrer Experimente Veränderungen im Alkaloidmuster von *A. insularis* im Zeitraum zwischen 5 und 30 bzw. 120 min nach Gewebsverletzung. In diesen Experimenten hatte sich kein Anstieg des Aeroplysinin-

1 und Dienon – Gehaltes nach Verletzung des Gewebes mit einem Skalpell im Schwamm gezeigt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein Zeitserien – Experiment mit einem *A. insularis* – Individuum durchgeführt, in dem entsprechende Veränderungen innerhalb von 150 sec nach Beschädigung des Schwammes untersucht wurden. Auch für diese Zeitserie wurden das Schwammgewebe lediglich durch 15sekündiges Anschneiden mit einem Skalpell verletzt, was in meinen Experimenten mit *A. aerophoba* nicht zu einer erkennbaren Erhöhung der Gehalte an Aeroplysinin-1 und Dienon geführt hatte (Abb. 3A-8). Die von Puyana *et al.* (2003) veröffentlichten Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 4A-1 dargestellt.

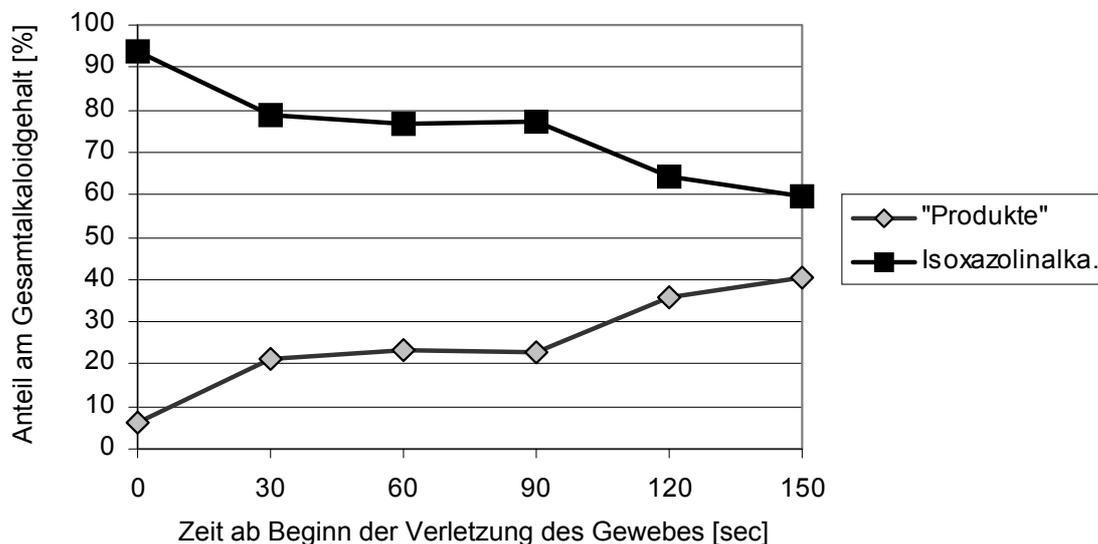


Abb. 4A-1: Grafische Darstellung von Daten aus Puyana *et al.* (2003): Veränderungen im Alkaloidmuster nach Verletzung des frischen Gewebes von *A. insularis* durch 15sekündiges Anschneiden mit einem Skalpell.

- „Produkte“ = Summe der Anteile von Aeroplysinin-1 und Dienon
- Isoxazolinalka. = Summe der Anteile aller im Gewebe des Schwammes quantifizierter Isoxazolinalkaloide

Die Arbeiten von Ebel *et al.* (1997) und meine Untersuchungen (Abb. 3A-9) haben gezeigt, dass die Biotransformations - Reaktionen in *A. aerophoba* in weniger als 1 min nach Gewebsverletzung ablaufen. Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass diese Reaktionen auch in karibischen *Aplysina* – Schwämmen innerhalb eines Zeitraumes < 5 min beendet sind. In diesem Fall stellen die in Abb. 4A-1 abgebildete Daten das einzige Experiment mit dem Schwamm *A. insularis* in der Studie von Puyana *et al.* (2003) dar, bei dem zu erwarten wäre, dass ein Änderungsverlauf des Alkaloidmusters beobachtet werden kann. Tatsächlich deutet sich in Abb. 4A-1 der erwartete Änderungsverlauf an. In den ersten 150 sec nach Gewebsverletzung sinkt

der Isoxazolinalkaloid – Anteil zugunsten des Anteils der Biotransformationsprodukte Aeroplysinin-1 und Dienon am Gesamtalkaloidgehalt. Das würde bedeuten, dass *A. insularis* im Experiment von Puyana *et al.* (2003) stärker auf die Verletzung reagiert hat, als das bei den von mir bei Rovinj gesammelten *A. aerophoba* – Individuen der Fall war. In den Rovinj – Schwämmen hatte 15sekündiges Anschneiden mit einem Skalpell zu keinen erkennbaren Änderungen im Alkaloidmuster geführt. Dennoch war auch in *A. insularis* der Umfang der Isoxazolinalkaloid – Umsetzung so gering, dass nur bei relativer Betrachtung der Alkaloidgehalte in den Proben eine Veränderung beobachtet werden kann. Die Änderungen in den Absolutgehalten der Metabolite reichen nicht aus, um gegenüber dem Rauschen der Gesamtalkaloidgehalts – Schwankungen hervorzutreten.

Das in Abb. 4A-1 dargestellte Experiment wurde von Puyana *et al.* (2003) lediglich an einem Individuum durchgeführt und pro Messzeitpunkt wurde jeweils nur eine Probe genommen. Entsprechend ist es nur bedingt angebracht, die in diesem Experiment gemachten Beobachtungen zu verallgemeinern. Interpretiert man aus den Daten dennoch, dass im Gewebe dieses *A. insularis* – Individuums die Biotransformation stattgefunden hat, bleibt zu erklären, warum in den Langzeitserien mit *A. insularis* keine Unterschiede zwischen den Alkaloidmustern der Kontrollproben und der verletzten Gewebestücke festgestellt worden waren. Auch wenn aufgrund des langen Zeitabstandes zwischen der Verletzung und der ersten Probenahme in den darauffolgenden Proben kein Änderungsverlauf mehr zu beobachten war, so hätte man doch einen Unterschied zwischen den unverletzten Kontrollen und den verletzten Proben erwarten können. Vermutlich verhinderte aber auch hier der lange Zeitabstand zwischen der Verletzung des Gewebes und der ersten Probenahme ein entsprechendes Resultat. Die geringen, durch die Skalpellverletzung erzeugten Mengen an Biotransformationsprodukten waren über einen Zeitraum von 5 min und mehr dem umgebenden Seewasser ausgesetzt. Es ist damit zu vermuten, dass die polaren Biotransformationsprodukte nach dieser Zeit größtenteils aus dem verletzten Oberflächengewebe ausgespült worden waren, bevor die erste Probe genommen wurde. Die dennoch in den Schwammstücken detektierten Biotransformationsprodukt – Konzentrationen sind vermutlich auf die Bearbeitung des Schwammgewebes nach den eigentlichen Experimenten zurückzuführen. Die Proben von den Bahamas wurden von den Schwämmen mit einem Skalpell abgeschnittenen, bevor sie eingefroren und gefriergetrocknet wurden. Hierbei entstanden für alle Proben des

Experimentes mehr oder weniger einheitliche, sehr geringe Biotransformationsprodukt – Konzentrationen. Im Gewebe der Schwämme, die bei Florida gesammelt worden waren, wurde die Biotransformation zusätzlich durch das Auftauen der feuchten Proben in organischem Lösungsmittel induziert. Somit lagen die Konzentrationen der Biotransformationsprodukte höher als bei den Bahamas - Proben. Doch auch bei den Proben aus Florida war die Bearbeitung im Anschluss an das eigentliche Zeitserienexperiment für alle Proben des Experimentes einheitlich. Dies begründet vermutlich auch hier das weitgehend identische Alkaloidmuster dieser Proben.

Somit widersprechen sich die Daten der Studie von Puyana *et al.* (2003) und die Beobachtungen zur Biotransformation, die von Teeyapant & Proksch (1993), Ebel *et al.* (1997) und in meiner Arbeit gemacht worden waren, nicht. Vielmehr lässt sich anhand der Ergebnisse von Puyana *et al.* (2003) vermuten, dass die im mediterranen Schwamm *A. aerophoba* beobachtete verletzungsinduzierte Biotransformation auch in dem karibischen Schwamm *A. insularis* abläuft. Dass die Biotransformation nicht nur auf *A. aerophoba* beschränkt ist, sondern auch in auch in anderen *Aplysina* – Arten abläuft, zeigten meine Experimente mit gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe dieser Schwämme. Nach Zugabe von Seewasser zu Gewebe des mediterranen Schwammes *A. cavernicola* und der karibischen Arten *A. archeri* und *A. fistularis* zeigte die Biotransformation hierin sogar einen deutlicheren Verlauf, als es in gefriergetrocknetem und gemörsertem Gewebe von *A. aerophoba* der Fall gewesen war (Abb. 3A-10, 3A-11; 3A-12; Tab. 3A-4). Ebel *et al.* (1997) hatten zuvor schon in Experimenten mit zellfreien Enzymextrakten der Schwämme *A. cavernicola*, *A. archeri*, *A. cauliformis*, *A. fistularis*, *A. fulva* und *A. lacunosa* gezeigt, dass diese in der Lage sind, zugesetztes Aerophobin-2 zu Dienon transformieren.

All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verletzungsinduzierte Biotransformation der Isoxazolinalkaloide zu Aeroelysinin-1 und Dienon eine Prozess ist, der in allen *Aplysina* – Arten unabhängig von der geographischen Herkunft stattfindet. Möglicherweise findet diese Reaktion sogar in allen Schwämmen statt, die bromierte Isoxazolinalkaloide akkumulieren. Damit würde sich das Vorhandensein der Biotransformation auf alle Schwämme der Ordnung Verongida erstrecken.

### Handelt es sich bei der Biotransformation um eine Enzymreaktion?

Aus den Überlegungen im vorigen Abschnitt ergibt sich die Frage, ob die Biotransformation ein Phänomen ist, das sich auf bestimmte Schwammarten beschränkt. Die Isoxazolinalkaloide, die Vorstufen der Reaktion, treten nahezu ausschließlich in Schwämmen der Ordnung Verongida auf. Doch möglicherweise handelt es sich bei der Spaltung dieser Metabolite um einen von seiner biologischen Umgebung unabhängigen, rein chemischen Prozess, der auch in anderen Schwämmen und vielleicht sogar außerhalb des Schwammgewebes stattfinden kann.

Um dieser Frage nachzugehen, habe ich frischem Gewebe des Schwammes *Crambe crambe* (Ordnung Myxillida) Isoxazolinalkaloide hinzugefügt, die zuvor aus *A. aerophoba* isoliert worden waren. In gleicher Weise wie die Proben von *A. aerophoba* habe ich das mit den Biotransformationsvorstufen versetzte Gewebe von *C. crambe* über 5 min gemörstert und anschließend extrahiert. Die zugegebenen Isoxazolinalkaloide waren nach dieser Behandlung unverändert im Schwammgewebe erhalten geblieben (Abb. 3A-18). Es waren keine Biotransformationsprodukte entstanden.

Auch zugesetztes Aeroplysinin-1, das im Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen nach Verletzung meist weiter zu Dienon reagiert, blieb in *C. crambe* nach Mörsern des frischen Schwammgewebes erhalten (Abb. 3A-18).

Ergänzend habe ich entsprechende Versuche mit gefriergetrocknetem und gemörstertem Gewebe von *C. crambe* durchgeführt. In getrennten Ansätzen wurde Gewebe dieses Schwammes mit isolierten Isoxazolinalkaloiden und Aeroplysinin-1 versetzt und das Gemisch wurde für 24 h in Seewasser inkubiert. Auch diese Behandlung bewirkte keine Transformation der zugesetzten Metabolite (Abb. 3A-18). Dagegen wurden die aus *A. aerophoba* isolierten Alkaloide, bei ansonsten identischer Vorgehensweise, im Schwamm *Aplysina archeri* (Ordnung Verongida) nahezu vollständig zu Dienon umgesetzt (Abb. 3A-17).

Ein weiteres Experiment zur Transformation der Isoxazolinalkaloide außerhalb des Gewebes von *Aplysina* – Schwämmen habe ich mit gefriergetrocknetem und gemörstertem Gewebe der mediterranen Schnecke *Tylodina perversa* durchgeführt. Diese Schnecke frisst den Schwamm *A. aerophoba* und lagert dabei die Isoxazolinalkaloide aus ihrer Beute in ihr eigenes Gewebe ein (siehe Abschnitt 4B).

Es war deshalb nicht notwendig, das Schneckengewebe künstlich mit diesen Metaboliten zu versetzen um entsprechende Experimente durchzuführen. Nachdem das gefriergetrocknete und gemörserte Gewebe von *T. perversa* – in gleicher Weise, wie in den oben beschriebenen Experimenten die Schwammgewebe – über 24 h in Seewasser inkubiert worden war, blieben die darin enthaltenen Isoxazolinalkaloide unverändert erhalten (Abb. 3A-19).

Weitere Experimente zur chemischen Stabilität der *Aplysina* – Metaboliten habe ich mit dem Methanolextrakt von *A. cavernicola* durchgeführt. Diese zeigten, dass aus den Isoxazolinalkaloiden – selbst bei sehr hohen Temperaturen – keine Biotransformationsprodukte gebildet werden. Selbst nach achtstündiger Inkubation in Seewasser bei einer Temperatur von 110 °C entstanden Aeroplysinin-1 und Dienon nicht (Abb. 3A-13). Für den Ablauf der Biotransformation sind demnach weitere Faktoren notwendig, die nicht im Gewebe des Schwammes *C. crambe* und *T. perversa*, sondern nur in *Aplysina* – Schwämmen vorhanden sind.

Diese Befunde werden durch Ergebnisse von Ebel *et al.* (1997) gestützt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zugesetztes Aerophobin-2 in zellfreien Enzymextrakten aller sieben getesteter *Aplysina* – Arten zu Dienon transformiert wird. In entsprechenden Experimenten mit Enzymextrakten von Schwämmen, die nicht der Gattung *Aplysina* angehören (*Stellella globostellata* (Ordnung Astrophorida), *Axinella carteri* (Ordnung Halichondrida) und *Theonella swinhoei* (Ordnung Lithistida)), kam es zu keiner Transformation des Aerophobin-2.

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass die Spaltung der Isoxazolinalkaloide und die Umsetzung von Aeroplysinin-1 zu Dienon nicht spontan stattfindet. Es bedarf hierfür weiterer Faktoren, die sich im Gewebe und im Enzymextrakt von *Aplysina* – Schwämmen finden. Darüber hinaus hatte sich gezeigt, dass die Biotransformationsreaktionen nur bei Anwesenheit von Wasser ablaufen. Im gefriergetrockneten Gewebe, das nicht mit Seewasser vermischt worden war, blieben die Isoxazolinalkaloide bei Raumtemperatur über mehrere Monate hinweg in ihrem ursprünglichen Zustand erhalten.

Vieles deutet demnach auf eine Beteiligung von Enzymen an der Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in *Aplysina* – Schwämmen hin. In diesem Zusammenhang ist jedoch erstaunlich, dass die normalerweise verletzungsinduzierten Reaktionen auch bei Kontakt des Gewebes mit organischen Lösungsmitteln induziert werden (siehe

Abb. 3A-7). Kann ein Enzym nach Kontakt mit organischen Lösungsmitteln noch seine katalytische Wirkung entfalten?

Aktuelle Studien zeigen, dass Enzyme auch in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln katalytische Aktivität aufweisen können (Klibanov 1990, Klibanov 2001, Faber 2004, Jakubowski 2004). Ist ein Protein direkt von organischem Lösungsmittel umgeben, so führt dies normalerweise zu einer verringerten strukturellen Flexibilität des Proteinmoleküls (Affleck et al. 1992). Dies kann zu einer Einschränkung oder auch zu einer vollständigen Blockade seiner Funktion führen (Jeffrey & Saenger 1994). Liegt in dem umgebenden organischen Lösungsmittel jedoch eine geringe Menge an Wasser vor, so reicht dies normalerweise aus, um die für die Enzymaktivität notwendige Flexibilität des Proteinmoleküls zu gewährleisten (Zaks & Klibanov 1988, Klibanov 2001, Jakubowski 2004). Grund hierfür ist, dass dann ein dünner Wasserfilm (im Englischen treffender als „monolayer“ aus Wassermolekülen beschrieben) das Proteinmolekül umgibt und fest mit ihm verbunden ist (Jakubowski 2004). Deshalb wird das Enzym von der Lösungsumgebung nicht, oder nur wenig beeinflusst (Jakubowski 2004). Verschiedene Stoffe, die üblicherweise im Schwammgewebe vorhanden sind, wie z.B. Meersalz und Lipide, können die Enzyme im Schwamm darüber hinaus vor der denaturierenden Wirkung von organischen Lösungsmitteln schützen und so ihre enzymatisch aktive Konformation aufrecht erhalten (Khmelnitsky et al. 1994, Okahata & Mori 1997). Die Erkenntnis, dass Enzyme auch in organischen Lösungsmitteln katalytisch aktiv sein können, hat sie in den letzten Jahren für verschiedene technologische Anwendungen sehr interessant gemacht (Klibanov 2001).

Folgendermaßen könnte man sich demnach die Vorgänge in einem Gewebstück von *A. aerophoba*, nachdem es (wie in Abschnitt 3A.2.1. beschrieben) in Aceton, Ethanol, oder Methanol gegeben worden war, vorstellen: Das organische Lösungsmittel dringt langsam von außen nach innen in das Schwammgewebe ein und verdrängt dabei das darin vorhandene Seewasser. Es wirkt als Detergenz und zerstört somit die Lipiddoppelschicht der Biomembranen in den Schwammzellen. Hierdurch werden auch die Rosettenzellen zerstört, was ähnlich wie bei einer mechanischen Verletzung des Schwammes zu einer Dekompartimentierung dieser Zellen führt. Als Folge davon treten die für die Biotransformation verantwortlichen Enzyme mit ihren Substraten, den Isoxazolinalkaloiden, in Kontakt. Die Konzentration des organischen Lösungsmittels steigt graduell in der Umgebung der

Enzyme an. Doch bis diesen das umgebende Wasser vollständig entzogen ist, kann ein Großteil der vorhandenen Isoxazolinalkaloide enzymatisch zu Aerophysinin-1 gespalten und teilweise auch zu Dienon weitertransformiert werden.

Bereits in früheren Studien waren verschiedene Experimente durchgeführt worden, um eine Beteiligung von Enzymen an den Biotransformationsprozessen in *Aplysina* – Schwämmen zu überprüfen. Ebel et al. (1997) kochten den Enzymextrakt von *A. aerophoba* auf bzw. versetzten ihn mit Protein – denaturierenden Agenzien, bevor sie das Isoxazolinalkaloid Aerophobin-2 hinzufügten. In beiden Fällen wurde der zugesetzte Metabolit daraufhin nicht mehr zu den Biotransformationsprodukten umgesetzt.

Goldenstein et al. (2000) führten Experimente zur Substratspezifität des „Isoxazolin – spaltenden Enzyms“ durch. Sie stellten fest, dass im Enzymextrakt aus *A. aerophoba* eine Spaltung von zugegebenen Substraten nur dann stattfindet, wenn diese die für die Isoxazolinalkaloide typischen Spirohexadienisoxazolin – Ringsysteme besitzen.

Teeyapant (1994) führte in ihrer Doktorarbeit Versuche zur Biotransformation mit gefriergetrocknetem Gewebe von *A. aerophoba* durch. Sie erhitzte das Gewebe bei 90 °C für 5 min in Wasser und inkubierte es dann für 6 h in 30 °C warmen Wasser. Anschließend wurden die Metabolite Isofistularin-3 und Dienon im Extrakt dieser Probe quantifiziert. Während in einem Ansatz nach sechsständiger Inkubation in 30 °C warmen Wasser das Alkaloid Dienon in einer hohen Konzentration entstanden war, fanden sich in dem Ansatz, der zunächst auf 90 °C erhitzt worden war, nur sehr geringe Mengen dieses Metaboliten. Daraus wurde geschlossen, dass das Erhitzen die Biotransformationsprozesse gehemmt hatte (Teeyapant & Proksch 1993, Teeyapant 1994). Ein weiterer Versuch wurde mit Trichloressigsäurelösung durchgeführt, die statt des Seewassers als Inkubationsmedium diente. Nach 24ständiger Inkubation bei Raumtemperatur war in diesem Ansatz kein Dienon entstanden (Teeyapant & Proksch 1993, Teeyapant 1994). Beide Ergebnisse wurden als Hinweis auf die Beteiligung von Enzymen an den Reaktionen gewertet. Bei späterer, genauerer Betrachtung der Daten wurde jedoch festgestellt, dass sowohl im HPLC – Chromatogramm des Ansatzes, der auf 90 °C erhitzt worden war als des Ansatzes, der mit Trichloressigsäure versetzt worden war, die Signale der Isoxazolinalkaloide Aerophobin-1 und Aerophobin-2 verschwunden waren. Darüber hinaus fand sich in den HPLC – Chromatogrammen beider Ansätze ein Peak, der

möglicherweise dem Biotransformationsprodukt Aeroplysinin-1 zuzuordnen ist. Aerophobin-1, Aerophobin-2 und Aeroplysinin-1 waren jedoch nicht quantifiziert worden.

Aufgrund dieser Ungereimtheiten habe ich ähnliche Experimente mit gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* durchgeführt. Im ersten Experiment habe ich Schwammgewebe für die Dauer von 7 min in Seewasser aufgekocht und anschließend über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wie im Experiment von Teeyapant (1994) waren die Konzentrationen der Isoxazolinalkaloide, die durch Signale im mittleren Bereich der HPLC – Chromatogramme repräsentiert werden (in diesem Fall Aplysinaminin-1 und Aerophobin-2) deutlich zurück gegangen (Abb. 3A-15). Darüber hinaus waren große Mengen an Aeroplysinin-1 und geringe Mengen an Dienon entstanden. Wie läßt sich dieses Ergebnis erklären?

Die Arbeiten von Ebel (1998) und Fendert (2000) zeigen, dass es sich bei der Biotransformation in *Aplysina* – Schwämmen um einen zweistufigen Prozess handelt (Abb. 1-5). Die erste Stufe ist die Spaltung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1. Im zweiten Schritt wird dann, vermutlich katalysiert durch eine Nitrilhydratase, aus Aeroplysinin-1 das Dienon gebildet. In frischem Gewebe von *A. cavernicola* findet dieser zweite Schritt sehr schnell statt, so dass hier nur sehr geringe Konzentrationen des Zwischenproduktes Aeroplysinin-1 zu beobachten sind (Brenzinger 1996; Thoms 2000). Auch nach Inkubation von gefriergetrocknetem *A. cavernicola* – Gewebe in Seewasser bei Raumtemperatur hatte darin nahezu ausschließlich Dienon vorgelegen (Abb. 3A-10). Durch das kurzzeitige Aufkochen des Gewebes vor der Inkubation in Seewasser bei Raumtemperatur war also vor allem der zweite Schritt der Biotransformation, die Reaktion des Aeroplysinin-1 zu Dienon gehemmt worden (Abb. 3A-15). Der erste Schritt, die Spaltung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1, hatte trotz des Aufkochens des Schwammgewebes – wenn auch eingeschränkt – stattfinden können.

Dies passte nicht mit den Ergebnissen meiner anderen Experimente (siehe oben) und der Arbeiten von Ebel (1998) und Fendert (2000) zusammen, die alle auf die Beteiligung von Enzymen auch am ersten Biotransformationsschritt, der Spaltung der Isoxazolinalkaloide, hinwiesen. Ein derart thermostabiles Enzym in einem mediterranen Schwamm schien schwer vorstellbar. Auch eine Spaltung der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1 als Artefakt der Hitzeeinwirkung konnte ausgeschlossen werden, da bei der entsprechenden Behandlung von extrahierten

Isoxazolinalkaloiden aus *A. cavernicola* kein Aeroplysinin-1 entstanden war (Abb.3A-13).

Eine mögliche Erklärung für die Thermostabilität des ersten Biotransformationsschrittes ergab sich nach Betrachtung der Ergebnisse des Experimentes zum Zeitverlauf der Biotransformation in gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* nach Zugabe von Seewasser (Abb. 3A-12). Bei der Vorgehensweise in diesem Versuch waren die Biotransformationsprozesse erst nach ca. 8 h beendet gewesen. Die gleichen Reaktionen laufen dagegen in frischem Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen in weniger als einer Minute ab (Abb. 3A-9, Brenzinger 1996, Ebel et al. 1997, Puyana et al. 2003). Die starke Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit in dem Experiment mit gefriergetrocknetem Schwammgewebe könnte im Zusammenhang mit der Hitzestabilität der Biotransformationsprozesse bei Verwendung von gefriergetrocknetem Material stehen:

Dehydrierte Enzyme weisen keine katalytische Aktivität auf, weil ihre Moleküle in wasserfreiem Zustand nicht die für die Enzymreaktion erforderliche Flexibilität aufweisen (Affleck et al. 1992, Jeffrey & Sanger 1994). Dies ist vermutlich die Begründung für den langsamen Reaktionsablauf in dem in Abb. 3A-12 dargestellten Experiment. Das Schwammgewebe und die darin vorhandenen Enzyme mussten – nachdem sie mit Seewasser vermischt worden waren – sehr wahrscheinlich zunächst quellen bevor Enzymreaktionen stattfinden konnten. Das Quellen des Schwammgewebes war nach Zugabe des Seewassers zu beobachten: Zunächst lag das Gewebe als Pulver im zugegebenen Wasser vor. Später bildet es eine feuchte Masse ohne Wasserüberstand. Es ist damit anzunehmen, dass ein Teil der Enzyme im Seewasser / Schwammgewebe – Gemisch ebenfalls noch über einen längeren Zeitraum in dehydrierter Form vorlag.

Ebenso wie das Proteinmolekül für die katalytische Aktivität ein ausreichendes Maß an struktureller Flexibilität aufweisen muss, ist auch für die Denaturierung des Enzyms eine gewisse Flexibilität notwendig (Klibanov 2001, Jakubowski 2004). Im dehydrierten Zustand ist diese Flexibilität nicht gewährleistet (Kunz & Kauzmann 1974, Rupley & Careri 1991). Darüber kann auch die Hydrolyse der Peptidbindungen des Enzyms, ein Prozess der unter Hitzeeinwirkung zur Denaturierung von Enzymen führt, nur stattfinden, wenn die Peptidbindungen mit Wasser in Kontakt stehen (Ahern & Klibanov 1987). Entsprechend kann eine Denaturierung von dehydrierten

Enzymen auch bei sehr hohen Temperaturen ausbleiben. Da in gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* nach siebenminütiger Inkubation in Seewasser nur ein sehr geringer Teil der Isoxazolinalkaloide gespalten wurde (Abb. 3A-12) scheint es wahrscheinlich, dass nach dieser Zeit ein Großteil der Biotransformationsenzyme im Schwammgewebe noch dehydriert vorlag. Dies könnte deren Hitzestabilität bei kurzzeitigem Aufkochen des Gewebes (7 min; Abb. 3A-15) erklären. Während der 24stündigen Inkubation in Seewasser bei Raumtemperatur, die dem siebenminütigen Aufkochen folgte, quollen die Proteinmoleküle dann auf und waren daraufhin in der Lage die Biotransformationsreaktionen zu katalysieren.

Um diese Überlegungen auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, habe ich gefriergetrocknetes Gewebe von *A. cavernicola* über 8 h in Seewasser gekocht. Innerhalb dieses Zeitraumes waren die Biotransformationsreaktionen in gefriergetrocknetem Gewebe von *A. cavernicola* nach Zugabe von Seewasser bei Raumtemperatur vollständig abgelaufen (Abb. 3A-12). Die daran beteiligten Enzyme mussten also innerhalb dieses Zeitraums größtenteils funktionsfähig geworden und demnach gequollen sein. Entsprechend war anzunehmen, dass 8 h auch für das Quellen und Denaturieren der Enzyme im kochenden Wasser ausreicht. Im Anschluß an die 8stündige Kochzeit froz ich das Schwammgewebe direkt bei -80 °C ein, um so eventuelle weitere Reaktionen nach dem Abkühlen des Schwammgewebes zu verhindern. Die HPLC – Analyse der über einen Zeitraum von 8 h gekochten Proben ergab, dass hierin tatsächlich weder Aeroplysinin-1 noch Dienon gebildet worden waren (Abb. 3A-16). Somit hatte sich durch diese Behandlung auch der erste Biotransformationsschritt hemmen lassen.

Das zweite Experiment von Teeyapant (1994), die Behandlung des Schwammgewebes mit Trichloressigsäure, habe ich ebenfalls ein weiteres Mal in ähnlicher Weise durchgeführt. Nach achtstündiger Inkubation des gefriergetrockneten Gewebes von *A. cavernicola* in 10%iger Trichloressigsäurelösung (angesetzt mit Seewasser) konnten in diesem Fall die Biotransformationsreaktionen nahezu vollständig gehemmt werden (Abb. 3A-14). Dienon war nicht, Aeroplysinin-1 nur in sehr geringen Konzentrationen entstanden. Die genuin im Schwamm *A. cavernicola* vorhandenen Isoxazolinalkaloide lagen nach der Inkubation des Gewebes im Säure/Seewasser – Gemisch immer noch in weitgehend unveränderten Konzentrationen vor. Der Aerophobin-2 – Gehalt war sogar etwas gestiegen. Möglicherweise ist dies auf eine Protonierung der

Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 11 und 12 in der aliphatischen Seitenkette des Aplysinamisin-1 aufgrund der Säureeinwirkung zurückzuführen. In diesem Fall könnte aus Aplysinamisin-1, das in seinem Gehalt nach der Inkubation in der Trichloressigsäurelösung etwas zurückgegangen ist (Abb. 3A-14), Aerophobin-2 entstanden sein.

Nach wie vor weisen also zahlreiche Befunde auf die Beteiligung von Enzymen an beiden Biotransformationsschritten in den *Aplysina* – Schwämmen hin. Der endgültige Nachweis für die Existenz der Enzyme, der wohl nur durch ihre Isolierung erbracht werden könnte, steht allerdings noch aus. Dies scheiterte trotz großen Aufwandes daran, dass der Enzymextrakt von *A. aerophoba* im Verlauf der Protein – Aufreinigung seine katalytische Aktivität verlor (Ebel 1998).

#### Hat die Biotransformation ökologische Relevanz?

Aufgrund der in den vorigen Abschnitten beschriebenen Befunde liegt nahe, über einen ökologischen Zweck der Biotransformation für die *Aplysina* – Schwämme nachzudenken.

Fischfütterungsversuche im Rahmen meiner Diplomarbeit (Thoms 2000; Thoms *et al.* 2004) hatten gezeigt, dass die Isoxazolinalkaloide in Konzentrationen, wie sie im Gewebe der mediterranen *Aplysina* – Schwämme auftreten, stark fraßhemmend sind. In den gleichen Experimenten zeigten die Biotransformationsprodukte Aeroplysinin-1 und Dienon in Konzentrationen, wie sie nach nahezu vollständiger Umsetzung der Isoxazolinalkaloide in den Schwämmen vorliegen, eine weitaus schwächere, bzw. gar keine fraßhemmende Wirkung. Die verletzungsinduzierte Biotransformation führte also zu einer Abschwächung des Fraßschutzes der *Aplysina* – Schwämme gegenüber den Versuchsfischen. Dies mag zunächst überraschend erscheinen, da sicherlich gerade im Moment des Angriffs durch einen Fraßfeind, der zur Verletzung des Schwammgewebes führt, eine effiziente Verteidigung am notwendigsten wäre. Angesichts der erforderlichen Reaktionszeit der Biotransformation (> 40 sec) wird jedoch klar, dass auch bei Entstehung von Metaboliten mit stärker fraßhemmenden Eigenschaften ein Fraßschutz, der erst nach dieser Zeit entsteht, nicht effizient wäre. Sehr wahrscheinlich wird ein Nahrungsbrocken innerhalb einer weit kürzeren Zeit von einem Fisch verschlungen.

Ein konstitutiver Fraßschutz, wie er durch das Vorhandensein der Isoxazolinalkaloide im Gewebe der Schwämme gegeben ist (Thoms 2000, Thoms *et al.* 2004), ist sicherlich weit wirkungsvoller. Die Biotransformation scheint somit nicht der Aktivierung eines Fraßschutzes gegenüber Fischen zu dienen.

In einer Reihe von Studien zu *Aplysina* - Alkaloiden hatte sich jedoch auch gezeigt, dass die in diesen Schwämmen entstehenden Biotransformationsprodukte eine starke antimikrobielle Wirkung aufweisen. Sowohl Aeroplysinin-1 als auch Dienon zeigten in einer Vielzahl von Arbeiten eine stark wachstumshemmende Aktivität gegenüber terrestrischen und marinen Bakterien (Teeyapant *et al.* 1993b, Weiss *et al.* 1996, Debitus *et al.* 1998, Kelly *et al.* 2003). Debitus *et al.* (1998) schlagen Dienon sogar als antibakteriellen Wirkstoff für die Kultivierung von Meeresorganismen vor. In dieser Studie bewirkte der Metabolit aufgrund seiner ausgeprägten antimikrobiellen Eigenschaften bei gleichzeitig geringer Toxizität eine dem Chloramphenicol vergleichbare, geringe Sterblichkeit von Larven der Kammuschel *Pecten maximus* in Kultur.

In den genannten Studien (Teeyapant *et al.* 1993b, Weiss *et al.* 1996, Debitus *et al.* 1998) wiesen die getesteten Isoxazolinalkaloid – Vorstufen der Biotransformation keine oder nur sehr schwache antibakterielle Aktivität auf. Eine Ausnahme stellt hierbei Aerothionin dar. Für diesen Metabolit wurde mehrfach antibakterielle Aktivität nachgewiesen (Thompson *et al.* 1985, Walker *et al.* 1985, Encarnacion-Dimayuga *et al.* 2003).

Während die Fraßhemmungsaktivität des Metabolitengemisches an der Wundstelle des Schwammgewebes im Laufe der Biotransformation sinkt, steigt also die antimikrobielle Wirksamkeit an. Die Biotransformation stellt somit vermutlich einen verletzungsinduzierten Wundschutz dar, der Infektionen des verletzten Gewebes durch pathogene Mikroorganismen verhindert.

Es stellt sich die Frage, ob die an einer Wundstelle entstehenden Konzentrationen der Biotransformationsprodukte ausreichen, um eine ökologisch relevante Wirksamkeit gegenüber Bakterien zu zeigen. Nach Skalpellverletzung des Schwammes war kein Anstieg der Konzentrationen an Aeroplysinin-1 und Dienon detektierbar (Abb. 3A-8). Erst durch Mörsern des Gewebes konnten hohe Konzentrationen dieser Metabolite im analysierten Schwammstück erzeugt werden. Der Biss eines Fisches entspricht im Ausmaß der Verletzung für das zurückbleibende Schwammgewebe sicher eher einem Skalpellschnitt als dem

vollständigen Zermörsern dieses Gewebes. Demnach wären Wirkungen von Biotransformationsprodukt – Konzentrationen, die erst durch Mörsern des Schwammgewebes entstehen, kaum ökologisch relevant. Dieser Logik liegt jedoch ein Denkfehler zugrunde. Induziert wird die Biotransformation in *Aplysina* – Schwämmen sehr wahrscheinlich durch die Dekompartimentierung von Rosettenzellen, die Träger der Isoxazolin – Vorstufen sind (Thompson *et al.* 1983; Turon *et al.* 2000; Paul & Puglisi 2004). Ein Skalpellschnitt und vermutlich auch ein Fischbiss bewirken lediglich an der Wundoberfläche die Dekompartimentierung der dort liegenden Rosettenzellen. Wird daraufhin das verletzte Schwammstück für eine chemische Analyse beprobt, werden dabei zwangsläufig auch die unterhalb der Schnittfläche liegenden, unverletzten Gewebebereiche mit analysiert. Abhängig vom Verhältnis des Volumens des beprobten Schwammstückes zur verletzten Oberfläche wird deshalb die ausschließlich an der Wundfläche entstandene Produktkonzentration mehr oder weniger stark durch native Isoxazolinalkaloide verdünnt. Die an der Wundfläche entstandene Konzentration der Produkte wird somit unterschätzt.

Für die Schutzwirkung der Biotransformationsprodukte gegen Bakterienbefall sind jedoch die unverdünnten Konzentrationen relevant, die an der verletzten Oberfläche entstehen, durch die die Bakterien eindringen könnten. Um diese Konzentrationen abschätzen zu können, müsste eine Gewebsschicht von wenigen  $\mu\text{m}$  Dicke (dem Durchmesser von Rosettenzellen) unterhalb der Wundfläche beprobt werden. Dies ist experimentell kaum möglich, da die Menge an Alkaloiden in einem Gewebstück dieses Volumens nicht detektierbar wäre, oder aber eine riesige Verletzungsfläche für die Beprobung erzeugt werden müsste. Durch Mörsern des gesamten zu analysierenden Schwammstückes ist jedoch sicher eine gute Näherung dieses Wertes zu erreichen, denn hierbei wird ebenfalls ein Großteil der im untersuchten Gewebe vorliegenden Rosettenzellen dekompartimentiert. Dieser Logik folgend ist es legitim, Biotransformationsprodukt – Konzentrationen, die in gemörsertem Gewebe entstehen, zum Vergleich mit den Daten zur Bioaktivität dieser Metabolite heranzuziehen.

Im Agar Diffusion Assay zeigten Aeroplysinin-1 und Dienon bereits ab einer eingesetzten Dosis von 5  $\mu\text{g}$  gegen zwei bzw. fünf von sechs getesteten marinen Bakterienspezies Aktivität (Weiss *et al.* 1996; Debitus *et al.* 1998). 100  $\mu\text{g}$  dieser Substanzen hemmten jeweils das Wachstum aller acht mit dieser Dosis behandelten

Bakterienarten. Darüber hinaus wurden von Teeyapant *et al.* (1993b) die Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) von Aeroplysinin-1 und Dienon gegenüber *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* ermittelt. Für beide Metabolite lagen die MICs je nach Bakterienart zwischen 12,5 und 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Kelly *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Aeroplysinin-1 in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  die Ansiedelung von marinen Bakterien der Spezies *Vibrio harveyi* an Agar – Blöcken auf  $1,4 \pm 0,1\%$  im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen reduziert. Dienon in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  verringerte die Bakterienanlagerung in entsprechenden Experimenten auf  $4,1 \pm 0,1\%$ . In meinen Experimenten mit frischem Gewebe von *A. aerophoba* waren die Biotransformationsprodukte nach dem Mörsern des Gewebes zu einem feinkörnigen Brei auf einen Gehalt von  $4400 \pm 2036 \mu\text{g ml}^{-1}$  angestiegen (Abb. 3A-8). Damit überstieg die entstandene Konzentration um ein Vielfaches, die Konzentrationen, die notwendig sind, um antibakterielle Wirkung zu zeigen. Selbst bei Verlust eines großen Teils der polaren Biotransformationsprodukte an das umgebende Seewasser ist somit ein Schutz der Wunde gegen bakterielle Infektion gegeben.

Dieser Mechanismus wird jedoch erst nach mechanischer Beschädigung des Schwammgewebes wirksam und dient deshalb wahrscheinlich nicht dem Schutz von mechanisch unverletztem Gewebe. So zeigten Aquariexperimente mit *A. aerophoba* im Rahmen meiner Arbeiten, dass Verfall des Schwammgewebes, verursacht durch ungünstige Umgebungsbedingungen, nicht zur Bildung von Aeroplysinin-1 und Dienon führt (Abschnitt 3A.2.2). Nach sechswöchiger Hälterung im Aquarium wiesen die Schwämme deutliche Zeichen der Gewebszersetzung auf. Große Teile des Gewebes waren schwarz und an vielen Stellen zeigte sich das Sponginskelett. Durch Faulgase wurden die Schwämme an die Wasseroberfläche getrieben. Dennoch zeigte das Gewebe, sowohl in den schwarzen als auch in den gelben Bereichen, das übliche Alkaloidmuster. Aeroplysinin-1 und Dienon waren nicht entstanden und die Konzentrationen der Isoxazolinalkaloide hatten sich nicht erkennbar verringert. Möglicherweise besitzen *Aplysina* – Schwämme andere Mechanismen, die ihr unverletztes Gewebe vor Befall durch pathogene Mikroorganismen schützen.

### Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente zur verletzungsinduzierten Biotransformation in *Aplysina* - Schwämmen

Anhand meiner Experimente mit *A. aerophoba* konnte ich zeigen, dass es in lebendem Gewebe dieses Schwammes aufgrund von mechanischer Verletzung zur Bildung von Aeroplysinin-1 und/oder Dienon kommt. Parallel zum Anstieg der Konzentrationen dieser Metabolite werden die im Schwamm konstitutiv auftretenden Isoxazolinalkaloide abgebaut. Die Entstehung von Aeroplysinin-1 und Dienon als Abbauprodukte der Isoxazolinalkaloide erscheint damit sowohl aus chemischer (Ebel 1998) als auch aus biologischer Sicht wahrscheinlich. Da Rosettenzellen die Lagerstätten der Isoxazolinalkaloide im Schwammgewebe sind (Thompson *et al.* 1983; Turon *et al.* 2000), liegt es nahe anzunehmen, dass die Transformation der Isoxazolinalkaloide zu Aeroplysinin-1 und Dienon durch die mechanische Dekompartimentierung dieser Zellen induziert wird.

Diese Reaktion findet nicht nur in frischem Gewebe der Schwämme, sondern auch in gefriergetrocknetem Material nach Zugabe von Seewasser statt. Anhand von gefriergetrocknetem Schwammgewebe konnte die Biotransformation auch in der zweiten mediterranen *Aplysina* – Art *A. cavernicola* und in den karibischen Arten *A. archeri* und *A. fistularis* nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Arbeit von Ebel *et al.* (1997) legt dieser Befund die Vermutung nahe, dass alle Schwämme der Gattung *Aplysina* und möglicherweise auch alle Schwämme der Ordnung Verongida zur verletzungsinduzierten Biotransformation ihrer Isoxazolinalkaloide befähigt sind. Gleichzeitig wurde aber deutlich, dass die Reaktionen ausschließlich in diesen Schwämmen und nicht in anderen Meeresorganismen ablaufen, auch wenn die Isoxazolinalkaloide letzterem künstlich zugesetzt werden.

Versuche zur Hemmung von enzymatischer Aktivität in Gewebe und Enzymextrakten der *Aplysina* – Schwämme zeigten, dass es sich bei den Biotransformationsreaktionen sehr wahrscheinlich um enzymkatalysierte Prozesse handelt. Diese unterteilen sich in mindestens zwei Reaktionsschritte, wobei anzunehmen ist, dass für diese unterschiedliche Enzyme verantwortlich sind.

Die bei der Biotransformation in den *Aplysina* – Schwämmen entstehenden Produkte sind in hohem Maße antimikrobiell aktiv (Teeyapant *et al.* 1993b; Weiss *et al.* 1996; Debitus *et al.* 1998; Kelly *et al.* 2003). Nach mechanischer Verletzung des Gewebes

von *A. aerophoba* entstehen lokal an der Verwundungsstelle Konzentrationen dieser Metabolite die ein Vielfaches der Gehalte darstellen die für eine ökologisch relevante antimikrobielle Aktivität notwendig sind. Somit liegt nahe, dass es sich bei der verletzungsinduzierten Biotransformation in *Aplysina* – Schwämmen um einen Wundschutz handelt, der verhindert, dass nach Gewebsverletzung pathogene Mikroorganismen in die Wundstelle eindringen und den Schwamm schädigen.

## 4B. *Aplysina* – Alkaloide in der Meeresschnecke *Tylodina perversa*

### 4B.1. Ursprung des Aerothionins in *T. perversa*

Trotz der auf Fische stark fraßhemmend wirkenden Isoxazolinalkaloide im Gewebe von *Aplysina aerophoba* (Thoms 2000, Thoms *et al.* 2004) ist die mediterrane Schnecke *Tylodina perversa* ein spezialisierter Fraßfeind dieses Schwammes (Teeyapant *et al.* 1993a, Ebel *et al.* 1999, Becerro *et al.* 2003). Dabei überwindet sie den chemischen Fraßschutz von *A. aerophoba* nicht nur, zudem finden sich auch die für *Aplysina* – Schwämme charakteristischen Alkaloide in ihrem Gewebe. Es wird angenommen, dass *T. perversa* die Schwammalkaloide aus der aufgenommenen Nahrung in ihr Gewebe transferiert (Teeyapant *et al.* 1993a, Ebel *et al.* 1999).

Überraschenderweise wurde im Gewebe aller bisher analysierter *T. perversa* – Individuen, zusätzlich zu den Metaboliten aus *A. aerophoba*, stets Aerothionin gefunden (Teeyapant *et al.* 1993a, Teeyapant 1994, Ebel *et al.* 1997, Ebel *et al.* 1999). Dieser Metabolit ist den Isoxazolinalkaloiden in *A. aerophoba* strukturell zwar sehr ähnlich, jedoch wurde er bisher nie in dieser Schwammart detektiert (Cimino *et al.* 1983, Teeyapant *et al.* 1993a, Teeyapant 1994, Ciminiello *et al.* 1997, Ebel *et al.* 1997, Ebel *et al.* 1999, Thoms *et al.* 2004). Die zweite mediterrane *Aplysina* – Art, *A. cavernicola*, besitzt dagegen stets hohe Konzentrationen an Aerothionin (Brenzinger 1996, Ciminiello *et al.* 1997, Thoms *et al.* 2004).

Die Herkunft des Aerothionins in *T. perversa* ist unklar, da bisher noch nicht dokumentiert worden war, dass sie den Schwamm *A. cavernicola* frisst (Becerro *et al.* 2003). Zudem waren die in den früheren Studien untersuchten *T. perversa* – Individuen stets von *A. aerophoba* – Schwämmen abgesammelt worden, deren chemische Analyse ergab, dass sie selbst kein Aerothionin enthielten (Teeyapant *et al.* 1993a, Teeyapant 1994, Ebel *et al.* 1999).

In Wahlversuchen konnte ich zeigen, dass *T. perversa* keine erkennbare Nahrungspräferenz für eine der beiden mediterranen *Aplysina* – Arten zeigt (Abb. 3B-1). Die Schnecken krochen bei gleichzeitiger Präsentation von *A. aerophoba*, *A. cavernicola* und eines Schwammes der Gattung *Axinella* mit nahezu übereinstimmender Häufigkeit auf eine der beide *Aplysina* – Arten. Dagegen wählten sie in lediglich 8,3% der 48 Parallelversuche den *Axinella* – Schwamm. Dieser

Befund widerspricht den Daten eines Experimentes von Becerro *et al.* (2003), bei dem *T. perversa* – Individuen ebenfalls die beiden mediterranen *Aplysina* – Arten zur Auswahl gestellt wurden. Hier krochen die Schnecken in allen acht Versuchsdurchgängen ausschließlich auf *A. aerophoba*. Wie es zu diesem Unterschied zwischen den Ergebnissen kommt ist unklar.

Die Bereitschaft der im Rahmen meiner Arbeit gesammelten Schnecken, *A. cavernicola* als Nahrung anzunehmen, ermöglichte einen Langzeitfütterungsversuch mit diesem Schwamm zur Untersuchung der Folgen des Nahrungswechsels auf ihr Alkaloidmuster. Die Schnecken wurden über zwei Wochen zusammen mit mehreren *A. cavernicola* – Individuen in einem Aquarium gehalten und fraßen in dieser Zeit ausschließlich von diesem Schwamm. Anhand von Fraßspuren an den Schwämmen konnte beobachtet werden, dass die Fraßaktivität der Schnecken durch den Wechsel des Nahrungsschwammes nicht beeinträchtigt worden war. Am Ende des Experimentes wurden die Schnecken seziiert und ihre Organe getrennt analysiert.

Die Mitteldarmdrüsen von Schnecken dienen der Produktion von Verdauungsenzymen und der Resorption von Nahrungsinhaltsstoffen (Götting 1996). Dies macht wahrscheinlich, dass dieses Organ in *T. perversa* auch der Aufnahme von Schwammalkaloiden in das Schneckengewebe dient. Entsprechend ist es nicht verwunderlich, dass die Mitteldarmdrüsen der Schnecken (Abb. 3B-6, 3B-7), die den Schwamm *A. cavernicola* gefressen hatten, ein Alkaloidmuster aufwiesen, das mit dem Alkaloidmuster dieses Schwammes nahezu übereinstimmte (Abb. 3B-3, 3B-5). Dort lag neben den Isoxazolinalkaloiden Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 nach dem Fressen des Schwammes *A. cavernicola* auch Aerothionin in einer hohen Konzentration vor. Außerdem war die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure in die Mitteldarmdrüsen der Schnecken aufgenommen worden. Dieser Metabolit tritt in *A. cavernicola* anstelle des Uranidins auf, das bei *A. aerophoba* für die gelbe Färbung verantwortlich ist.

In den Mänteln und dem Laich der Schnecken zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 3B-5, 3B-8, 3B-9). Auch hier lag, neben den auch für *A. aerophoba* typischen Isoxazolinalkaloiden, das Aerothionin und die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure vor. Dies, zusammen mit der hohen Übereinstimmung zwischen den Alkaloidmustern der Mitteldarmdrüsen und der Nahrungsschwämme, ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass die Schnecken tatsächlich in der Lage sind, die Alkaloide aus ihrer Beute in ihr Gewebe einzulagern.

In einem weiteren Experiment hatten fünf *T. perversa* – Individuen ausschließlich von dem Schwamm *A. aerophoba* gefressen. Die als Nahrung für die Schnecken verwendeten Schwämme wurden im Verlauf des Experimentes mehrfach auf das Vorhandensein von Aerothionin untersucht. In keinem Fall wurde dieser Metabolit in den Schwämmen gefunden (Abb. 3B-4). Nach fünf Wochen wurde das Experiment beendet und drei der fünf Schnecken wurden seziiert. Ihre Organe wurden im Anschluss daran getrennt extrahiert und mittels HPLC analysiert. Wieder zeigte sich in den Mitteldarmdrüsen der Versuchstiere eine große Übereinstimmung des Alkaloidmusters mit der Alkaloidzusammensetzung im Gewebe des Nahrungsschwammes (Abb. 3B-6, 3B-7). Sowohl in den Schwämmen, als auch in den Mitteldarmdrüsen der Schnecken dominierte das Isoxazolinalkaloid Aplysinamisin-1. Aerophobin-2 und Isofistularin-3 kamen ebenfalls in hohen Konzentrationen vor. Darüber hinaus fanden sich in den Mitteldarmdrüsen dieser Schnecken jedoch zusätzlich geringe Mengen an Aerothionin. Auch in den Mänteln und im Laich der Schnecken wurde Aerothionin gefunden (Abb. 3B-6, 3B-8, 3B-9). Dies bestätigten die Befunde von Teeyapant *et al.* (1993a) und Ebel *et al.* (1999), in deren Untersuchungen Gewebe von *T. perversa* – Individuen, die im Freiland von *A. aerophoba* abgesammelt worden waren bzw. die über eine Woche kontrolliert von *A. aerophoba* gefressen hatten, immer Aerothionin aufgewiesen hatte.

Gavagnin *et al.* (2000) fassen die Möglichkeiten, wie es zu einer Anreicherung von Sekundärmetaboliten im Gewebe von Opisthobranchia kommen kann in drei ökologische Szenarios zusammen:

- 1) Die *de novo* – Synthese der Metabolite durch die Schnecken selbst.
- 2) Die Transformation von aus der Nahrung aufgenommenen Substanzen.
- 3) Die Anreicherung von aus der Nahrung aufgenommenen Substanzen.

So sind beispielsweise verschiedene Polypropionate im Gewebe der mediterranen Sacoglossae *Cyerce cristallina*, *Elyisia viridis* und *Ercolania funerea* Produkte des Sekundärstoffwechsels dieser Schnecken (Vardaro *et al.* 1991, Di Marzo *et al.* 1991, 1993, Gavagnin *et al.* 1994). Hier findet also eine *de novo* Biosynthese dieser Substanzen im Gewebe der Schnecken statt. Im Fall von *T. perversa* erscheint eine *de novo* Synthese des Aerothionins dagegen eher unwahrscheinlich, da den Tieren strukturell sehr ähnliche Isoxazolinalkaloide aus der Nahrung zur Verfügung stehen. Würde die Schnecke selbst Aerothionin produzieren, so würde dies bedeuten, dass

sich im Laufe der Evolution der Schnecken parallel zu der Möglichkeit zur Aufnahme von Alkaloiden aus *A. aerophoba* ein Biosyntheseweg hätte entwickeln müssen, der zu einer den Schwammalkaloiden sehr ähnlichen Substanz führt. Der dadurch entstehende doppelte Aufwand scheint durch den geringfügigen Unterschied der Substanzen, die den Schnecken dadurch zur Verfügung stehen, kaum gerechtfertigt. Auch erscheint es unwahrscheinlich, dass durch den Sekundärstoffwechsel von *T. perversa* „zufällig“ ein Metabolit mit einer derart großen Ähnlichkeit zu den aus der Nahrung aufgenommenen Alkaloiden gebildet wird. Letzteres ist vor allem aufgrund der strukturellen Außergewöhnlichkeit der Isoxazolinalkaloide unwahrscheinlich, die dazu führt, dass diese Metabolite (außer in *T. perversa*) ausschließlich in Schwämmen der Ordnung Verongida auftreten (Ciminiello *et al.* 1994).

Es sind bereits zahlreiche Beispiele mariner Opisthobranchia bekannt, die bioaktive Metabolite aus ihrer Nahrung aufnehmen, diese jedoch zunächst modifizieren, bevor sie sie in ihr eigenes Gewebe einlagern (z. B. Pawlik *et al.* 1988, Cimino *et al.* 1993, Gavagnin *et al.* 2000). Eine entsprechende Transformation der zusammen mit dem Schwamm *A. aerophoba* aufgenommenen Isoxazolinalkaloide zu Aerothionin wäre grundsätzlich auch für *T. perversa* denkbar. Sämtliche hierfür erforderliche Bausteine stehen den Schnecken sehr wahrscheinlich zur Verfügung: Durch eine Spaltung der Isoxazolinalkaloide aus *A. aerophoba* könnten die darin vorhandenen Untereinheiten dieser Moleküle, Spirocyclohexadienisoxazolin – Ringsysteme, freigesetzt werden (Abb. 5). Diese sind in Aerothionin über eine Putrescin – Brücke verbunden (Abb.4). Putrescin wiederum ist ein biogenes Amin, das in lebenden Organismen durch Kohlendioxidabspaltung aus Ornithin gebildet wird (Karlson *et al.* 1994).

Eine Spaltung der Isoxazolinalkaloide findet in *Aplysina* – Schwämmen im Verlauf der in Abschnitt 4A.2. beschriebenen verletzungsinduzierten Biotransformation statt. Es ist bisher unklar, wie die Schnecke diese Spaltung beim Fressen des Schwammes verhindert, um so die „intakten“ Isoxazolinalkaloide in ihr Gewebe einzulagern. Möglicherweise dient die Bildung von Aerothionin einer Entgiftung der durch die Fraßverletzung in *A. aerophoba* entstandenen Biotransformationsprodukte. Entsprechende Entgiftungsprozesse wurden bereits in einer Reihe anderer Schneckenarten nachgewiesen. So transformiert die Schnecke *Ascobulla ulla* das aus Algen aufgenommene Caulerpenin in Ascobullin-A und -B um Schäden an ihrem eigenen Gewebe durch den toxischen Metabolit zu verhindern (Gavagnin *et al.* 2000). Die Mittelmeerschnecke *Hypselodoris orsini* transformiert aus dem Schwamm

*Cacospongia mollior* aufgenommenes Scleradiol in das weniger toxische Deoxoscleradiol um es so zu entgiften (Cimino *et al.* 1993)

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Mantelgewebe und im Laich der Schnecken, die unter kontrollierten Bedingungen von *A. aerophoba* gefressen hatten, Isofistularin-3 kaum zu finden war (Abb. 3B-5, 3B-8, 3B-9). Im Nahrungsschwamm (Abb. 3B-3) und in den Mitteldarmdrüsen (Abb. 3B-6, 3B-7) dieser Schnecken lag Isofistularin-3 dagegen in hohen Konzentrationen vor. Dieser Metabolit war von den Schnecken also nicht aufgenommen worden, oder aber, er war in das zusätzlich zu den Schwammalkaloiden auftretende Aerothionin transformiert worden. Möglicherweise stellt die Akkumulation des Aerothionins im Vergleich zur Akkumulation von Isofistularin-3 für die Schnecken einen ökologischen und/oder physiologischen Vorteil dar was die Entstehung einer entsprechenden Transformation in den Schnecken begründen könnte. Experimentelle Befunde zu solch einer Transformation liegen jedoch noch nicht vor.

Das von Gavagnin *et al.* (2000) beschriebene dritte Szenario für den Ursprung eines Sekundärmetaboliten im Gewebe von Schnecken ist die direkte Aufnahme dieses Stoffes aus ihrer Nahrung. Im Fall von *T. perversa* scheint dies für die Isoxazolinalkaloide Aerophobin-2, Aplysinaminin-1, Isofistularin-3 und das *A. aerophoba* - Pigment Uranidin, wie oben erläutert, sehr wahrscheinlich gegeben. Für Aerothionin würde diese Erklärung jedoch bedeuten, dass alle in den Arbeiten Teeyapant *et al.* (1993a), Teeyapant (1994), Ebel *et al.* (1997), Ebel *et al.* (1999) von *A. aerophoba* abgesammelten Schnecken zuvor von *A. cavernicola* gefressen haben müssten. Unabhängig vom Sammelort wurden hier in den analysierten Schnecken stets vergleichbare Anteile des Aerothionins am Gesamtalkaloidgehalt im Gewebe gefunden. Gleiches gilt auch für die Schnecken, die in meinen Experimenten über fünf Wochen unter kontrollierten Bedingungen ausschließlich von *A. aerophoba* gefressen hatten (Abb. 3B-6). Auch im Gewebe dieser Tiere fand sich am Ende des Experimentes Aerothionin. Weder in den früheren Untersuchungen noch bei meiner Sammlung der Schnecken war jedoch *A. cavernicola* in der näheren Umgebung des Sammelortes aufgefunden worden. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass sich der Lebensraum des Schwammes *A. cavernicola* auf „versteckte“ Standorte wie Höhlen und größere Meerestiefen beschränkt, während *A. aerophoba* sehr exponiert wächst (Pansini 1997). Es wäre deshalb denkbar, dass *A. cavernicola* bei der Sammlung der Schnecken übersehen worden war. Hinzu kommt, dass inzwischen *Aplysina* –

Individuen im Mittelmeer gefunden wurden, die zwar morphologisch kaum von *A. aerophoba* zu unterscheiden sind und auch dessen Pigment Uranidin enthalten, aber dennoch den *A. cavernicola* – Metabolit Aerothionin aufweisen (siehe Abschnitt 4A.1). Auch solche Schwämme könnten übersehen worden sein. Allerdings läßt die Tatsache, dass auch diese Schwämme bisher nur an lichtarmen Standorten gefunden wurden darauf schließen, dass sich die Habitate von aerothioninhaltigen und aerothioninfreien *Aplysina* – Schwämmen im Mittelmeer sehr wahrscheinlich nicht unmittelbar überschneiden. Deshalb ist die Homogenität des Auftretens von Aerothionin in *T. perversa* in den früheren Studien nach wie vor überraschend. Wenn Aerothionin von *T. perversa* tatsächlich ausschließlich über die Nahrung aufgenommen werden würde, würde dies bedeuten, dass alle in den früheren Arbeiten gesammelten *T. perversa* – Individuen ausnahmslos eine große Wegstrecke für den Wechsel zwischen *A. aerophoba* und den Schwämmen, die ihnen als Aerothioninquelle dienten, zurückgelegt haben müssen.

In meinen Untersuchungen fanden sich erstmals *T. perversa* – Schnecken ohne Aerothionin im Gewebe (Abb. 3B-7, 3B-8 Gruppe t0). Weder in den Mitteldarmdrüsen noch in den Mänteln von drei im Freiland gesammelten Individuen konnte der Metabolit detektiert werden. Dagegen war in Laichproben, die direkt von *A. aerophoba* – Schwämmen im Meer abgesammelt worden waren, Aerothionin enthalten. Aerothionin ist also sehr häufig, jedoch nicht immer im Gewebe von *T. perversa* enthalten. Mediterrane *Aplysina* – Schwämme, die Aerothionin enthalten sind dagegen, vor allem im Vergleich mit dem sehr abundanten *A. aerophoba*, im Mittelmeer eher selten. Stammt das Aerothionin in *T. perversa* aus aerothioninhaltigen Schwämmen, so bedeutet das nicht nur, dass die Schnecken weite Strecken zwischen ihren Nahrungsschwämmen zurücklegen. Darüber hinaus müssen sie in der Lage sein, Aerothionin über eine sehr lange Zeit zu speichern.

Im Langzeitfraßversuch mit *A. aerophoba* hatte sich gezeigt, dass *T. perversa* – Individuen, die sich über fünf Wochen ausschließlich von aerothioninfreiem *A. aerophoba* ernährt hatten, nach diesem Zeitraum immer noch Aerothionin im Mantelgewebe aufwiesen (Abb. 3B-6). Die Konzentrationen dieses Metaboliten waren nach diesem Zeitraum vergleichbar mit Konzentrationen in Schnecken, die kurz vor der chemischen Analyse ihrer Gewebe von *A. cavernicola* gefressen hatten. Selbst in Schnecken, die nach dem fünfwöchigen Fressen von *A. aerophoba* über weitere zwei Wochen ausgehungert worden waren, verringerten sich die

Konzentrationen des Aerothionins und auch der anderen Isoxazolinalkaloide in den Mänteln nicht (Abb. 3B-8, Gruppe 3). Dagegen waren die Mitteldarmdrüsen der Tiere nach dieser Zeit nahezu alkaloidfrei (Abb. 3B-7).

Die Speicherung von aus der Nahrung stammenden Sekundärmetaboliten über einen sehr langen Zeitraum wäre bei den Gastropoden kein Einzelfall. So frisst beispielsweise die terrestrische Schnecke *Chondrina clienta* die Flechte *Xanrhoria parietina* und ist in der Lage den gemeinsam mit der Flechte aufgenommenen Naturstoff Parietin über vier Wochen in ihrem Gewebe zu speichern (Hesbacher *et al.* 1995). Anders als in *T. perversa* verringerte sich in *C. clienta* der Gehalt der gespeicherten Substanz im Laufe einer vierwöchigen Ernährung mit parietinfreier Nahrung jedoch stetig. Dass dies bei *T. perversa* nicht der Fall ist, ist vor allem deshalb erstaunlich, weil die Schnecke Aerothionin in ihren Laich einlagert und beim Abbläuen somit ständig den Metabolit abgibt (Abb. 3B-9, Gruppe 1). Im Laufe des fünfwöchigen Langzeitfütterungsversuches produzierten die Schnecken große Mengen aerothioninhaltiger Eimassen und zeigten danach dennoch eine nahezu unveränderte Konzentration an Aerothionin in ihrem Mantelgewebe (Abb. 3B-8).

Sowohl die Aufnahme von Aerothionin über die Nahrung durch das Fressen aerothioninhaltiger Schwämme als auch die Transformation von *A. aerophoba* – Metaboliten zu Aerothionin erscheint als Erklärung für das Vorhandensein dieses Isoxazolinalkaloids in *T. perversa* möglich. Ist die Nahrung die direkte Quelle des Aerothionins in *T. perversa*, so bedeutet dies, dass die Schnecken in der Lage sein müssen, diesen Metabolit über mehr als sieben Wochen zu speichern und große Strecken zwischen den Nahrungsschwämmen zurückzulegen. Für die alternative Hypothese, die Transformation der aufgenommenen *A. aerophoba* – Alkaloide zu Aerothionin, gibt es derzeit jedoch noch keinen unterstützenden experimentellen Befund.

Um den Ursprung des Aerothionins in *T. perversa* zweifelsfrei ermitteln zu können, wären Experimente notwendig, in deren Verlauf <sup>13</sup>C – markierte potentielle Vorstufen des Aerothionins an die Schnecken verfüttert werden. Im Anschluß daran ließe sich überprüfen, ob die Vorstufen in das im Schneckengewebe vorhandene Aerothionin eingebaut worden sind. Für solche Experimente wäre es jedoch notwendig, dass die Versuchstiere künstliche Nahrung aufnehmen, die mit den markierten Vorstufen versetzt werden kann. Meine Versuche *T. perversa* mit auf Agar basierender

Nahrung zu füttern waren bisher nicht erfolgreich. Auch Agar, der mit Gewebe von *A. aerophoba*, aus dem zuvor die Isoxazolinalkaloide herausgelöst worden waren, versetzt worden war, wurde von den Schnecken nicht angenommen.

Alternativ könnten zur Ermittlung des Ursprungs von Aerothionin Schneckenlarven von *T. perversa* aufgezüchtet und ausschließlich auf aerothioninfreiem *A. aerophoba* gehalten werden. Durch eine chemische Analyse des Gewebes der ausgewachsenen Schnecken könnte dann ermittelt werden, ob diese trotzdem Aerothionin enthalten. In diesem Fall könnte der Nahrungsschwamm als Quelle des Aerothionins ausgeschlossen werden. Erste Versuche zeigten, dass die Veligerlarven von *T. perversa* auch unter Laborbedingungen problemlos innerhalb weniger Tage aus den Eigelegen der Schnecken schlüpfen (Abb. 3B-12). Es ist allerdings bisher unklar, wovon sich *T. perversa* in den ersten Stadien ihres Lebens ernährt und welche Anforderungen die Larven an ihre Umgebungsbedingungen haben. Entsprechend wären für eine Aufzucht der Schnecken zahlreiche Vorversuche notwendig.

Im Fall von *T. perversa* kann bisher nur darüber spekuliert werden, welchen Nutzen sie aus dem Einlagern der *Aplysina* – Metabolite in ihr Gewebe zieht. In Freilandversuchen waren Rohextrakte aus *T. perversa* – Individuen auf ihre fraßhemmende Wirkung gegenüber Fischen untersucht worden (Becerro *et al.* 2003). Diese Experimente hatten gezeigt, dass Fischfutterstücke, die mit natürlichen Konzentrationen von Metaboliten aus dem Gewebe und dem Laich von *T. perversa* behandelt worden waren, von Fischen gemieden werden. In Wahlfraßversuchen mit dem mediterranen Fisch *B. sphinx* waren isolierte Isoxazolinalkaloide in Konzentrationen, wie sie in *Aplysina* – Schwämmen auftreten getestet worden (Thoms *et al.* 2004). In diesen Experimenten wurde ebenfalls eine deutlich fraßhemmende Wirkung dieser Metabolite festgestellt. Da die Konzentrationen der Isoxazolinalkaloide in den Schwämmen aber höher als in den Schnecken liegen, lassen sich aus diesen Experimenten nur begrenzt Rückschlüsse ziehen, inwieweit die Alkaloide in den Schnecken für den Fraßschutz verantwortlich sind. Die Tatsache, dass *T. perversa* diese Metabolite bei Gefahr zusammen mit ihrem Schleim an die Umgebung abgibt (Ebel. *et al.* 1999), macht deren Beteiligung an einem chemischen Fraßschutz jedoch sehr wahrscheinlich.

## 4B.2. Cyanobakterien im Gewebe von *T. perversa*?

In einer Reihe von Studien konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Opisthobranchia – Arten photosynthetisch aktive Komponenten aus ihrer Nahrung aufnehmen, diese in ihr eigenes Gewebe einlagern und aus deren Photosyntheseaktivität Nutzen ziehen. Hierbei sind zwei Strategien bekannt (Wägele & Johnsen 2001).

Die erste Strategie wird durch den Namen Kleptoplastie beschrieben. Die Schnecken nehmen, zumeist aus Algen, Chloroplasten auf und lagern diese in funktionsfähigem Zustand in ihr Gewebe ein. Diese Form der Nutzung photosynthetischer Energie wurde innerhalb der Opisthobranchia bisher ausschließlich in der Ordnung Sacoglossa beobachtet (Wägele & Johnsen 2001). Hierbei sind vor allem Schnecken der Familie der Placobranchoidea (Synonym Elysioidea; siehe Jensen 1996) interessant, die teilweise in der Lage sind, mit Hilfe der aufgenommenen Chloroplasten mehrere Wochen zu überdauern, ohne zusätzliche Nahrung aufnehmen zu müssen (Hinde & Smith 1972, Mujer *et al.* 1996a,b, Williams & Walker 1999, Rumpho *et al.* 2000).

Die zweite Strategie ist innerhalb der Opisthobranchia und auch innerhalb der Metazoa generell weiter verbreitet (Wägele & Johnsen 2001). Hierbei werden einzellige symbiotische Dinoflagellaten, sogenannte Zooxanthellen, aus den Beuteorganismen aufgenommen um deren Photosyntheseaktivität auszunutzen. Diese Form der Symbiose ist vor allem in der Ordnung der Nudibranchia verbreitet. Ein bekanntes Beispiel sind hier Schnecken der Gattung *Phyllodesmium*, die Zooxanthellen aus verschiedenen Korallenarten in ihr Gewebe transferieren und anschließend mit ihnen in einer symbiotischen Beziehung leben (Rudman 1991, Avila 1995, Avila *et al.* 1998).

Mediterrane *Aplysina* – Schwämme, die natürliche Nahrung der Meeresschnecke *Tyrodina perversa*, akkumulieren nicht nur Alkaloide in hohen Konzentrationen, sie beherbergen auch eine Vielzahl an Bakterien in ihrem Gewebe. Diese machen bis zu 40% ihrer Biomasse aus (Vacelet 1975). In *A. aerophoba* haben, vor allem in den Oberflächenschichten des Gewebes, Cyanobakterien einen großen Anteil an dieser Bakteriengemeinschaft (Vacelet 1971).

In diesem Zusammenhang war es interessant, dass in Untersuchungen von Rainer Ebel (1998) sowohl das Mantelgewebe als auch der Laich von *T. perversa* „rundliche

Objekte“ aufwies, die nach Bestrahlung mit UV – Licht rote Eigenfluoreszenz zeigten. Nachdem der Laich der Schnecken zur Beimpfung flüssiger Standardmedien für die Kultur von marinen Cyanobakterien verwendet worden war, wuchsen hierin Cyanobakterien der Gattung *Chroococcus* heran (Ebel 1998). Vacelet (1971) hatte beschrieben, dass bestimmte chroococcale Cyanobakterien – Arten in Assoziation mit *Aplysina* – Schwämmen leben. Entsprechend lag nahe zu vermuten, dass die Schnecken die Mikroorganismen aus ihrer Nahrung aufnehmen und in ihr eigenes Gewebe einlagern. Es wurde spekuliert, dass *T. perversa* symbiotische Cyanobakterien über ihren Laich an ihre Nachkommen weitergibt (Ebel 1998).

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen der Gewebe von *T. perversa* versuchte ich, dies zu überprüfen und generell nach möglicherweise symbiotischen Bakterien in *T. perversa* zu suchen. Nach eingehender Analyse der Mitteldarmdrüse, des Verdauungstraktes (ohne Darminhalt), der Gonaden, des Mantels und des Laiches der Schnecke konnte ich jedoch in keinem dieser Gewebe Bakterien finden (Abb. 3B-11). Entsprechend ist anzunehmen, dass die Cyanobakterien und auch alle heterotrophen Bakterien, die zusammen mit *A. aerophoba* aufgenommen werden, von der Schnecke verdaut werden. Dieses Ergebnis wird durch Resultate der Studie von Wägele & Johnsen (2001) gestützt, die neben zahlreichen anderen Opisthobranchia – Arten auch *Tylodina perversa* auf eine Assoziation mit photosynthetisch aktiven Organismen hin untersucht haben. In dieser Studie lag das Hauptaugenmerk auf der Suche nach assoziierten Zooxanthellen. Allerdings ist zu vermuten, dass im Rahmen der elektronenmikroskopischen Studien in dieser Arbeit auch das Vorhandensein von Cyanobakterien im Gewebe von *T. perversa* aufgefallen wäre.

#### **4C. Das Verpflanzungsexperiment mit *Aplysina cavernicola***

Die mediterranen Schwämme *Aplysina aerophoba* und *Aplysina cavernicola* sind einander sehr ähnlich, unterscheiden sich aber in dem Lebensraum, den sie besiedeln (siehe Abschnitt 4A.1.). Während *A. aerophoba* in flachem Wasser zwischen 1 und 15 m Tiefe an sonnenexponierten Standorten wächst, ist *A. cavernicola* nur in Höhlen oder größeren Meerestiefen zu finden (Pansini 1997). Die große Ähnlichkeit in den Eigenschaften der beiden Schwämme hat schon Vielfach die Diskussion angeregt, ob es sich dabei tatsächlich um zwei getrennte Arten handelt, oder ob lediglich eine Art, abhängig von den jeweiligen Standortbedingungen, unterschiedlich ausgestaltet ist.

Beide mediterranen *Aplysina* – Schwämme beherbergen eine Vielzahl an heterotrophen Bakterien in ihrem Gewebe, die bis zu 40% ihrer Biomasse ausmachen (Vacelet 1975; Vacelet & Donadey 1977) und deren Dichte die Bakterienzahl im umgebenden Seewasser um zwei bis drei Zehnerpotenzen übersteigt (Friedrich *et al.* 2001). Im Gewebe von *A. aerophoba* lebt darüber hinaus eine große Zahl an Cyanobakterien, die für den Schwamm wahrscheinlich einen Schutz gegen UV – Strahlung darstellen und ihm so das Besiedeln der Flachwasserzone ermöglichen (Sara 1971, Vacelet 1971, Rützler 1985, Regoli *et al.* 2000).

Angesichts der hohen Abundanz und Diversität der heterotrophen Bakterien im Gewebe von *Aplysina* – Schwämmen liegt der Gedanke nahe, dass auch diese in einer symbiotischen Beziehung zu ihrem Wirt stehen. Doch die Komplexität der Bakterienzusammensetzung in Schwämmen der Gattung *Aplysina* erschwert es, entsprechende Interaktionen zu erkennen (Hentschel *et al.* 2003). Ein wichtiger Schritt hierbei wäre es, in der komplexen Mikroorganismen – Gemeinschaft im Gewebe des Schwammes potentielle Symbiosepartner zu identifizieren.

Die Bakteriengemeinschaft im Gewebe eines Schwammes lässt sich nach Hentschel *et al.* (2003) in mehrere Teile untergliedern: Ein Teil der Bakterien wird durch die Filtriertätigkeit des Schwammes zusammen mit dem Seewasser aufgenommen, wird dann aber sofort wieder durch die Osculen abgegeben. Dieser Teil gelangt nicht in das eigentliche Gewebe des Schwammes, sondern durchwandert lediglich das Wasserkanalsystem, das sein Gewebe durchzieht. Ein weiterer Teil wird ebenfalls

zusammen mit dem Seewasser in das Kanalsystem eingestrudelt, tritt dann aber, aufgenommen durch die Choanocyten, in das Schwammgewebe über.

Die Bakterien dieses zweiten, in das Schwammgewebe aufgenommenen Teils untergliedern sich wiederum in zwei Gruppen. Die erste Gruppe dient den frei beweglichen Schwammzellen, den Archaeocyten, als Nahrung und wird innerhalb kurzer Zeit von diesen phagocytiert und verdaut. Werden diese Bakterien nicht ständig aus dem filtrierten Seewasser nachgeliefert, so verschwinden sie schnell wieder aus dem Schwammgewebe. Die zweite Gruppe der Bakterien kann verhindern, aus dem Schwammgewebe eliminiert zu werden, auch wenn nicht ständig Vertreter der gleichen Art aus dem Seewasser nachgeliefert werden. Dies kann beispielsweise durch Anpassungen in der Morphologie der Bakterien bewerkstelligt werden, die eine Phagocytose durch die Schwammzellen verhindern (Wilkinson *et al.* 1984). Auf diese Weise kann es zu einer engen Assoziation zwischen den Bakterien und dem Wirtsschwamm über einen langen Zeitraum kommen und die Bakterien können einen festen Bestandteil der Schwamm – Mikroorganismen – Gemeinschaft bilden.

Schließlich können in einem Schwamm auch Bakterien auftreten, die nicht aus dem Seewasser filtriert wurden. Diese werden direkt von der Elterngeneration einer Schwammart auf die nächste Generation übertragen (Hentschel *et al.* 2003). Beispielsweise können bereits die Schwammlarven mit solchen Bakterien ausgestattet sein (Brusca & Brusca 1990). Oder es kommt im Laufe der bei Schwämmen sehr häufigen vegetativen Vermehrung (Gallissian & Vacelet 1976) zur Abtrennung von Gewebeteilen des Mutterschwammes, in denen der vollständige Satz an assoziierten Mikroorganismen vorhanden ist (Levi & Levi 1976, Vacelet *et al.* 1995).

Um eine Symbiose im klassischen Sinn zu ermöglichen bedarf es einer Assoziation, die von langer Dauer ist und in der Anpassungen der Symbiosepartner aneinander stattfinden (Steinert *et al.* 2000, Hentschel *et al.* 2000; Hentschel & Steinert 2001). Die Suche nach mikrobiellen Symbiosepartnern eines Schwammes innerhalb seiner komplexen Mikroorganismen – Gemeinschaft kann damit auf den Teil fokussiert werden, der dauerhaft und vor allem unabhängig von schwankenden äußeren Bedingungen mit ihm assoziiert ist. Um die gesamte Mikroorganismen – Gemeinschaft im Schwamm auf potentielle Schwammsymbionten einzugrenzen,

muss deshalb zwischen einem konstanten und einem variablen Teil dieser Gemeinschaft unterschieden werden.

Aus der Tatsache, dass sich die Bakteriengemeinschaft in Schwämmen meist deutlich von der des umgebenden Seewassers unterscheidet (Giovannoni & Rappe 2000), lässt sich schließen, dass ein Schwamm für bestimmte Bakterienspezies eine ökologische Nische darstellt, in der diese einen Wachstumsvorteil gegenüber Vertretern konkurrierender Arten haben. So können die mit Schwämmen assoziierten Bakterien beispielsweise von Abfallprodukten des Stoffwechsels ihres Wirtes profitieren (Davy *et al.* 2002), oder es werden durch bestimmte Faktoren im Schwammgewebe Konkurrenten zurückgedrängt. Auch für die Wirtsschwämme sind zahlreiche Vorteile denkbar (und in vielen Fällen bereits bekannt), die aus der Präsenz von Mikroorganismen in ihrem Gewebe resultieren. Darunter fallen u.a. der oben bereits erwähnte UV – Schutz durch Cyanobakterien (Sara 1971, Vacelet 1971, Rützler 1985, Regoli *et al.* 2000) und die Versorgung des Schwammes mit Nährstoffen, die in speziellen Stoffwechselprozessen der Bakterien entstehen (Wilkinson & Fay 1979, Wilkinson & Garrone 1980, Borrowitzka *et al.* 1988). Ein ganz wesentlicher Punkt in diesem Zusammenhang ist auch die Beteiligung der Mikroorganismen an der Produktion von Sekundärstoffen im Schwammgewebe, die ihrem Wirt einen ökologischen Vorteil verschaffen. Solche aus der Präsenz von Naturstoffen für den Schwamm resultierenden Vorteile können beispielsweise der chemische Schutz vor Fraßfeinden (Bakus 1981, Proksch & Ebel 1998, Becerro *et al.* 2003; Thoms *et al.* 2004), vor Überwuchs durch Raumkonkurrenten (Proksch 1994, Thacker *et al.* 1998, Engel & Pawlik 2000) und vor der Bildung eines Biofilms auf der Schwammoberfläche (Bakus *et al.* 1985, Kelly *et al.* 2003, Fusetani 2004) sein.

In einer Reihe von Studien konnte man bereits nachweisen, dass Naturstoffe, die man ursprünglich aus dem Schwamm isoliert hatte, tatsächlich von den assoziierten Mikroorganismen biosynthetisiert werden (z.B. Stierle *et al.* 1988, 1991, Unson and Faulkner 1993, Bewley *et al.* 1996, Schmidt *et al.*, 2000). Auch *Aplysina* – Schwämme akkumulieren Sekundärmetabolite, die in diesem Zusammenhang interessant sind. Die Bromotyrosin – Alkaloide dieser Schwämme zeigen Wirkung gegen potentielle Fraßfeinde (Thoms *et al.* 2004), gegen konkurrierende marine Invertebraten (Weiss *et al.* 1996) und gegen Bakterien (Teeyapant *et al.* 1993b). Aus der chemischen Struktur der *Aplysina* - Alkaloide könnte auf eine mikrobielle Beteiligung an deren Biosynthese geschlossen werden, da hierfür erforderliche

Enzyme bisher nur aus Mikroorganismen bekannt sind (Butler & Walker 1993, Kobayashi & Shimizu 1998).

Ziel meiner Arbeit war es, den Einfluß von Veränderungen in den Umgebungsbedingungen des Schwammes *A. cavernicola* auf seine Bakteriengesellschaft und sein Alkaloidmuster zu untersuchen, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die Stabilität dieser beiden Parameter ziehen zu können. Durch Vergleich von Schwammindividuen vor und nach den Veränderungen in den Umgebungsbedingungen sollte der konstante, dauerhaft mit *A. cavernicola* assoziierte Teil der Mikroorganismen – Gemeinschaft identifiziert werden. Auf diese Weise sollte das komplexe Konsortium der Mikroorganismen in *A. cavernicola* auf potentielle Schwammsymbionten eingegrenzt werden.

Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft sollten dann mit Veränderungen im Sekundärmetabolismus des Schwammes korreliert werden, um so auf eine Beteiligung einzelner Bakterienspezies an der Naturstoffsynthese schließen zu können. Ferner sollte untersucht werden, inwieweit sich die Charakteristika des Schwammes *A. cavernicola* durch eine Verpflanzung in flachere Meerestiefen, die normalerweise den typischen Lebensraum von *A. aerophoba* darstellen, den Charakteristika von *A. aerophoba* angleichen.

Um im Freiland Änderungen in den Umgebungsbedingungen von *A. cavernicola* zu bewirken, wurden mehrere Individuen des Schwammes von ihrem natürlichen Habitat in 40 m Meerestiefe auf Tiefen zwischen 7 und 15 m an Standorte mit unterschiedlichem Expositionsgrad verpflanzt.

Die Schwämme, die auf 7 m Tiefe an exponierte Standorte verpflanzt worden waren, waren im Lauf der drei Monate nach der Verpflanzung abgestorben und ihr Gewebe war vollständig degeneriert. Dies weist darauf hin, dass hier die obere Grenze des Verpflanzungsexperimentes erreicht worden war. Bei einem auf 15 m an einen exponierten Standort positionierten Schwamm hatte die Verpflanzung zu erkennbaren Gewebsschäden und zu Überwuchs durch Algen geführt. Zwei auf 12 m an die Basis eines großen Felsens verpflanzte Individuen wiesen dagegen nach den drei Monaten keine äußerlich erkennbaren Schäden auf.

Die Beobachtung, dass die Schwämme in Abhängigkeit von ihrem Expositionsgrad und nicht von der Tiefe, auf die sie verpflanzt worden waren, Schäden aufwiesen macht wahrscheinlich, dass die Lichtbedingungen am Standort ein wesentlicher Faktor sind, der den Lebensraum von *A. cavernicola* auf Höhlen und größere

Meerestiefen beschränkt. Diese Beobachtung entspricht Befunden von Wilkinson & Vacelet (1979) die feststellten, dass *A. cavernicola* auf erhöhte Lichtintensitäten mit einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit bis hin zum Rückgang des Gewebes reagiert.

Unklar ist, ob an dem auf 15 m verpflanzten Schwamm die verstärkte Sonneneinstrahlung zu einer Schädigung des Gewebes geführt hat, was dann verschiedenen Algen ermöglicht hat, den Schwamm zu überwachsen, oder ob andersherum die erhöhte Lichteinstrahlung das Algenwachstum auf dem Schwamm gefördert hat, was dann eine Schädigung des Gewebes zur Folge hatte. Eindeutig ist jedoch, dass der Schwamm *A. cavernicola* weniger gut gegen den Bewuchs durch Algen geschützt ist, als die nahe verwandte Art *A. aerophoba*. Dies ist sicherlich zumindest teilweise auf das Fehlen der vor UV – Licht schützenden Cyanobakterien (Vacelet 1971; Rützler 1985) zurückzuführen.

Interessant war es in diesem Zusammenhang auch zu untersuchen, ob es Cyanobakterien möglich sein würde, das Gewebe von *A. cavernicola* nach Erhöhung der Lichtintensitäten in der Umgebung des Schwammes zu besiedeln. Durch die Verpflanzung befanden sich die *A. cavernicola* – Individuen über drei Monate in Tiefenregionen, in denen der cyanobakterienhaltige *A. aerophoba* normalerweise wächst (Pansini 1997). Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchung und der DGGE – Analyse des Oberflächengewebes und der tieferen Gewebsschichten konnte in den verpflanzten Schwämmen jedoch keine Besiedelung durch Cyanobakterien festgestellt werden. Dies mag ein Hinweis auf einen grundsätzlichen Unterschied zwischen den beiden mediterranen *Aplysina* – Schwämmen sein, der vor allem im Zusammenhang mit der Frage, ob es sich bei diesen Schwämmen tatsächlich um getrennte Arten handelt (siehe Abschnitt 4A.1) interessant wäre.

Möglicherweise existieren im Gewebe von *A. cavernicola* physikalische Barrieren, die (anders als in *A. aerophoba*) eine Besiedelung durch Cyanobakterien verhindern. Denkbar wäre auch, dass das chemische Milieu in *A. cavernicola* für das Wachstum von Cyanobakterien nicht geeignet ist. Hier existieren zwei deutlich erkennbare Unterschiede zu *A. aerophoba*: Nur *A. cavernicola* besitzt Aerothionin und die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure (siehe Abschnitt 4A.1). Obwohl für Aerothionin vielfach antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen wurden (Thompson 1985, Thompson *et al.* 1985, Walker *et al.* 1985, Encarnacion-Dimayuga *et al.* 2003), ist unwahrscheinlich, dass das Vorhandensein dieses Metaboliten die Besiedelung von

*A. cavernicola* durch Cyanobakterien verhindert. Hiergegen spricht, dass verschiedene karibische *Aplysina* – Arten sowohl Aerothionin als auch Cyanobakterien enthalten (Rützler 1985, Acosta *et al.* 1992, Ciminiello *et al.* 1994). Die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carboxylsäure ist bisher noch nicht auf ihre antibakterielle Aktivität hin getestet worden. Somit ist unklar, wie sich das Vorhandensein dieses Metaboliten auf das Wachstum von Cyanobakterien im Gewebe des Schwammes auswirkt.

Andersherum kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass es Cyanobakterien möglich gewesen wäre, jüngere Individuen von *A. cavernicola*, als solche, die in meinem Experiment verpflanzt wurden, zu besiedeln. Denkbar wäre auch, dass für die Neubesiedelung des Schwammgewebes durch Cyanobakterien ein längerer Zeitraum als drei Monate nötig gewesen wäre. Außerdem wäre möglich, dass die erforderlichen Cyanobakterienspezies in dem Seewasser, das die Schwammindividuen nach deren Verpflanzung umgab, nicht vorhanden waren. Entsprechend lässt sich aufgrund der Daten meines Experimentes nicht auf einen grundsätzlichen Unterschied zwischen *A. aerophoba* und *A. cavernicola* schließen.

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte, dass die Verpflanzung auch in der Gemeinschaft der heterotrophen Bakterien in *A. cavernicola*, zumindest soweit wie elektronenmikroskopisch erkennbar, nicht zu Veränderungen geführt hatte (Abb. 3C-3). Wie in den Schwämmen des Originalstandortes waren die Bakterien im Gewebe der verpflanzten Schwammindividuen sehr zahlreich. Um anhand der elektronenmikroskopischen Analyse die mikrobielle Diversität der Bakterien in den Proben des Verpflanzungsexperimentes erfassen zu können, wurden die Bakterien anhand ihrer Membraneigenschaften nach Friedrich *et al.* (1999) und Vacelet (1975) in sechs Gruppen eingeteilt. Auch in der auf diese Weise analysierten Bakteriendiversität konnten keine Unterschiede zwischen den Proben vor und nach Verpflanzung und zwischen den Proben am Originalstandort zu Beginn und drei Monate später, am Ende des Verpflanzungsversuches beobachtet werden.

Die DGGE – Analyse der aus dem Schwamm isolierten und anschließend PCR – amplifizierten 16S rDNA ermöglichte einen genaueren Einblick in die bakterielle Diversität in den Schwämmen des Verpflanzungsexperimentes. Durch diesen molekularbiologischen Ansatz ist es möglich, das 16S rDNA – Gemisch der Proben in einzelne Banden aufzutrennen. Im Idealfall repräsentiert jede dieser Banden eine Bakterienspezies (Muyzer & Smalla 1998). Das auf diese Weise erzeugte

Bandenmuster stellt somit einen „Fingerprint“ der mikrobiellen Gemeinschaften in der Probe dar. Durch Vergleich der Fingerprints der unterschiedlichen Proben des Experimentes lassen sich konstante und variable Banden identifizieren und somit die gewünschte Einteilung in einen konstanten und einen variablen Teil der Bakteriengemeinschaft in *A. cavernicola* durchführen.

Die DGGE - Gele wiesen eine sehr hohe Zahl an Banden auf, was auf eine hohe Diversität der Bakterien in den beprobten *A. cavernicola* – Individuen schließen lässt (Abb. 3C-5). Dies entspricht früheren Beobachtungen an *Aplysina* – Schwämmen in anderen Studien (Friedrich *et al.* 1999, Hentschel *et al.* 2001). Bedingt durch deren hohe Anzahl lagen einige der Banden sehr dicht beieinander. Durch Variation des Gradienten an denaturierenden Agenzien in den Gelen konnte jedoch keine bessere Auflösung erzielt werden, da sich gleichzeitig der „Schmiereffekt“ verstärkte. Dennoch konnten zweifelsfrei einige konstante und einige variable Banden auf den Gelen identifiziert werden.

Dem Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analyse entsprechend erwies sich ein großer Teil der Banden auf den DGGE – Gelen unabhängig vom Einfluß der Verpflanzung der Schwämme als konstant (Abb. 3C-4). Sie waren in allen Proben des Verpflanzungsexperimentes inklusive der Proben des Originalstandortes, die zu Beginn und am Ende des dreimonatigen Experimentes genommen worden waren vorhanden. Ein entsprechendes Ergebnis erhielten Friedrich *et al.* (2001) nach Aquarienhälterung von *A. aerophoba* – Individuen über elf Tage unter unterschiedlichen Bedingungen. Ein Teil der Schwämme war hierbei in sterilem Seewasser, ein anderer in sterilem, mit Antibiotika behandeltem Seewasser gehalten worden. Auch diese Behandlung hatte lediglich zu geringfügigen Veränderungen in der Bakteriengemeinschaft des Schwammes geführt.

Die Daten beider Studien weisen darauf hin, dass ein Großteil der Bakterien in *Aplysina* – Schwämmen auch über lange Zeiträume unabhängig von schwankenden Umgebungsbedingungen in den Schwämmen auftreten. Selbst der äußerlich stark geschädigte Schwamm, der im Verpflanzungsversuch an einen exponierten Standort auf 15 m Tiefe versetzt worden war, wies eine weitgehend unveränderte Bakteriengemeinschaft auf. Die Ergebnisse von Friedrich *et al.* (2001) zeigen darüber hinaus, dass die meisten Bakterienarten auch dann im Schwammgewebe erhalten bleiben, wenn sie im umgebenden Seewasser nicht vorliegen und deshalb nicht daraus nachgeliefert werden können.

In diesem Zusammenhang sind Beobachtungen von Wilkinson *et al.* (1984) interessant, die sowohl an der Mikroorganismengemeinschaft von *A. aerophoba* als auch von *A. cavernicola* gemacht wurden. Sie stellten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen fest, dass Bakterien, die normalerweise mit diesen Schwämmen assoziiert leben, kaum von deren Archaeocyten phagozytiert werden. Dagegen wurden in dieser Studie zugefütterte Seewasserbakterien größtenteils innerhalb von 40 min in die Schwammzellen aufgenommen und verdaut. Hierfür sind sehr wahrscheinlich spezielle Strukturen an der Oberfläche der dauerhaft mit den Schwämmen assoziierten Bakterien verantwortlich. So sind unter dem Elektronenmikroskop an diesen Bakterien Schleimschichten und Kapseln erkennbar, von denen ausgegangen wird, dass sie die Phagozytose durch die Archaeocyten verhindern (Wilkinson 1978c, Wilkinson *et al.* 1981). Es scheinen also Anpassungen der Bakterien in den *Aplysina* – Schwämmen an den „Lebensraum Schwamm“ vorhanden zu sein. Solche Anpassungen sind nach Steinert *et al.* (2000) häufig mit der Entstehung von Symbiosen verknüpft.

Aus den DGGE – Gelen wurden exemplarisch einzelne der variablen und der konstanten Banden für eine phylogenetische Analyse der darin vorhandenen 16S rDNA ausgeschnitten. Von manchen Bandenreihen (= Banden, die auf den DGGE – Gelen in unterschiedlichen Proben eine identische Laufhöhe aufwiesen) wurde dabei mehr als eine Bande analysiert. Dabei traten stets geringfügige Unterschiede in der Basensequenz der verschiedenen analysierten Banden einer Bandenreihe auf (Tab. 3C-1). Es kann deshalb nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich die Bandenreihen aus der DNA unterschiedlicher, nahe verwandter Bakterienspezies zusammensetzten. Aus diesem Grund sind die ermittelten Sequenzen der einzelnen DGGE – Banden im phylogenetischen Baum in Abb. 3C-5 getrennt dargestellt. Es ist aber anzunehmen, dass es sich bei den Abweichungen zwischen den Sequenzen der Banden einer Bandenreihe um geringfügige Ungenauigkeiten in der Sequenzanalyse handelt. Vor allem die Beobachtung, dass selbst Banden verschiedener PCR – Ansätze der selben Schwammprobe Unterschiede in der Basensequenz aufweisen (z.B. die Banden 7 und 8, Tab. 3C-1) macht dies sehr wahrscheinlich. Somit ist davon auszugehen, dass Bandenreihen mit Banden gleicher Laufhöhe auf den DGGE – Gelen, trotz geringfügiger Unterschiede in den darin vorhandenen DNA – Sequenzen, jeweils die gleiche Bakterienspezies im Schwamm repräsentieren.

Die aus Bande 1 isolierte DNA – Sequenz lag lediglich in einer Probe, die von einem *A. cavernicola* – Individuum des Originalstandortes am Ende des dreimonatigen Verpflanzungsexperimentes genommen wurde und gehört damit dem variablen Teil des Bandenmusters an. Die aus Bande 1 isolierte 16S rDNA – Sequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz eines bisher unkultivierten Bakteriums innerhalb der Gruppe der Bacteroidetes. Dieses Bakterium entstammte dem Seewasser im Bereich einer Hydrothermalquelle im Mittelmeer nahe der Insel Milos, Griechenland (Sievert *et al.* 2000).

Die Banden 7 und 8 bilden gemeinsam eine Bandenreihe, die lediglich in den Oberflächengewebsproben eines der beiden auf 12 m Tiefe verpflanzten Schwammindividuen vorlag. Diese Bandenreihe repräsentierte eine Bakterienart, deren DNA – Sequenz eine hohe Übereinstimmung mit der des schwefeloxidierenden  $\gamma$ -Proteobakteriums OAlI2 aufwies. Auch dieses war aus dem Seewasser im Bereich der Hydrothermalquelle bei der griechischen Insel Milos isoliert worden (Sievert *et al.* 2000).

Die Bande 4 war, wie Bande 1, nur in dem Schwammindividuum vom Originalstandort zu finden, das am Ende des dreimonatigen Verpflanzungsversuches beprobt worden war. Die Sequenz des 16S rDNA – Fragmentes, das aus Bande 4 isoliert wurde, zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz des  $\alpha$ -Proteobakteriums MBIC3368, das ursprünglich ebenfalls aus einem marinen Schwamm isoliert worden war (T. Hamada, unpubliziert, GenBank Nr. AB012864). Im Anschluß daran wurden sehr ähnliche Sequenzen aus dem australischen Schwamm *Rhopaloeides odorabile* (Isolat NWCu001) (Webster & Hill 2001), aus *Aplysina aerophoba*, aus dem in der Adria wachsenden *Suberites domuncula* (Isolate SB1 und SB2) (Thakur *et al.* 2003) und aus einer Reihe von tropischen Tiefseeschwämmen (Ohlson *et al.* 2002) isoliert. Obwohl Bande 4 in *A. cavernicola* variabel auftrat und nahe verwandte  $\alpha$ -Proteobakterien auch aus mediterranem Seewasser bekannt sind (Hentschel *et al.* 2001), scheint diese Gruppe von Bakterien häufig mit unterschiedlichen marinen Schwämmen assoziiert zu sein.

Die variablen Banden 1, 4, 7 und 8 traten in einem Schwamm am Originalstandort in 40 m Tiefe und in einem der auf 12 m Tiefe verpflanzten Schwämme auf. Es scheint also keine Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Banden in den Proben und den Veränderungen, die durch das Verpflanzungsexperiment verursacht worden waren zu geben. Vielmehr unterliegt der variable Teil der Bakteriengemeinschaft in *A.*

*cavernicola* wohl natürlichen Schwankungen, auf die durch das Verpflanzungsexperiment kein Einfluß genommen werden konnte. Möglicherweise handelte es sich bei den Bakterienarten, die sich anhand der DGGE – Analyse als variabel im Schwamm *A. cavernicola* auftretend identifizieren ließen um solche, die keine Schutzmechanismen gegen die Phagocytose durch Schwammzellen besitzen (Wilkinson *et al.* 1984). Diese Arten sind vermutlich nur dann in mikrobiologischen Untersuchungen des Schwammgewebes detektierbar, wenn sie zum Zeitpunkt der Probenahme in so hohen Konzentrationen im Seewasser, das der Schwamm filtriert auftreten, dass sie trotz der Phagocytoseaktivität der Archaeocyten noch eine zur Detektion ausreichende Abundanz im Schwamm aufrecht erhalten können.

Aus der großen Zahl an konstanten Banden auf den DGGE – Gelen wurden solche für die phylogenetische Analyse ausgewählt, die sich im Laufe der elektrophoretischen Auftrennung besonders gut von den benachbarten Banden getrennt hatten (Abb. 3C-4). Ebenso, wie die zuvor beschriebenen variablen Banden wurden diese aus den Gelen ausgeschnitten und die darin vorhandenen 16S rDNA – Fragmente wurden sequenziert.

Aus einer in allen Proben konstant auftretenden Bandenreihe wurden sowohl aus dem DGGE – Gel der Proben des inneren Mesohyls (Abb. 3C-4 Gel 1; Banden 2 und 3) als auch aus dem DGGE – Gel der Oberflächengewebsproben (Abb. 3C-4 Gel 2; Banden 9 – 11) mehrere Banden ausgeschnitten. Die darin enthaltenen 16S rDNA – Sequenzen zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem  $\beta$ -Proteobakterium *Burkholderia cepacia*. *B. cepacia* wurde bereits in unterschiedlichen terrestrischen Umgebungen, darunter in Trinkwasser gefunden (Butler *et al.* 1995, Zanetti *et al.* 2000). Ein Auftreten im marinen Lebensraum ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden. Die terrestrische Variante des Bakteriums besitzt einen sehr anpassungsfähigen Metabolismus. So ist sie beispielsweise in der Lage, p-Nitrophenol als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen (Prakash *et al.* 1996). Das ist vor allem deshalb interessant, da das in *A. cavernicola* aufgefundene  $\beta$ -Proteobakterium im Gewebe des Schwammes ebenfalls in einem Habitat lebt, in dem hohe Konzentrationen an phenolischen Metaboliten auftreten (Ciminiello *et al.* 1997, Thoms *et al.* 2004). Es scheint somit denkbar, dass auch dieses Bakterium seine außergewöhnliche chemische Umgebung als Nährstoffquelle nutzen kann.

Die durch die ausgeschnittenen Banden 6 und 13 – 16 (Abb. 3C-4) repräsentierte Bandenreihe (im Folgenden „Bandenreihe A“ genannt) trat ebenfalls konstant in allen

analysierten Proben des Verpflanzungsexperimentes auf. Die daraus isolierte 16S rDNA gruppierte sich nach phylogenetischer Analyse mit Bakterienklonen aus anderen Schwämmen zu einem monophyletischen Cluster. Diese Bakterienklone waren aus Isolaten aus Gewebe der Schwämme *Aplysina aerophoba* und *Theonella swinhoei* hergestellt worden und gehörten dem Phylum Acidobakterien an (Hentschel *et al.* 2002). Das Vorhandensein von Bakterien dieses Clusters in *A. cavernicola* konnte zusätzlich durch die Hybridisierung des Schwammgewebes mit einer für das Cluster spezifischen Fluoreszenz – Sonde („TK66“) verifiziert werden (Abb. 3C-6). Ein Vergleich der nach dieser Behandlung erzielten Signaldichte mit der Signaldichte nach Hybridisierung mit einer generellen Eubakterien – Sonde ergab, dass die Bakterien des Acidobakterien – Clusters nur einen geringen Anteil an der gesamten Eubakterien – Gemeinschaft in *A. cavernicola* ausmachten.

Die ausgeschnittenen und phylogenetisch analysierten Banden 5 und 12 repräsentieren eine in allen Proben des Verpflanzungsversuchs konstante Bandenreihe, die im Folgenden „Bandenreihe B“ genannt wird. Die aus dieser Bandenreihe isolierten 16S rDNA – Sequenzen zeigen eine hohe Übereinstimmung mit Sequenzen eines monophyletischen Clusters, das wie das oben beschriebene Acidobakterien – Cluster ausschließlich Bakterien umfaßt, die aus marinen Schwämmen isoliert wurden. Eine phylogenetische Zuordnung dieses Clusters zu einer bestimmten Bakteriengruppe ist derzeit noch nicht möglich. Bei den Wirtsschwämmen der Bakterienspezies, die neben dem aus *A. cavernicola* isolierten Bakterium diesem Cluster angehören, handelt es sich um *Theonella swinhoei* und *Rhopaloeides odorabile* (Hentschel *et al.* 2002, Webster *et al.* 2001).

Mit den durch die Bandenreihen A und B repräsentierten zwei Bakterienarten waren im Rahmen der phylogenetischen Analyse der *A. cavernicola* – Individuen des Verpflanzungsexperimentes Angehörige von monophyletischen Clustern gefunden worden, die ausschließlich aus schwammassoziierten Bakterien bestehen. Dies bedeutet, dass alle schwammassoziierten Bakterienspezies, die diesen Clustern angehören, mit den Angehörigen dieses Clusters näher verwandt sind, als mit Bakterienarten, die in irgendeinem anderen Lebensraum (inklusive dem Seewasser) vorkommen. Dies ist vor allem deshalb interessant, weil sich die Habitate der verschiedenen Wirtsschwämme dieser Bakterien nicht überschneiden und viele tausend Kilometer voneinander entfernt liegen. Während der Lebensraum von *A. cavernicola* auf das Mittelmeer beschränkt ist (Riedl 1983) waren die Individuen von

*Theonella swinhoei* vor der Küste Japans gesammelt worden (Hentschel *et al.* 2002). *Rhopaloeides odorabile* entstammte dagegen dem Davies Reef bei Australien (Webster *et al.* 2001). Neben der großen geographischen Entfernung der Habitate dieser Schwämme sind die Schwammarten auch phylogenetisch nur sehr entfernt miteinander verwandt. Bestimmte Bakterienspezies in *A. cavernicola* sind also näher mit Bakterien verwandt, die in den geographisch und phylogenetisch weit entfernten Schwämmen *Theonella swinhoei* und *Rhopaloeides odorabile* auftreten, als mit den Bakterien, die im Seewasser vorhanden sind, das *A. cavernicola* umgibt. Es scheint also eine mikrobielle Gemeinschaft zu existieren, die ausschließlich in Assoziation mit Schwämmen lebt und nicht über das Filtrieren des Seewassers in die Schwämme gelangt (Hentschel *et al.* 2002, 2003).

Für die phylogenetische Analyse waren lediglich drei konstante Bandenreihen unter den zahlreichen Bandenreihen auf den DGGE – Gelen der Proben von *A. cavernicola* ausgewählt worden. Bereits zwei dieser drei konstanten Bandenreihen repräsentieren Bakterienarten, die der oben beschriebenen schwammspezifischen mikrobiellen Gemeinschaft angehören. Diese hohe Trefferquote lässt einen sehr hohen Anteil solcher schwammspezifischer Bakterienarten an der dauerhaft mit *A. cavernicola* assoziierten Mikroorganismen – Gemeinschaft vermuten.

Eine denkbare Erklärung für die Entstehung einer solchen schwammspezifischen Bakteriengemeinschaft wäre, dass die rezenten Bakterienspezies und die rezenten Schwammarten in Co – Evolution miteinander entstanden sind (Hentschel *et al.* 2002, 2003). Demnach hätten sich sehr früh in der Evolution gemeinsame Vorfahren der Bakterien in einem gemeinsamen Vorfahren der Schwämme *A. cavernicola*, *T. swinhoei* und *R. odorabile* angesiedelt. Die Bakterien hätten sich dann parallel mit den Schwämmen weiterentwickelt und die nah verwandten rezenten Spezies gebildet. Eine hierfür notwendige Bedingung ist, dass die schwammspezifischen Bakterien über sexuelle oder vegetative Fortpflanzungsstadien an die jeweilige Folgegeneration weitergeben werden. Eine solche „vertikale“ Übertragung von Bakterien zwischen Generationen wird vielfach als Indikator für eine Symbiose angesehen (Hentschel *et al.* 2003).

Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die scheinbar schwammspezifischen Bakterienarten auch im Seewasser vorhanden sind, hier aber in so geringer Konzentration vorliegen, dass sie in mikrobiologischen Untersuchungen des Seewassers nicht detektiert werden. Es ist bekannt, dass

Schwämme immense Mengen an Seewasser filtrieren. So kann ein 1 kg schweres Exemplar eine Filterkapazität von 24000 Liter Seewasser am Tag aufweisen (Vogel 1977). Auf diese Weise könnten Bakterienarten im Schwammgewebe akkumuliert werden, die im Meer nur in verschwindend geringen Anzahlen auftreten.

Zusätzlich zu der mikrobiologischen Untersuchung der *A. cavernicola* – Individuen des Verpflanzungsversuches wurden die Schwämme chemisch analysiert. Diese Analyse ergab, dass sich ihre Alkaloidmuster auch drei Monate nach der Verpflanzung nicht erkennbar verändert hatten. Selbst der aufgrund der veränderten Umgebungsbedingungen stark geschädigte Schwamm, der auf 15m Tiefe an einen exponierten Standort verpflanzt worden war, wies das für *A. cavernicola* typische Alkaloidmuster auf. Es zeigte sich in der Zusammensetzung der Sekundärmetabolite der verpflanzten Schwämme weder eine Angleichung an das Metabolitenmuster von *A. aerophoba*, noch waren in den verpflanzten Individuen die Biotransformationsprodukte Aeroplysinin-1 und Dienon gebildet worden. Ersteres weist auf eine von Umgebungsfaktoren unabhängige Naturstoffproduktion im Schwamm *A. cavernicola* hin. Letzteres bestätigt die im Abschnitt 4A.2. diskutierten Ergebnisse, dass ungünstige Umgebungsbedingungen keine induzierenden Faktoren für die Biotransformation der Isoxazolinalkaloide in *Aplysina* – Schwämmen sind.

Die Tatsache, dass das Alkaloidmuster ebenso wie ein Großteil der Bakteriengesellschaft drei Monate nach der Verpflanzung unverändert geblieben waren, lässt es zwar nach wie vor denkbar erscheinen, dass ein Teil dieser Mikroorganismen an der Naturstoffsynthese beteiligt ist. Dieser Befund macht es aber gleichzeitig unmöglich, die Präsenz einzelner Bakterien in Zusammenhang mit dem Vorhandensein einzelner Sekundärmetabolite zu bringen. Die Frage nach symbiotischen Beziehungen zwischen *A. cavernicola* und den in seinem Gewebe lebenden Bakterien bleibt also weiterhin offen. Sie wird erst nach genauerer Charakterisierung der mit *Aplysina* – Schwämmen assoziierten Mikroorganismen – Gemeinschaften beantwortet werden können. Solche Studien sind derzeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Dr. Ute Hentschel im Gange.

Die im Rahmen des Verpflanzungsversuches mit *A. cavernicola* erzielten Ergebnisse zeigen, dass dieser Schwamm eine gegenüber Veränderungen in seiner Umgebung ausgesprochen stabile Mikroorganismengemeinschaft und ein sehr stabiles Alkaloidmuster besitzt. Die Verpflanzung mehrerer Individuen des Schwammes an

Standorte, die in den Lichtbedingungen dem Lebensraum von *A. aerophoba* entsprechen, bewirkte weder in der Zusammensetzung der assoziierten Bakterien (vor allem im Hinblick auf Cyanobakterien) noch in der Zusammensetzung der Sekundärmetabolite Angleichungen an die Charakteristika von *A. aerophoba*. Mit Hilfe der DGGE – Analyse der aus den Proben des Verpflanzungsversuches isolierten 16S rDNA konnte erstmals zwischen dem variablen und dem konstanten Teil einer schwammassoziierten Bakteriengemeinschaft unterschieden werden. Der analysierte variable Teil setzte sich aus Bakterien zusammen, die hohe Sequenzübereinstimmungen mit Bakterien aufweisen, die bereits aus dem Seewasser bekannt sind. Zwei der drei Bakterienarten, die mit Hilfe der DGGE – Analyse als permanent mit *A. cavernicola* assoziiert identifiziert werden konnten, gehören einer schwammspezifischen Bakteriengemeinschaft an, die unabhängig von der großen geographischen Entfernung der bisher untersuchten Wirte in phylogenetisch nur sehr entfernt miteinander verwandten Schwammarten auftritt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Acosta, A. L. und Rodriguez, A. D. (1992). 11-Oxo-aerolithin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod. Lloydia*. **55**, 1007-1012.
- Adler, F. R. und Harvell, C. D. (1990). Inducible defenses, phenotypic variability and biotic environments. *Trends Ecol. Evol.* **5**, 407-410.
- Affleck, R., Haynes, C. A. und Clark, D. S. (1992). Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 5167-5170.
- Ahern, T. J. und Klibanov, A. M. (1988). Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes. *Methods Biochem. Anal.* **33**, 91-127.
- Aiello, A., Fattorusso, E., Menna, M. und Pansini, M. (1995). Chemistry of Verongida sponges .5. Brominated metabolites from the Caribbean sponge *Pseudoceratina* sp. *Biochem. Syst. Ecol.* **23**, 377-381.
- Albrizio, S., Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1994). Chemistry of Verongida sponges. 1. Constituents of the Caribbean sponge *Pseudoceratina crassa*. *Tetrahedron* **50**, 783-788.
- Amann, R., Ludwig, W. und Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **56**, 143-169.
- Avila, C. (1995). Natural products from opisthobranch molluscs. A biological review. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **33**, 487-559.
- Avila, C., Ballesteros, M., Slattery, M., Starmer, J. und Paul, V. J. (1998). *Phyllodesmium guamensis* (Nudibranchia : Aeolidioidea), a new species from Guam (Micronesia). *J. Molluscan Stud.* **64**, 147-160.
- Bakus, G. J. (1981). Chemical defense mechanisms on the Great Barrier Reef, Australia. *Science* **211**, 497-498.
- Bakus, G. J., Schulte, B., Jhu, S., Wright, M., Green, G. und Gomez, P. (1985). Antibiosis and antifouling in marine sponges: Laboratory versus field studies. In "New Perspectives in Sponge Biology" (K. Rützler, Ed.), pp. 102-108. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA.

- Bakus, G. J., Targett, N. M. und Schulte, B. (1986). Chemical ecology of marine organisms: An overview. *J. Chem. Ecol.* **12**, 951-987.
- Becerro, M. A., Turon, X., Uriz, M. J. und Lopez, N. I. (1994). Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **179**, 195-205.
- Becerro, M. A., Turon, X., Uriz, M. J. und Templado, J. (2003). Can a sponge feeder be a herbivore? *Tylodina perversa* (Gastropoda) feeding on *Aplysina aerophoba* (Demospongiae). *Biol. J. Linnean Soc.* **78**, 429-438.
- Beer, S. und Ilan, M. (1998). In situ measurements of photosynthetic irradiance responses of two Red Sea sponges growing under dim light conditions. *Mar. Biol.* **131**, 613-617.
- Bewley, C. A. und Faulkner, D. J. (1998). Lithistid sponges: Star performers or hosts to the stars. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **37**, 2163-2178.
- Bewley, C. A., Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52**, 716-722.
- Borowitzka, M. A., Hinde, R. und Pironet, F. (1988). Carbon fixating by the sponge *Dysidea herbacea* and its endosymbiont *Oscillatoria spongelliae*. In "Proc. 6th int Coral Reef Symp. Symposium Executive Committee" (J. H. e. a. Choat, Ed.), pp. 151-155, Townsville.
- Brenzinger, M. (1996). Bromierte Alkaloide aus *Verongia* - Arten: Isolierung, Identifizierung und enzymatische Umsetzung. Diplomarbeit, Universität Würzburg, Würzburg.
- Brusca, R. C. und Brusca, G. J. (1990). Phylum Porifera: the sponges. In "Invertebrates" (A. D. Sinauer, Ed.), pp. 181-210. Sinauer Press, Sunderland, Mass., USA.
- Butler, A. und Walker, J. V. (1993). Marine haloperoxidases. *Chem. Rev.* **93**, 1937-1944.
- Butler, S. L., Doherty, C. J., Hughes, J. E., Nelson, J. W. und Govan, J. R. (1995). *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard? *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1001-1004.

- Carballo, J. L., Naranjo, S. und Garcia-Gomez, J. C. (1997). Where does the Mediterranean Sea begin? Zoogeographical affinities of the littoral sponges of the Straits of Gibraltar. *J. Biogeogr.* **24**, 223-232.
- Carpenter, R. C. (1986). Partitioning herbivory and its effects on coral algal communities. *Ecol. Monogr.* **56**, 345-365.
- Chanas, B. und Pawlik, J. R. (1996). Does the skeleton of a sponge provide a defense against predatory reef fish? *Oecologia* **107**, 225-231.
- Ciminiello, P., Costantino, V., Fattorusso, E., Magno, S., Mangoni, A. und Pansini, M. (1994a). Chemistry of Verongida sponges .2. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *J. Nat. Prod.* **57**, 705-712.
- Ciminiello, P., dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S., Carrano, L. und Pansini, M. (1996b). Chemistry of Verongida sponges .7. Bromocompounds from the Caribbean sponge *Aplysina archeri*. *Tetrahedron* **52**, 9863-9868.
- Ciminiello, P., dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1999). Chemistry of Verongida sponges. 9. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.* **62**, 590-593.
- Ciminiello, P., dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (2000). Chemistry of Verongida sponges. 10. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Verongula gigantea*. *J. Nat. Prod.* **63**, 263-266.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S. und Pansini, M. (1997). Chemistry of verongida sponges .8. Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron* **53**, 6565-6572.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1994b). Chemistry of Verongida sponges .3. Constituents of a Caribbean *Verongula* sp. *J. Nat. Prod.* **57**, 1564-1569.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1995). Chemistry of Verongida sponges .4. Comparison of the secondary metabolite composition of several specimens of *Pseudoceratina crassa*. *J. Nat. Prod.* **58**, 689-696.

- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S. und Pansini, M. (1996a). Chemistry of verongida sponges .6. Comparison of the secondary metabolic composition of *Aplysina insularis* and *Aplysina fulva*. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 105-107.
- Cimino, G., de Rosa, S., de Stefano, S., Self, R. und Sodano, G. (1983). The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Lett.* **24**, 3029-3032.
- Cimino, G., de Rosa, S., de Stefano, S., Spinella, A. und Sodano, G. (1984). The zochrome of the sponge *Verongia aerophoba* ("Uranidine"). *Tetrahedron Letters* **25**, 2925-2928.
- Cimino, G., Fontana, A., Gimenez, F., Marin, A., Mollo, E., Trivellone, E. und Zubia, E. (1993). Biotransformation of a dietary sesterterpenoid in the Mediterranean nudibranch *Hypselodoris orsini*. *Experientia* **49**, 582-586.
- Conn, E. E. (1979). Cyanide and cyanogenic glycosides. In "Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites" (G. A. Rosenthal und D. H. Janzen, Ed.), pp. 387-412. Academic Press, New York.
- Connon, S. A. und Giovannoni, S. J. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3878-3885.
- Costantino, V., Fattorusso, E., Mangoni, A. und Pansini, M. (1994). 3 new brominated and iodinated tyrosine derivatives from *Iotrochota birotulata*, a von-Verongida sponge. *J. Nat. Prod.* **57**, 1552-1556.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. und Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444.
- Davy, S. K., Trautmann, D. A., Borrowitzka, M. A. und Hinde, R. (2002). Ammonium excretion by a symbiotic sponge supplies the nitrogen requirements of its rhodophyte partner. *J. Exp. Biol.* **205**, 3505-3511.
- Dayton, P. K., Robilliard, G. A., Paine, R. T. und Dayton, L. B. (1974). Biological accomodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antactrica. *Ecol. Monogr.* **44**, 105-128.

- de Rosa, M., Minale, L. und Sodano, G. (1973). Metabolims in Porifera. I. Biosynthesis of fatty acids, sterols, and bromo-compounds by the sponge *Verongia aerophoba*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **45**, 883-893.
- Debitus, C., Guella, G., Mancini, I., Waikedre, J., Guemas, J.-P., Nicolas, J.-L. und Pietra, F. (1998). Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 136-141.
- Dimarzo, V., Vardaro, R. R., Depetrocellis, L., Villani, G., Minei, R. und Cimino, G. (1991). Cyercenes, novel pyrones from the Ascoglossan mollusk *Cyerce cristallina* - Tissue distribution, biosynthesis and possible involvement in defense and regenerative processes. *Experientia* **47**, 1221-1227.
- Ebel, R. (1998). Wundinduzierte Biotransformation bromierter Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina*: Biochemische Charakterisierung und ökologische Bedeutung. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H. J. und Proksch, P. (1997). Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1451-1462.
- Ebel, R., Marin, A. und Proksch, P. (1999). Organic-specific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**, 769-777.
- Encarnacion-Dimayuga, R., Ramirez, M. R. und Luna-Herrera, J. (2003). Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharm. Biol.* **41**, 384-387.
- Engel, S. und Pawlik, J. R. (2000). Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 273-281.
- Faber, K. (2004). "Biotransformations in organic chemistry," 5/Ed. Springer, Berlin.
- Fattorusso, E., Forenza, S., Minale, L. und Sodano, G. (1971). Isolation of 3,4-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Gazz. Chim. Ital.* **101**, 104-105.

- Faulkner, D. J. (1993). Academic chemistry and the discovery of bioactive marine natural products. *Mar. Biotechnol.* **1**, 459-474.
- Faulkner, D. J. (1997). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 323-539.
- Faulkner, D. J. (2000). Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 135-145.
- Faulkner, D. J., Harper, M. K., Haygood, M. G., C.E., S. und Schmidt, E. W. (2000). Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. In "Drugs from the sea" (N. Fusetani, Ed.), Vol. 107-119, pp. 158. Karger, Basel.
- Fendert, T. (2000). Charakterisierung der enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* und Isolierung von Bromotyrosinalkaloiden aus *Aplysina insularis*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Finks, R. M. (1970). The evolution and ecologic history of sponges during Palaeozoic times. In "The biology of the Porifera" (W. G. Fry, Ed.), Vol. 25, pp. 3-22. Symp. Zool. Soc. Lond.
- Friedrich, A. B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J. und Hentschel, U. (2001). Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**, 105-113.
- Friedrich, A. B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. und Hentschel, U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**, 461-470.
- Fuerst, J. A., Webb, R. I., Garson, M. J., Hardy, L. und Reiswig, H. M. (1998). Membrane-bounded nucleoids in microbial symbionts of marine sponges. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 29-34.
- Fuerst, J. A., Webb, R. I., Garson, M. J., Hardy, L. und Reiswig, H. M. (1999). Membrane-bounded nuclear bodies in diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensland Mus.* **44**, 193-203.
- Fusetani, N. (2004). Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 94-104.

- Gallissian, M. F. und Vacelet, J. (1976). Ultrastructure of some stages of oogenesis of sponges of genus *Verongia* (Dictyoceratida). *Ann. Sci. Nat.-Zool. Biol. Anim.* **18**, 381-404.
- Gavagnin, M., Marin, A., Mollo, E., Crispino, A., Villani, G. und Cimino, G. (1994). Secondary metabolites from Mediterranean Elysioidea - Origin and biological role. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **108**, 107-115.
- Gavagnin, M., Mollo, E., Montanaro, D., Ortea, J. und Cimino, G. (2000). Chemical studies of Caribbean sacoglossans: Dietary relationships with green algae and ecological implications. *J. Chem. Ecol.* **26**, 1563-1578.
- Giovannoni, S. J. und Rappe, M. S. (2000). Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In "Microbial ecology of the ocean" (D. L. Kirchmann, Ed.), pp. 47-84. Wiley, New York.
- Goldenstein, G., Fendert, T., Proksch, P. und Winterfeldt, E. (2000). Enantioselective preparation and enzymatic cleavage of spiroisoxazoline amides. *Tetrahedron* **56**, 4173-4185.
- Götting (1996). Mollusca. In "Einzeller und Wirbellose" (W. Westheide und R. M. Rieger, Ed.), pp. 276-330. Spektrum Akademischer Verlag.
- Green, G. (1977). Ecology of toxicity in marine sponges. *Mar. Biol.* **40**, 207-215.
- Grigg, R. W., Polovina, J. J. und Atkinson, M. J. (1984). Model of a coral reef ecosystem. III. Resource limitation, community regulation, fisheries yield, and resource management. *Coral Reefs* **3**, 23-27.
- Hammerstrom, K., Dethier, M. N. und Duggins, D. O. (1998). Rapid phlorotannin induction and relaxation in five Washington kelps. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **165**, 293-305.
- Harvell, C. D. (1990a). The evolution of inducible defense. *Parasitology* **100**, 53-61.
- Harvell, C. D. (1990b). The ecology and evolution of inducible defenses. *Q. Rev. Biol.* **65**, 323-340.
- Havel, J. (1986). Predator-induced defenses: a review. In "Predation: direct and indirect effects on aquatic communities" (W. C. Kerfoot und A. Sih, Ed.), pp. 263-278. University Press of New England, Hanover, New Hampshire.

- Hay, M. E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 103-134.
- Hay, M. E. und Fenical, W. (1988). Marine plant - herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **19**, 111-145.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J. und Horn, M. (2003). Microbial diversity of marine sponges. In "Marine Molecular Biotechnology" (W. E. G. Müller, Ed.), pp. 59-88. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J. und Moore, B. S. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431-4440.
- Hentschel, U. und Steinert, M. (2001). Symbiosis and pathogenesis: common themes, different outcomes. *Trend. Microbiol.* **9**, 585-585.
- Hentschel, U., Steinert, M. und Hacker, J. (2000). Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trend. Microbiol.* **8**, 226-231.
- Hesbacher, S., Baur, B., Baur, A. und Proksch, P. (1995). Sequestration of lichen compounds by three species of terrestrial snails. *J. Chem. Ecol.* **21**, 233-246.
- Hildebrand, M., Waggoner, L. E., Lim, G. E., Sharp, K. H., Ridley, C. P. und Haygood, M. G. (2004). Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 122-142.
- Hinde, R. und Smith, D. C. (1972). Persistence of functional chloroplasts in *Elysia viridis* (Opisthobranchia, Sacoglossa). *Nature* **239**, 30.
- Huston, M. A. (1985). Patterns of species diversity on coral reefs. *A. Rev. Ecol. Syst.* **16**, 149-177.
- Jackson, J. B. C. und Buss, L. (1975). Allelopathy and spatial competition among coral reef invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5160-5163.
- Jakubowski, H. (2004). "Biochemistry online: An approach based on chemical logic. [Online]," College of St. Benedict/St. John's Univ., St. Joseph, USA. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bcintro/default.html>.
- Jeffrey, J. A. und Saenger, W. (1994). "Hydrogen bonding in biological structures," Springer Verlag, Berlin.

- Jensen, K. R. (1997). Evolution of the Sacoglossa (Mollusca, Opisthobranchia) and the ecological associations with their food plants. *Evol. Ecol.* **11**, 301-335.
- Jones, D. A. (1988). Cyanogenesis in animal-plant interactions. In "Cyanide compounds in biology" (D. Evered und S. Harnett, Ed.). Wiley, Chichester.
- Jung, V. und Pohnert, G. (2001). Rapid wound-activated transformation of the green algal defensive metabolite caulerpenyne. *Tetrahedron* **57**, 7169-7172.
- Kaeberlein, T., Lewis, K. und Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J. (1994). "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler," 14/Ed. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kelly, S. R., Jensen, P. R., Henkel, T. P., Fenical, W. und Pawlik, J. R. (2003). Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**, 175-182.
- Kerr, R. G. (2000). Biosynthesis of bioactive marine natural products. In "Studies in natural products chemistry. Vol. 21" (Atta-ur-Rahman, Ed.), pp. 293-328. Elsevier, Amsterdam.
- Khmelnitsky, Y. L., Welch, S. H., Clark, D. S. und Dordick, J. S. (1994). Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2647-2648.
- Kikuchi, A., Nieda, M., Schmidt, C., Koezuka, Y., Ishihara, S., Ishikawa, Y., Tadokoro, K., Durrant, S., Boyd, A., Juji, T. und Nicol, A. (2001). In vitro anti-tumour activity of alpha-galactosylceramide-stimulated human invariant V alpha 24+NKT cells against melanoma. *Br. J. Cancer* **85**, 741-746.
- Klibanov, A. M. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts Chem. Res.* **23**, 114-120.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241-246.
- Kobayashi, M. und Shimizu, S. (1998). Metalloenzyme nitrile hydratase: Structure, regulation and application to biotechnology. *Nature Biotechnol.* **16**, 733-735.

- Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M. und Fukatsu, T. (2002). Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14280-14285.
- König, G. M. und Wright, A. D. (1993). Agelorin-a and agelorin-B, and 11-epi-fistularin-3, 3 new Antibacterial fistularin-3 derivatives from the tropical marine sponge *Agelas oroides*. *Heterocycles* **36**, 1351-1358.
- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A. C., van Uden, W., Konings, A. W. T., Pedersen, J. A., Pras, N. und Woerdenbag, H. J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeropylsinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Nat. Prod.* **59**, 591-594.
- Kuntz, I. D. und Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Adv. Protein Chem.* **28**, 293-345.
- Lappin-Scott, H. M. und Costerton, J. W. (1989). Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling* **1**, 323-342.
- Levi, C. und Levi, P. (1976). Embryogenesis de *Chondrosia reniformis* (Nardo), demosponge ovipare, et transmission des bacteries symbiotiques. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **18**, 367-380.
- Li, C. W., Chen, J. Y. und Hua, T. E. (1998). Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**, 879-882.
- MarinLit Version October 2003. A marine literature database produced and maintained by the Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand.
- McClintock, J. B. (1987). Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica. *Mar. Biol.* **94**, 479-487.
- McClintock, J. B. und Baker, B. J. (2001). "Marine chemical ecology," CRC, Boca Raton, Florida.

- McKee, T. C., Cardellina, J. H., Riccio, R., Dauria, M. V., Iorizzi, M., Minale, L., Moran, R. A., Gulakowski, R. J., McMahon, J. B., Buckheit, R. W., Snader, K. M. und Boyd, M. R. (1994). Hiv-inhibitory natural products .11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.* **37**, 793-797.
- Mujer, C. V., Andrews, D. L., Manhart, J. R., Pierce, S. K. und Rumpho, M. E. (1996). Chloroplast genes are expressed during intracellular symbiotic association of *Vaucheria litorea* plastids with the sea slug *Elysia chlorotica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12333-12338.
- Mujer, C. V. und Rumpho, M. E. (1996). Chloroplast gene expression by symbiotic algal chloroplasts in a molluscan host. *Mol. Biol. Cell* **7**, 2898-2898.
- Müller, W. E. G. (1998). Origin of Metazoa: Sponges as living fossils. *Naturwissenschaften* **85**, 11-25.
- Müller, W. E. G., Klemt, M., Thakur, N. L., Schroder, H. C., Aiello, A., D'Esposito, M., Menna, M. und Fattorusso, E. (2004). Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Mar. Biol.* **144**, 19-29.
- Muyzer, G. und Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Okahata, Y. und Mori, T. (1997). Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends Biotechnol.* **15**, 50-54.
- Olsen, G. J., Matsuda, H., Hagstrom, R. und Overbeek, R. (1994). FastDNAm1 - a tool for construction of phylogenetic trees of DNA-sequences using maximum-likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 41-48.
- Olson, J. B., Harmody, D. K. und McCarthy, P. J. (2002). alpha-Proteobacteria cultivated from marine sponges display branching rod morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**, 169-173.
- Pansini, M. (1997). Effects of light on the morphology, distribution and ecology of some Mediterranean sponges. *Biol. Mar. Mediterr.* **4**, 74-80.

- Paul, V. J. (1992). Chemical defense of benthic marine invertebrates. In "Ecological roles of marine natural products" (V. J. Paul, Ed.), pp. 164-188. Cornell University Press (Comstock), Ithaca, NY.
- Paul, V. J. und Puglisi, M. P. (2004). Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 189-209.
- Paul, V. J. und van Alstyne, K. L. (1992). Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **160**, 191-203.
- Pawlik, J. R. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol.* **30**, 273-335.
- Pawlik, J. R., Kernan, M. R., Molinski, T. F., Harper, M. K. und Faulkner, D. J. (1988). Defensive chemicals of the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchnus sanguineus* and its egg ribbons: Macrolides derived from a sponge diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **119**, 99-109.
- Pomponi, S. A. und Willoughby, R. (1994). In "Sponges in time and space" (R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen und J. C. Braekman, Ed.), pp. 395-400. AA Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Porter, J. W. und Targett, N. M. (1988). Allelochemical interactions between sponges and corals. *Biol. Bull.* **175**, 230-239.
- Prakash, D., Chauhan, A. und Jain, R. K. (1996). Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 375-381.
- Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranches. *Toxicon* **32**, 639-655.
- Proksch, P. und Ebel, R. (1998). Ecological significance of alkaloids from marine invertebrates. In "Plant alkaloids: biochemistry, ecology and medical applications." (M. F. Roberts und M. Wink, Ed.), pp. 379-394. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Proksch, P., Edrada, R. A. und Ebel, R. (2002). Drugs from the seas: Current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 125-134.

- Puyana, M., Fenical, W. und Pawlik, J. R. (2003). Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **246**, 127-135.
- Randall, J. E. und Hartmann, W. D. (1968). Sponge-feeding fishes of the West Indies. *Mar. Biol.* **1**, 216-225.
- Rappe, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L. und Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**, 630-633.
- Regoli, F., Cerrano, C., Chierici, E., Bompadre, S. und Bavestrello, G. (2000). Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. *Mar. Biol.* **137**, 453-461.
- Reiswig, H. M. (1971). Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* **141**, 568-591.
- Reiswig, H. M. (1973). Population dynamics of three Jamaican Demospongiae. *Bull. Mar. Sci.* **23**, 191-226.
- Reiswig, H. M. (1974). Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **14**, 231-249.
- Reiswig, H. M. (1975). Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Can. J. Zool.* **53**, 582-589.
- Riedl, H. (1983). "Fauna und Flora des Mittelmeeres," 3/Ed. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Rudman, W. B. (1991). Further studies on the taxonomy and biology of the octocoral-feeding genus *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831 (Nudibranchia, Aeolidioidea). *J. Molluscan Stud.* **57**, 167-203.
- Rumpho, M. E., Summer, E. J. und Manhart, J. R. (2000). Solar-powered sea slugs. Mollusc/algal chloroplast symbiosis. *Plant Physiol.* **123**, 29-38.
- Rupley, J. A. und Careri, G. (1991). Protein hydration and function. *Adv. Protein Chem.* **41**, 37-172.
- Rützler, K. (1978). Sponges in coral reefs. In "Coral reefs: research methods. Monographs on oceanographic methodology" (D. R. Stoddart und R. E. Johannes, Ed.), Vol. 5, pp. 299-314. UNESCO, Paris.

- Rützler, K. (1985). Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In "New perspectives in sponge biology" (K. Rützler, Ed.), pp. 455-466. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Santavy, D. L., Willenz, P. und Colwell, R. R. (1990). Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean Sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1750-1762.
- Sara, M. (1971). Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). *Mar. Biol.* **11**, 214-221.
- Schmahl, G. P. (1991). Community structure and ecology of sponges associated with four southern Florida coral reefs. In "New perspectives in sponge biology." (K. Rützler, Ed.), pp. 376-383. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Schmidt, E. W., Obratsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J. und Haygood, M. G. (2000). Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel  $\delta$ -proteobacterium, "*Candidatus* Entotheonella palauensis". *Mar. Biol.* **136**, 969-977.
- Schmidt, I. (1970). Phagocytose et pinocytose chez les Spongillidae. Étude in vivo de l'ingestion de bactéries et de protéines marquées à l'aide d'un colorant fluorescent en lumière ultra-violette. *Z. vergl. Physiol.* **66**, 398-420.
- Sievert, S. M., Kuever, J. und Muyzer, G. (2000). Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3102-3109.
- Steinert, M., Hentschel, U. und Hacker, J. (2000). Symbiosis and pathogenesis: Evolution of the microbe-host interaction. *Naturwissenschaften* **87**, 1-11.
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H. und Singleton, F. L. (1988). A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* **44**, 1021-1021.

- Stierle, A. C., Cardellina, J. H. und Singleton, F. L. (1991). Benzothiazoles from a putative bacterial symbiont of the marine sponge *Tedania ignis*. *Tetrahedron Lett.* **32**, 4847-4848.
- Suchanek, T. H., Carpenter, R. C., Witman, J. D. und Harvell, C. D. (1985). Sponges as important space competitors in deep Caribbean coral reef communities. In "The ecology of deep and shallow coral reefs. Symposia series for undersea research 3(1)" (M. L. Reaka, Ed.), pp. 55-59. NOAA/NURP, Rockville, MD.
- Sullivan, B., Faulkner, D. J. und Webb, L. (1983). Siphonodictidine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon sp.* that inhibits coral growth. *Science* **221**, 1175-1176.
- Taylor, R. B., Sotka, E. und Hay, M. E. (2002). Tissue-specific induction of herbivore resistance: seaweed response to amphipod grazing. *Oecologia* **132**, 68-76.
- Teeyapant, R. (1994). Brominated secondary metabolites of the marine sponge *Verongia aerophoba* Schmidt and the sponge feeding gastropod *Tylodina perversa* Gemlin: Identification, biological activities and biotransformation. Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg.
- Teeyapant, R., Kreis, P., Wray, V., Witte, L. und Proksch, P. (1993a). Brominated secondary compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba* and the sponge feeding gastropod *Tylodina perversa*. *Z. Naturforsch.* **48c**, 640-644.
- Teeyapant, R. und Proksch, P. (1993). Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*. Evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften* **80**, 369-370.
- Teeyapant, R., Woerdenbag, H. J., Kreis, P., Hacker, J., Wray, V., Witte, L. und Proksch, P. (1993b). Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z. Naturforsch.* **48c**, 939-945.
- Thacker, R. W., Becerro, M. A., Lumbang, W. A. und Paul, V. J. (1998). Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* **79**, 1740-1750.
- Thakur, N. L., Hentschel, U., Krasko, A., Pabel, C. T., Anil, A. C. und Müller, W. E. G. (2003). Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**, 77-83.

- Thompson, J. E. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. *Mar. Biol.* **88**, 23-26.
- Thompson, J. E., Barrow, K. D. und Faulkner, D. J. (1983). Localization of two brominated metabolites, arothionin and homoaerotionin , in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis*. *Act. zool. Stockh.* **64**, 199-210.
- Thompson, J. E., Walker, N. D. und Faulkner, D. J. (1985). Screening and bioassays for biologically active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Mar. Biol.* **88**, 11-21.
- Thoms, C. (2000). Untersuchungen zur fraÙhemmenden Aktivität von Schwamminhaltsstoffen gegenüber Fischen. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Thoms, C., Wolff, M., Padmakumar, K., Ebel, R. und Proksch, P. (2004). Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z. Naturforsch.* **59c**, 113-122.
- Tramper, J., Battershill, C., Brandenburg, W., Burgess, G., Hill, R., Luiten, E., Müller, W., Osinga, R., Rorrer, G., Tredici, M., Uriz, M., Wright, P. und Wijffels, R. (2003). What to do in marine biotechnology? *Biomolecular Engineering* **20**, 467-471.
- Turon, X., Becerro, M. A. und Uriz, M. J. (2000). Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tiss. Res.* **301**, 311-322.
- Turon, X., Galera, J. und Uriz, M. J. (1997). Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J. Exp. Zool.* **278**, 22-36.
- Tymiak, A. A. und Rinehart Jr., K. L. (1981). Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6763-6765.
- Unson, M. D. und Faulkner, D. J. (1993). Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* **49**, 349-353.

- Unson, M. D., Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1994). A brominated secondary metabolite synthesized by a cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**, 1-11.
- Vacelet, J. (1970). Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *J. Microsc.* **9**, 333-346.
- Vacelet, J. (1971). Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococcale et une éponge du genre *Verongia*. *J. Microsc.* **12**, 363-380.
- Vacelet, J. (1975). Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microscop. Biol. Cell.* **23**, 271-288.
- Vacelet, J., Boury-Esnault, N., Fiala-Medioni, A. und Fisher, C. R. (1995). A methanotropic carnivorous sponge. *Nature* **377**, 296.
- Vacelet, J. und Donadey, C. (1977). Electron-microscope study of association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301-314.
- van Alstyne, K. L. und Houser, L. T. (2003). Dimethylsulfide release during macroinvertebrate grazing and its role as an activated chemical defense. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **250**, 175-181.
- van Alstyne, K. L., Wolfe, G. V., Freidenburg, T. L., Neill, A. und Hicken, C. (2001). Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **213**, 53-65.
- van Soest, R. (1996). Porifera, Schwämme. In "Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere" (W. Westheide und R. Rieger, Ed.), pp. 98-119. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Vardaro, R. R., Dimarzo, V., Crispino, A. und Cimino, G. (1991). Cyercenes, novel polypropionate pyrones from the autotomizing Mediterranean mollusk *Cyerce cristallina*. *Tetrahedron* **47**, 5569-5576.
- Vogel, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2069-2071.

- Wägele, H. und Johnsen, G. (2001). Observations on the histology and photosynthetic performance of "solar-powered" opisthobranchs (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia) containing symbiotic chloroplasts or zooxanthellae. *Org. Divers. Evol.* **1**, 193-210.
- Walker, R. P., Thompson, J. E. und Faulkner, D. J. (1985). Exudation of biologically active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. *Mar. Biol.* **88**, 27-32.
- Webster, N. S. und Hill, R. T. (2001). The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an alpha-Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**, 843-851.
- Webster, N. S., Webb, R. I., Ridd, M. J., Hill, R. T. und Negri, A. P. (2001a). The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environ. Microbiol.* **3**, 19-31.
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L. und Hill, R. T. (2001b). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 434-444.
- Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter, M., Kirchner, M. und Proksch, P. (1996). Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 1-12.
- Wenner, E. L., Knott, D. M., van Dolah, R. F. und Burrell, V. G. (1983). Invertebrate communities associated with hard bottom habitats in the South Atlantic Bight. *Estuar. coas. Shelf Sci.* **17**, 143-158.
- Wilkinson, C. R. (1978a). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 161-167.
- Wilkinson, C. R. (1978b). Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.* **49**, 169-176.
- Wilkinson, C. R. (1978c). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 177-185.
- Wilkinson, C. R. und Fay, P. (1979). Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic bacteria. *Nature* **279**, 527-529.

- Wilkinson, C. R. und Garrone, R. (1980). Nutrition in marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In "Nutrition in lower Metazoa" (D. C. Smith und Y. Tiffon, Ed.), pp. 157-161. Pergamon Press, Oxford.
- Wilkinson, C. R., Garrone, R. und Vacelet, J. (1984). Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **220**, 519-528.
- Wilkinson, C. R., Nowak, M., Austin, B. und Colwell, R. R. (1981). Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb. Ecol.* **7**, 13-21.
- Wilkinson, C. R. und Vacelet, J. (1979). Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **37**, 91-104.
- Willenz, P. und Hartman, W. D. (1989). Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges .1. *Ceratoporella nicholsoni* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae, Porifera). *Mar. Biol.* **103**, 387-401.
- Willenz, P. und van de Vyver, G. (1982). Endocytosis of latex beads by the exopinacoderm in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*: an *in vitro* and *in situ* study in SEM an TEM. *J. Ultrastut. Res.* **79**, 294-306.
- Williams, S. I. und Walker, D. I. (1999). Mesoherbivore-macroalgal interactions: Feeding ecology of sacoglossan sea slugs (Mollusca, Opisthobranchia) and their effects on their food algae. *Oceanogr. Mar. Biol.* **37**, 87-128.
- Wolfe, G. V. und Steinke, M. (1996). Grazing-activated production of dimethyl sulfide (DMS) by two clones of *Emiliana huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* **41**, 1151-1160.
- Wolfe, G. V., Steinke, M. und Kirst, G. O. (1997). Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature* **387**, 894-897.
- Wörheide, G. (1998). The reef cave dwelling ultraconservative coralline demosponge *Astrosclera willeyana* Lister 1900 from the Indo-Pacific - Micromorphology, ultrastructure, biocalcification, isotope record, taxonomy, biogeography, phylogeny. *Facies* **38**, 1-88.
- Zaks, A. und Klibanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* **263**, 8017-8021.

- Zanetti, F., de Luca, G. und Stampi, S. (2000). Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 67-72.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. und Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15681-15686.
- Zhang, Q. B., Cone, M. C., Gould, S. J. und Zabriskie, T. M. (2000). Reevaluation of the final steps in the biosynthesis of blasticidin S by *Streptomyces griseochromogenes* and identification of a novel self-resistance mechanism. *Tetrahedron* **56**, 693-701.

## Zusammenfassung

### **Alkaloidmuster in Schwämmen der Gattung *Aplysina***

Schwämme der Gattung *Aplysina* akkumulieren bromierte Isoxazolinalkaloide in hohen Konzentrationen. Meist werden in *Aplysina* – Schwämmen zudem stark schwankende Gehalte der Metabolite Aeroplysinin-1 und Dienon gefunden. Diese Schwankungen zeigten sich in früheren Studien auch innerhalb einer Art und sogar innerhalb von Individuen.

In verschiedenen Experimenten mit frischem und gefriergetrocknetem Gewebe der mediterranen *Aplysina* – Arten *A. aerophoba* und *A. cavernicola* konnte ich zeigen, dass die Metabolite Aeroplysinin-1 und Dienon nicht genuin im Schwammgewebe auftreten, sondern vielmehr Produkte einer verletzungsinduzierten Reaktion sind. Hierbei werden die in hohen Konzentrationen im Schwammgewebe akkumulierten Isoxazolinalkaloide gespalten.

Versuche mit karibischen *Aplysina* – Schwämmen zeigten, dass die beobachteten Biotransformationsreaktionen gattungs- und möglicherweise sogar ordnungsübergreifend innerhalb der Verongida stattfinden. Dagegen finden sie im Gewebe von Schwämmen anderer Ordnungen und in der Schnecke *Tylodina perversa* nicht statt. Auch im isolierten Zustand außerhalb des Schwammgewebes sind die Isoxazolinalkaloide sehr stabil.

Die Ergebnisse verschiedener Experimente zur Enzymhemmung machen wahrscheinlich, dass es sich bei den *Aplysina* – typischen Biotransformationsprozessen um enzymkatalysierte Reaktionen handelt. Da die Spaltungsprodukte eine deutlich höhere antibakterielle Aktivität als die Isoxazolinvorstufen besitzen, ist zu vermuten, dass die verletzungsinduzierten Reaktionen einen aktivierten Wundschutz der Schwämme gegen Infektionen durch pathogene Mikroorganismen darstellen.

### ***Aplysina* – Alkaloide in der Meeresschnecke *Tylodina perversa***

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich zeigen können, dass die Isoxazolinalkaloide der mediterranen *Aplysina* – Schwämme diese gegen Fraßfeinde schützen (Thoms *et al.* 2004). Die Schnecke *Tylodina perversa* überwindet die Fraßschutzmetabolite nicht nur, sie lagert sie auch (möglicherweise zu ihrem

eigenen Schutz) in ihre eigenen Organe ein. Früheren Studien zufolge ist sie auf *Aplysina aerophoba* als Nahrungsquelle spezialisiert. Ich konnte ich zeigen, dass die Schnecke zwei Metabolite des Schwammes, Aplysinamisin-1 und Aerophobin-2, selektiv in ihrem Mantelgewebe und ihrem Laich anreichert. Außerdem findet sich in ihrem Gewebe fast immer auch das Isoxazolinalkaloid Aerothionin.

Dies ist überraschend, da Aerothionin nicht im Schwamm *A. aerophoba* vorkommt. Lediglich die zweite mediterrane *Aplysina* – Art, *A. cavernicola*, besitzt diesen Metabolit in hohen Konzentrationen. Während *A. aerophoba* in flachem Wasser an stark lichtexponierten Standorten wächst, ist der Lebensraum von *A. cavernicola* auf Höhlen oder Meerestiefen um 40 m beschränkt. Bisher war *T. perversa* nicht auf *A. cavernicola* beobachtet worden.

In Wahlfraßversuchen konnte ich zeigen, dass *T. perversa* zwar *Aplysina* – Arten gegenüber Schwämmen anderer Gattungen bevorzugt, dass sie jedoch keine Präferenz zwischen den beiden mediterranen *Aplysina* – Arten zeigt. Ein Langzeitfütterungsversuch mit *A. cavernicola* als ausschließliche Nahrung ergab, dass die Schnecken in der Lage sind, das gelbe Pigment von *A. cavernicola* in ihrem Gewebe einzulagern. In früheren Untersuchungen an Gewebe von im Freiland gesammelten Schnecken war stattdessen stets das *A. aerophoba* – Pigment Uranidin aufgefunden worden.

In einem weiteren Experiment fraßen *T. perversa* – Individuen über fünf Wochen ausschließlich von dem aerothioninfreien Schwamm *A. aerophoba*. Einige Schnecken wurden danach über weitere zwei Wochen ausgehungert. Selbst nach diesen Zeiträumen enthielten die Schnecken in ihrem Mantelgewebe Gehalte an Aerothionin, die mit den Konzentrationen in Individuen, die kurz vor der chemischen Analyse ihres Gewebes von aerothioninhaltigem *A. cavernicola* gefressen hatten, vergleichbar waren. Möglicherweise wechselt *T. perversa* im Laufe ihres Lebens zwischen den Schwämmen *A. aerophoba* und *A. cavernicola* und ist in der Lage, das aus letzterem Schwamm aufgenommene Aerothionin über einen langen Zeitraum (> sieben Wochen) zu speichern. Alternativ wäre eine Transformation der zusammen mit dem Nahrungsschwamm *A. aerophoba* aufgenommenen Isoxazolinalkaloide zu Aerothionin in den Schnecken denkbar.

Zusätzliche elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Aufnahme der Sekundärmetabolite aus *Aplysina* – Schwämmen in die Schneckenorgane nicht mit einem Transfer der schwammassoziierten Bakterien in das Gewebe einhergeht.

### **Das Verpflanzungsexperiment mit dem Schwamm *Aplysina cavernicola***

Um die Stabilität des Sekundärstoffmusters und der Bakteriengemeinschaft im Gewebe von *Aplysina cavernicola* zu untersuchen, wurden sieben Individuen des Schwammes von ihrem natürlichen Standort ( $\approx 40$  m Meerestiefe) in wesentlich flachere Regionen (7 – 15 m) mit deutlich erhöhter Lichtexposition verpflanzt. Drei Monate später wurden die Schwämme untersucht. Das Sekundärmetabolitenmuster war nach dieser Zeit erstaunlich konstant geblieben, was auf eine von Umweltfaktoren weitgehend unabhängige Naturstoffproduktion hinweist. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte auch in der mikrobiellen Gemeinschaft im Schwamm keine Veränderung beobachtet werden. Cyanobakterien, die im Gegensatz zu *A. cavernicola* in *A. aerophoba* in hoher Dichte im Gewebe auftreten, hatten die verpflanzten Individuen selbst nach drei Monaten verstärkter Lichtexposition nicht besiedelt.

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) von bakterieller 16S rDNA aus den Schwammindividuen des Verpflanzungsversuches ermöglichte die Unterscheidung zwischen einem variablen und einem konstanten Teil der Bakteriengemeinschaft in *A. cavernicola*. Angehörige des variablen Teils wiesen eine nahe Verwandtschaft zu verschiedenen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien auf, die zuvor schon aus Meerwasser isoliert worden waren. Die Analyse von Sequenzen, die anhand der DGGE – Analyse dem konstanten Teil zugeordnet worden waren, ergab dagegen hohe Homologien mit Sequenzen von Bakterienspezies, die monophyletischen 16S rDNA Sequenzclustern angehören. Interessant ist, dass diese Cluster nicht in Seewasser, sondern ausschließlich assoziiert mit verschiedenen Schwammarten, unabhängig von deren phylogenetischer und geographischer Entfernung auftreten. Es ist damit denkbar, dass es sich bei den in *A. cavernicola* konstant auftretenden Bakterienarten um Angehörige einer weltweit vorkommenden, schwammspezifischen Mikroorganismengemeinschaft handelt, die möglicherweise symbiotische Beziehungen zu ihren Wirten entwickelt haben.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ca.	circa
DC	Dünnschicht - Chromatographie
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
bidest.	zweifach destilliert
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Konz.	Konzentration
MeOH	Methanol
MS	Massenspektroskopie
PBS	Phosphatpuffer (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase – Kettenreaktion
REM	Raster – Elektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions – Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t0	Kontrollproben
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 8. Publikationsliste

### Veröffentlichungen in rezensierten Fachzeitschriften

Thoms, C.; Horn, M.; Wagner, M.; Hentschel, U.; Proksch, P. (2003) Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Marine Biology* 142 (4): 685-692.

Thoms, C.; Ebel, R.; Hentschel, U.; Proksch, P. (2003) Sequestration of dietary alkaloids by the spongivorous marine mollusc *Tylodina perversa*. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c (5/6): 426-432.

Thoms, C.; Wolff, M.; Padmakumar, K.; Ebel, R.; Proksch, P. (2004) Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c (1/2): 112-122.

### Posterbeiträge zu Konferenzen

Thoms, C.; Hentschel, U.; Brümmer, F.; Ebel, R.; Proksch, P. (2002) Alkaloide aus *Aplysina*-Schwämmen – chemische Ökologie und mikrobielle Diversität. 14. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V., Irsee, Februar 2002.

Thoms, C.; Ebel, R.; Hentschel, U.; Proksch, P. (2003) Aufnahme bromierter Alkaloide durch die schwammfressende Meeresschnecke *Tylodina perversa*. 15. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V., Irsee, Februar 2003.

Heim, I.; Thoms, C.; Eschbach, E.; Proksch, P.; Brümmer, F. (2003) Taxonomy of the sponge genus *Aplysina* Nardo, 1834 from the Mediterranean Sea. Abstracts of the 6th Annual Congress of the Gesellschaft für Biologische Systematik, Org. Divers. Evol. 3, Electr. Suppl. 17: 23.

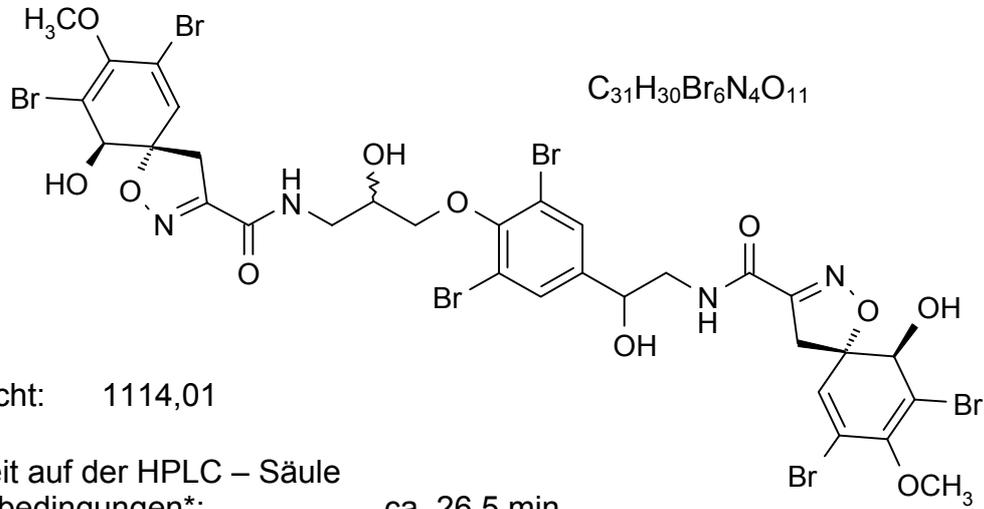
### Vorträge

- „Bioconversion of brominated isoxazoline alkaloids in *Aplysina* sponges.“ BiotecMarin – Konferenz am Leibniz – Institut für Meereswissenschaften, Kiel (November 2003)
- „Alkaloids in *Aplysina* sponges – chemical ecology and the influence of sponge-associated bacteria“ Universität von Neapel, Italien (Mai 2003)
- „Alkaloids in *Aplysina* sponges – chemical ecology and the influence of sponge-associated bacteria“ 4. Kurt – Mothes – Doktorandenworkshop „Sekundärstoffwechsel“ am Max – Planck – Institut für chemische Ökologie, Jena (Oktober 2002)
- „Monitoring microbial diversity and natural products profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation.“ BiotecMarin – Konferenz am Zentrum für Meeresforschung “Ruder Boscovic”, Rovinj, Kroatien (August 2002)

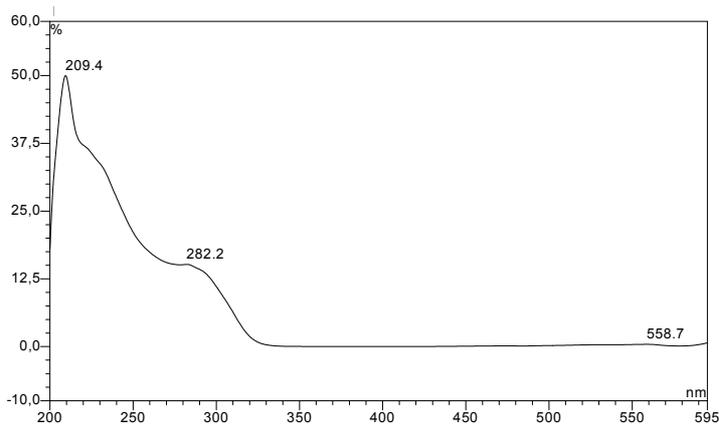
# **Anhang**

Übersicht über die quantifizierten Metaboliten

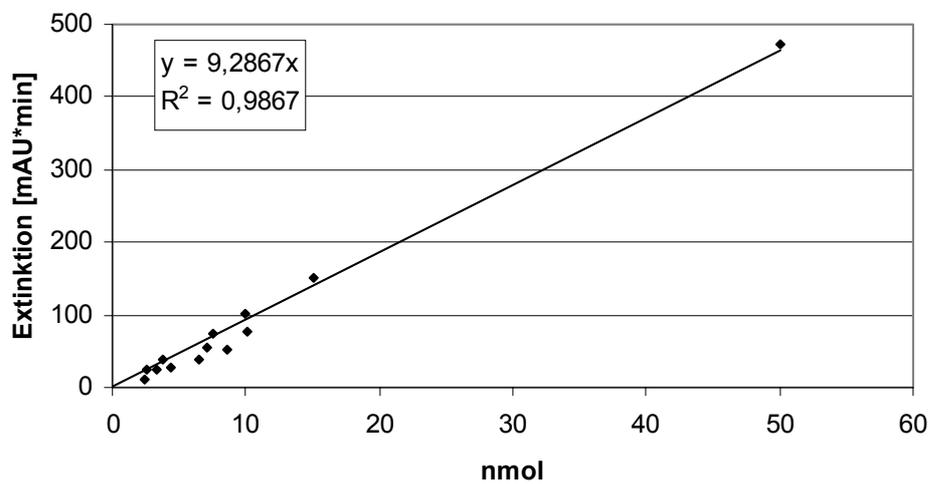
## Isofistularin-3



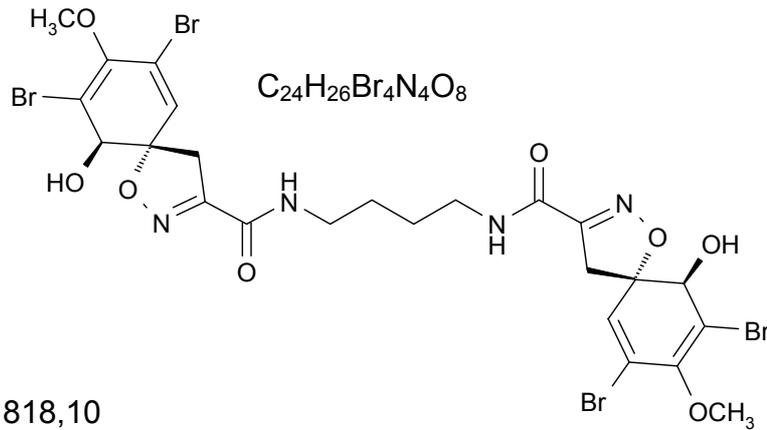
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 280 nm



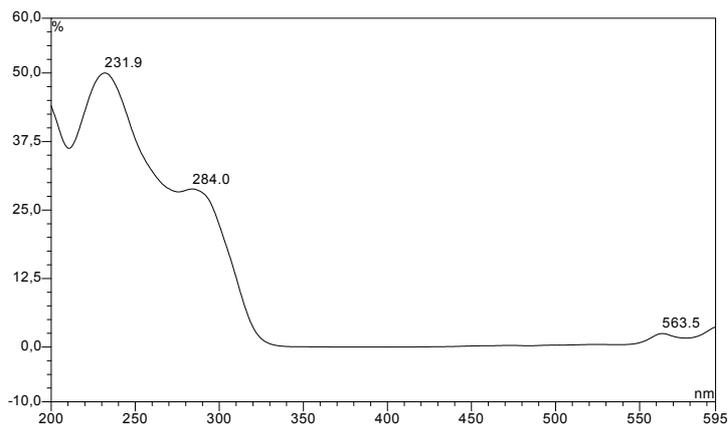
## Aerothionin



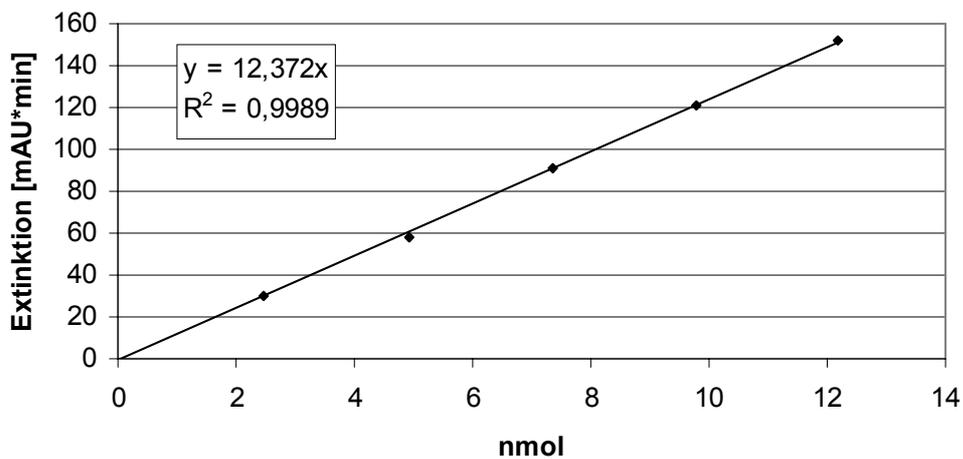
Molekülgewicht: 818,10

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 25,8 min

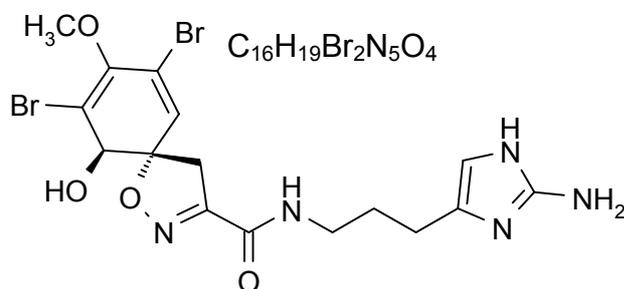
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 254 nm



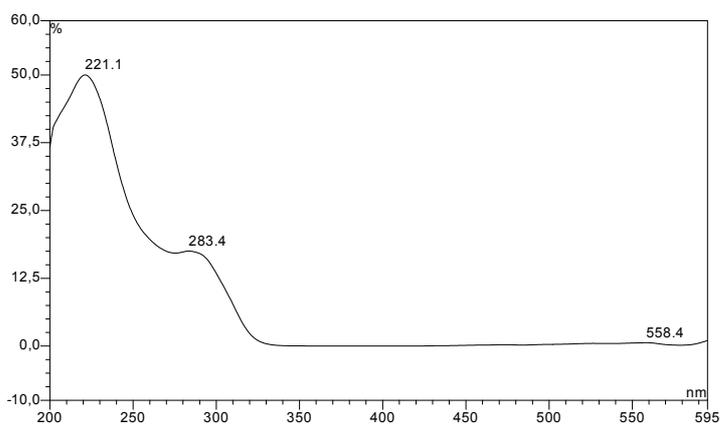
## Aerophobin-2



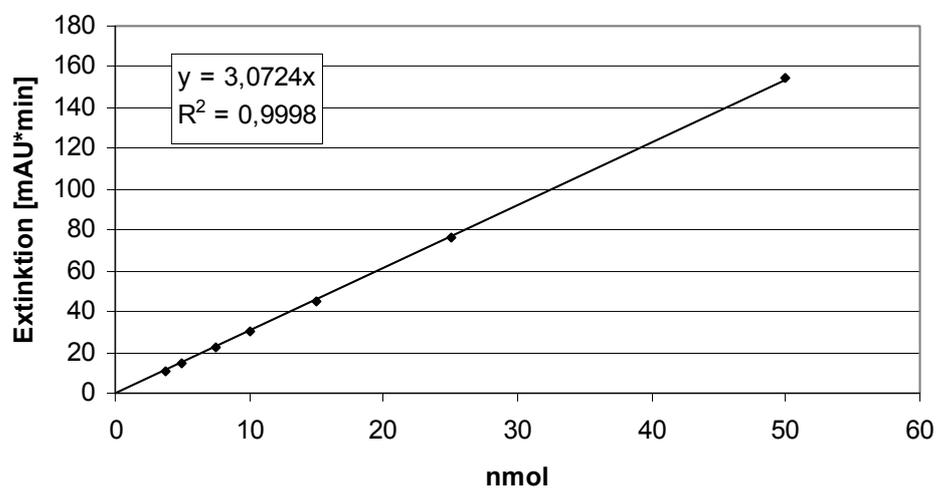
Molekülgewicht: 505,16

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 15,4 min

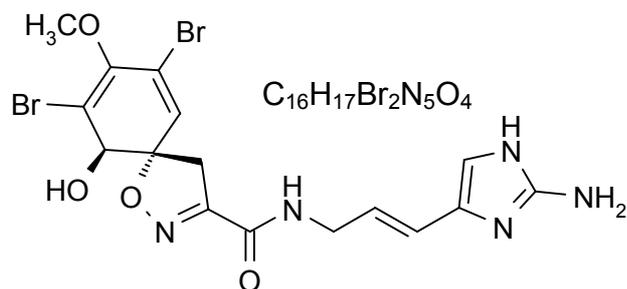
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 280 nm



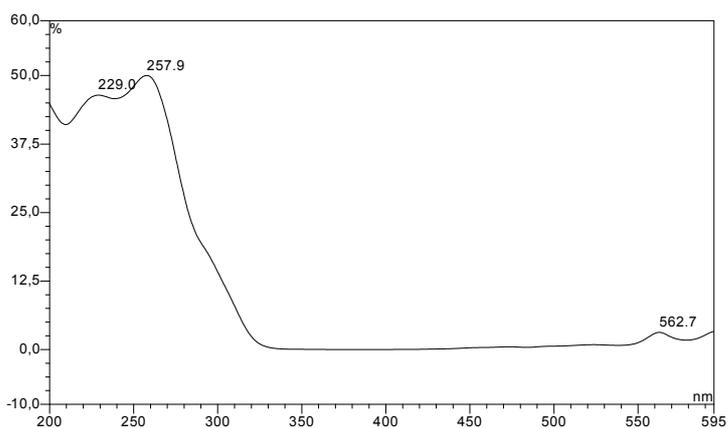
## Aplysinamisin-1



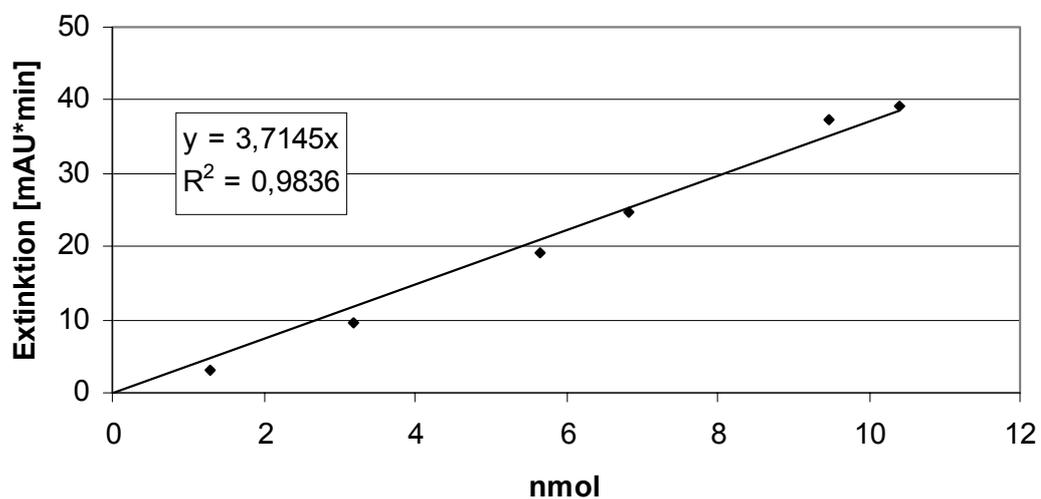
Molekülgewicht: 503,15

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 16,7 min

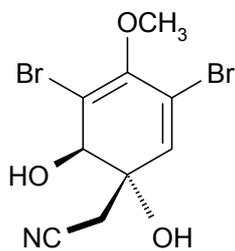
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 254 nm



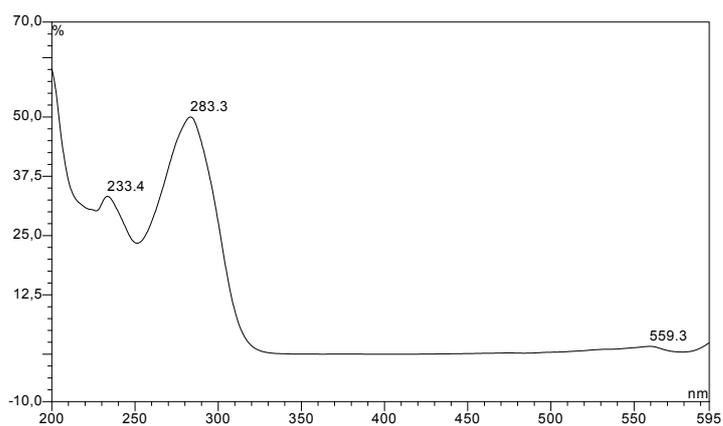
## Aeroplysin-1



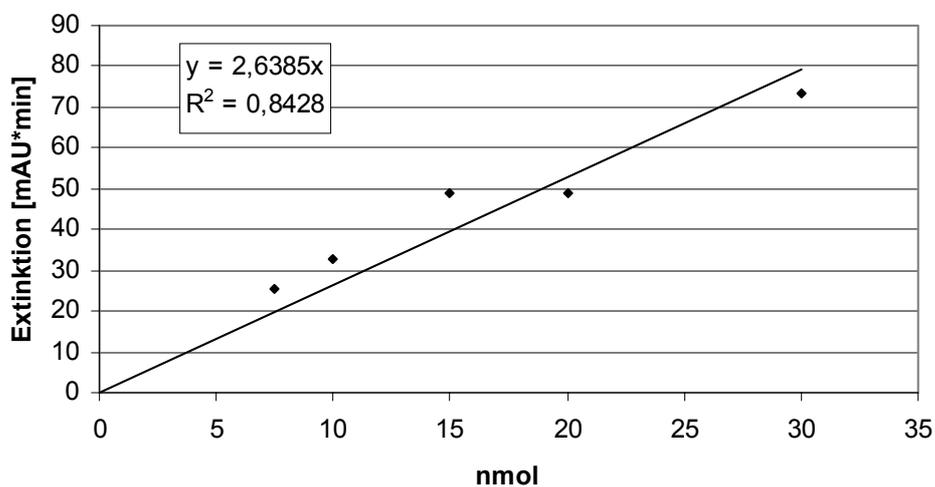
Molekülgewicht: 338,98

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 10,9 min

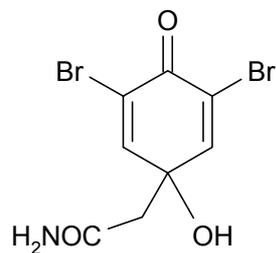
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 280 nm



## Dienon

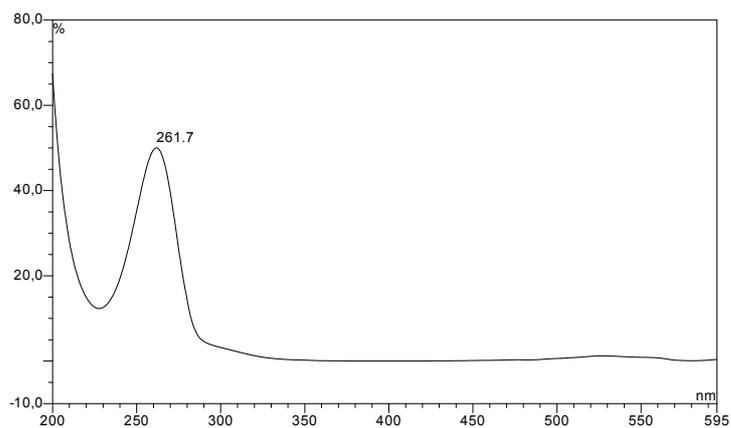


Molekülgewicht: 324,95

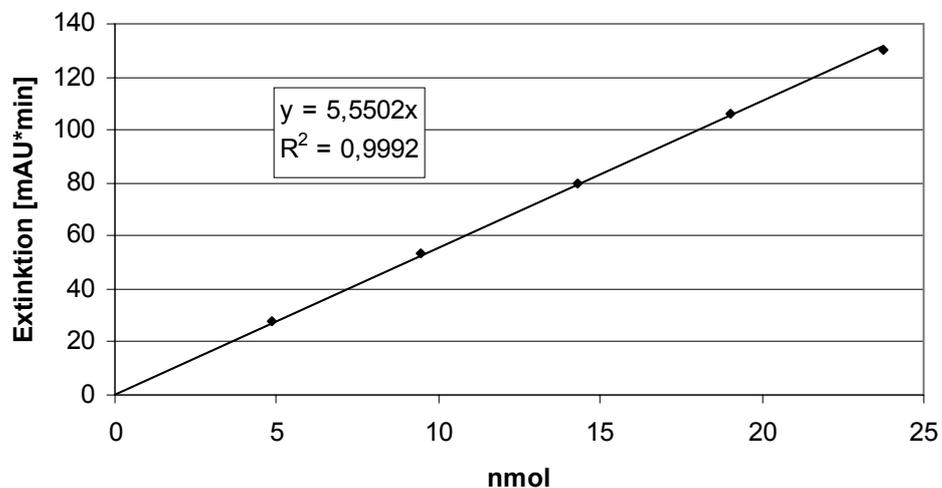
Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*:

ca. 7,7 min

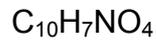
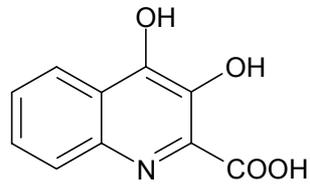
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 254 nm



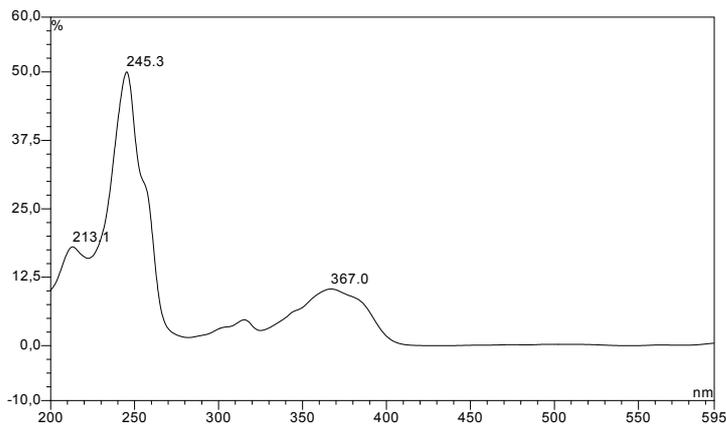
## 3,4 – Dihydroxychinolin – 2 – carboxylsäure



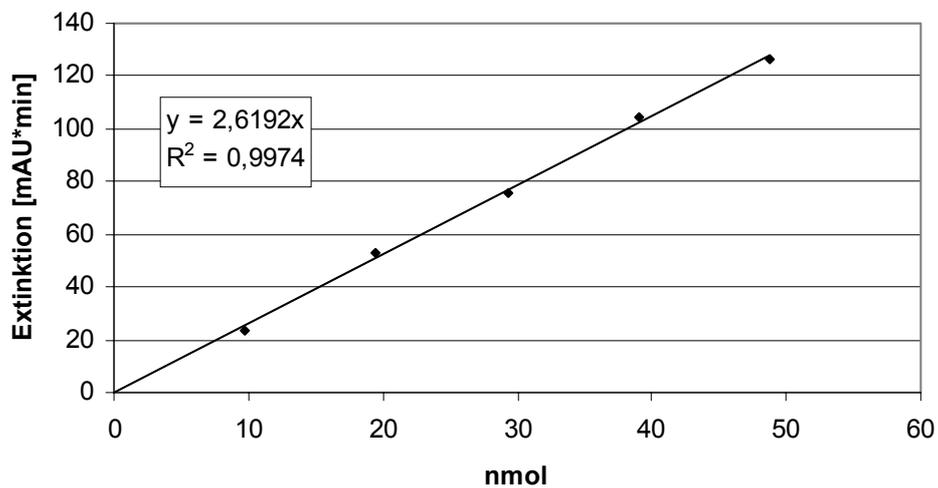
Molekulgewicht: 205,17

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 13,0 min

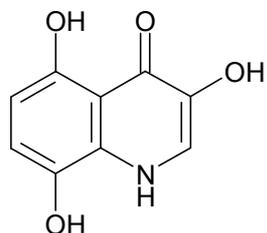
### UV - Spektrum



### Eichgerade bei 254 nm



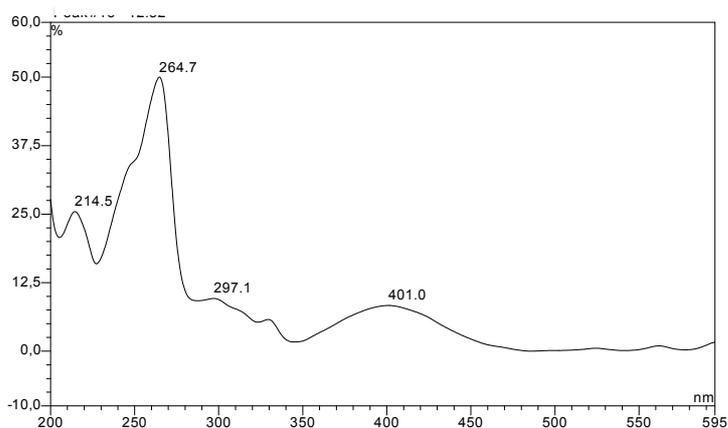
## Uranidin



Molekülgewicht: 193,16

Retentionszeit auf der HPLC – Säule  
bei Standardbedingungen\*: ca. 12,8 min

### UV - Spektrum



### Eichgerade

**Nicht quantifiziert**

\* Standardbedingungen: siehe Abschnitt 2.2.1., Seite 37

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina* – chemische Ökologie und assoziierte Bakterien“

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfen verwendet habe. Ich habe diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Düsseldorf, den

Carsten Thoms

## LEBENS LAUF

NAME : **Carsten Thoms**

GEBURTSDATUM : 05.07.1974

GEBURTSORT : Karlsruhe

STAATSANGEHÖRIGKEIT: deutsch

ELTERN : Susanne Thoms - Studienrätin  
Henning Thoms - Konrektor

WERDEGANG:	September 1980 – Dezember 1983	Europäische Schule Karlsruhe
	Dezember 1983 – Juli 1984	Grundschule Wildberg
	September 1984 – Mai 1993	Otto-Hahn-Gymnasium Nagold
	11. Mai 1993	Abitur
	Oktober 1993 – Dezember 1994	Zivildienst am Kreiskrankenhaus Nagold
	März 1995 – August 1995	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Fachhochschule Albstadt – Sigmaringen
	September 1995 – Februar 1998	Grundstudium der Biologie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
	März 1998 – Februar 2000	Hauptstudium der Biologie an der Universität Bremen
	April 2000 – Dezember 2000	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Proksch am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	Seit Januar 2001	Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Proksch am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift