

**Tunikaten (Ascidiacea) der Nordsee:
Chemische Ökologie und pharmakologisches Potential**

**Tunicates (Ascidiacea) of the North Sea:
chemical ecology and pharmacological potential**

Jana Stefanie Barenbrock

Jana Stefanie Barenbrock
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Am Handelshafen 12
27570 Bremerhaven

Die vorliegende Arbeit ist die im Anhang und Aufbau leicht veränderte Fassung einer Dissertation, die in der Sektion Chemische Ökologie bei PD Dr. Matthias Köck angefertigt und 2005 dem Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main vorgelegt wurde.

Eine farbige Ausgabe der Dissertation mit vollständigem Anhang ist im Internet verfügbar (http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor.php?source_opus=1410).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	V
Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1 Systematik und Biologie von Ascidien	3
1.2 Naturstoffe aus Ascidien	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Methoden	16
2.1 Materialsammlung	16
2.2 Habitat Nordsee	17
2.2.1 Orkney-Inseln	17
2.2.2 Helgoland und Doggerbank	22
2.3 Chemische Methoden	24
2.3.1 Extraktion	24
2.3.2 Chromatographische Methoden	25
2.3.3 Spektroskopische Methoden	25
2.4 Artenvergleich <i>Ascidiella aspersa</i> und <i>Ascidiella scabra</i>	26
2.5 Bioassays	26
2.5.1 Phytigel-Assay	27
2.5.2 Antimikrobieller Assay	29
2.5.3 Cytotoxischer Assay	30
2.5.4 Protein-Tyrosin-Kinase-Assay	31
3. Ergebnisse und Diskussion	32
3.1 Artenvergleich <i>Ascidiella aspersa</i> und <i>Ascidiella scabra</i>	32
3.2 Bioassays	39
3.2.1 Phytigel-Assay	39
3.2.2 Antimikrobieller Assay	45
3.2.3 Cytotoxischer Assay	54
3.2.4 Protein-Tyrosin-Kinase-Assay	64
3.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse der Bioassays	68
3.4 Isolierung von Reinsubstanzen aus <i>Dendrodoa grossularia</i>	71
3.4.1 <i>Bioassay-guided Fractionation</i>	71

3.4.2	Identifizierung des EGFR-Inhibitors Tubastrin	77
3.4.3	Physiologische und ökologische Bedeutung von PTK-beeinflussenden Substanzen	87
3.4.4	Zusammenfassung der biologischen Aktivität von <i>Dendrodoa grossularia</i> .	88
3.5	Weitere Isolate aus Ascidien	91
3.5.1	Homarin	91
3.5.2	Aminosäuren und Nukleoside	94
4.	Experimenteller Teil	99
4.1	Chemische Methoden	99
4.1.1	Extraktion	99
4.1.2	Chromatographische Methoden	99
4.1.3	Spektroskopische Methoden	102
4.2	Nachweis von Guanidingruppen	103
4.3	Trennbedingungen	103
4.4	Artenvergleich <i>Ascidiella aspersa</i> und <i>Ascidiella scabra</i>	108
4.4.1	Morphologie	108
4.4.2	Chemie	109
4.5	Bioassays	110
4.5.1	Phytigel-Assay	110
4.5.2	Antimikrobieller Assay	112
4.5.3	Cytotoxischer Assay	115
4.5.4	Protein-Tyrosin-Kinase-Assay	117
4.6	Statistik	119
5.	Literaturverzeichnis	120
6.	Abbildungsverzeichnis	134
7.	Tabellenverzeichnis	137
8.	Beschreibung der bearbeiteten Ascidienarten	139
	Danksagung	166

Zusammenfassung

Tunikaten produzieren eine Vielzahl an cytotoxischen und antimikrobiellen Verbindungen, die ihnen in ihrem Ökosystem zu überlebenswichtigen Vorteilen verhelfen. Wegen ihrer strukturellen Diversität und ihrer spezifischen Eigenschaften haben bislang einige dieser Sekundärstoffe Eingang in die pharmazeutische Industrie gefunden. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Untersuchung des chemischen Potentials benthischer Ascidien der Nordsee. Die Eigenschaften der organischen Ascidienextrakte wurden anhand von vier Bioassays beschrieben. Die Assays fungierten gleichzeitig als Wegweiser zur Isolierung der aktiven Sekundärmetaboliten, der sich eine Strukturaufklärung mit spektroskopischen Methoden (NMR, MS, IR) anschloss.

Es wurden Tests auf bewuchshemmende, antimikrobielle, cytotoxische und enzymhemmende Eigenschaften durchgeführt. Eingesetzt wurden organische Extrakte von 13 solitären und koloniebildenden Ascidienarten der nördlichen und südlichen Nordsee.

In allen vier Assays zeigten mehrere oder alle Ascidienarten Aktivität. Es ließen sich keine Hinweise auf eine mit der Wuchsform der Arten korrelierte biologische Aktivität sammeln. In einem Freilandversuch zur Untersuchung der besiedlungshemmenden Wirkung der Extrakte konnte gezeigt werden, dass einige Ascidien eine chemische Abwehr von Algensporen oder Epibionten aufweisen, die artspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Alle Ascidienarten bewiesen antimikrobielle Aktivität, es ergaben sich aber sowohl in der Hemmhofbreite als auch in der Anzahl der gehemmten Bakterienstämme große artspezifische Unterschiede. Auffallend war, dass deutlich mehr Gram-positive sowie marine Bakterienstämme als Gram-negative bzw. nicht-marine Bakterienstämme inhibiert wurden. Im Gegensatz zur antimikrobiellen Aktivität wurden in den Assays zur Cytotoxizität und zur spezifischen Enzymhemmung lediglich bei jeweils vier Ascidienarten positive Effekte festgestellt. Durch die spezifische Anfärbung von Zellorganellen konnten morphologische Veränderungen, die durch die Ascidienmetaboliten in den Mausfibroblasten induziert wurden, sichtbar gemacht und der Einfluß der Extrakte auf das Cytoskelett und spezifische Zellfunktionen dokumentiert werden.

Im Protein-Tyrosin-Kinase-Assay führte eine *Bioassay-guided Fractionation* von Extrakten der Ascidie *Dendrodoa grossularia* zur Isolierung der aktiven Substanz. Über spektroskopische Methoden sowie den Vergleich mit Literaturdaten konnte der enzymhemmende Metabolit als das Guanidinostyren Tubastrin identifiziert werden. Tubastrin wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals in Tunikaten nachgewiesen. Der Metabolit zeigte als Reinsubstanz nur

geringe cytotoxische Effekte und keine antimikrobiellen Eigenschaften. Als weitere Metaboliten der Ascidien *Dendrodoa grossularia* und *Asciidiella aspersa* wurden Homarin, Betain, Adenosin und Inosin identifiziert. Keiner dieser Substanzen konnte in der vorliegenden Arbeit eine biologische Aktivität zugeordnet werden. Während Betain, Adenosin und Inosin Funktionen innerhalb des Primärmetabolismus besitzen oder als Zwischenprodukte in Synthesewege eingebunden sein können, stellt Homarin einen Sekundärmetaboliten dar, der in einer Vielzahl von marinen Organismen unterschiedliche Funktionen erfüllt. Seine Aufgabe in Tunikaten muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Dass antimikrobielle Aktivität bei allen Ascidienarten gefunden wird, lässt auf eine grundlegende Bedeutung prokaryontischer Abwehr schließen. Die Unterschiede in der Stärke der Effekte aller Bioassays legen nahe, dass jede Ascidienart eine eigene Gesamtstrategie zur Verteidigung gegen Bewuchs und Fraßfeinde ausgebildet hat. Die aus den Laborversuchen erhaltenen Daten verdeutlichen eine weitreichende biologisch-chemische Aktivität von *Aplidium punctum*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum*, die neben der antimikrobiellen auch starke cytotoxische und/oder enzymhemmende Wirkung gezeigt haben. Die Lokalisation der aktiven Substanzen im Tier sowie eingehendere Versuche zur molekularen Wirkungsweise sind notwendig, die beobachteten Aktivitäten umfassend zu deuten und ihre Nutzbarkeit unter pharmakologischen Gesichtspunkten zu evaluieren.

Summary

Tunicates produce a wide variety of cytotoxic and antimicrobial compounds which provide vital advantages in their natural environment. Due to their structural diversity and specific characteristics so far some of these secondary metabolites found their way into the development process in the pharmaceutical industry. The aim of the present study was a comprehensive investigation of the chemical potential of benthic ascidians of the North Sea. The characteristics of the organic extracts of the ascidians were described on the basis of four different bioassays which also allowed a bioassay-guided fractionation of the active compounds. The isolates were subsequently structurally elucidated using spectroscopic and spectrometric methods (NMR, MS, IR).

Organic extracts of 13 solitary and colonial ascidians species of the northern and southern North Sea were tested for their antifouling, antimicrobial, cytotoxic and enzyme-inhibitory properties.

In all four bioassays several or all ascidian species showed activity. There was no evidence for an activity related to their solitary or colonial growth form. In a field assay investigation of the antifouling effects of the crude extracts some ascidians showed a chemical defence against algal spores and epibionts which was differently pronounced depending on ascidian species. All species proved antimicrobial activity. However, prominent species-specific differences were found in the width of inhibition zones as well as the number of inhibited bacterial strains. Additionally, more Gram-positive bacterial strains than Gram-negative or non-marine bacterial strains were influenced. In contrast to the antimicrobial activity only four ascidian species, respectively, displayed cytotoxic or enzyme-inhibitory effects. By the specific staining of cell organelles extract-induced changes of cell morphology were visualized, and the influence of the extracts on the cytoskeleton and specific cell functions was documented.

Bioassay-guided fraction using the protein tyrosine kinase assay (PTK-Assay) lead to the isolation of one active compound of the baked bean ascidian *Dendrodoa grossularia*. Spectroscopic analysis as well as comparison with literature data helped to identify the compound as the guanidinostyrene Tubastrine. This is the first documentation of Tubastrine in ascidians. The metabolite showed only small cytotoxic effects and no antimicrobial characteristics as a pure substance. Of *Dendrodoa grossularia* and *Asciidiella aspera* Homarin, Betain, Adenosin and Inosin were also isolated, but these metabolites showed no biological activity within the scope of this study. While Betain, Adenosin and Inosin play crucial roles

within the primary metabolism and several synthesis pathways, the secondary metabolite Homarin fulfills many different functions in a variety of marine organisms. The ecological and functional relevance of tubastrine in tunicates must be clarified in further investigations.

The fact that antimicrobial activity is found with all ascidian species indicates a fundamental significance of prokaryotic defence in the marine habitat. However, the differences in the strength of the effects in all bioassays suggest that each of the ascidians investigated may employ a different strategy against hazards such as predation or epibiosis. The data obtained from the laboratory studies demonstrate extensive biochemical activity of *Aplidium punctum*, *Dendrodoa grossularia* and *Didemnum candidum* which showed apart from the antimicrobial also strong cytotoxic and/or enzyme-inhibitory effects. Localization of the active substances within the living animal as well as more detailed understanding of their mode of action are necessary to interpret the observed activities comprehensively and to evaluate their serviceability under pharmacological criteria.

Abkürzungen

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	IC ₅₀	<i>Inhibitor Concentration; Substanzkonzentration, bei der die Enzymaktivität oder das Zell-/Virenwachstum um 50% reduziert wird</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat	IR	Infrarot
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>	KBr	Kaliumbromid
δ	chemische Verschiebung (in ppm)	LPLC	<i>Low Pressure Liquid Chromatography</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol	MIC	Minimale Inhibierende Konzentration (in µg/ml)
DC	Dünnschicht-Chromatographie	[M]	Masse
DNS	Desoxyribonucleinsäure	MS	Massen-Spektrometrie
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid	MTA/ MT-Test	Microculture Tetrazolium Assay/ Test
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>	Δm	Fehler bei der Berechnung der Masse
ER	Endoplasmatisches Reticulum	<i>m/z</i>	Masse pro Ladung
FAB-MS	<i>Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry</i>	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
GA	Größenausschlußchromatographie	1D-NMR	eindimensionale NMR
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig	2D-NMR	zweidimensionale NMR
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	ppm	<i>parts per million</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	PIC	Piceatannol
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>	PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
HR-ESI-MS	<i>High Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>	RNS	Ribonucleinsäure
HR-MS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>	V-ATPase	<i>Vacuolar Adenosin Triphosphatase</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
		VLC	<i>Vacuum Liquid Chromatography</i>

1. Einleitung

Naturstoffe als physiologisch wirksame Bestandteile von Pflanzen und Tieren werden seit Jahrhunderten in allen Kulturen zu unterschiedlichen Zwecken genutzt. In der westlichen Welt fanden hauptsächlich terrestrische Pflanzen in der traditionellen Heilkunde Anwendung. Im asiatischen Raum wurden, durch den engeren Bezug zum Meer als Nahrungsquelle und durch die offensichtlichere Präsenz anderer Meeresbewohner als Fische, schon frühzeitig marine Organismen als Lieferant von Heilmitteln entdeckt (Ruggieri 1976). Die Weiterentwicklung der traditionellen Arzneikunde zusammen mit der zunehmenden Erforschung chemisch-ökologischer Zusammenhänge führten im letzten Jahrhundert zur Entwicklung von drei parallelen Schwerpunkten im Bereich der marinen Naturstoffforschung: der marinen Toxikologie, der marinen chemischen Ökologie und der marinen Biomedizin (Faulkner 2000). Marine Toxikologie befasst sich mit den Auswirkungen von Toxinen aus Meerestieren, die dem Menschen als Nahrung dienen. Über 20.000 Fälle von Vergiftungen mit 150 Todesfällen gehen jährlich auf Toxine aus marinen Nahrungsmitteln zurück (Russell 1984). Gut erforschte Beispiele sind a) die Muschelvergiftung (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) durch das in Schalentieren oft hochkonzentriert enthaltene Saxitoxin, b) die Fischvergiftung (Ciguatera), deren verantwortlicher Wirkstoff Ciguatoxin in Fischen angereichert wird (Mebs 1989), und c) Vergiftungen durch Tetrodotoxin, einem Neurotoxin der Kugelfische (Familie Tetraodontidae), die als Fugu in Japan als Delikatesse gelten.

Ein weiterer Berührungspunkt mit marinen Toxinen im wahren Wortsinn ist der Kontakt mit nesselnden, stechenden und beißenden Meeresbewohnern, die ihre Gifte zur Verteidigung und zum Beutefang einsetzen (Russell 1984, Mebs 1989). Zunächst unfreiwilliger Kontakt mit diesen Tieren führte zur Erforschung ihrer Gifte und der ökologischen Zusammenhänge im Lebensraum Wasser und zur Prägung des Begriffs der marinen chemischen Ökologie.

Die Toxizität eines Organismus impliziert eine physiologische Aktivität der Substanz (Ruggieri 1976). Die Fragestellung nach der ökologischen Bedeutung der Toxine führte zur Erforschung ihrer Wirkungsweise und einer möglichen medizinischen Bedeutung. In den 40er Jahren fand mit den Arbeiten von Bergmann (Bergmann *et al.* 1949, 1950, 1951) die marine Naturstoffchemie ihren Anfang. Diese Forschungsrichtung expandierte durch die Weiterentwicklung der Tauchtechnik und die resultierende Ausweitung der Probenbeschaffung auf bisher unberührte Meeresbereiche ebenso wie durch die Fortschritte in der Aufarbeitung der

marinen Proben und der Strukturaufklärung mittels NMR (Munro *et al.* 1999, Newman *et al.* 2003).

Die Zahl aller auf der Erde lebenden Arten ist Gegenstand unterschiedlicher Kalkulationen. Vorsichtige Schätzungen beziffern sie auf drei bis fünf Millionen, wobei mehr als 70% dieser Arten zum Tierreich gehören. Obwohl nur 20% der Tierarten aquatisch leben, repräsentieren sie über 90% der Phyla des Tierreiches (May 1988). Diese hohe Biodiversität des marinen Habitats gewährt in der Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen einen entscheidenden Vorteil gegenüber terrestrischen Lebensräumen, da mit zunehmender evolutiver Entfernung zweier Arten die Wahrscheinlichkeit einer unterschiedlichen Sekundärmetabolitenzusammensetzung zunimmt. Zudem produzieren marine im Vergleich zu terrestrischen Organismen eine unerschöpfliche Anzahl neuartiger Strukturen und chemischer Gruppen (Faulkner 2000, Blunt *et al.* 2004), was die Chance erhöht, in groß angelegten Screeningreihen eine neue Substanzklasse mit biologisch-pharmakologischer Aktivität zu entdecken (Harvey 1999, Munro *et al.* 1999). Dass Sekundärmetaboliten oft als Familien strukturverwandter Moleküle in den Organismen zu finden sind, erleichtert die Aufklärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen und ermöglicht die Optimierung eventueller *lead compounds* durch chemische Methoden (Harvey 1999).

Vor allem sessile, mechanisch wenig geschützte Invertebraten haben sich als eine reichhaltige Quelle für bioaktive Naturstoffe erwiesen (Kaul 1982, Aygün *et al.* 2003). Das Phylum Porifera stellt die am umfassendsten untersuchte Gruppe der marinen Organismen dar (Munro *et al.* 1999), gefolgt von den Cnidaria, den Rhodophyta, den Chromophyta und den Molluska. Verglichen mit der Forschung an Schwämmen ist das Subphylum der Tunikata relativ unberührt, was eine Betrachtung ihrer chemischen Inhaltsstoffe im Hinblick auf unbekannte Strukturen viel versprechend macht.

1.1 Systematik und Biologie von Ascidien

Tunikaten (Manteltiere) fanden erstmals bei Aristoteles Erwähnung, der den Begriff „THALIA“ für solitäre Ascidien prägte. Weitgehend bekannt wurde diese Gruppe des Tierreichs zu Beginn des 19. Jahrhunderts, als ihre Systematik und ihre Anatomie eingehender untersucht wurden. Wegen der sessilen Lebensweise und der weichen Morphologie wurden sie zunächst den Lamellibranchiern zugeordnet. Erst die Entdeckung, dass Ascidienlarven ein Gehirn, ein Neuralrohr sowie eine Chorda dorsalis besitzen, brachte in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts die Erkenntnis, dass die Tunikaten ein Subphylum der Wirbeltiere darstellen (Berrill 1950).

Das Subphylum der ausschließlich marinen Tunikata beinhaltet die Klassen der Ascidiacea (Ascidien, Seescheiden, griech. *askidion*: kleiner Weinschlauch), der Thaliacea (Salpen, griech. *thalia*: Fülle, Menge) und der Appendicularia (Geschwänzte Manteltiere, lat: *larva*: Geist). Während die Thaliacea und die Appendicularia mit ihrer pelagischen Lebensweise dem Zooplankton zugeordnet werden, gehört die ausschließlich sessile Klasse der Ascidiacea zum dominanten Bewuchs von Hartsubstraten im Flachwasser und weichem Substrat der Tiefsee. Sie stellt mit über 2000 Arten die größte und bekannteste der drei Klassen dar, weshalb die Stammbezeichnung Tunikata oft als Synonym für Vertreter dieser Gruppe benutzt wird. Der Aufbau einer Ascidie richtet sich nach ihrer Wuchsform als solitäre oder koloniebildende Art. Generell gliedert sich der Körper in die apikale Region, in der zwei Siphone zu finden sind, die abdominale Region mit Kiemendarm und Verdauungsapparat, und die postabdominale Region, die das Herz sowie die Reproduktionsorgane umfasst. Bei solitären Ascidien sind der postabdominale und oft auch der abdominale Bereich zurückgebildet und die Organe in die apikale Region verschoben, so dass sie mit der Basis der apikalen Region direkt auf dem Substrat aufsitzen (Abbildung 1.1), während bei koloniebildenden Arten die abdominale und postabdominale Regionen erhalten sind. Die Körpergröße der Ascidien liegt zwischen 0,1 cm bei koloniebildenden und 30 cm bei solitären Arten, einige Kolonien können mehrere Meter Durchmesser erreichen. Namensgebendes Merkmal der Ascidien ist die Tunika (Mantel), die sich aus Proteinen, stickstoffhaltigen Substanzen, Mucopolysacchariden und Carbohydraten zusammensetzt (Smith *et al.* 1971, Goodbody 1974) und ihre Festigkeit durch eingebettete Fasern erhält, die in mehreren Schichten unterschiedlicher Orientierung übereinander liegen. Das an Cellulose erinnernde Netzwerk dieser Stoffe, genannt Tunicin, wird von den Epidermiszellen des Körpers ausgeschieden. Die Tunika umschließt bei den solitären Ascidien ein einzelnes Individuum. Bei koloniebildenden Ascidien sind die Individuen basal miteinander verbunden

(soziale Arten) oder von einer gemeinsamen Tunika umschlossen (Synascidien). Artspezifische Unterschiede sind in der Färbung, Festigkeit und Struktur der Tunika zu finden. Sie kann durchsichtig, schmutzig grau oder leuchtend pigmentiert und je nach Ascidiensart dünn oder fast lederartig sein. Einige Arten weisen eine glatte, unbewachsene Tunika auf, andere Arten besitzen eine knorpelige oder bewachsene, mit Steinchen oder Muschelschalen besetzte Oberfläche. Ascidien ernähren sich durch das aktive Einstrudeln des Umgebungswassers, das durch den Branchialsiphon in den Kiemendarm gepumpt wird (Abbildung 1.1). Im Kiemendarm werden Phytoplankton, Bakterien und organisches Material aus dem Wasser herausgefiltert und über das Endostyl, einer Art Rinne des Kiemendarms, dem Magen-Darm-Trakt zugeführt (Ruppert *et al.* 1994), während das Wasser durch die Kiemenspalten ins Atrium gepumpt und über den Atrialsiphon wieder abgegeben wird. In das Atrium münden die Öffnungen des Darms und der Geschlechtsorgane (Oviduct und Vas deferens), so dass Verdauungsprodukte sowie Geschlechtszellen mit dem Wasserstrom in das Umgebungswasser transportiert werden. An der Mündung des Branchialsiphons in den Kiemendarm befinden sich Oraltentakel, die ein grobes Netz im Siphon bilden, sowie das dorsale Tuberkel, das eine Drüsenfunktion besitzt. Beide Merkmale sind bei der Unterscheidung nah verwandter Arten von Bedeutung.

Die Systematik der Ascidiensarten erfuhr über zwei Jahrhunderte eine fortwährende Neuordnung. Im Jahr 1841 beschrieb Milne-Edwards erstmals drei Gruppen von Ascidien: die *Ascidies simple*, die *Ascidies composées* und die *Ascidies sociales* (Berrill 1950). Nach diversen Modifikationen des Stammbaums der Tunikaten, die sich nach ihrer internen Morphologie oder ihren Reproduktionsorganen richteten, fasste Húus 1937 alle Klassifizierungsansätze zusammen und ordnete die Arten in Ordnungen und Subordnungen. Der Stammbaum in Abbildung 1.2 gibt die systematische Einordnung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten wieder.

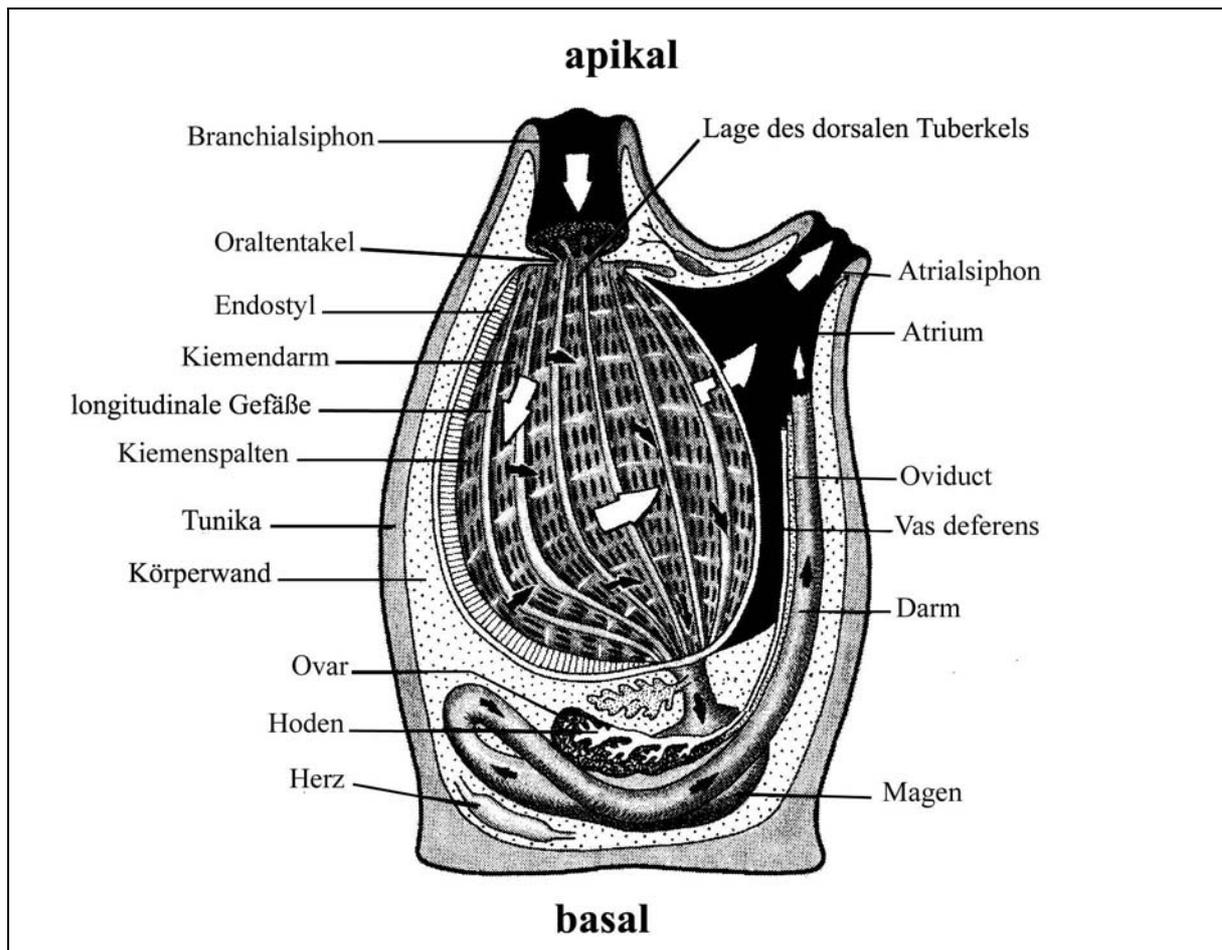


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer solitären Ascidie.

Schema einer solitären, von einer Tunika umschlossenen Ascidie, die basal auf dem Substrat angeheftet ist (verändert nach Ruppert *et al.* 1994). Die weißen Pfeile veranschaulichen den Weg des eingepumpten Wassers durch den Branchialsiphon, die Kiemenspalten und das Atrium, die schwarzen Pfeile skizzieren den Weg der Nahrung durch Kiemendarm, Magen und Darm.

PHYLUM CHORDATA

SUBPHYLUM TUNICATA (Manteltiere)

Klasse Ascidiacea (Seescheiden)

- | | |
|---------------------|--|
| Ordnung | Enterogona |
| Unterordnung | Aplousobranchia |
| Familie | Clavelinidae |
| Familie | Polyclinidae |
| | <i>Aplidium punctum</i> (Giard, 1873) |
| | <i>Polyclinum aurantium</i> Milne-Edwards, 1841 |
| | <i>Sidnyum turbinatum</i> Savigny, 1816 |
| Familie | Didemnidae |
| | <i>Didemnum candidum</i> Savigny, 1816 |
| | <i>Trididemnum cereum</i> (Giard, 1872) |
| | <i>Trididemnum solidum</i> (Van Name, 1902)* |
| Unterordnung | Phlebobranchia |
| Familie | Cionidae |
| Familie | Diazonidae |
| Familie | Perophoridae |
| | <i>Ecteinascidia turbinata</i> Herdman, 1880* |
| Familie | Corellidae |
| | <i>Corella parallelogramma</i> (Müller, 1776) |
| Familie | Asciidae |
| | <i>Ascidia mentula</i> Müller, 1776 |
| | <i>Ascidia virginea</i> Müller, 1776 |
| | <i>Ascidiella aspersa</i> (Müller, 1776) |
| | <i>Ascidiella scabra</i> (Müller, 1776) |
| Familien | Hypobythiidae und Agnesiidae (Tiefsee) |
| Ordnung | Pleurogona |
| Unterordnung | Stolidobranchia |
| Familie | Styelidae |
| | <i>Botryllus schlosseri</i> (Pallas, 1766) |
| | <i>Botrylloides leachi</i> (Savigny, 1816) |
| | <i>Dendrodoa grossularia</i> (van Beneden, 1846) |

Klasse Thaliacea (Salpen)

Klasse Appendicularia (Geschwänzte Manteltiere)

SUBPHYLUM CEPHALOCHORDATA (Lanzettfischchen)

SUBPHYLUM VERTEBRATA (Wirbeltiere)

Abbildung 1.2: Stammbaum der Ascidiacea.

Systematische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Ascidienarten in das Phylum Chordata und die Klasse Ascidiacea. Das Sternchen bezeichnet Arten, die nicht in die Versuche eingegangen sind, aber im Text erwähnt werden.

Als sessile Invertebraten mussten Ascidien spezielle Abwehrmechanismen in der Interaktion mit Nachbarorganismen, Fraßfeinden und Epibionten entwickeln. Mechanischen Schutz bieten Verstärkungen der Tunika. So inkorporieren zum Beispiel Individuen der Art *Eudistoma carolinense* Steine in die Tunika, die einerseits als Tarnung, andererseits als Schutz gegen Fraßfeinde dienen. Ebenfalls fraßabwehrend wirken die Kalknadeln einiger Didemnidarten. Vertreter der Gattungen *Ascidiella* und *Ascidia* tarnen sich mit Algen, Bryozoen und anderen Invertebraten, die auf ihrer Tunika wachsen. Der Aufwuchs darf allerdings weder die Nahrungsaufnahme behindern noch den Wasserwiderstand so sehr erhöhen, dass die Ascidie von ihrem Substrat losgerissen wird. Eine mechanische Regulation der Epibiose erreichen einige solitäre Ascidien über die regelmäßige Ablösung der obersten Schicht ihres Mantels mitsamt dem Aufwuchs. Koloniebildende Ascidien erneuern ihre Oberfläche durch das periodische Absterben und rasche Nachwachsen von einzelnen Zooiden oder Kolonieköpfchen. Physikalische Charakteristika wie Mikrostruktur und Oberflächenspannung beeinflussen die Ansiedlung von Sporen und Larven, und die extrem dünnen Mäntel einiger Ascidienarten sind für die Anheftung von Invertebratenlarven von vornherein ungeeignet (Davis *et al.* 1989a).

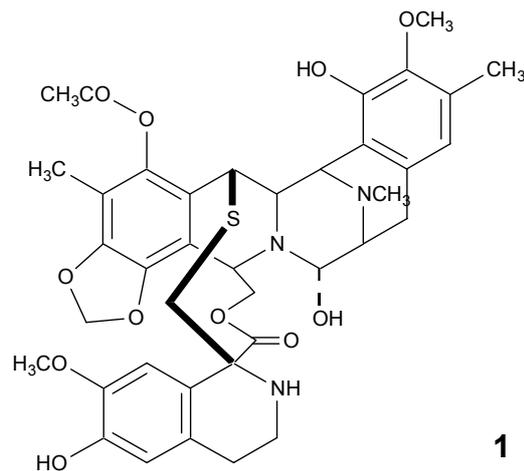
Neben diesen morphologischen Strategien spielt die Chemie der Ascidien in der Regulierung der Besiedlung eine große Rolle. Bakterien, Diatomeen und Protozoen bilden auf marinen Oberflächen einen Primärfilm, an den sich nachfolgend Makrophyten und Epizooen anheften. In jedem dieser drei Stadien können von der Ascidie produzierte oder gespeicherte chemische Substanzen einwirken. Zwei physiologisch-chemische Charakteristika von Ascidien wurden in diesem Zusammenhang seit Beginn des letzten Jahrhunderts diskutiert (Henze 1911, in Goodbody 1974), als bekannt wurde, dass einige Ascidienarten, vor allem Vertreter der Familien Ascidiidae und Perophoridae, in großen Mengen Vanadium akkumulieren. Das Schwermetall, das im Seewasser in Konzentrationen von 0,3 bis 3,0 µg/l enthalten ist, wird über das Epithel des Kiemendarms absorbiert, in den Blutzellen bis zur 10⁶-fachen höheren Konzentration angereichert und in Vanadocyten der Tunika gespeichert (Pirie *et al.* 1984). Vanadium ist ein wirksamer Inhibitor von vielen Enzymen, die an der Zellfunktion und Muskelkontraktion beteiligt sind. Die Bedeutung des Metalls in Ascidien wurde mit vielfältigen Vorgängen wie Sauerstofftransport, Tunicinsynthese oder Phagozytose von Fremdkörpern in Verbindung gebracht (Stoecker 1978). Auch eine antimikrobielle Wirkung wurde postuliert (Rowley 1983). Stoecker (1978) stellte zudem die Vermutung auf, dass Vanadocyten an einer chemischen Abwehr von *Fouling*-Organismen beteiligt sind. Versuche zur Korrelation von Vanadiumkonzentration und epibiontischem Besatz von Ascidien konnten die generelle Gültigkeit dieser These aber nicht bestätigen (Stoecker 1980). Neben Vanadium besitzen einige

solitäre Ascidien in der Tunika so genannte Blasenellen, die Schwefelsäure beinhalten (Pirie *et al.* 1984). Stoecker (1980a, b) zeigte eine positive Korrelation der Abwesenheit von Aufwuchsorganismen zum Säuregehalt der Tunika auf und postulierte gleichzeitig eine fraßabwehrende Wirkung der bei Verletzung der Tunika freiwerdenden Säure. Diese These wurde durch Parry (1984) mit dem Argument angezweifelt, dass sich die Säure im Meerwasser umgehend verdünnen würde. Durch die Dokumentation einer trotz eines Oberflächen-pH-Wertes von unter 2 stark mit *Fouling*-Organismen besetzten Ascidie der Art *Eudistoma capsulatum* wurde außerdem die Behauptung der besiedlungshemmenden Wirkung von Schwefelsäure widerlegt (Davis *et al.* 1989b). Trotzdem hält sich die Meinung, dass zumindest in dem Untersuchungsobjekt *Phallusia* (= *Ascidia*) *nigra*, an dem Stoecker ihre Betrachtungen vorgenommen hat, Schwefelsäure als Abwehrstoff von Epibionten, Bakterien und Fraßfeinden dienen könnte (Hirose *et al.* 2001). Anorganische chemische Abwehr scheint zusammen mit den zunehmend erforschten Sekundärmetaboliten (siehe folgendes Kapitel) in sehr vielen Ascidienarten redundant vorzuliegen (Pisut *et al.* 2002), was eine endgültige Interpretation der tatsächlichen Funktion erschwert.

1.2 Naturstoffe aus Ascidien

Ascidien sind vor allem auf marinen Hartböden weltweit dominierende Organismen. Ihr Erfolg im inter- als auch intraspezifischen Konkurrenzkampf um Platz- und Nahrungsressourcen und gegenüber Fraßfeinden wird ihren Sekundärmetaboliten zugeschrieben (Jiménez *et al.* 2003). Schon zu Julius Caesars Zeit waren die toxischen Eigenschaften der Tunikaten bekannt, und seiner Frau wird nachgesagt, Rivalen ihres Mannes ausgeschaltet zu haben, indem sie ihnen Tunikaten servierte (Harris 1996). Im letzten Jahrhundert wurden vor allem tropische, leicht zu erreichende Arten naturstoffchemisch untersucht. Nachdem in den späten 60er und beginnenden 70er Jahren vor allem Sterole aus Tunikaten charakterisiert wurden (Delrio *et al.* 1971, Yasuda 1975), konnte Mitte der 70er Jahre der Naturstoff Geranyl-Hydrochinon aus *Aplidium* sp. isoliert werden (Fenical 1976). Zwei Jahre später wurden im Labor von Rinehart die Sekundärmetaboliten Polyandrocarpidin und Aplidiasphingosin beschrieben (Carter *et al.* 1978, Cheng *et al.* 1978). Parallel durchgeführte Tests auf cytotoxische oder antiproliferative Aktivität kanalisiert die Isolierung von neuen Metaboliten.

Schon 1969 wurde in Extrakten von *Ecteinascidia turbinata*, einer koloniebildenden Ascidie der Karibik, eine cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen nachgewiesen (Sigel 1969), gefolgt von der Dokumentation ihrer immunsuppressiven Aktivität und der Inhibition der DNS-Synthese in Lymphozyten (Lichter *et al.* 1972). Die Isolierung der verantwortlichen Substanzen gestaltete sich aber durch ihre Instabilität schwierig, so dass erst zehn Jahre später durch die technische Weiterentwicklung von chromatographischen Methoden und die Etablierung der FAB-MS die Isolierung von sechs verwandten Komponenten, den Ecteinascidinen, gelang (Rinehart *et al.* 1990a, b). Den Molekülen liegt eine Tetrahydroisochinolin-Alkaloid-Struktur zugrunde, die mit der von Saframycin-Antibiotika verwandt ist. Ecteinascidin 743 (Abbildung 1.3) wurde als Hauptmetabolit intensiv studiert. Es zeigte in der präklinischen Phase *in vitro*-Cytotoxizität gegen eine Reihe von Tumorzelllinien und gegen frisch explantierte humane Tumoren in Substanzkonzentrationen von weniger als 0,01 μM . Anschließend *in vivo*-Versuche der klinischen Phase I- und II-Studien bestätigten die bisherigen Ergebnisse durch eine Tumorreduktion bei Brust-, Haut-, Lungen- und Gebärmutterkrebs (Rinehart 2000). Derzeit andauernde Phase III-Studien sollen die Möglichkeit des Einsatzes von Ecteinascidin 743 in kombinatorischer und sequentieller Therapie ermitteln (Aune *et al.* 2002, Jimeno 2002, Jimeno *et al.* 2004).



1

Abbildung 1.3: Strukturformel von Ecteinascidin 743 (1).

Ecteinascidin wurde aus der Ascidie *Ecteinascidia turbinata* isoliert. Das Molekül gehört zu einer Strukturfamilie von Tetrahydroisochinolid-Alkaloiden und wird aufgrund seiner cytotoxischen Wirkung in Phase-III-Studien auf seine Anwendung in der Krebstherapie erforscht.

Die Cytotoxizität von Ecteinascidin 743 besteht in der Bindung an die DNS und seiner Wirkung als selektiver Transkriptions-Inhibitor durch Hemmung eines DNS-Reparatursystems und der Topoisomerase (Aune *et al.* 2002). Ecteinascidin 743 beeinflusst außerdem die Organisation der Mikrotubuli, die unter anderem an zellulären Transportprozessen und an der Zellteilung beteiligt sind (Rinehart 2000). Ecteinascidin 743 wird unter dem Namen Yondelis™ von dem spanischen Biotech-Unternehmen PharmaMar weiterentwickelt.

Ähnlich viel versprechende Verbindungen wurden aus der koloniebildenden karibischen Ascidie *Trididemnum solidum* isoliert. Auch hier ging der Isolierung von Sekundärmetaboliten die Entdeckung antiviraler Wirksamkeit der Extrakte voraus. Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse begründete eine chemische Untersuchung der Extrakte und führte zur Isolierung der Didemnine A bis E (Rinehart *et al.* 1981b), einer Molekülfamilie von Cyclodepsipeptiden, die abhängig von ihren Seitenketten eine hohe Variabilität in biologischen Assays aufweisen. Didemnin B (Abbildung 1.4) zeigte in den Tests breite antivirale, cytotoxische und immunsuppressive Aktivität (Montgomery *et al.* 1985, Vera *et al.* 2002). Es war der erste marine Naturstoff, der in klinischen Phase I- und II-Studien getestet wurde. Die zelluläre Wirkungsweise des Didemnins wurde nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass es die Proteinbiosynthese und zu einem geringeren Grad die DNS- und RNS-Synthese inhibiert (Watters *et al.* 1993). Didemnin B wurde 1998 wegen seiner cardiotoxischen Eigenschaften aus den klinischen Versuchen genommen (Rinehart 2000).

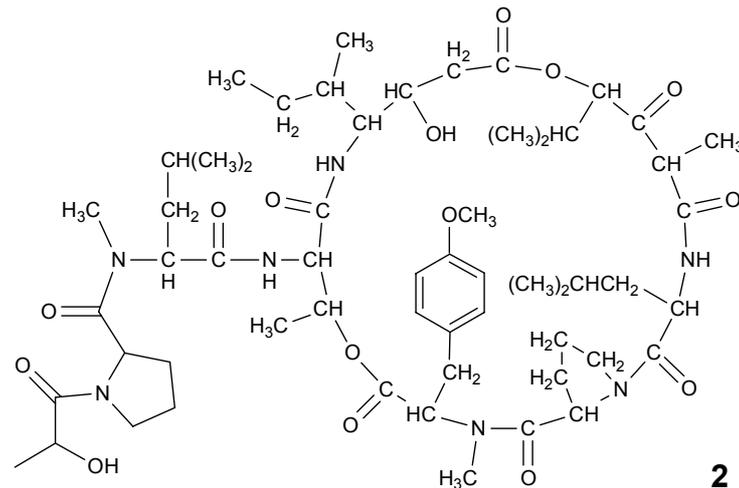


Abbildung 1.4: Strukturformel von Didemnin B (2).

Didemnin B wurde neben weiteren Cyclopeptiden aus der Ascidie *Trididemnum solidum* isoliert. Es zeigte breite cytotoxische und antivirale Aktivität und war der erste marine Naturstoff, der in die klinischen Phasen I und II übernommen wurde.

Über 40 weitere Strukturen der Didemnin-Molekülfamilie wurden bisher isoliert oder synthetisiert (Sakai *et al.* 1996), die sich in ihrer biologischen Aktivität deutlich unterscheiden. Eine dieser Substanzen ist das aus der mediterranen Ascidie *Aplidium albicans* isolierte Dehydrodidemnin B oder Aplidin (Urdiales *et al.* 1996). Es verursacht als Proteinbiosynthese-Inhibitor z.B. die Repression des Gens für den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Jimeno 2002), einem Signalprotein, das die Bildung von Blutgefäßen anregt und damit auch die Versorgung von Tumorgewebe unterstützt. Weitere cytotoxische Mechanismen von Aplidin umfassen die Blockierung der Zellteilung und die Induktion von Apoptose. Da es außerdem eine geringere Cardiotoxizität als Didemnin B aufweist, wurde es 1998 in die klinischen Tests übernommen (Nuijen *et al.* 1999, Rinehart 2000). Aplidin ist das zweite von PharmaMar (Spanien) entwickelte Produkt und befindet sich zurzeit in klinischen Studien der Phase II (Jimeno *et al.* 2004).

Zu Beginn der 90er Jahre wurde die kommerzielle Aquakultur von Speisefischen und Algen zur Züchtung von *non-food-species* weiter entwickelt, um die bei natürlicher Sammlung in der Regel sehr geringen Ausbeuten der Wirkstoffmengen zu erhöhen und gleichzeitig die Belastung der Umwelt durch Entnahme von Organismen zu reduzieren. Im Falle von *Ecteinascidia turbinata* ergab eine Modellrechnung aus Vorversuchen in Florida (CalBioMarine) und Spanien (PharmaMar) einen mit natürlicher Sammlung und Verarbeitung vergleichbaren Ertrag (Mendola 2000, 2003), so dass zurzeit die notwendige Wirkstoffmenge an Ecteinascidin 743 durch Aquakultur (Abbildung 1.5) und semi-Synthese bereitgestellt werden kann (Cuevas *et al.* 2000, Jimeno *et al.* 2004). Durch Steigerung der Effizienz in der Totalsynthese wird

langfristig die aufwändige und ertragsarme Extraktion des Wirkstoffes aus Ascidien abgelöst werden können (Corey *et al.* 1996, Martinez *et al.* 2000).



(Foto: Erich Bartels, CalBioMarine)

Abbildung 1.5: *Ecteinascidia turbinata* in Aquakultur.

Ecteinascidia turbinata wird zur Gewinnung von Ecteinascidin 743 in Aquakultur gehalten. Ascidienlarven aus gesammelten Kolonien werden in Anzuchtbecken an Seilen angesiedelt und später sowohl in Labortanks als auch im Freiland herangezüchtet.

Neben diesen medizinisch und pharmakologisch relevanten Substanzen wurden zahlreiche weitere Sekundärmetaboliten aus Ascidien isoliert, die cytotoxische oder antivirale Eigenschaften besitzen. Die folgende Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Sekundärmetaboliten, die bisher aus den in dieser Arbeit bearbeiteten Ascidien isoliert wurden (MarinLit 2004) sowie über beobachtete Wirkungen von Extrakten dieser Arten.

Tabelle 1.1: Bisher aus den in dieser Arbeit eingesetzten Ascidien isolierte Verbindungen und deren biologische Wirkung.

	Struktur	Wirkung	Zitat
Gattung <i>Asciidiella</i> (5)			
<i>Asciidiella aspersa</i>	Epidioxy-Sterole	–	Jiménez <i>et al.</i> 1986
Gattung <i>Ascidia</i> (146)			
<i>Ascidia virginea</i>	Alkylsulfate	antiproliferativ	Aiello <i>et al.</i> 1997
<i>Ascidia mentula</i>	Sterole		Ballantine <i>et al.</i> 1977
Gattung <i>Aplidium</i> (96)			
<i>Aplidium</i> sp.	Geranyl-Hydrochinon	antiproliferativ	Fenical 1976
	Aplidiasphingosin	antimikrobiell	Carter <i>et al.</i> 1978
	Aplidite A-G	–	Murray <i>et al.</i> 1995
	Aplidin	antiproliferativ, cytotoxisch	Urdiales <i>et al.</i> 1996
	Floresolides	–	Issa <i>et al.</i> 2003
Gattung <i>Botryllus</i> (17)			
<i>Botryllus</i> sp.	Botryllamide A - D		McDonald <i>et al.</i> 1995
	Cadiolides A und B		Smith <i>et al.</i> 1998
<i>Botrylloides leachi</i>	1,3-Dimethylguanin	–	Lindsay <i>et al.</i> 1999
<i>Botryllus schlosseri</i>	Extrakte	toxisch	Teo <i>et al.</i> 1995
Gattung <i>Dendrodoa</i> (21)			
<i>Dendrodoa grossularia</i>	Dendrodoin (Abbildung 1.6, 3)	cytotoxisch	Heitz <i>et al.</i> 1980
	Grossularine 1 und 2 (Abbildung 1.6, 5,6)	cytotoxisch	Moquin-Patthey <i>et al.</i> 1989, Helbecque <i>et al.</i> 1987, Moquin <i>et al.</i> 1984
	3-Indolyl-Imidazol-4-on	–	Guyot <i>et al.</i> 1986
	Alboinon (Abbildung 1.6, 4)	–	Bergmann <i>et al.</i> 1997
Gattungen <i>Didemnum</i> und <i>Trididemnum</i> (112)			
<i>Didemnum candidum</i>	Ascidiatrienolid A-C	–	Lindquist <i>et al.</i> 1989
	6-Bromtryptamin	–	Fahy <i>et al.</i> 1991
<i>Trididemnum cereum</i>	2'-Deoxyribonucleoside	–	Dematté <i>et al.</i> 1985
<i>Trididemnum solidum</i>	Didemnine A-E	antiviral, cytotoxisch, immunosuppressiv	Rinehart <i>et al.</i> 1981a
Gattung <i>Sidnyum</i> (4)			
<i>Sidnyum turbinatum</i>	Turbinamid	cytotoxisch	Aiello <i>et al.</i> 2001a
	Alkylsulfate	antiproliferativ	Aiello <i>et al.</i> 2001b

Angegeben sind die Naturstoffe, die bisher aus den in dieser Arbeit untersuchten Ascidienarten isoliert wurden, sowie bekannte Naturstoffe aus verwandten Ascidien der gleichen Gattung, die biologische Aktivität zeigten. Die Anzahl der Literaturstellen, die bei MarinLit unter dem Gattungsnamen verzeichnet sind, sind in Klammern angegeben.

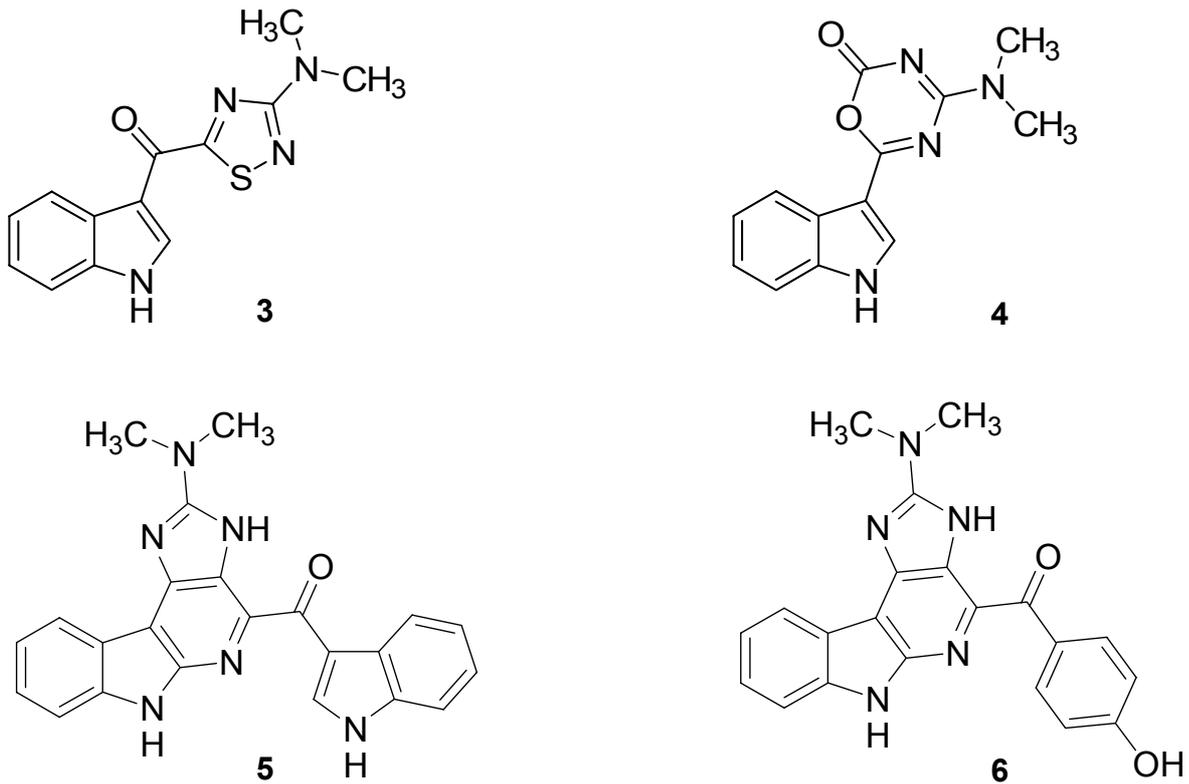


Abbildung 1.6: Dendrodoin (3) und Alboinon (4) sowie die Grossularine 1 (5) und 2 (6).

Dargestellt sind die bekanntesten Naturstoffe aus der Ascidie *Dendrodoa grossularia*, die den Versuchen dieser Arbeit ausgeprägte biologische Aktivität zeigte.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Ascidien der Nordsee auf ihre biologisch-chemischen Eigenschaften und neue Inhaltsstoffe hin zu untersuchen. Da chemische Untersuchungen von Ascidien sich bisher vornehmlich auf die Isolierung einzelner Sekundärmetaboliten beschränkte, sollte durch die vergleichende Betrachtung von zwölf Ascidienarten eines geographischen Standortes ein Überblick über das chemische Potential dieses Phylums gewonnen werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Charakterisierung der Ascidienextrakte durch den Einsatz verschiedener Assays, die zur Bearbeitung folgender Themenbereiche dienten:

Das chemische Potential von Ascidien wurde in einer möglichst breiten Untersuchung abgeschätzt. Durch vier Assays unterschiedlichen Aufbaus und Inhalts wurden sowohl biologisch-ökologische als auch zellbiologische Wirkungen der Extrakte aufgedeckt, um daraus Hinweise auf die Interaktion der Ascidien mit ihrer Umwelt zu erhalten. Die Bedeutung der Tunikaten als Quelle medizinisch verwertbarer Heilmittel sollte über ihre Aktivität in den pharmakologischen Assays bewertet werden.

Die Suche nach Sekundärmetaboliten erfolgte durch ihre biologische Aktivität. Dabei lag das Augenmerk auf Extrakten der zwölf Ascidienarten, die in den Assays eine Wirkung zeigten. Die aktive(n) Substanz(en) sollte(n) isoliert, aufgereinigt und ihre Struktur über NMR-spektroskopische Methoden aufgeklärt werden.

Der methodische und zeitliche Aufwand der Assays sowie ihre reproduzierbare Durchführbarkeit sollten begutachtet werden. Neben seiner inhaltlichen Aussagekraft war die Eignung des jeweiligen Tests für eine die Fraktionierung begleitende Durchführung (*Bioassay-guided Fractionation*) von Interesse, um langfristig einfach und in kleinem Rahmen die gerichtete Suche nach Sekundärmetaboliten zu ermöglichen.

2. Methoden

2.1 Materialsammlung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ascidienarten wurden während zweier Forschungsfahrten der FS *Heincke* bei den Orkney-Inseln nördlich von Schottland (GB) gesammelt. In Tabelle 2.1 sind die jeweiligen Sammelorte vermerkt. Die Organismen wurden während der Fahrt im Jahr 2001 (HE 151) durch Taucher der Biologischen Anstalt Helgoland, während der Fahrt im Jahr 2003 (HE 189) von mir selbst in einer Tiefe zwischen 5 und 20 Metern vom Substrat gelöst und in mit Wasser gefüllten Tüten an Bord gebracht. Die Proben wurden bestimmt, weitgehend von Fremdorganismen gesäubert, eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.1: Ascidienarten mit Sammeldatum und Sammelort, die in den biologischen Tests eingesetzt wurden.

Art	Sammeldatum	Sammelort
<i>Asciidiella aspersa</i>	1999 (BMBF-Projekt)	Roscoff, Bretagne (FR)
<i>Asciidiella aspersa</i>	2000 (BMBF-Projekt)	Helgoland (D)
<i>Asciidiella aspersa</i>	2000 (BMBF-Projekt)	Doggerbank
<i>Asciidiella scabra</i>	08. Juli 2001, 16. Mai 2003	Tuquoy Bay (UK)
<i>Ascidia virginea</i>	09. Juli 2001, 22. Mai 2003	Saviskaill Bay (UK)
<i>Ascidia mentula</i>	09. Juli 2001, 19. Mai 2003	Saviskaill Bay (UK)
<i>Aplidium punctum</i>	07. Juli 2001, 17./18. Mai 2003	Red Nev (UK)
<i>Botrylloides leachi</i>	09. Juli 2001	Saviskaill Bay (UK)
<i>Botryllus schlosseri</i>	08. Juli 2001	Red Nev, Saviskaill Bay (UK)
<i>Corella parallelogramma</i>	15. Juli 2001	Grames Ness, Colla Firth (UK)
<i>Dendrodoa grossularia</i>	08. Juli 2001, 18./19. Mai 2003	Red Nev (UK)
<i>Didemnum candidum</i>	08. Juli 2001, 21./22. Mai 2003	Tuquoy Bay (UK)
<i>Polyclinum aurantium</i>	09. Juli 2001	Saviskaill Bay (UK)
<i>Sidnyum turbinatum</i>	09. Juli 2001	Saviskaill Bay (UK)
<i>Trididemnum cereum</i>	08. Juli 2001	Tuquoy Bay (UK)

Zusätzlich zu den Proben von den Orkney-Inseln konnten Extrakte der Art *Ascidiella aspersa* getestet werden, die aus einem BMBF-Projekt (03F0254A) zur Verfügung standen. Die Sammlungen von *Ascidiella aspersa* erfolgten an der bretonischen Kanalküste (1999), auf Helgoland und auf der Doggerbank (2000). Die Herkunft wird im Folgenden mit B: Bretagne, H: Helgoland und D: Doggerbank gekennzeichnet.

2.2 Habitat Nordsee

2.2.1 Orkney-Inseln

Die Orkney-Inseln gehören zu Großbritannien und liegen an der Nordspitze Schottlands. Die rund 70 Inseln, deren südlichste nur knapp 10 km vom britischen Festland entfernt ist (Abbildung 2.1), bestehen hauptsächlich aus dem Old Red, etwa 370 Millionen Jahren altem Sandstein, der an wenigen Stellen auf den Inseln Hoy und Eday tatsächlich rot, meist aber grau ist. Lediglich an der Westküste des Mainlands liegen vulkanische Gesteine an der Oberfläche. Die Küstenlänge aller Inseln beläuft sich auf etwa 900 km Länge, von denen 12% bis 15% von den so genannten High Cliffs eingenommen werden, über 30 Meter hohe senkrecht ins Meer fallende Abbruchkanten. Unter Wasser fällt das Schelf an den West- und Ostküsten der Inseln ebenso rapide auf Tiefen zwischen 50 und 100 Metern. Allein die Buchten und Meeresarme sowie Scapa Flow erreichen maximal 36 Meter Tiefe. 89% der Küstenlinie bestehen aus Hartsubstrat, die übrigen Übergänge zwischen Land und Meer werden den seichten Sand- und Shingle-Stränden zugeordnet, einer Mischung aus Sand, Muschelbruch und kleinen Kieselsteinen. Das Klima der Orkneys ist sehr mild, aber windig. Die Jahrestemperaturen liegen im Mittel zwischen 3°C im Januar und 13°C im August, die maximalen Temperaturen reichen, wenn auch selten, von -7°C im Winter bis zu 25°C im Sommer (Schlick 2000). Die Hydrographie der Orkneys wird durch den nordwärts gerichteten Atlantikstrom an der Westseite der Inseln bestimmt, der durch west-ost-orientierte Meerengen in die Nordsee drückt und in Abhängigkeit von den Gezeiten Geschwindigkeiten von über vier Knoten entwickeln kann. Die Wassermassen bewegen sich im Uhrzeigersinn um die Inseln und werden durch Ausläufer des Golfstroms auf jahreszeitabhängige 5°C bis 13°C erwärmt.

Die Lebensgemeinschaften der Küsten werden durch Substrat, Licht und Wellenexposition bestimmt. Sandstrände werden hauptsächlich von Polychaeten und Mollusken dominiert (Atkins *et al.* 1985). Die Hartsubstrate der Küsten werden bei starken Wasserströmen von der Braunalge *Laminaria hyperborea*, in geschützten Bereichen von *Laminaria saccharina* und *Chorda filium* dominiert. Im Gezeitenbereich sind verschiedene *Fucus*-Arten häufig. Exponierte Hartsubstrate

werden von sessilen Filtrierern wie Schwämmen, Tunikaten, Hydrozoen, Bryozoen und Balaniden dominiert. An mobilen Arten sind Nackt- und Gehäuseschnecken sowie diverse Echinodermen zu finden (Baxter *et al.* 1985, de Kluijver 1993).

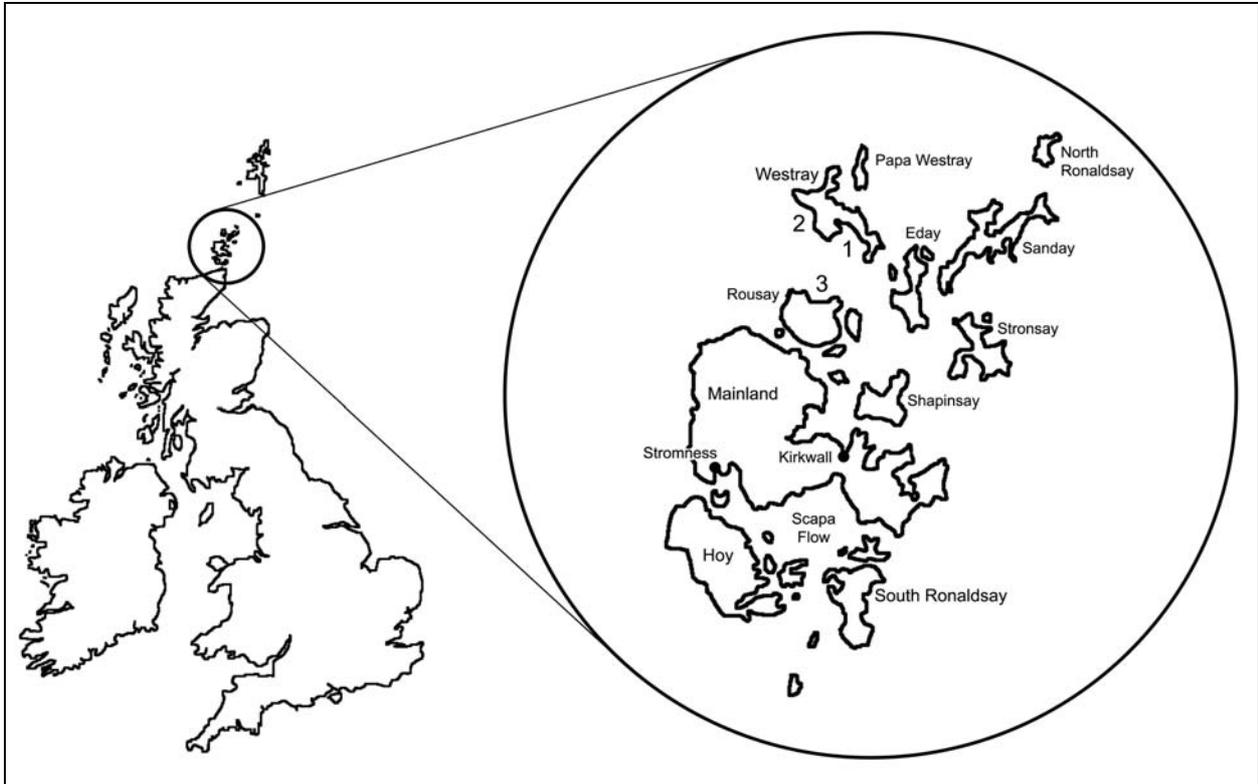


Abbildung 2.1: Karte der Sammelorte um die Orkney-Inseln.

Lage der Orkney-Inseln an der Nordspitze Großbritanniens sowie die Tauch- und Sammelplätze Tuquoy Bay (1), Red Nev (2) und Saviskaill Bay (3) (Karte verändert nach Reynolds 1985).

Tauchplatz 1: Tuquoy Bay, Westray

Die Tuquoy Bay (Abbildung 2.2) liegt an der südöstlichen Seite der Insel Westray. Sie ist damit sehr gut vor Strömung geschützt. Die Bucht ist mit maximal zehn Metern Tiefe sehr seicht.



Abbildung 2.2: Tuquoy Bay, Westray. Blick von der Öffnung der Bucht zum Land hin.

Auf dem felsigen Untergrund dominiert ein dichter Wald aus *Laminaria hyperborea*. An den Laminarienstängeln wachsen dichte Trauben von *Ascidia scabra* und flächige Kolonien von *Didemnum candidum* (Abbildung 2.3) sowie Schwämme der Arten *Halichondria panicea*, *Haliclona* sp. und *Leucosolenia complicata*. Zwischen den Laminarien sind diverse Crustaceen und Gehäuseschnecken heimisch. Das Hartsubstrat wird durch breite Korridore aus Sand und Schill unterbrochen, die Muscheln und sabelliden Polychaeten Lebensraum bieten.

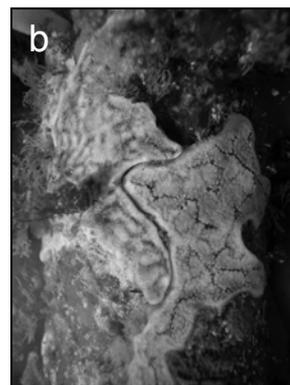
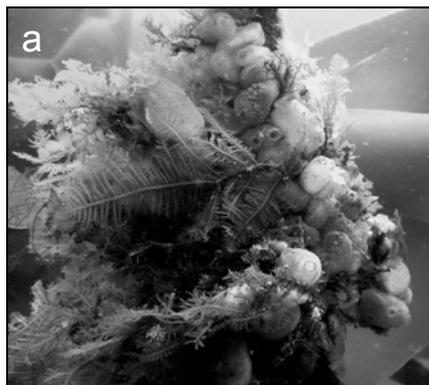


Abbildung 2.3: *Ascidia scabra* (a) und *Didemnum candidum* (b) an Laminarienstängeln.

Tauchplatz 2: Red Nev

Das Gebiet Red Nev bezeichnet die Westseite der Insel Westray und liegt in einem starken Strömungs-, Wellen- und Gezeitenbereich. Bis zu sechzig Meter hohe Klippen sind durch Höhlen gekennzeichnet, die durch den Wellenschlag ausgewaschen wurden (Abbildung 2.4). Unter Wasser ergeben sich durch große Felsquader Plateaus von einigen Metern Höhe und Breite, die sich bis zu einer Tiefe von 30 Metern erstrecken.



Abbildung 2.4: Steilküste des Red Nev an der Westseite der Insel Westray.

Die vertikalen Wände dieser Terrassen zeichnen sich durch eine typische Besiedlung eines exponierten Standortes mit Filtrierern aus. Teppiche von *Dendrodoa grossularia*, assoziiert mit dem Schwamm *Clathrina coriacea*, sowie Kolonien von *Sidnyum turbinatum* und *Aplidium punctum* (Abbildung 2.5) wechseln sich mit großflächigem Bewuchs durch diverse Schwamm-, Bryozoen- und Hydrozooenarten ab. Die horizontalen Felsflächen sind mit verschiedenen Schwämmen, Aggregaten von *Mytilus edulis*, Seeanemonen, Seesternen, Schlangensterne sowie Seeigeln besiedelt.

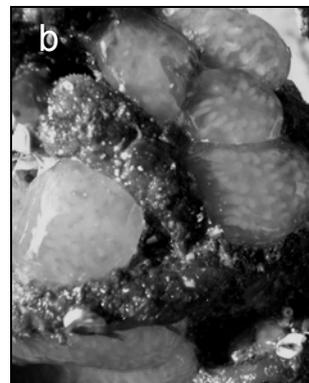
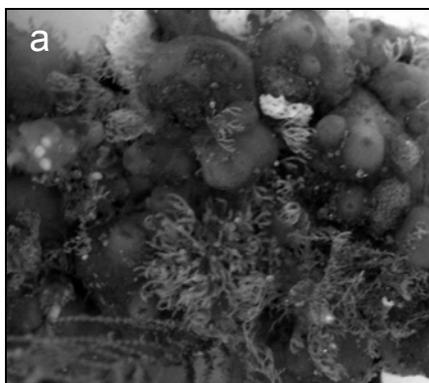


Abbildung 2.5: *Dendrodoa grossularia* (a) und *Aplidium punctum* (b).

Tauchplatz 3: Saviskaill Bay

Die Saviskaill Bay (Abbildung 2.6) liegt im Norden der Insel Rousay. Sie bildet die südliche Begrenzung des Westray Firth zwischen Westray und Rousay und ist dem Gezeitenstrom dieser Meerenge mit wechselnder Strömung und starkem Wellenschlag ausgesetzt.



Abbildung 2.6: Westliche Seite der Saviskaill Bay mit Blick in den Westray Firth.

Der Untergrund fällt durch sehr breite Felsplateaus stufenweise auf eine Tiefe von bis zu 25 Metern ab, zwischen denen sich mit Muscheln und Sabelliden besiedelte, einige Meter breite und viele Meter lange Sand- und Schillcanyons erstrecken. Die Felsflächen sind innerhalb der ersten 15 Meter Tiefe dicht mit Laminarien bewachsen, die Gehäuseschnecken, Echinodermen und Crustaceen einen geschützten Lebensraum bieten. In Tiefen unterhalb 15 Metern findet man häufig in Felsspalten vertikaler Abbrüche *Ascidia mentula* sowie sehr vereinzelt *Ascidia virginea* (Abbildung 2.7). Schwämme sind am häufigsten durch *Cliona celata* sowie *Pachymatisma johnstonia* vertreten.



Abbildung 2.7: *Ascidia mentula* (a) und *Ascidia virginea* (b) in Felsspalten der Saviskaill Bay.

2.2.2 Helgoland und Doggerbank

Die Nordsee hat als typisches Schelfmeer eine mittlere Tiefe von 70 Metern. Der Meeresboden der südlichen Nordsee besteht hauptsächlich aus weichem Sand und Schlack. Darin stellen der Helgoländer Buntsandstein sowie der Muschelkalk und die Kreide um die Düne einen einmaligen Besiedlungsgrund für sessile Invertebraten und Algen dar. Der felsige Lebensraum um Helgoland unterteilt sich in den Gezeitenbereich, das „Helgoländer Felswatt“, und den sublittoralen Felssockel, und zeichnet sich auf 4 km Breite und 8 km Länge durch seine große Biodiversität aus (Rietdorf 2001). Durch die exponierte Lage in der Deutschen Bucht (Abbildung 2.8) ist Helgoland starkem Wellenschlag und Gezeitenströmen ausgesetzt. Vor allem zwischen der Hauptinsel und der vorgelagerten Düne, die 1720 während einer Sturmflut von der Hauptinsel getrennt wurde, herrschen teilweise sehr starke Strömungen. Die Wassertemperaturen liegen zwischen 2°C im Winter und 18°C im Sommer.

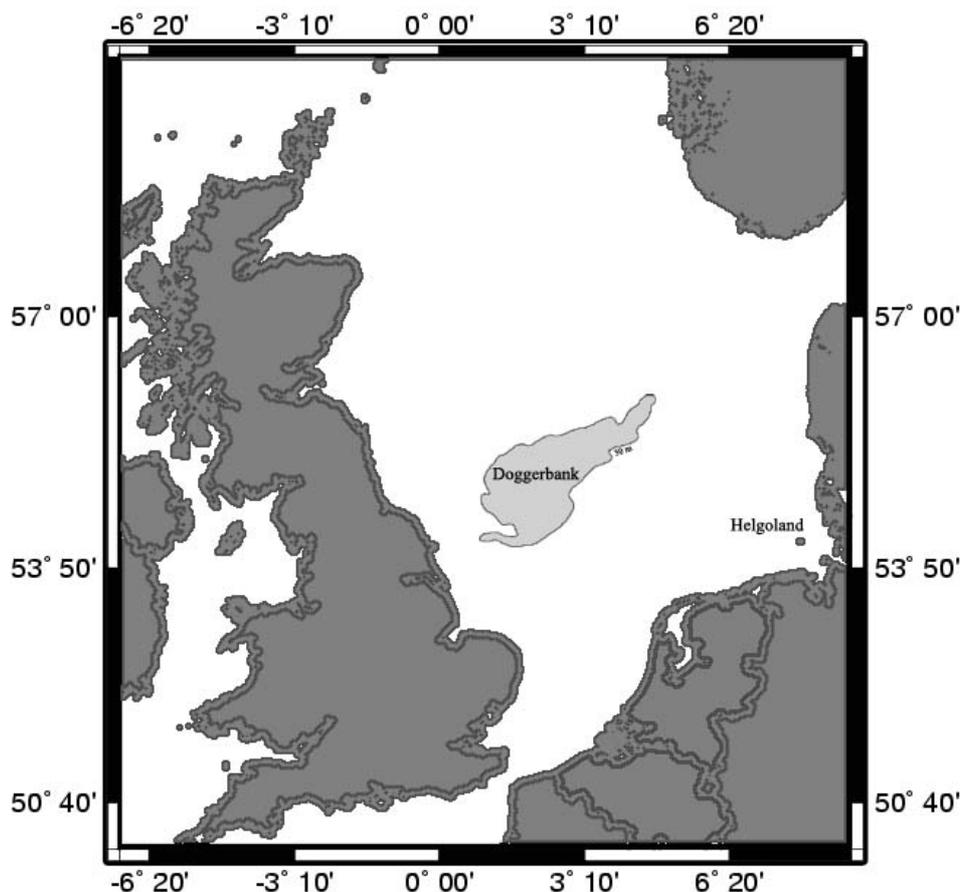


Abbildung 2.8: Geographische Lage von Helgoland und der Doggerbank.

Die Grafik zeigt Helgoland in der Deutschen Bucht sowie die Lage der Doggerbank zwischen England und Dänemark. Die Doggerbank ist entlang ihrer 30 m-Tiefenlinie eingetragen.

Die Doggerbank liegt etwa auf Höhe der mittelenglischen Grafschaft Yorkshire und erstreckt sich Richtung Jütland und Skagerrak (Abbildung 2.8). Sie ist mit durchschnittlich 30 Metern, minimal 13 Metern Wassertiefe das flachste Gebiet der Nordsee und stellte in der Nacheiszeit die südliche Begrenzung der Nordsee dar. Vor etwa 10000 bis 8000 Jahren wurde durch das Abschmelzen der Gletscher der letzten Eiszeit der südliche Teil der Nordsee allmählich überflutet. Die Doggerbank ist heute eine rund 300 Kilometer lange und 120 Kilometer breite Sandbank, die vielen Fischen als Laichgrund dient. Sie zählte früher zu den fischreichsten Gebieten der Nordsee.

2.3 Chemische Methoden

2.3.1 Extraktion

Die gesammelten Organismen wurden in gefrorenem Zustand in einer Gefriertrocknungsanlage vollständig getrocknet, dann gewogen und grob zerkleinert. Die Extraktion der Organismen erfolgte mit Methanol und Dichlormethan (1:1), hieraus resultierte der Rohextrakt. Nach Trocknung und Feststellung der Menge wurde der Rohextrakt in Methanol aufgenommen und zwischen vier Lösungsmitteln zunehmender Polarität fraktioniert. Zur Verwendung kamen *n*-Hexan, Essigester, *n*-Butanol und Wasser (Abbildung 2.9). *n*-Hexan diente zur Abtrennung von unpolaren Substanzen, in der Wasserphase sammelten sich anorganische Stoffe und Salze. In der Essigesterphase und der *n*-Butanolphase wurden polare Sekundärmetaboliten angereichert.

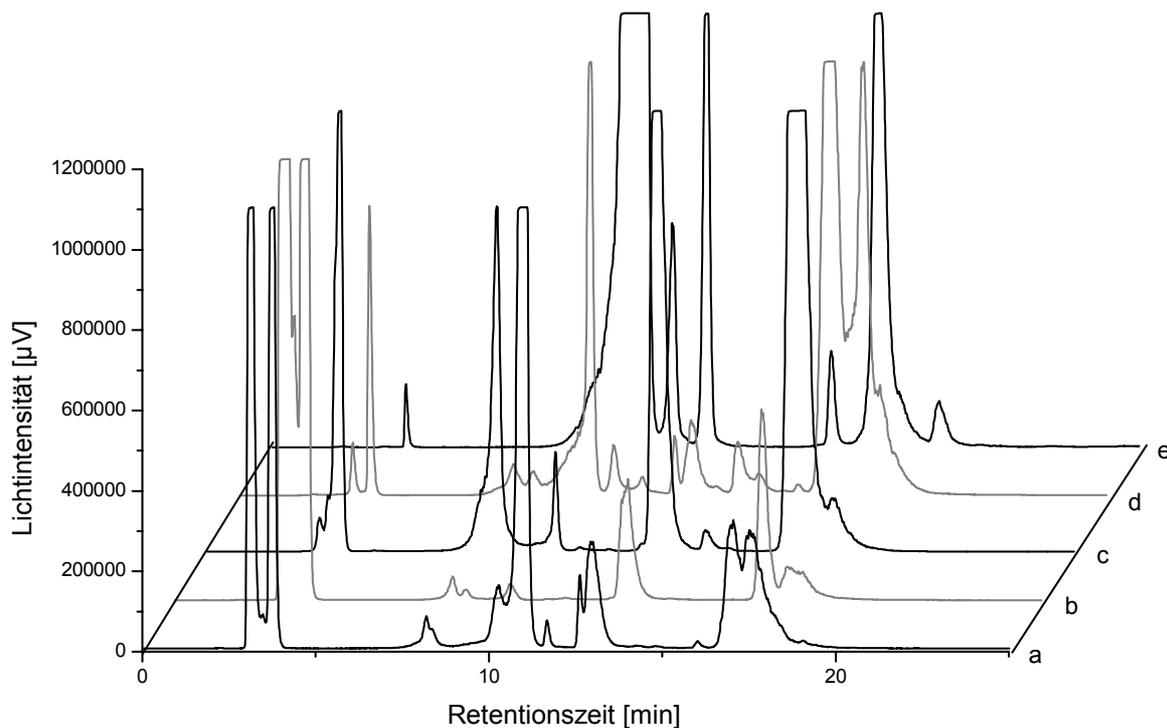


Abbildung 2.9: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes und der vier Phasen von *Didemnum candidum*.

Die HPLC-Analytik erfolgte mit einer Diol-Säule. In der Grafik sind die Chromatogramme des Rohextraktes (a), der *n*-Hexanphase (b), der Essigesterphase (c), der *n*-Butanolphase (d) und der Wasserphase (e) dargestellt.

2.3.2 Chromatographische Methoden

Die durch die Extraktion gewonnenen Substanzgemische wurden mit Hilfe von verschiedenen chromatographischen Methoden analysiert und aufgereinigt. Eine Auftrennung von Essigester- oder *n*-Butanolphasen erfolgte mittels Gelpermeations- oder Größenausschlußchromatographie über Sephadex LH-20. Zur Aufreinigung kleinerer Mengen vorgetrennter, apolarer Fraktionen diente die *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC), bei polaren Fraktionen kam die *Low Pressure Liquid Chromatography* (LPLC) zum Einsatz. Mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie wurde vor einer gelchromatographischen Aufreinigung die optimale Kombination von stationärer und mobiler Phase für die Auftrennung des jeweiligen Substanzgemisches ermittelt. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) diente der präparativen Trennung von Substanzgemischen sowie der qualitativen und quantitativen Analyse.

2.3.3 Spektroskopische Methoden

Zur Ermittlung der chemischen Struktur isolierter Substanzen wurden die Methoden der kernmagnetischen Resonanz (NMR) und der Massenspektrometrie (MS) verwendet. Zur Fraktionierung einer Substanz kam die Methode der hochaufgelösten Masse (MS/MS) zum Einsatz, zur Auftrennung und massenspektrometrischen Charakterisierung eines Gemisches wurde *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (HPLC-MS) angewendet. Die Infrarot-Spektroskopie (IR) diente der weiteren Charakterisierung einer Reinsubstanz. Anhand von MS-Spektren wurde außerdem die Zusammensetzung bestimmter Substanzgemische überprüft.

2.4 Artenvergleich *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra*

Die systematische Einordnung von *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra* ist seit ihrer Bestimmung Gegenstand weitreichender Diskussionen. Seit den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts werden sie je nach Autor als zwei Arten oder als Varietäten einer Art betrachtet (Berrill 1950). Ausschlaggebende Argumente beider Seiten stützen sich auf morphologische Merkmale, die je nach Gewichtung für oder gegen die Unterscheidung sprechen. Berrill (1950) fasst die Diskussion der vorhergehenden 70 Jahre so zusammen, dass mit *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra* zwei distinkte Arten vorliegen, wobei das Ausmaß der Unterschiede weiterhin diskutabel bleibe. Dass die von ihm und nachfolgend von Millar (1971) aufgezeigten Unterscheidungsmerkmale tatsächlich noch Raum für Interpretation lassen, wird auch bei Rietdorf (2001) deutlich, der einen Artvergleich von zwei Populationen der Gattung *Ascidiella* auf Helgoland durchführte.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Untersuchung und Beurteilung morphologischer Unterschiede der Arten *Ascidiella aspersa* von Helgoland und *Ascidiella scabra* von den Orkney-Inseln in Bezug auf Literaturangaben und systematischen Stellenwert. Außerdem sollte die Möglichkeit einer chemischen Taxonomie beider Arten abgeschätzt werden. Dazu wurden die Rohextrakte der sezierten Arten mittels HPLC analysiert. Die HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte von zehn Individuen der Art *Ascidiella scabra* wurden als Referenz zur innerartlichen Variabilität der chemischen Inhaltsstoffe herangezogen. Eine genetische Analyse der Populationen ist in Vorbereitung.

2.5 Bioassays

Es wurden vier verschiedene Bioassays durchgeführt, die sich in ihrer ökologischen und pharmakologischen Ausrichtung unterscheiden. Der Phytigel-Assay sollte Aufschluss über eine mögliche besiedlungshemmende Wirkung von Ascidienextrakten in ihrer natürlichen Umgebung geben. Der antimikrobielle und der cytotoxische Assay sollten die Wirkung der Ascidienextrakte auf prokaryontische und eukaryontische Zellen aufzeigen. Der Protein-Tyrosin-Kinase-Assay stellte einen spezifischen Test auf Beeinflussung eines pharmakologisch wichtigen eukaryontischen Enzyms dar. Die im Labor durchgeführten Assays gewährten neben Einblicken in die ökologische Funktion von Sekundärmetaboliten auch Aufschluss über mögliche pharmakologische Wirkungen von Ascidienmetaboliten.

2.5.1 Phytigel-Assay

Ascidien besitzen je nach Art unterschiedlich starken Aufwuchs. Es konnten dabei Unterschiede im epibiontischen Besatz von Ascidien beobachtet werden, deren Habitus ähnlich war und die im gleichen Lebensraum siedelten (persönliche Beobachtung). Einige Ascidien schützen sich durch morphologische Anpassungen vor zu starkem Aufwuchs. Die Mehrzahl der Ascidien nutzt aber vermutlich chemische Substanzen, um sich gegen Besiedlung zu schützen. Um Ascidien auf besiedlungshemmende Inhaltsstoffe zu testen, wurden Ascidienextrakte in Phytigel-Platten eingegossen und an der Schwimmbadmole (Abbildung 2.10) auf Helgoland angebracht. Eingesetzt wurden Extrakte von ausgewählten Ascidienarten, von denen genug Substanzmenge für diesen Versuch zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden Gele mit Frischmaterial von *Asciella aspersa* ausgebracht. Mit Methanol oder bekannten Extrakten versetzte Gele dienten als Kontrolle.

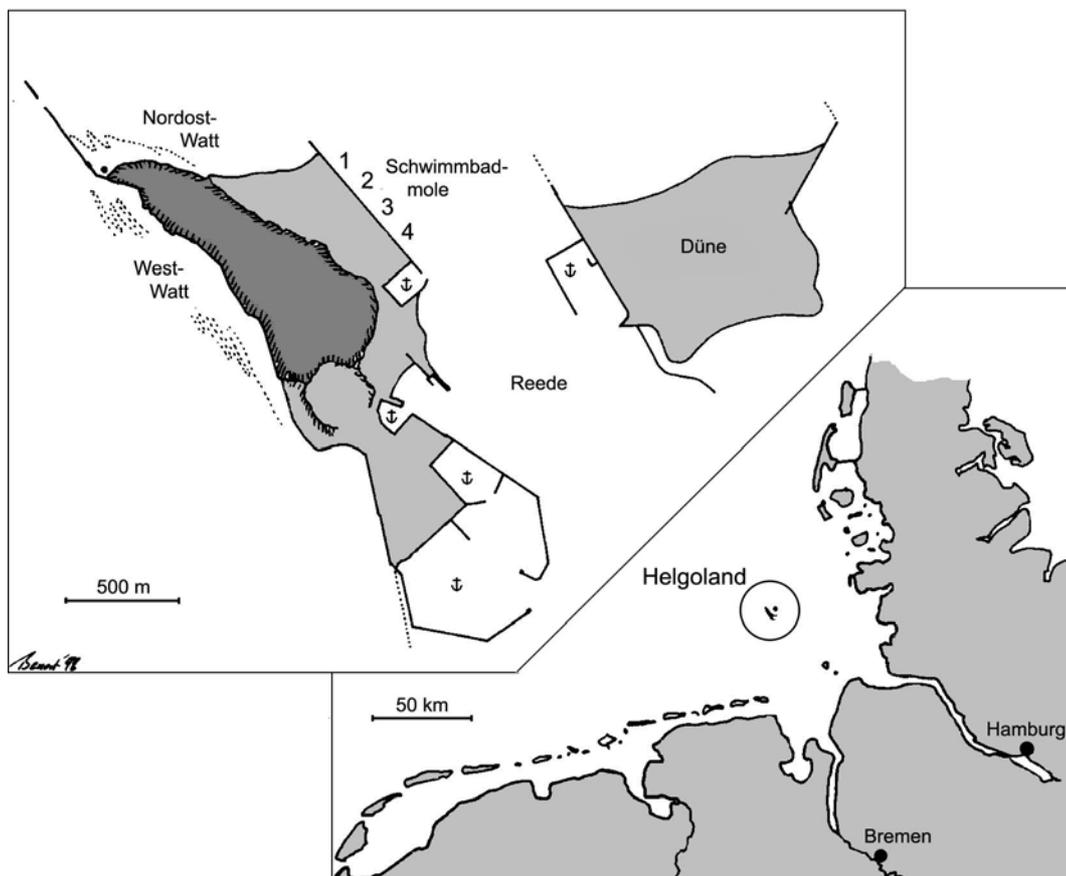


Abbildung 2.10: Karte von Helgoland und der Düne.

An der Schwimmbadmole an der Ostseite der Hauptinsel sind vier Leitern, an denen die Versuche angebracht wurden, von Nord nach Süd mit den Nummern 1 bis 4 bezeichnet (Zeichnung verändert nach Benoit 1998).

Die Schwimmbadmole ist eine Betonbefestigung an der östlichen Seite der Insel. Sie zeichnet sich durch ihren dichten Bewuchs mit Algen und sessilen Invertebraten aus und beherbergt eine Vielzahl von mobilen Organismen. An dieser Stelle ist durch die schmale Passage zwischen Insel und Düne der Gezeitenstrom sehr stark. Die Wasserbewegung garantiert eine geringe Sedimentation und eine gute Versorgung der sessilen Fauna mit Nährstoffen sowie eine weitreichende Dispersion von pelagischen Larven. Die herrschenden physikalischen Bedingungen sind denen der Orkney-Inseln sehr ähnlich. Die Phytigel-Platten wurden an in der Molenwand eingelassene Leitern, in der Zeichnung von Nord nach Süd mit den Nummern 1 bis 4 bezeichnet, in einer Tiefe von 6-7 Metern (mittlere Tidenlinie) montiert. Sie hingen senkrecht, waren vor Beschädigung durch zu starken Wasserstrom geschützt und bildeten mit der Molenwand und deren Bewuchs eine Ebene. Im ersten Versuch wurden jeweils zwei Platten mit Extrakt- und Kontrollgelen an die Leitern 1, 2 und 3 montiert. Im zweiten Versuch wurde jeweils eine Platte mit Extrakt- und Kontrollgelen an der Basis der Leitern 1 bis 4 angebracht. Zusätzlich wurden an den Leitern 1 und 4 je eine Platte mit Diffusions-Kontrollgelen, versetzt mit einem bekannten Rohextrakt, angebracht, von denen jeweils zwei Gele am 6., 9., 12. und 18. Tag der Inkubation geborgen wurden, um die Diffusionsrate der Substanz aus dem Gel zu dokumentieren. Alle anderen Platten wurden nach definierter Zeit abmontiert und im Labor ausgewertet. Um mögliche bewuchshemmende Wirkungen der eingegossenen Substanzen beurteilen zu können, wurde die Dichte des Algenrasens jedes Gels visuell auf einer Skala von 1 (wenig bis gar nicht bewachsen) bis 4 (sehr stark bewachsen) beurteilt sowie die Anzahl der sessilen und assoziierten Epibionten bestimmt.

2.5.2 Antimikrobieller Assay

Die antimikrobielle Aktivität von Ascidienextrakten wurde mit Hilfe des Agar-Diffusions-Assays geprüft. Der Test wurde während eines mehrwöchigen Aufenthalts an der Biologischen Anstalt Helgoland durchgeführt. Er stellt eine einfache Möglichkeit dar, die Wirkung verschiedener Extrakte auf eine Vielzahl von Bakterienstämmen zu testen (Jenkins *et al.* 1998, Abbildung 2.11). Es wurden in diesem Versuch 25 Bakterienstämme verwendet, die aus unterschiedlichen Habitaten stammten und sich in Morphologie und Physiologie unterschieden. Neben freilebend marinen Bakterienstämmen wurden auch Isolate aus dem Schwamm *Halichondria panicea* sowie terrestrische Mikroorganismen eingesetzt, die als Pathogene bekannt sind. Extrakte von 13 Ascidienarten wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Die Beurteilung der Aktivität richtete sich nach der Ausprägung der Hemmhöfe. Aktive Fraktionen wurden in geringerer Konzentration erneut getestet.

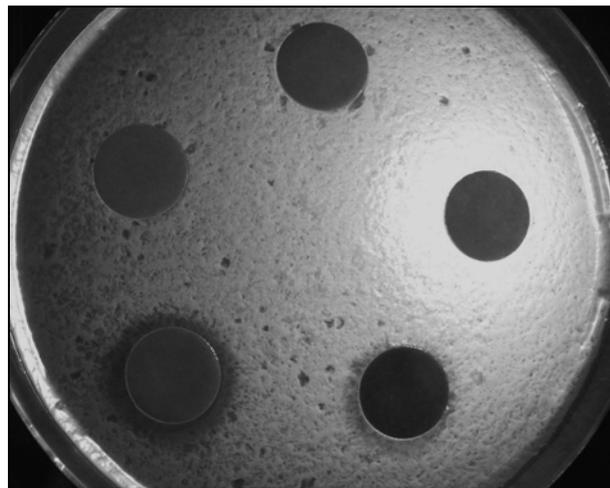


Abbildung 2.11: Versuchs-Agarschale mit Filterpapierblättchen.

Auf die Filterblättchen wurden die Ascidienextrakte aufgetragen und mit der Platte inkubiert. Um die beiden unteren Blättchen sind Hemmhöfe erkennbar.

Marine Oberflächen, wie die Tunika von Ascidien, werden schnell von einem Biofilm bedeckt (Keough *et al.* 1995), dessen physikalische und chemische Eigenschaften die nachfolgende Besiedlung beeinflussen (Wahl *et al.* 1994). Die Modifikation dieser Biofilm-Zusammensetzung durch antimikrobielle Substanzen stellt für die Ascidie eine Möglichkeit dar, den Bewuchs ihrer Tunika in gewissem Maße zu steuern. Es sollte mit diesem Test herausgefunden werden, in welchem Verhältnis die antimikrobielle Aktivität der Extrakte in Bezug zur tatsächlich beobachteten Besiedlung der Ascidien steht und welchen Stellenwert diese chemische Abwehr in der Anpassung der Ascidien an ihren natürlichen Standort einnimmt.

2.5.3 Cytotoxischer Assay

Die im antimikrobiellen Assay getesteten Proben wurden auf ihre cytotoxische Wirkung auf Mausfibroblasten untersucht. Fraktionen, die das Zellwachstum beeinflussten, wurden weiter aufgetrennt und erneut getestet. Die Feststellung der cytotoxischen Aktivität erfolgte über die Minimale Inhibitorische Konzentration (MIC) der Substanzen, wobei eine MIC von unter 20 µg/ml als relevanter cytotoxischer Effekt bewertet wurde. Die cytotoxische Aktivität von chemischen Substanzen, die von dem marinen Organismus synthetisiert werden, stellt wie die antimikrobielle Aktivität einen Schutzmechanismus dar. Zielorganismen sind dabei benachbarte sessile Invertebraten als Konkurrenten um Platz und Nahrung sowie Fraßfeinde wie Seesterne oder Nacktschnecken. Naturstoffe mit cytotoxischer Aktivität sind auch pharmakologisch von Bedeutung, da immer noch neue Wirkstoffe zur Tumorthherapie gesucht werden. Marine Invertebraten stellen eine herausragende Quelle von Naturstoffen dar, weil ihre Inhaltsstoffe eine durchschnittlich höhere cytotoxische Aktivität aufweisen (Garson 1994) als terrestrische und auch marine Pflanzen.

Im cytotoxischen Assay können über die differenzierte Anfärbung von Zellorganellen durch die eingesetzte Substanz induzierte morphologische Veränderungen sichtbar gemacht werden, die einen ersten Rückschluss auf die Zielorganelle der Substanz erlauben. Diese Ganzzelltests werden aber heute nur noch auf der Suche nach Cytostatika benutzt. Meist werden die Substanzen an molekularbiologischen Testsystemen untersucht, bei denen die Wirkung auf ein spezifisches *Target* wie Rezeptor, Ionenkanal oder Signalproteinen konzentriert ist (Zeeck *et al.* 2001). Der Protein-Tyrosin-Kinase-Assay stellt ein solches molekulares Testsystem dar. Er wird im nächsten Kapitel beschrieben.

2.5.4 Protein-Tyrosin-Kinase-Assay

Der Protein-Tyrosin-Kinase-Assay stellt ein Testsystem dar, in dem Substanzgemische und Reinsubstanzen an einem spezifischen Enzym, dem *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), geprüft werden können (Cleaveland *et al.* 1990). Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) bilden eine sehr konservative Enzymklasse, die in multizellulären Organismen seit Millionen Jahren an entscheidenden Zellfunktionen beteiligt sind (Yarden *et al.* 1988). Diese Funktionen beeinflussen und steuern das Zellwachstum, die Zellproliferation und auch den programmierten Zelltod, die Apoptose (Hollósy *et al.* 2004). Der EGFR als spezielle Kinase spielt vor allem bei der Zellteilung eine Rolle. Eine Fehlfunktion dieser Kinase kann während der Entwicklung zu gravierenden Wachstumsstörungen führen. Eine Überfunktion des EGFR wird zudem beim Menschen mit einigen Krebsarten in Zusammenhang gebracht (Noble *et al.* 2004). Die Entwicklung neuer PTK-Hemmer ist daher im pharmakologischen Bereich in der Tumorthherapie von Bedeutung. Auch in Invertebraten ist die Regulation der PTKs essentiell. Bei einigen Invertebraten wurde eine Beteiligung des EGFR an der Auswahl eines geeigneten Substrats, der Anheftung und der Metamorphose vom mobilen Larvenstadium zum sessilen Adulten nachgewiesen (Okazaki *et al.* 2000, Green *et al.* 2002). Eine Störung dieser streng konzertierten Abläufe kann einem Konkurrenten um Platz und Nahrung zu überlebenswichtigen Vorteilen verhelfen.

Der Test basiert auf einem *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), der die Aktivität des Enzyms über eine Farbreaktion quantifiziert. Die Enzymaktivität stand in Relation zu einer Positivkontrolle, dem normal arbeitenden Enzym, und zu einer Negativkontrolle, die durch den bekannten Hemmstoff Piceatannol gewährleistet wurde. Die Restaktivität des inhibierten Enzyms wurde in prozentualer Aktivität zu der Positivkontrolle angegeben (zur Berechnung siehe Kapitel 4.5.4) und folgendermaßen bewertet (nach Kirsch 1999):

- stark inhibierend: < 20%,
- moderat inhibierend: 21% bis 50%,
- keine Beeinflussung: 51% bis 120 %,
- aktivierend: > 120%.

Es wurden Rohextrakte und nach Polarität aufgetrennte Phasen von Ascidiensextrakten getestet. Der Test wurde parallel zur weiteren Auftrennung der Extrakte eingesetzt. Diese *Bioassay-guided Fractionation* sollte zur Isolierung der enzyminhibierenden Reinsubstanz führen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die beschriebenen Versuche wurden während des Zeitraums der Arbeit parallel durchgeführt. Mehrere Forschungsaufenthalte auf Helgoland dienten der Durchführung der antimikrobiellen Versuche sowie der PTK-Assays. Die Phytigel-Versuche wurden im Sommer 2003 auf Helgoland vorbereitet und angebracht. Ein Dank schon an dieser Stelle an Florenz Sasse und Bettina Hinkelmann von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, die die Testung der Ascidiensextrakte bereitwillig in ihre cytotoxischen Assays aufnahmen. Der Vergleich der *Asciidiella*-Arten von den Orkney-Inseln und Helgoland ergab sich während der Forschungsfahrt 2003, da die Bestimmung der auf den Orkney-Inseln gesammelten Art zunächst nicht eindeutig durchzuführen war. Der morphologische Vergleich wurde auf dem Schiff und anschließend auf Helgoland geführt, eine DNS-Isolierung und genetische Analyse der beiden Arten wird derzeit vorbereitet.

3.1 Artenvergleich *Asciidiella aspersa* und *Asciidiella scabra*

Bei der Sammlung einer Art der Gattung *Asciidiella* auf den Orkney-Inseln, die zunächst als *Asciidiella aspersa* identifiziert wurde, kamen Zweifel an der Richtigkeit dieser Bestimmung auf, da äußerlich Unterschiede zu der auf Helgoland heimischen Art *Asciidiella aspersa* auffielen. Literaturangaben wiesen auf die nah verwandte Art *Asciidiella scabra* hin, die von *Asciidiella aspersa* zwar distinkt, aber schwer zu unterscheiden sei (Abbildung 3.1). Um herauszufinden, ob es sich bei der Orkney-Population tatsächlich um die Art *Asciidiella scabra* handelte, wurden mehrere Tiere mit den eindeutig der Art *Asciidiella aspersa* zugehörigen Individuen von Helgoland verglichen. Zusätzlich sollte ein Vergleich ihrer Inhaltsstoffe durchgeführt werden, um die Möglichkeit einer chemischen Taxonomie der morphologisch nur schwer zu differenzierenden Arten zu begutachten. Chemische Charakteristika in der taxonomischen Beschreibung verschiedener Invertebraten haben gleichzeitig mit der Suche nach Sekundärmetaboliten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Frühe taxonomische Beschreibungen stützten sich bei allen Phyla auf morphologische Kennzeichen und Ähnlichkeiten im Lebenszyklus. Mit zunehmender Entwicklung der chemischen und genetischen Analyse verschoben sich die Gesichtspunkte, mit Hilfe derer Arten und Gattungen taxonomisch eingeordnet wurden. Die Schwierigkeiten liegen auf der Hand: es musste mit jeder Studie abgeschätzt werden, auf welchen Merkmalen die taxonomische Einordnung stattfand, denn nicht selten widersprachen sich die molekularbiologischen und chemischen Ergebnisse mit der herkömmlichen

morphologischen Einordnung. Andererseits konnten mit den neuen Methoden auch unsichere systematische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Gattungen und Klassen von Organismen aufgeklärt werden (Hooper *et al.* 1992, Thiel *et al.* 2002). Im Bereich der Invertebraten stellen die Schwämme das am besten chemotaxonomisch untersuchte Phylum dar (Bergquist *et al.* 1983). Von Tunikaten sind zwar viele chemische Studien bekannt, es fehlen aber weitgreifende Untersuchungen hinsichtlich der taxonomischen Bedeutung chemischer Inhaltstoffe. Im vorliegenden Fall einer auf den ersten Blick nicht eindeutigen Differenzierung zweier Arten der Gattung *Ascidiella* stützte sich auch die Literatur zunächst auf morphologische Unterschiede. Obwohl Millar (1970) die Arten anhand morphologischer Daten zweifelsfrei differenzierte, beschrieben sowohl Berrill (1950) als auch Rietdorf (2001) die Schwierigkeiten sowohl in der Unterscheidung der Arten dieser Gattung im allgemeinen und der Arten *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra* im Speziellen. Als morphologische Vergleichsmerkmale wurden in dieser Arbeit Körperlänge und Körperbreite, Distanz zwischen den Siphonen und zwischen den Siphonöffnungen (Abbildung 3.2), die Form des dorsalen Tuberkels sowie Anzahl der oralen Tentakel und der longitudinalen Gefäße des Kiemendarms herangezogen (Abbildung 1.1). Als sicherstes Merkmal zur Unterscheidung der beiden Arten gelten die Eier, deren Follikelzellen sich bei den beiden Arten deutlich voneinander unterscheiden (Berrill 1950). Rietdorf (2001) billigte in Übereinstimmung mit anderen Autoren den morphologischen Merkmalen wie Körpergröße und Form des Tuberkels einen geringeren Stellenwert als der Anatomie der Eier zu (Abbildung 3.4), was in Anbetracht der Variabilität der Morphologie, wie sie sich im Vergleich mit Literaturdaten präsentiert, sinnvoll erscheint. Die Eier wurden den Individuen beider Standorte mit einer Pipette entnommen und unter dem Binokular untersucht.

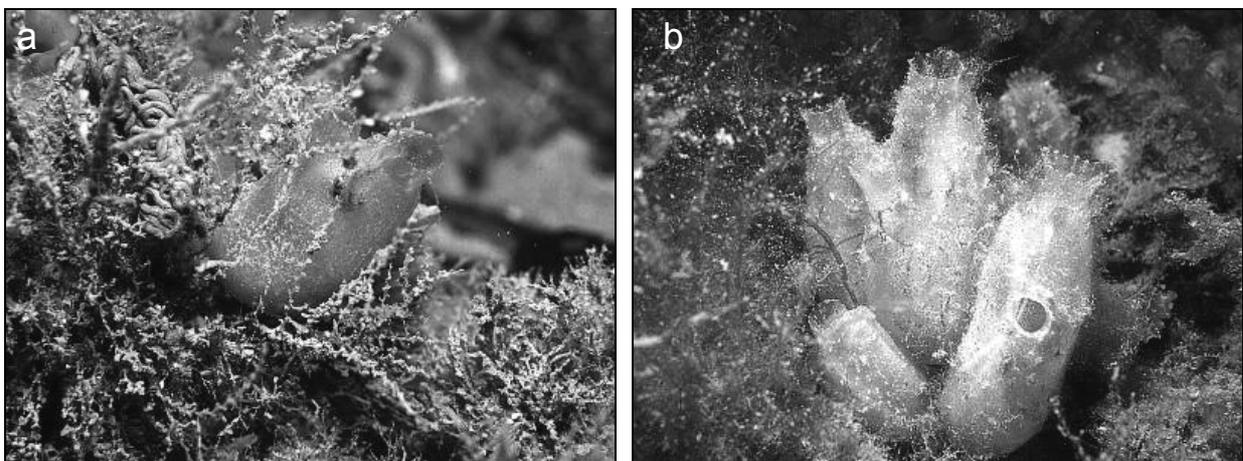


Abbildung 3.1: *Ascidiella scabra* (a) und *Ascidiella aspersa* (b) in ihrem natürlichen Habitat.

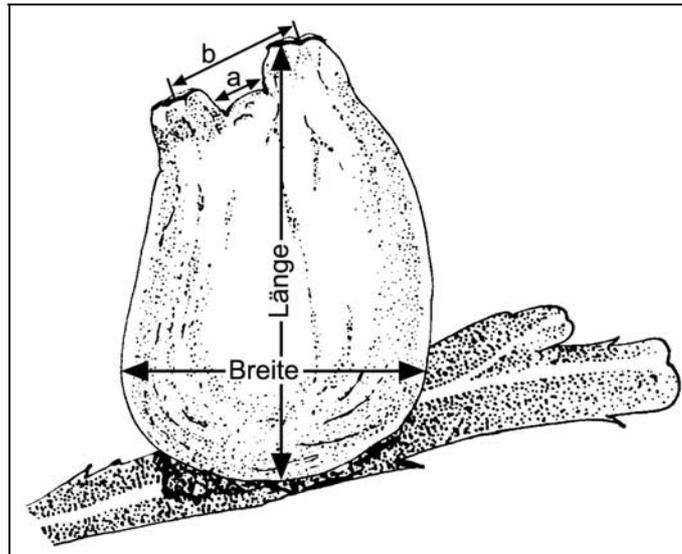


Abbildung 3.2: Schema zur Vermessung der äußeren Morphologie.

Darstellung der Parameter, die zum Vergleich der äußeren Morphologie der beiden *Ascidiella*-Populationen dienen. a: Distanz zwischen der Basis beider Siphone, b: Abstand der Siphonöffnungen.

Ein Vergleich der Mittelwerte der erhobenen morphologischen Daten zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Populationen (Abbildung 3.3). Die Unterschiede waren bei allen Merkmalen signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Sowohl in der Körperlänge als auch der Körperbreite waren die Individuen von Helgoland signifikant größer, allerdings nicht um mehr als das Doppelte, wie es in der Literatur bei dem Vergleich von *Ascidiella aspersa* mit *Ascidiella scabra* berichtet wird (Berrill 1950). Sowohl der Abstand der Siphone als auch der Abstand der Siphonöffnungen waren bei der Orkney-Population geringer als bei der Helgoland-Population. Das Verhältnis von Siphonabstand zur Körpergröße lag bei der Orkney-Population bei 10,9% und bei der Helgoland-Population bei 17,3%. Demgegenüber betrug der Abstand der Siphonöffnungen in beiden Populationen etwa $\frac{1}{3}$ der Körperlänge (30,5% Orkney, 33,8% Helgoland), wobei diese Distanz nach Berrill zumindest für *Ascidiella scabra* lediglich $\frac{1}{4}$ der Körperlänge betragen soll.

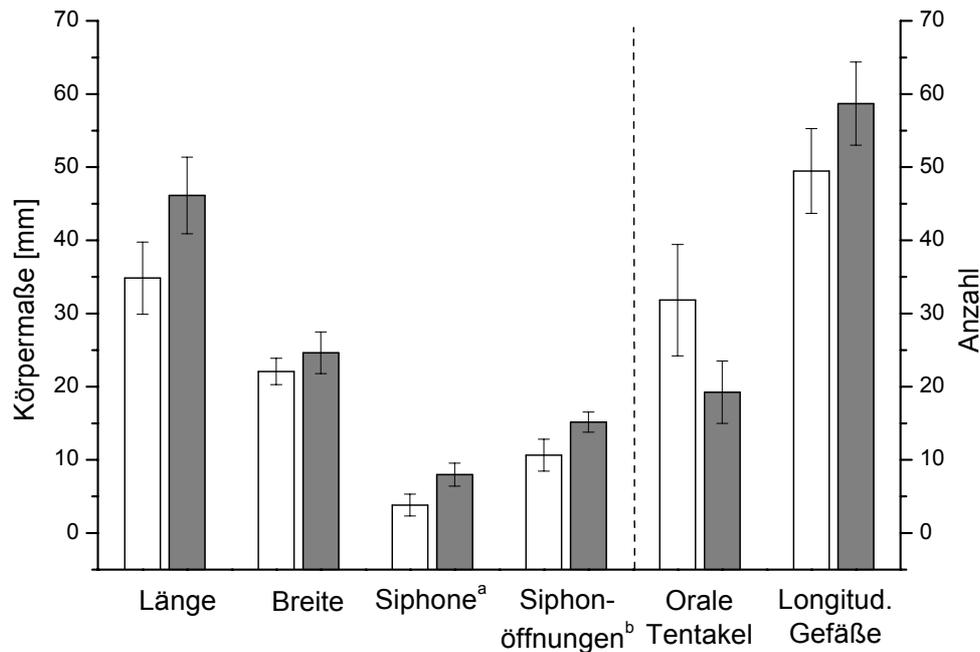


Abbildung 3.3: Daten des morphologischen Vergleichs der beiden *Ascidiella*-Populationen.

Dargestellt sind die morphologischen Parameter von Individuen der Orkney-Population (weiße Balken) und der Helgoland-Population (graue Balken). ^a Distanz zwischen der Basis beider Siphone. ^b Distanz zwischen den Siphonöffnungen.

Die Anzahl der oralen Tentakel war bei der Orkney-Population größer, die Anzahl der longitudinalen Gefäße des Branchialsacks aber geringer als bei der Helgoland-Population. Bei keiner der beiden Arten überstieg die Anzahl der oralen Tentakel die Anzahl der longitudinalen Gefäße, was Berrill (1950) als artspezifisches Merkmal für *Ascidiella scabra* beschreibt. Die Form des dorsalen Tuberkels konnte bei 49 von 50 präparierten Ascidiern der Orkney-Inseln und bei allen 32 Individuen von Helgoland bestimmt werden. Die dorsalen Tuberkel der Ascidiernpopulation Helgoland zeigten ausnahmslos eine elliptische Form mit nach innen eingeschlagenen Enden. 44 Individuen der Orkney-Population besaßen ebenfalls Tuberkel mit nach innen weisenden Enden, nur bei vier Individuen bogen sich ein oder beide Enden des Tuberkels nach außen oder wiesen eine gerade U-förmige Morphologie auf (Abbildung 3.5), so dass durch dieses Merkmal auch keine eindeutige Artzugehörigkeit abgeleitet werden konnte.

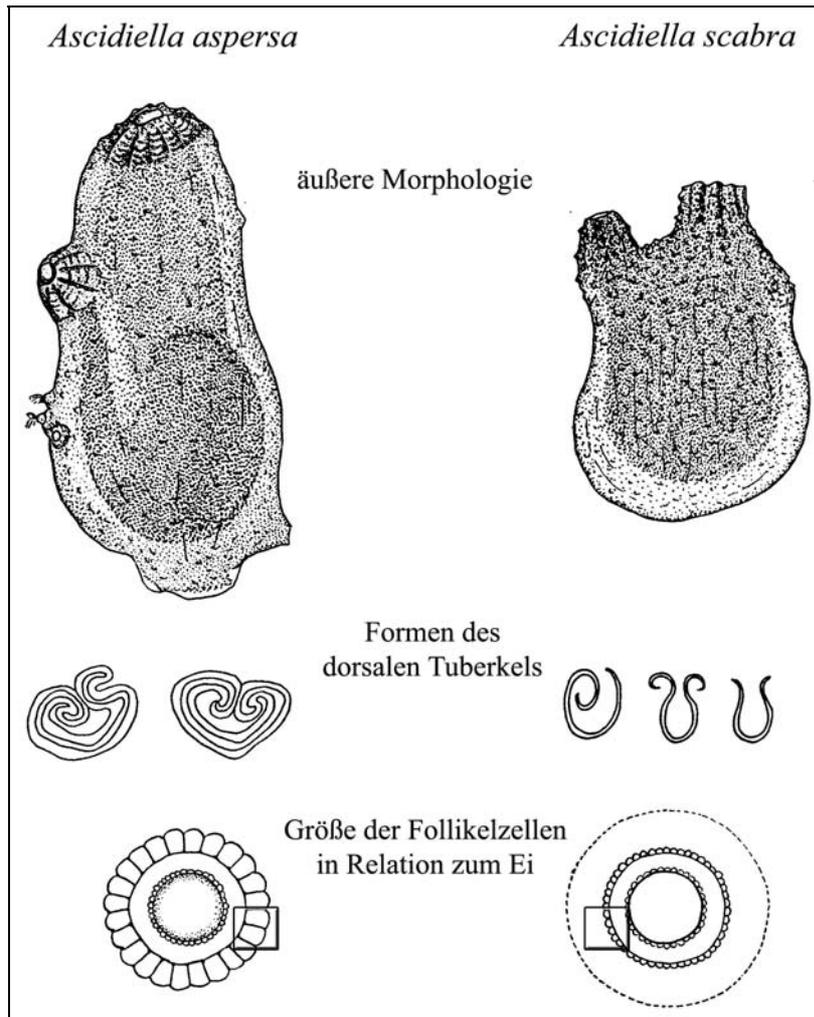


Abbildung 3.4: Morphologische Merkmale von *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra*.

Literaturbeschreibung der äußeren Morphologie, der Form des dorsalen Tuberkels sowie der Form der Eier und deren Follikelzellen (in den Kästchen) der Arten *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra* (Zeichnung verändert nach Berrill 1950).

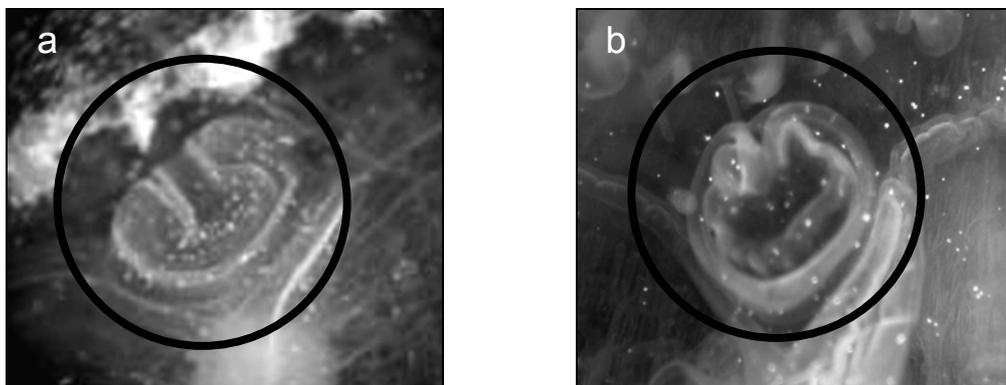


Abbildung 3.5: Dorsales Tuberkel eines *Ascidiella*-Individuums von Helgoland (a) und von den Orkney-Inseln (b).

Als Unterscheidungskriterium von systematischem Rang wurde die Morphologie der Eier betrachtet (Abbildung 3.4). Die Eier beider Arten sind im Schnitt 0,16 mm groß (Berrill 1950), weisen aber charakteristische Unterschiede in der Größe ihrer Follikelzellen auf. Die Follikelzellen der Eier von *Ascidiella aspersa* sind deutlich größer als die Eizellen und befähigen das Ei, einige Zeit in der Wassersäule zu treiben. Die Follikelzellen der Eier von *Ascidiella scabra* sind zahlreich, aber sehr klein, wodurch das Ei schnell absinkt. Ein Vergleich der Eizellen unter dem Binokular ergab, dass die Eier der Orkney-Population (n = 40) die Merkmale aufweisen, die für *Ascidiella scabra* beschrieben sind, und dass die Eier der Helgoland-Population (n = 25) den Beschreibungen für *Ascidiella aspersa* entsprechen. Somit wurde eine Zuordnung der beiden untersuchten Populationen zu zwei distinkten Arten möglich. Eine chemische Analyse könnte die Frage nach Verwandtschaftsbeziehungen vielleicht auch außerhalb der Laichzeit beantworten. Daher wurden die Rohextrakte der morphologisch untersuchten Tiere, getrennt nach Tunika und Körper, mit HPLC analysiert (siehe Kapitel 4.4.2). Für *Ascidiella aspersa* liegt jeweils ein zweiter Datensatz vor, da die beiden Sammlungen Anfang und Ende Juni getrennt bearbeitet wurden. Es konnten mit dieser Methode aber keine Unterschiede bezüglich der Hauptmetaboliten zwischen den Arten festgestellt werden (Abbildung 3.7). Die zehn Extrakte der einzeln bearbeiteten Individuen von *Ascidiella scabra* zeigten sogar größere Variationen in der chemischen Zusammensetzung (Abbildung 3.6), als zwischen den beiden Populationen auftraten. Eine weitergehende chemische Fraktionierung und Analyse könnte aber möglicherweise charakteristische Inhaltsstoffe der jeweiligen Art aufdecken.

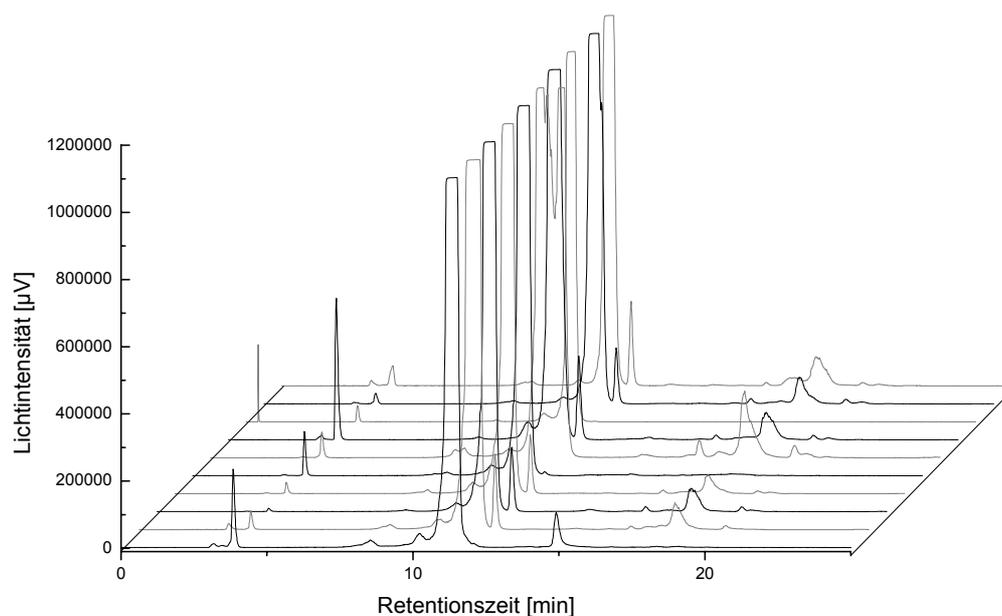


Abbildung 3.6: HPLC-Analyse der Rohextrakte von zehn Individuen der Art *Ascidiella scabra*.

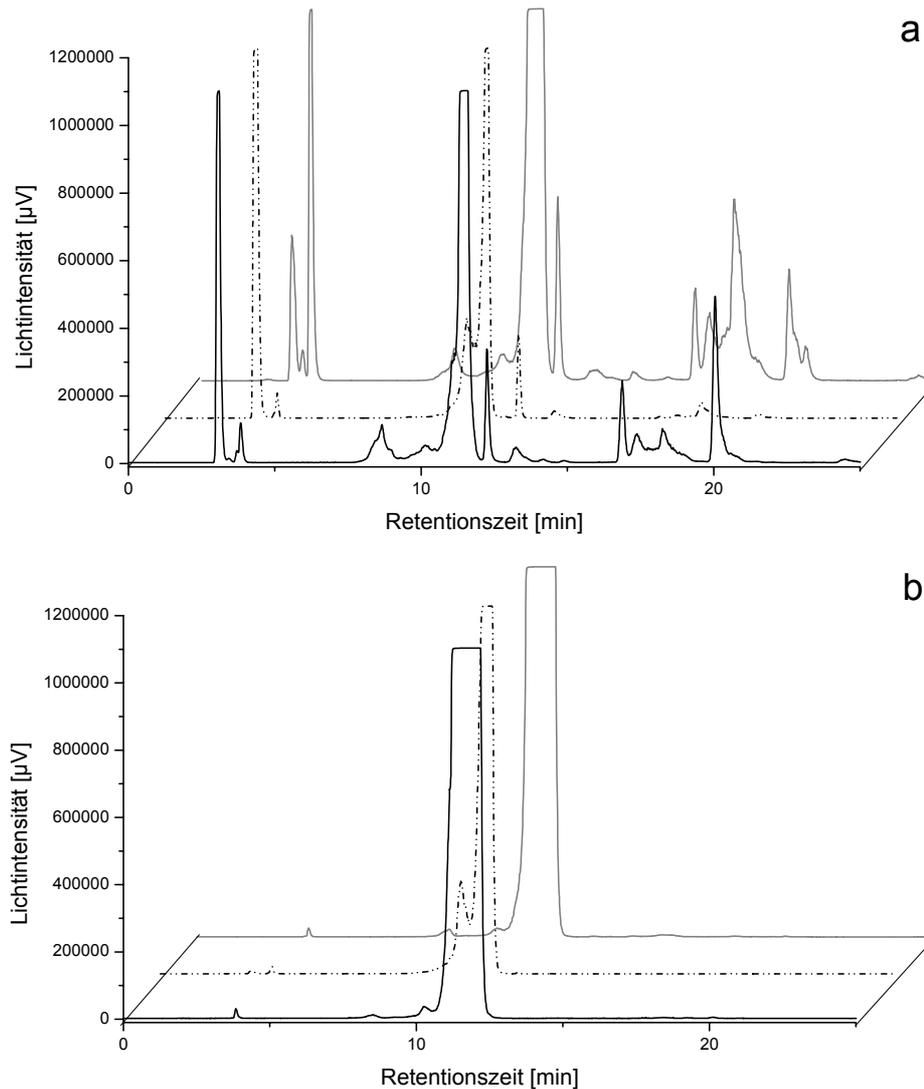


Abbildung 3.7: HPLC-Analyse der Rohextrakte von Individuen der Orkney-Inseln und Helgoland.

Chromatogramm a zeigt die Analyse der Körper, Chromatogramm b die der Tuniken beider Arten. Dargestellt sind jeweils die Chromatogramme der beiden Sammlungen von *Ascidiella aspersa* (schwarze und gestrichelte Linie, jeweils $n = 16$) und das Chromatogramm von *Ascidiella scabra* (graue Linie, $n = 50$).

Ein weiterer Ansatz zur Differenzierung beider Arten könnten molekularbiologische oder pharmakologische Tests darstellen, womit eine Artunterscheidung ohne aufwändige Isolierungsschritte möglich wäre. Eine molekulargenetische Analyse der beiden *Ascidiella*-Arten befindet sich in Vorbereitung, um den Grad der evolutiven Entfernung der Populationen der Orkney-Inseln und Helgolands abzuschätzen. Zur taxonomischen und phylogenetischen Analyse sollen Unterschiede der ribosomalen DNS (rDNS) herangezogen werden. Die drei ribosomalen Gene werden durch die *internal transcribed spacer* (ITS) Regionen voneinander separiert. Diese Regionen zeigen häufig eine höhere Variabilität als die rDNS-Sequenzen und können schon bei Arten der gleichen Gattung voneinander abweichen, während Unterschiede in den rDNS-

Sequenzen meist erst bei fern verwandten Arten auftreten (White *et al.* 1990, Coleman *et al.* 1997). Der Sequenzvergleich der ITS-Region zur Entschlüsselung von Verwandtschaftsbeziehungen wurde bei marinen Algen und Dinoflagellaten (Coleman *et al.* 1997, Shao *et al.* 2004) als auch bei marinen Invertebraten erfolgreich zum Einsatz gebracht (López-Pinòn *et al.* 2002, Wörheide *et al.* 2002). Als Referenz soll die Art *Ascidia mentula* als nah verwandte Gattung in die Untersuchung einbezogen werden.

3.2 Bioassays

3.2.1 Phytigel-Assay

Versuche mit in Phytagelen eingegossenen Extrakten aus Schwämmen und Ascidien sind zuvor in tropischen Gebieten durchgeführt worden (Henrikson *et al.* 1995, 1998, Pereira *et al.* 2002). Mit dieser Methodik können besiedlungshemmende Eigenschaften von Extrakten unter natürlichen Bedingungen getestet werden, da Laborversuche zu antimikrobiellen und larvenabwehrenden Stoffen nur bedingt die Übertragung auf natürliche Bedingungen zulassen. Der beschriebene Versuchsaufbau bietet die Vorteile, dass die enthaltenen Substanzen auf eine Weise „angeboten“ werden, die einer Oberfläche im natürlichen Umfeld in Struktur und physikalischen Eigenschaften entspricht. Die Gele wurden in einer Wasserumgebung unter natürlichen Larvendispersions- und Besiedelungsbedingungen inkubiert, die im Labor nicht nachgestellt werden können. Die in diesem Versuch angewendete Methodik lehnte sich an Versuche von Henrikson und Pawlik (1995, 1998) an. Der für diesen Versuch konstruierte Aufbau war für Nordseebedingungen geeignet. Die PVC-Platten waren sehr gut an den Leitern der Schwimmbadmole zu befestigen, und das Phytigel blieb über den Inkubationszeitraum trotz der teilweise sehr starken Strömung stabil. Nachteilig wirkte sich aus, dass die Apparatur nicht von Land aus erreichbar war. Dies und weitere Aspekte der Versuchsdurchführung werden zum Abschluss dieses Kapitel diskutiert.

Henrikson (1995) gab die Diffusionsrate von Substanzen aus dem Gel, ermittelt durch den Gewichtsverlust der unterschiedlich lang inkubierten Platten, als langsam und kontinuierlich an. Demnach waren nach 21 Tagen Inkubation noch 54% der ursprünglichen Substanzkonzentration im Gel enthalten. Im vorliegenden Versuch wurden die Diffusions-Kontrollgele am 6., 9., 12. und 18. Tag der Inkubation geborgen und eingefroren. Durch Gefriertrocknung und Extraktion mit Methanol sollte die Substanz aus den Gelen extrahiert und die Diffusionsrate aus den Gelen bestimmt werden. Es gelang jedoch nicht, die eingebettete Substanz quantitativ zu isolieren.

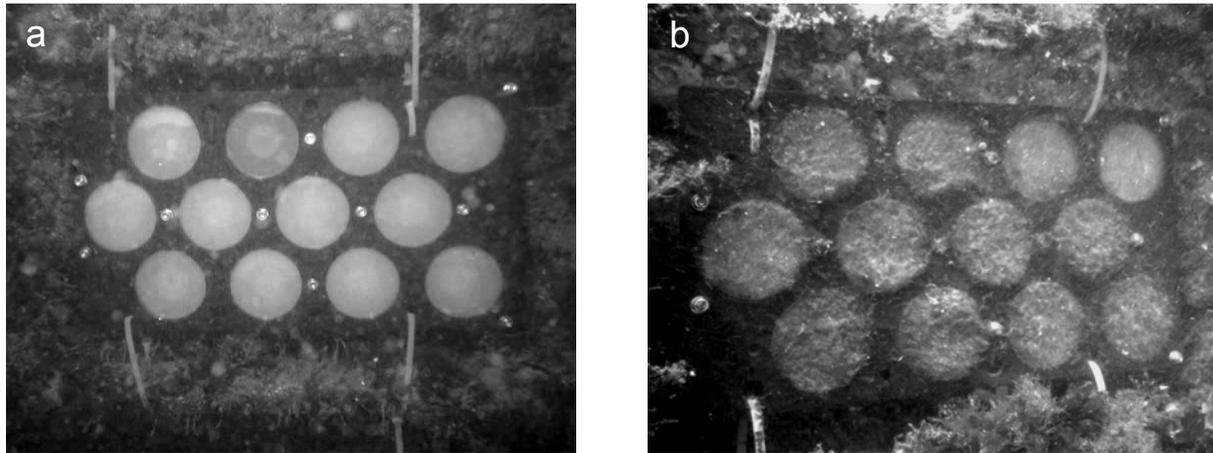


Abbildung 3.8: Eine der Phytagel-Platten vor und nach der Inkubation.

Zu sehen ist eine der Phytagel-Platten mit zwölf Phytagelen, angebracht zwischen den Sprossen einer Leiter an der Schwimmbadmole Helgoland auf einer Tiefe von sechs Metern, zu Beginn des Versuchs (a) und nach 36 Tagen Inkubation (b).

Die Bedeckung der Gele des Versuchs, der 36 Tage inkubiert wurde, war neben wenigen Invertebraten hauptsächlich auf die Grünalge *Acrosiphonia* sp. zurückzuführen (Abbildung 3.8). Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über den Grad des Bewuchses der Extrakt- und Kontrollgele, der visuell in vier Kategorien gegliedert wurde (siehe Kapitel 2.5.1). Die Kontrollen wurden im Durchschnitt der Bewuchskategorie 3 zugeordnet. Nur die Gele mit dem *n*-Butanolextrakt aus *Dendrodoa grossularia* zeigten einen Bewuchs der Kategorie 4. Die Gele mit Extrakten aus *Corella parallelogramma* wurden in diesem Versuch signifikant am wenigsten bewachsen (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD-Test, $p < 0,05$). Gele mit Substanzen von *Aplidium punctum* und *Ascidia virginea* wurden ebenfalls nur in geringem Maße von der Grünalge bedeckt. Der Besatz mit sessilen Organismen lag zwischen 0 bis drei Individuen pro Platte, die mit sechs sessilen Individuen größte Anzahl wurde auf einem Gel von *Ascidia virginea* gefunden. Gele mit Extrakten von *Dendrodoa grossularia* zeigten gar keinen Besatz mit sessilen Organismen. Bei der Betrachtung der Rohdaten war eine Abnahme der Anzahl sessiler Epibionten mit zunehmender Algenbedeckung zu beobachten, und die insgesamt geringe Ansiedlung sessiler Epibionten wurde auf den starken Bewuchs mit Algen zurückgeführt. Es war außerdem zweifelhaft, ob die im Gel enthaltenen Substanzen durch den Algent Teppich hindurch auf die Ansiedlung von sessilen Invertebraten Einfluss genommen haben konnten. Die rapide und massive Besiedelung der Phytagele mit Algensporen, die schon nach fünf Tagen deutlich erkennbar war, erfolgte deutlich schneller als in tropischen Gebieten, wo eine Besiedlung erst nach 2-3 Wochen beobachtet wurde (Pereira *et al.* 2002). Die ist auf einen durch ihren Nährstoffgehalt bedingten höheren Gehalt an planktischen Partikeln der temperierten Gewässer gegenüber tropischen Systemen zu erklären (Barnes *et al.* 1982). Der Versuch wurde daher

wiederholt, wobei die Gele in Abständen von drei bis sechs Tagen begutachtet wurden, um den Fortgang des Bewuchses zu kontrollieren und die Inkubation gegebenenfalls nach kürzerer Zeit abubrechen.

Die Inkubation des zweiten Versuchs wurde nach 26 Tagen beendet, weil sich der Algenbewuchs zu dem Zeitpunkt deutlich verstärkte. Die Kontrollen waren am wenigsten bewachsen und wurden in die Kategorie 1 eingeordnet. Die Extraktgele zeigten Bewuchsgrade zwischen 2 und 3. Ein Bewuchs der Kategorie 4 fehlte (Tabelle 3.1), der allerdings im ersten Versuch lediglich bei dem *n*-Butanolextrakt von *Dendrodoa grossularia* auftrat, der im zweiten Versuch nicht eingesetzt wurde. Der insgesamt geringere Bewuchs der Gele wurde dennoch darauf zurückgeführt, dass der zweite Versuch nach kürzerer Inkubationszeit abgebrochen wurde als der erste. Der geringe Bewuchs von *Aplidium punctum* des ersten Versuchs ließ sich im zweiten Versuch bestätigen. Auch die anderen Extraktgele zeigten jeweils einen mit den Ergebnissen des ersten Versuchs vergleichbaren Bewuchsgrad. Einzig die Kontrollgele waren deutlich weniger bewachsen. Daher erwies sich auch die starke Bedeckung der Gele von *Asciidiella scabra*, *Ascidia mentula*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* gegenüber den Kontrollen als signifikant (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD-Test, $p < 0,05$).

In beiden Versuchsansätzen wurden die Gele mit Balaniden der Art *Semibalanus balanoides* und mit Hydrozoen der Gattungen *Obelia* besiedelt. Im ersten Versuch waren zusätzlich eine Muschel der Art *Mytilus edulis* sowie einzelne Fäden von Rotalgen, im zweiten Versuch Ascidien der Arten *Asciidiella aspersa* und *Didemnum candidum* sowie Larvenester und Gelege zu finden, die keiner Art zugeordnet werden konnten. Der Durchschnitt an sessilen Invertebraten lag im zweiten Versuch mit 18 (± 18) je Gel deutlich höher als im ersten Versuch, was hauptsächlich auf ein vermehrtes *Settlement* von Balaniden zurückging. Die Gele mit Extrakten aus *Dendrodoa grossularia* wurden in beiden Versuchen am wenigsten von sessilen Epibionten besiedelt, gefolgt von den Extraktgelen der Ascidienarten *Ascidia mentula* und *Asciidiella scabra*. Die im Vergleich zur Kontrolle geringere Besiedlung dieser Gele ist aber in beiden Versuchen nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA; Tukey HSD, $p < 0,05$).

Tabelle 3.1: Algendichte und Anzahl der sessilen bzw. assoziierten Epibionten der Extraktgele der Versuche 1 und 2.

Versuch 1	Algendichte (Kategorien 1 - 4)	Sessile Epibionten (Anzahl)	Assoz. Epibionten (Anzahl)
<i>Corella parallelogramma</i> R	1,0 ± 0 ^{a)}	1,0 ± 1,7	12,0 ± 9,6
<i>Aplidium punctum</i> R	1,7 ± 0,6	1,7 ± 2,9	7,3 ± 3,2
<i>Ascidia virginea</i> R	2,0 ± 1,0	3,3 ± 2,5	11,3 ± 6,0
<i>Ascidiella scabra</i> R	2,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2	21,7 ± 1,5
<i>Didemnum candidum</i> R	2,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	28,3 ± 13,7
<i>Dendrodoa grossularia</i> R	2,7 ± 0,6	0	18,0 ± 5,0
<i>Dendrodoa grossularia</i> E	3,0 ± 0	0	15,3 ± 6,7
<i>Ascidia mentula</i> R	3,0 ± 1,0	0,3 ± 0,6	14,3 ± 3,2
Kontrolle (Methanol)	3,0 ± 1,1	1,5 ± 1,9	19,8 ± 9,3
<i>Dendrodoa grossularia</i> B	3,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	23,7 ± 6,8

Versuch 2	Algendichte (Kategorien 1 - 4)	Sessile Epibionten (Anzahl)	Assoz. Epibionten (Anzahl)
Kontrolle (Methanol)	1,0 ± 0	17,0 ± 13,0	25,3 ± 18,4
<i>Aplidium punctum</i> R	2,3 ± 1,2	16,3 ± 17,2	28,7 ± 16,9
<i>Ascidiella aspersa</i> F	2,3 ± 0,6	18,7 ± 16,7	38,0 ± 19,7
<i>Dendrodoa grossularia</i> R	2,7 ± 0,6 ^{b)}	7,0 ± 1,0	12,0 ± 3,0
<i>Didemnum candidum</i> R	2,7 ± 0,6 ^{b)}	34,0 ± 32,0	22,7 ± 3,2
<i>Ascidiella scabra</i> R	3,0 ± 0 ^{b)}	11,5 ± 2,1	65,5 ± 3,5
<i>Ascidia mentula</i> R	3,0 ± 0 ^{b)}	16,3 ± 25,7	12,7 ± 3,2

Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung aus jeweils drei Extraktgelen und sechs (Versuch 1) bzw. vier (Versuch 2) Kontrollgelen berechnet. Die Werte der Algendichte wurden in Kategorien, die der Epibionten als Anzahl angegeben. Gele mit einem signifikant geringeren Algenbewuchs als die Kontrolle sind mit ^{a)}, Gele mit einem signifikant stärkeren Algenbewuchs als die Kontrolle mit ^{b)} gekennzeichnet.

R: Rohextrakt, E: Essigesterphase, B: *n*-Butanolphase, F: Frischmaterial.

Der sprunghafte Anstieg des Balanidenbesatzes sowie das Auftreten der neuen Arten im zweiten Versuch machen deutlich, dass erst im Juni die Hauptverbreitung der Invertebratenlarven stattgefunden hat. Die geringe Ansiedlung von sessilen Invertebraten im ersten Versuch ist daher vermutlich nicht durch eine Verdrängung der Invertebraten durch Algen, sondern durch eine niedrige Anzahl von pelagischen Larven in der Wassersäule verursacht worden. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass sich auch auf Gelen des Bewuchsgrads 3 im zweiten Versuch deutlich mehr sessile Organismen ansiedelten als auf gleichermaßen bewachsenen Gelen des ersten Versuchs (Abbildung 3.9). Es muss daher bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass das Spektrum an Larvenarten mit der Jahreszeit variiert. Damit können Unterschiede in der Besiedlung eines Gels nicht mehr zweifelsfrei auf einen abwehrenden Effekt der inkorporierten Substanz zurückgeführt werden, sondern könnten auch durch die substratspezifischen Bedürfnisse der Larvenart bedingt sein.

Zur Auszählung der assoziierten Epibionten wurden die PVC-Platten in einem Fließwasserbecken gelagert, aus dem die Gele nacheinander entnommen wurden. Die Auszählung dauerte etwa einen Tag. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass sich der eine oder andere Organismus von einem Gel zum anderen bewegt hat. Auf eine statistische Auswertung wurde daher verzichtet. Zur tendenziellen Feststellung der mobilen Epibionten sollte diese Art der Zählung aber ausreichen. Es wurden in beiden Versuchen kleine Gehäuseschnecken, Copepoden, Amphipoden, Raubmilben und Polychaeten sowie Planarien in dem Algenbewuchs gefunden. Im ersten Versuch fanden sich zusätzlich eine geringe Anzahl an Caprelliden sowie ein kleiner Seestern, die nicht als Unterschied im Besatz an mobilen Epibionten gewertet werden können. Auffällig war aber, dass die Anzahl der assoziierten Organismen im zweiten Versuch mit 574 Individuen auf 21 Gelen (Mittelwert: 27 ± 19) deutlich größer war als im ersten Versuch (575 Individuen auf 33 Gelen; Mittelwert: 17 ± 9). Es ergab sich in beiden Versuchen ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Algendichte auf den Gelen und der Zahl an assoziierten Organismen, der sich durch die Entstehung eines Mikrohabitats mit einem mechanischen Strömungsschutz sowie die Bereitstellung an Nahrung durch die Algen selbst oder sich dort verfangene Detrituspartikel erklären lässt. Ein Einfluss der Algenbedeckung auf die Besiedlung mit sessilen Organismen wurde nicht festgestellt (Abbildung 3.9).

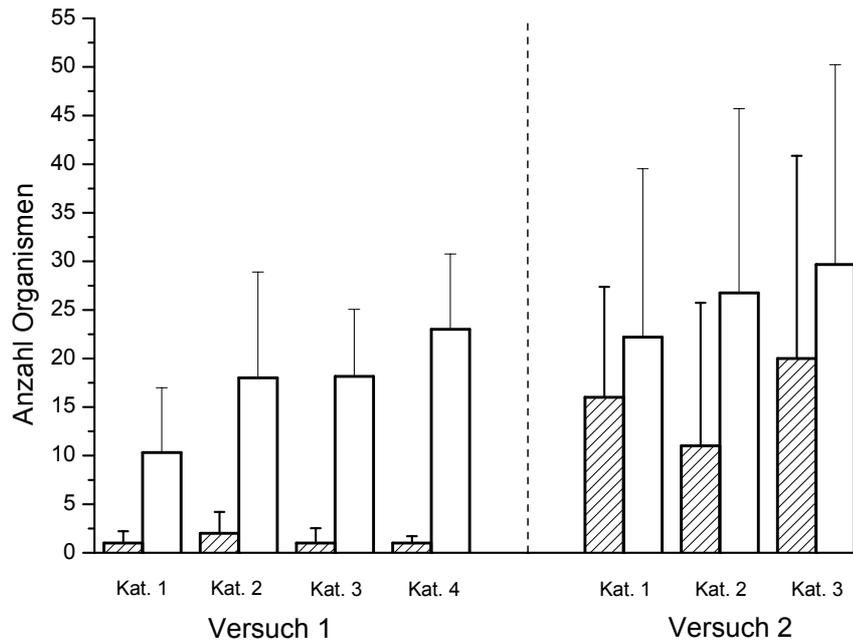


Abbildung 3.9: Anzahl der Epibionten in Relation zum Algenbewuchs.

Dargestellt ist die Anzahl der sessilen (schattiert) und assoziierten (weiß) Organismen ($MW \pm STD$) auf den Gelen der Bewuchsgrade 1 bis 4 des ersten Versuchs (links) und der Bewuchsgrade 1 bis 3 des zweiten Versuchs (rechts).

Ein großer Nachteil in diesem Versuchsansatz war der große taucherische Aufwand. Die Gele konnten nicht, wie in den zitierten Arbeiten von Henrikson, an Apparaturen angebracht werden, die regelmäßig aus dem Wasser entnommen und ausgezählt werden konnten. Stattdessen waren die Platten nur in wenigen, aufwändigen Taucheinsätzen zu erreichen, was eine detaillierte Dokumentation der Sukzession der Besiedlung verhinderte. Zur differenzierteren Interpretation der *Settlement*-Ergebnisse wäre in folgenden Versuchen zu ermitteln, welche physikalischen Aspekte des Phytagels eine Besiedlung durch Algensporen und Invertebratenlarven eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass die Festigkeit der Oberfläche, ihre Benetzbarkeit sowie pH-Werte für Larven in der Auswahl eines Untergrundes eine Rolle spielen (Pawlik 1992, Rodríguez *et al.* 1993). Es wurde zwar in diesem und den Versuchen von Henrikson gezeigt, dass die Gele eine weiche, aber widerstandsfähige Matrix darstellen, die als Substrat für diverse Invertebratenlarven geeignet ist. Der Einfluss verschiedener Gelzusammensetzungen und der damit verknüpften physikalischen Charakteristika auf die Besiedlung ist allerdings nicht bekannt. Diese Parameter sowie spezifische Larven- oder sporenabwehrende Eigenschaften von einzelnen Extrakten lassen sich mit Sicherheit mit kleinen Gelansätzen im Labor besser herausfinden (Wahl *et al.* 1994). Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Freilandtest stellt aber trotz der notwendigen Modifikationen wie einfachere Erreichbarkeit und physikalische Charakterisierung des Phytagels eine gute Möglichkeit dar, die Auswirkungen von chemischen Substanzen aus Invertebraten in ihrem natürlichen Habitat unter den dort herrschenden Bedingungen zu untersuchen.

3.2.2 Antimikrobieller Assay

Mit dem Agar-Diffusions-Assay sollten antimikrobielle Effekte der Ascidienextrakte nachgewiesen werden. Dazu wurden die Extrakte auf Filterblättchen aufgetragen und diese auf mit Bakterien beimpften Agarosegelen inkubiert. Antimikrobielle Wirkung zeigte sich an Hemmhöfen um die Filterblättchen, deren Breite über die Auswertung digitaler Fotos ermittelt wurde. Die Hemmaktivität wurde sowohl für bakterizide als auch für bakteriostatische Effekte angegeben. Das Kriterium zur Auswertung der Hemmhöfe war ein dichter, gleichmäßiger Bakterienrasen auf dem Weichagar. Die Hemmhofbreite der Ansätze von *Pseudoalteromonas* sp. und *Pseudoalteromonas tetraodonis* konnte nicht ermittelt werden, da der Bakterienrasen auf den digitalen Fotos nicht zu erkennen war. Alle getesteten Ascidienarten zeigten hemmende Aktivitäten (Tabelle 3.2). Abgesehen von *Ascidia virginea* inhibierte jede Ascidienart mehrere Bakterienstämme. Neun Ascidienarten hemmten sowohl marine als auch nicht-marine Bakterienstämme, bei jeweils drei Ascidienarten war die Hemmwirkung auf Bakterienstämme eines Habitats beschränkt. Es wurden hauptsächlich Hemmhöfe von unter 1 mm Breite registriert. Die drei Ascidienarten *Ascidiella aspersa* (Doggerbank), *Corella parallelogramma* und *Botrylloides leachi* zeigten mit Hemmhöfen von 2-3 mm Breite gegen einzelne marine Bakterienstämme die stärksten antimikrobiellen Aktivitäten des Tests, wiesen aber mit drei bis fünf inhibierten Bakterienstämmen ein durchschnittliches antimikrobielles Spektrum auf. *Ascidiella virginea* zeigte mit nur einer Fraktion Aktivität gegen einen Bakterienstamm und damit die geringste antimikrobielle Wirkung des Tests. *Ascidiella aspersa* (Helgoland) wies die breiteste antimikrobielle Aktivität auf. Extrakte dieser Art inhibierten sieben der 25 Mikroorganismenarten, allerdings waren hauptsächlich schwache Effekte zu sehen.

Die aktiven Ascidienextrakte wurden bis auf diejenigen von *Ascidiella aspersa* (B), die nicht mehr in ausreichender Menge vorlagen, in einem Konzentrationsversuch mit 400 µg, 200 µg und 100 µg Substanz erneut getestet. Es wurden die Bakterienstämme eingesetzt, gegen die die getesteten Substanzen im ersten Versuch aktiv waren. In Abweichung davon wurden die Stämme Alpha proteobacterium [AJ244780.1] und *Comamonas testosteroni* aus Zeitmangel nicht getestet. Stattdessen wurden Konzentrationsversuche mit *Pseudoalteromonas* sp. durchgeführt, bei denen allerdings keine Hemmhöfe erkennbar waren. Etwa die Hälfte der zuvor erhaltenen Hemmwirkungen war reproduzierbar, die Hemmhöfe waren allerdings weniger ausgeprägt. So traten keine Hemmhöfe breiter als 2 mm auf. Die Konzentrationsreihen wirkten nach einem „Alles oder nichts“-Prinzip. Jeder Effekt bei 400 µg Konzentration ließ sich bis zur 100 µg-Konzentration verfolgen, wobei die Aktivität sowohl positiv als auch negativ mit der Extraktkonzentration korreliert sein konnte.

Tabelle 3.2: Anzahl der durch jede Ascidiensart gehemmten Bakterienstämme.

Art	Gehemmte Bakterienstämme	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Ascidella scabra</i>	2			█	█					
<i>Ascidia virginea</i>	1		█							
<i>Ascidia mentula</i>	3			█	█	█				
<i>Aplidium punctum</i>	5			█	█	█	█	█		
<i>Botrylloides leachi</i>	3			█	█	█				
<i>Botryllus schlosseri</i>	5			█	█	█	█	█		
<i>Corella parallelogramma</i>	3			█	█	█				
<i>Dendrodoa grossularia</i>	3			█	█	█				
<i>Didemnum candidum</i>	3			█	█	█				
<i>Polyclinum aurantium</i>	4			█	█	█	█			
<i>Sidnyum turbinatum</i>	3			█	█	█				
<i>Trididemnum cereum</i>	4			█	█	█	█			
<i>Ascidella aspersa</i> B	2			█	█					
<i>Ascidella aspersa</i> H	7			█	█	█	█	█	█	
<i>Ascidella aspersa</i> D	5			█	█	█	█	█		

B: Bretagne, H: Helgoland, D: Doggerbank.

Graphische Darstellung: schraffiert: marin/nicht marin; weiß: marin; grau: nicht marin.

Zwölf der 25 Bakterienstämme wurden von den Ascidiensextrakten gehemmt (48%). Abgesehen von den Archaea und Planctomyces wurden Vertreter aus allen Bakteriengruppen inhibiert. Dabei wurden drei von sieben Gram-positiven Bakterienstämmen (Actinobacteria) gehemmt (42,9%) und einer von zwei Stämmen der Cytophaga (50%). Die Stämme der Proteobacteria (Gram-negativ) erwiesen sich als empfindlichste Gruppe. Von 14 getesteten Stämmen dieser Gruppe wurden acht inhibiert (57%). Die Empfindlichkeit gegenüber Ascidiensextrakten ließ sich mit der Herkunft der Bakterienstämme korrelieren. Von den nicht-marinen Bakterienstämmen wurden lediglich 33% inhibiert. Dem gegenüber wurden die marinen Bakterien mit 60% und die Schwammisolate mit 57% fast doppelt so oft von den Extrakten beeinflusst. Zwar hemmten nur

drei Ascidienarten ausschließlich marine Bakterien, dass aber insgesamt mehr marine als terrestrische Bakterienstämme inhibiert wurden, spricht für eine auf ihre Umwelt spezialisierte antimikrobielle Aktivität der Ascidien. Da aber neben dem marinen Bakterium *Zobellia uliginosa* (Cytophaga) auch das nicht-marine Bakterium *Microbacterium barkeri* (Actinobacteria) am empfindlichsten auf die Ascidienextrakte reagierte, wäre es notwendig, in einem Folgeversuch freilebend marine Gram-positive Stämme einzuschließen und den Einfluss des Zellwandaufbaus auf diese Ergebnisse abzuschätzen.

Tabelle 3.3: Anzahl der die jeweiligen Bakterienstämme hemmenden Ascidienarten.

Organismus	*	Aktive Ascidien	0 2 4 6 8 10
Actino-bacteria	Gram-positive bacterium str. 121	<i>Hp</i>	3
	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Hp</i>	0
Gram-positiv	<i>Microbacterium barkeri</i>	nm	10
	<i>Planococcus citreus</i>	nm	0
	<i>Streptomyces purpureus</i>	nm	0
	<i>Bacillus badius</i>	nm	1
	<i>Bacillus subtilis</i>	nm	0
Proteo-bacteria	Alpha proteobacterium	<i>Hp</i>	1
	<i>Roseobacter litoralis</i>	<i>Hp</i>	3
Gram-negativ	<i>Ruegeria algicola</i>	m	2
	<i>Comamonas testosteroni</i>	nm	7
	<i>Alteromonas macleodii</i>	<i>Hp</i>	0
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Hp</i>	7
	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	m	0
	<i>Vibrio fischeri</i>	m	2
	<i>Vibrio harveyi</i>	m	2
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	nm	0
	<i>Escherichia coli</i>	nm	0
	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	nm	5
	<i>Serratia rubidaea</i>	nm	0
	<i>Xanthomonas campestris</i>	nm	0
Flavobact./	<i>Cytophaga</i> sp. Gene	<i>Hp</i>	0
Cytophaga	<i>Zobellia uliginosa</i>	m	10
Archaea	<i>Halobacterium salinarium</i>	nm	0
Planctom.	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	m	0

* Herkunft der Bakterienstämme: *Hp*: Isolat aus dem Schwamm *Halichondria panicea*, nm: nicht-marin, m: marin. Das Diagramm stellt die Daten graphisch dar.

Tabelle 3.4: Bewertung der ausgemessenen Hemmhöfe nach ihrer Breite.

Art		Actinobacteria			Proteobacteria						Cyto- phaga	
		High GC	Low GC		α			β	γ			
		Gram-positive bacterium strain 121	<i>Microbacterium barkeri</i>	<i>Bacillus badius</i>	Alpha proteobacterium	<i>Roseobacter litoralis</i>	<i>Ruegeria algalicola</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Zobellia uliginosa</i>	
<i>Asciidiella scabra</i>	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+
	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+
<i>Ascidia mentula</i>	R	0	0	0	0	0	0	+	0	0		+
	P	0	0	0	0	0	0	+	0	0		+
<i>Aplidium punctum</i>	R	0	0	0	0	0	0	+	0	0		+
	P	+	+	0	0	0	0	+	0	0		++
<i>Botrylloides leachi</i>	R	0	0	0	0	0	0	+	0	0		+++
	P	0	+	0	0	0	0	+	0	0		++
<i>Botryllus schlosseri</i>	R	0	0	0	0	0	+	+	0	0		+
	P	0	+	0	0	0	+	+	0	0		+
<i>Corella parallelogramma</i>	R	0	0	0	0	0	0	++	0	0		0
	P	0	+	0	0	+++	0	+	0	0		0
<i>Dendrodoa grossularia</i>	R	0	0	0	0	0	+	0	0	0		0
	P	0	0	0	++	0	+	0	0	0		0
<i>Didemnum candidum</i>	R	0	+	0	0	0	0	+	0	0		0
	P	0	++	0	0	0	0	+	0	0		0
<i>Polyclinum aurantium</i>	R	0	++	0	0	0	0	+	0	0		++
	P	0	++	0	0	0	0	+	0	0		+
<i>Sidnyum turbinatum</i>	R	0	++	0	0	0	0	0	0	0		0
	P	0	++	0	0	0	0	0	0	0		0
<i>Trididemnum cereum</i>	R	0	+	0	0	0	0	0	0	0		+
	P	0	+	0	0	0	0	0	0	+		++
<i>Asciidiella aspersa</i> B ¹⁾	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0		+
	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0		++
<i>Asciidiella aspersa</i> H	R	0	++	+	0	0	0	0	+	0		+
	P	+	++	+	0	++	0	0	+	0		+
<i>Asciidiella aspersa</i> D	R	0	+	0	0	0	0	0	+	0		+
	P	+++	+	0	0	+	0	0	+	0		+
400 μ g		0	keine Hemmung		+	< 1 mm	++	1 mm \leq x \leq 2 mm		+++	> 2 mm	
Konzentrationsversuch										--		

Die Ziffern markieren die Ergebnisse des ersten Versuchs (400 μ g), die Zellenfärbung markiert die Ergebnisse des Konzentrationsversuchs.

¹⁾ nicht im Konzentrationsversuch getestet. B: Bretagne, H: Helgoland, D: Doggerbank.
R: Rohextrakt, P: Phasen, angegeben ist jeweils der stärkste beobachtete Effekt.

Bakterien sind die ersten Organismen, die eine freie Oberfläche im marinen Habitat kolonisieren. Der resultierende Biofilm zieht eine Besiedlung mit *Fouling*-Organismen wie Bryozoen, Hydrozoen und Polychaeten nach sich (ZoBell *et al.* 1934). Generell ist eine stärkere Besiedlung mit *Fouling*-Organismen bei Oberflächen zu beobachten, die einen Biofilm aufweisen, als bei sauberen Oberflächen (Todd *et al.* 1994, Keough *et al.* 1995). Die Besiedlung toter Oberflächen mit Mikroorganismen und nachfolgenden Makrobionten geht relativ schnell vonstatten und beruht vor allem auf physikalischen Gegebenheiten. Die Besiedlung von Oberflächen lebender Organismen ist dagegen zusätzlich abhängig von der chemischen Interaktion von Organismus und Mikroorganismen. Bei tropischen und subtropischen Schwämmen und Ascidien wurde eine negative Korrelation zwischen antimikrobieller Aktivität der Schwammextrakte und ihrer epibiontischen Besiedlung festgestellt (McCaffrey *et al.* 1985, Davis *et al.* 1989b). Dies legt die Vermutung nahe, dass die in diesem Versuch beobachtete antimikrobielle Aktivität bei Ascidien dazu dient, einen Biofilm auf der Tunika zu verhindern und somit *Fouling*-Organismen das Substrat zu entziehen. Auffällig ist aber, dass gerade die Ascidienarten *Ascidia virginea* und *Corella parallelogramma*, die in ihrem natürlichen Lebensraum sehr wenig bis keine epibiontische Besiedlung aufweisen (persönliche Beobachtung), nur sehr geringe antimikrobielle Aktivität zeigten, andererseits die breiteste antimikrobielle Aktivität bei der Art *Ascidiella aspersa* zu beobachten war, deren Tunika im Feld sehr stark von Algen und kleinen Epibionten besetzt ist. Tatsächlich haben weitergehende Untersuchungen festgestellt, dass nicht nur die Anwesenheit eines Biofilms die Besiedlung einer Oberfläche bestimmt, sondern dass Larven verschiedener Invertebratenphyla sehr differenziert auf die Beschaffenheit des Films bezüglich der physikalischen und chemischen Eigenschaften reagieren (Crisp *et al.* 1960, Wiczorek *et al.* 1997, Unabia *et al.* 1999). Beide Beobachtungen legen nahe, dass Invertebraten nicht generell eine Besiedlung durch Mikroorganismen abwehren, sondern dass sie durch chemische Lock- oder Abwehrstoffe die Zusammensetzung des Bakterienrasens regulieren (Beccero *et al.* 1994, Wahl *et al.* 1994, Wahl 1995, Kelman *et al.* 2001) und eine Abwesenheit von toxischer Aktivität nicht zwangsläufig eine Abwesenheit von Mechanismen bedeutet, die die Besiedlung der Tunika steuern. Vorstellbar ist auch, dass nicht nur der Wirt, sondern auch schon vorhandene Bakterienarten oder Symbionten an der Regulierung der mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilms beteiligt sind (Holmström *et al.* 1992, Wahl 1995, Thakur *et al.* 2000, Romanenko *et al.* 2001) und darüber die Ansiedlung von Makroorganismen steuern.

Einige Bakterienstämme induzierten verstärktes Wachstum oder Verfärbungen der Bakterienkolonien. Extrakte von *Ascidiella scabra*, *Ascidia mentula* und *Didemnum candidum* riefen ein verstärktes Wachstum von *Escherichia coli* hervor, Extrakte von *Polyclinum aurantium* und *Ascidiella aspersa* (H und D) führten bei *Planococcus citreus* ebenfalls zu verstärktem Wachstum um die Extraktblättchen (Abbildung 3.10). Induziertes Wachstum ließe sich durch eine Bereitstellung von Nährstoffen mittels des Ascidiensextraktes erklären, die über die Versorgung durch das Nährmedium hinausging. Möglicherweise kann man sich eine bevorzugte Besiedlung der Ascidentunika durch bestimmte Bakterienstämme durch deren stoffwechselbedingte Möglichkeit vorstellen, einige Substanzen der Ascidie für ihr Wachstum besonders zu nutzen.

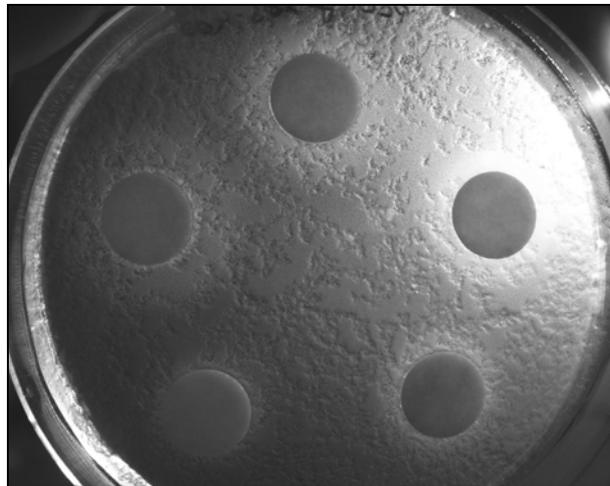


Abbildung 3.10: Induziertes Bakterienwachstum um Filterblättchen mit Ascidiensextrakten.

Dargestellt ist das verstärkte Wachstum von *Planococcus citreus* bei Inkubation mit Extrakten von *Ascidiella aspersa* (Helgoland).

Verfärbungen der Bakterienkolonien konnten bei den Stämmen *Planctomyces brasiliensis* und *Streptomyces purpureus* beobachtet werden. Die Kolonien von *Planctomyces brasiliensis* waren in der Regel weißlich-farblos. Auf den Platten mit Extrakten von *Polyclinum aurantium*, *Sidnyum turbinatum* und *Ascidiella aspersa* (D) färbten sich einige Kolonien gelb, mit Extrakten von *Botryllus schlosseri* und *Trididemnum cereum* rosa. Die normalerweise weißlichen Kolonien von *Streptomyces purpureus* verfärbten sich bei Inkubation mit Extrakten von *Botryllus schlosseri* und *Sidnyum turbinatum* rot (Abbildung 3.11). Die Verfärbung von Bakterienkolonien deutet darauf hin, dass bestimmte Stoffwechselwege durch Metaboliten des Ascidiensextraktes aktiviert oder modifiziert worden sind, ohne das Wachstum dieser Kolonien zu beeinflussen. Welche Bedeutung diese Modifizierung der Stoffwechselwege für das Bakterium hat, müsste in folgenden Versuchen geklärt werden.

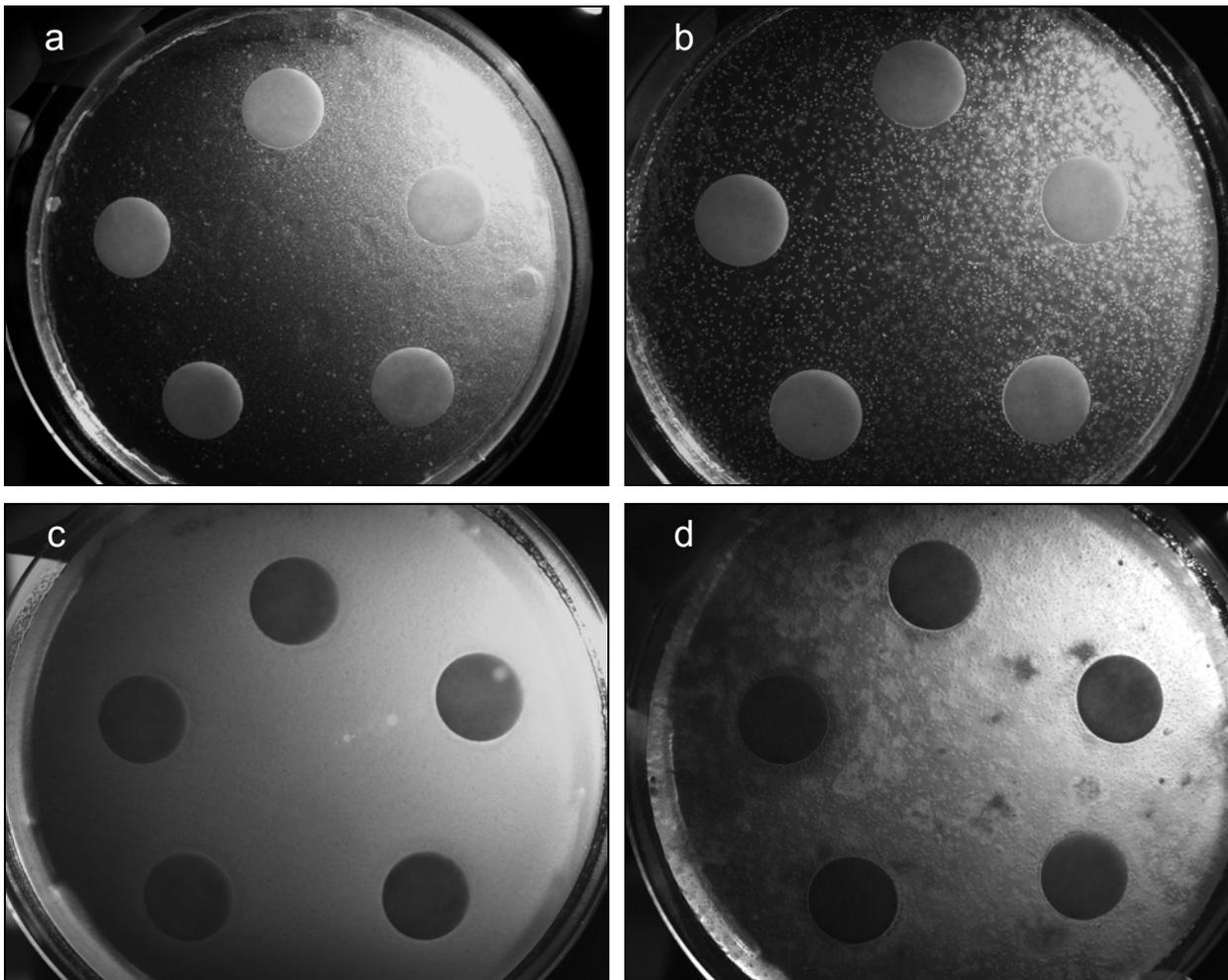


Abbildung 3.11: Durch Inkubation mit Ascidienextrakten verfärbte Bakterienkolonien.

Gelb (a) bzw. rosa (b) gefärbte Kolonien des Bakterienstammes *Planctomyces brasiliensis*, inkubiert mit Extrakten von *Polyclinum aurantium* bzw. *Trididemnum cereum*. Normaler Wuchs von *Streptomyces purpureus* (c) und rote Kolonien desselben Bakterienstammes bei Inkubation mit Extrakten aus *Sidnyum turbinatum* (d). (Eine farbige Ausgabe der Dissertation ist im Internet verfügbar. Adresse siehe vorderer Einband.)

Der Agar-Diffusions-Assay wurde in der Form, wie er in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, seit Jahrzehnten zur Untersuchung diverser mariner Phyla auf der Suche nach neuen Sekundärmetaboliten und ihrer Funktion genutzt. Vor allem bei Schwämmen sowohl aus tropischen als auch temperierten Gewässern wurden mittels dieser Methode breit angelegte antimikrobielle Screenings durchgeführt (Burkholder *et al.* 1969, Bergquist *et al.* 1978, Amade *et al.* 1982, Amade *et al.* 1987, Kelman *et al.* 2001). Schwämme beider Breiten zeigten sich sehr aktiv gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wobei inaktive Schwämme ebenfalls häufig in beiden Verbreitungsgebieten zu finden waren. Die Versuche warfen die Diskussion auf, inwiefern die These, dass tropische Invertebraten in der Regel eine höhere antimikrobielle Aktivität aufweisen als solche temperierter Gewässer, gerechtfertigt sei. Durchschnittliche Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Bakterienstämmen sowie häufige

antimikrobielle Inaktivität sind von Ascidien beider geographischer Räume dokumentiert (Davis *et al.* 1989b, Teo *et al.* 1994, Ramasamy *et al.* 2003). Auffällige Unterschiede in diesen Versuchen sind die beobachteten Hemmhöfe, die in Versuchen mit Extrakten tropischer Ascidien bis zu 30 mm Breite erreichten (Davis *et al.* 1989b, Ramasamy *et al.* 2003). Extrakte von Ascidien der Nordsee induzierten dagegen trotz höherer Konzentration der eingesetzten Substanz lediglich Hemmhöfe unter 4 mm Breite (Teo *et al.* 1994), was durch diese Arbeit bestätigt wurde. In beiden geographischen Habitaten sind also antimikrobiell aktive und inaktive Ascidien anzutreffen, aber Ascidien der tropischen Gewässer besitzen deutlich ausgeprägtere Wirkung in Bezug auf die Hemmhofbreite.

Ein Vergleich von Literaturdaten mit den vorliegenden Ergebnissen ist allerdings einigen Beschränkungen unterworfen. Abgesehen von der unterschiedlichen Substanzkonzentration, die in den zitierten Arbeiten eingesetzt wurden (sofern sie überhaupt angegeben war), beeinflussen methodische Komponenten die Aussage des Tests und damit die Vergleichbarkeit (Jenkins *et al.* 1998). Die Ergebnisse des Tests sind abhängig von der Auswahl der Mikroorganismen, die je nach Test und Schwerpunkt differierte. Außerdem können sich antimikrobielle Substanzen abhängig von ihrer Struktur in ihrer Diffusionsrate unterscheiden und durch ihre physikalischen Parameter wie Viskosität und pH das Testergebnis verändern. Diese Parameter konnten in der gezeigten Durchführung des Tests nicht differenziert betrachtet und gewichtet werden.

3.2.3 Cytotoxischer Assay

Cytotoxische Aktivität von Ascidiensextrakten ist seit langem bekannt. Die Arten *Didemnum molle* (Rudi *et al.* 1998), *Botryllus schlosseri* (Ballarin *et al.* 1998), *Eudistoma toaalensis* (Schupp *et al.* 2001), *Ascidia mentula* (Aiello *et al.* 2001a) und *Styela plicata* (Raftos *et al.* 1995) sind nur einige Beispiele für Tunikaten mit cytotoxischer und antiproliferatorischer Aktivität. Sehr bekannte Vertreter cytotoxischer Substanzen aus Ascidien sind die Didemnine aus *Trididemnum solidum* (Rinehart *et al.* 1988), die Ecteinascidine aus *Ecteinascidia turbinata* (Sigel 1969) sowie die Grossularine 1 und 2 (Moquin *et al.* 1984, Moquin-Patthey *et al.* 1989) und Dendrodoin (Heitz *et al.* 1980) aus *Dendrodoa grossularia* (vgl. auch Tabelle 1.1). In dieser Arbeit wurden zwölf Ascidiensarten durch Inkubation mit Mausfibroblasten auf ihr cytotoxisches Potential hin untersucht. Die Extrakte wurden in Verdünnungsreihen eingesetzt und anschließend lebende Zellen von toten Zellen durch einen MT-Test differenziert. Somit konnte für jeden Extrakt eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC, in µg/ml) definiert werden.

Vier von zwölf Ascidiensarten zeigten cytotoxische Aktivität (Tabelle 3.5). Allen anderen Ascidiensarten konnte keine Wirkung auf die Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Starke cytotoxische Effekte mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration unter 20 µg/ml fanden sich bei *Aplidium punctum*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum*. Diese Extrakte wurden mit Material aus der Sammlung 2003 erneut untersucht. Eine Testung der *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum* aus der Sammlung von 2003 bestätigte mit einer MIC von 0,4 µg/ml deren cytotoxisches Potential. Die Essigesterphasen von *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* aus der Sammlung 2003 zeigten mit MICs von jeweils 37 µg/ml deutlich geringere Cytotoxizität als die Extrakte aus der Sammlung zwei Jahre zuvor. Die *n*-Hexanphasen von *Aplidium punctum* sowie die Essigesterphasen von *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* wurden aufgetrennt und erneut getestet, um die verantwortlichen Substanzen in den resultierenden Fraktionen zu lokalisieren.

Tabelle 3.5: Cytotoxische Aktivität der untersuchten Ascidien.

Art	aktive Phase	Sammlung 2001	Sammlung 2003
<i>Ascidia mentula</i>	Essigesterphase	60 µg/ml	–
<i>Aplidium punctum</i>	Essigesterphase	60 µg/ml	–
	<i>n</i> -Hexanphase	2 µg/ml	0,4 µg/ml
<i>Dendrodoa grossularia</i>	Essigesterphase	7 µg/ml	37 µg/ml
<i>Didemnum candidum</i>	Essigesterphase	20 µg/ml	37 µg/ml

Angegeben sind die minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC). Es wurden die Extrakte aller Ascidien der Sammlung 2001 getestet. Die drei stark aktiven Extrakte (fett) wurden mit Material der Sammlung 2003 erneut untersucht.

Cytotoxische Substanzen bieten dem Produzenten die Möglichkeit, sich gegen Fraßfeinde zu verteidigen, die sich vielleicht auch langfristig wegen der einmal gemachten Erfahrung von dem Tier fernhalten. Ebenso wie die antimikrobielle Aktivität schützt eine cytotoxische Wirkung, solange sie an der Oberfläche des Tieres auftritt, gegen die Besiedlung mit Epibionten, in diesem Fall gegen eukaryontische Zellen wie andere Invertebratenlarven, die entweder abgewehrt oder getötet werden, sobald sie mit der Oberfläche in Kontakt kommen. Gleichmaßen könnte ein sessiler Nachbar durch Kontaktvergiftung auf Distanz gehalten und somit der eigene Platz verteidigt werden. Cytotoxische Aktivität trat bei den untersuchten Arten weniger häufig auf als antimikrobielle Aktivität, was möglicherweise auf eine ökologisch geringere Relevanz dieser Art von Abwehr hinweist, andererseits aber auch die artspezifische Spezialisierung von Überlebensmechanismen verdeutlicht. Um auszuschließen, dass solche punktuellen Beobachtungen nicht auf eine zufällige Aktivität von Stoffwechselnebenprodukten zurückzuführen sind (Pawlik 1993), sind die Identifizierung der Substanzen und gezielte ökologische Versuche notwendig. Diese Aspekte werden in der Zusammenfassung der biologischen Ergebnisse noch einmal aufgegriffen.

In bisherigen Versuchen zum Nachweis von Cytotoxizität in marinen Organismen wurde nur selten neben der aktiven Substanz auch der Wirkmechanismus des cytotoxischen Effekts aufgeklärt, da die Aufklärung der Wirkmechanismen einen großen Aufwand an nachfolgenden Tests erfordert. Der Wirkmechanismus ist aber für eine weiterführende Entwicklung der Substanz als Tumorstoff wesentlich. Einen wichtigen Hinweis auf diese Mechanismen bieten zellmorphologische Veränderungen, die sich bei Inkubation der Zellen mit der Substanz ergeben und durch spezifische Färbungen sichtbar gemacht werden können. In diesem Test wurden die Zellkerne, das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mikrotubuli als

charakteristische Organellen angefärbt. Es ergaben sich bei Extrakten aus den Ascidien *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* folgende morphologische Veränderungen:

- Zellkernfragmentierung,
- sichelförmige Zellkerne,
- sichtbare Centrosomen,
- abnormale multipolare Mitosespindeln,
- Vakuolisierung des endoplasmatischen Retikulums.

Aus diesen Veränderungen konnten die beeinflussten Zellfunktionen ermittelt werden. Gleichzeitig wurde dadurch dokumentiert, dass die cytotoxische Aktivität tatsächlich durch eine gerichtete Wirkung der Extrakte hervorgerufen wurde. In den folgenden drei Kapiteln werden die Auftrennungen und die cytotoxischen Effekte der drei stark aktiven Extrakte beschrieben.

3.2.3.1 Auftrennung der *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum*

Die *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum* wurde über präparative HPLC aufgetrennt. Eine anschließende HPLC-Analyse ergab, dass alle Fraktionen Substanzgemische waren, die wegen zu geringer Menge nicht weiter aufgereinigt werden konnten. Da die *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum* aus der Sammlung 2003 ebenfalls cytotoxische Aktivität zeigte, wurde versucht, den aktiven Metaboliten aus dieser Fraktion zu isolieren. Eine bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig durchgeführte Auftrennung mittels HPLC (Säule: Nucleosil C18, Gradient: 45-100% Methanol/Wasser in 41 min) erbrachte 90 Fraktionen, die sich aus jeweils 30 Sekunden Durchlauf zusammensetzen. Die cytotoxische Aktivität wurde in den Fraktionen zwischen der 43 und 44 Minute des Durchlaufs wiedergefunden (Abbildung 3.12).

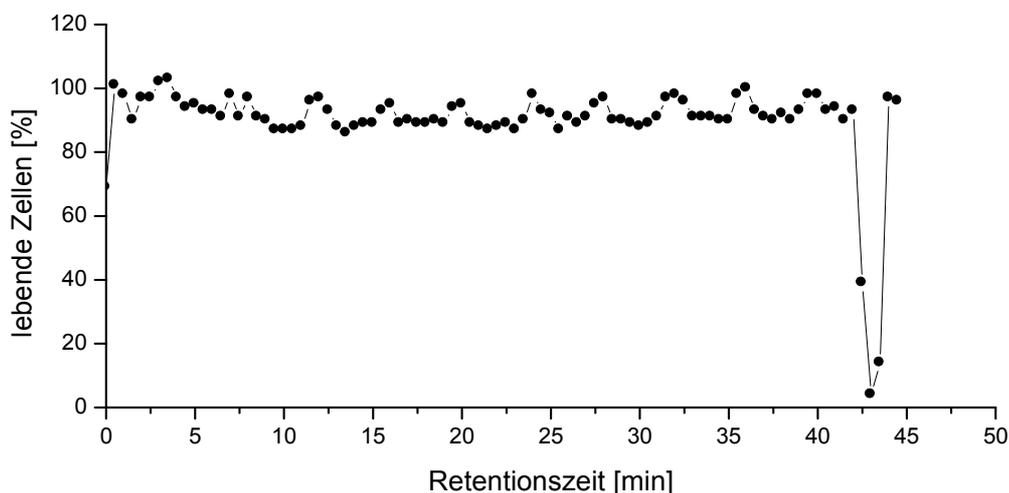


Abbildung 3.12: Cytotoxizität der fraktionierten *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum*.

Um die aktive Substanz der *n*-Hexanphase nach der Trennung mittels HPLC wiederzufinden, wurden alle Fraktionen direkt in den Assay eingeschleust. Die aktive Substanz befindet sich in den Fraktionen zwischen der 43. und 45. Minute des HPLC-Durchlaufs. Angegeben ist die Anzahl der lebenden Zellen in Prozent, nachgewiesen über einen MT-Test.

Eine Untersuchung der Fraktion 44 mit HR-MS ergab eine Molekülmasse von $m/z = 283,2616$ [M]⁻. Um eine Substanzmenge zu erhalten, die eine Aufklärung mittels NMR ermöglichen sollte, wurde die *n*-Hexanphase von *Aplidium punctum* über präparative HPLC aufgereinigt. Die Substanz der obigen Masse fand sich in drei von fünf Hauptfraktionen, die allerdings durchgehend starke Verunreinigungen aufwiesen. Eine Isolierung der Substanz und die anschließende Strukturaufklärung stehen noch aus.

3.2.3.2 Weitere Auftrennung der Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia*

Die Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia* wurde über Größenausschlußchromatographie aufgetrennt und zu 17 Fraktionen zusammengefasst. Alle 17 Fraktionen beeinflussten das Zellwachstum der Mausfibroblasten. Die minimale inhibierende Konzentration lag zwischen 2 µg/ml für Fraktion L5 und 185 µg/ml für die Fraktionen L1 und L11. Bei sechs Fraktionen konnte zudem eine Fragmentierung des Zellkerns erkannt werden (Abbildung 3.13). Die Fraktionen L3, L4 und L5 wurden als aktive Fraktionen mit ausreichender Substanzmenge aufgereinigt. Die Fraktionen dieser Trennungen induzierten verschiedene morphologische Zellveränderungen. So wurden bei einigen Zellen die Centrosomen sichtbar, bei anderen bildeten sich multipolare Mitosespindeln oder sichelförmige Zellkerne (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.17).

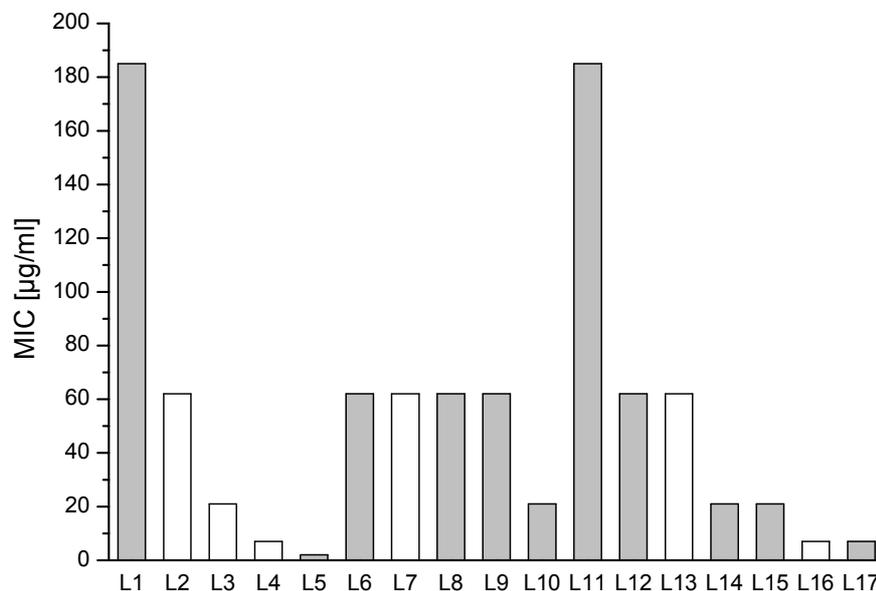


Abbildung 3.13: Cytotoxische Aktivität der aufgetrennten Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia*.

Dargestellt sind die minimalen inhibitorischen Konzentrationen der Fraktionen, die aus der Auftrennung der Essigesterphase resultierten. Die weißen Balken markieren Fraktionen, die Zellkernfragmentierung induzierten.

Änderungen der Zellkerngestalt sind Hinweise auf eine Apoptose. Der programmierte Zelltod ist eine wichtige Voraussetzung zur regulierten Rückbildung von Gewebe und zur Eliminierung von schadhafte Zellen. Apoptose wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli angeregt und durch diverse Faktoren reguliert. Die Regulation reicht von Sensoren, die die unversehrte Funktion von Zellmembran und Zellorganellen überprüfen, über eine Kaskade von Signalen zu den proteolytischen Effektoren, die die Zelle, zunächst innerhalb der Plasmamembran, in ihre Einzelteile zerlegen (Kaufmann *et al.* 2001). Klassische morphologische Kennzeichen einer

Apoptose sind unter anderem die Kondensation der genomischen DNS zu einer sichelförmigen Masse an der Zellkernperipherie sowie die nachfolgende Fragmentierung des Zellkerns, wie sie in dieser Arbeit bei der Inkubation der Mausfibroblasten mit Extrakten aus *Dendrodoa grossularia* zu erkennen sind.

Die Freilegung des Centrosoms und die anormale Veränderung der Mitosespindel wiesen auf eine Beeinflussung des Mikrotubulsystems der Zelle hin. Mikrotubuli stellen mit den Actinfilamenten und den Intermediärfilamenten das Cytoskelett einer Zelle dar. Sie ziehen sich als röhrenförmige Filamente vom Zellkern zur Zellperipherie. Die Struktur wird durch 13 Protofilamente aufgebaut, die ihrerseits durch zwei globuläre Proteine, den α - und β -Tubulinen, gebildet werden. Trotz ihrer Stabilität sind die Mikrotubuli dynamische Polymere. Durch stetigen Auf- und Abbau der Filamente sowie die Geschwindigkeit, mit der diese Prozesse verlaufen, werden die Länge der Mikrotubuli genau reguliert und Transportvorgänge vermittelt. Die Filamente sind in der Zellkernperipherie an zwei kleinen Mikrotubulistücken, den Centriolen, verankert, die zusammen das Centrosom bilden. Bei der Zellteilung wandern die Centriolen zu entgegengesetzten Polen der Zelle. An den zwischen ihnen liegenden Mikrotubuli werden die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt. Eine Störung dieser Abläufe durch eine Blockierung der Mikrotubuli führen daher zu einem gestörten Ablauf der Zellteilung. Eine Freilegung des Centrosoms deutet auf eine Ausdünnung des Mikrotubulinetzes um den Zellkern hin. Dies resultiert aus einer Verschiebung der Mikrotubuli-Dynamik zugunsten des Abbaus, wie es von Colchizin, einem aus Krokussen gewonnenen Alkaloid, bekannt ist (Wilson *et al.* 1999). Eine gegenteilige Wirkung zeigen Taxol (Kumar 1981), eine Substanz aus der Eibe *Taxus brevifolia*, oder Epothilon B (Muhlradt *et al.* 1997) aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*. Beide Substanzen hyperstabilisieren die Mikrotubuli und verhindern den im Zellwachstum und bei der Zellteilung notwendigen Umbau. Eine Folge ist die Bildung von abnormalen Spindelapparaten, wie sie auch bei Inkubation der Mauszellen mit Extrakten von *Dendrodoa grossularia* zu sehen sind. Beide Vorgänge, die eine Störung der ausgewogenen Dynamik der Mikrotubuli darstellen, sind Ziele von Tumortherapien.

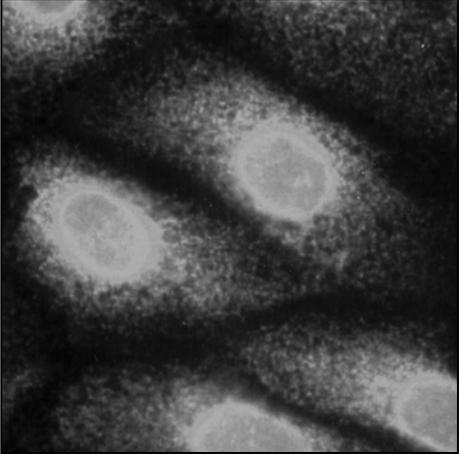
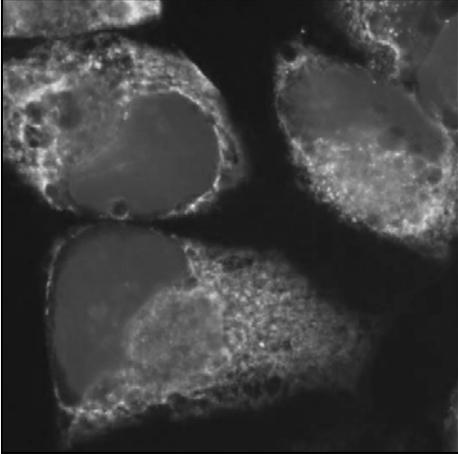
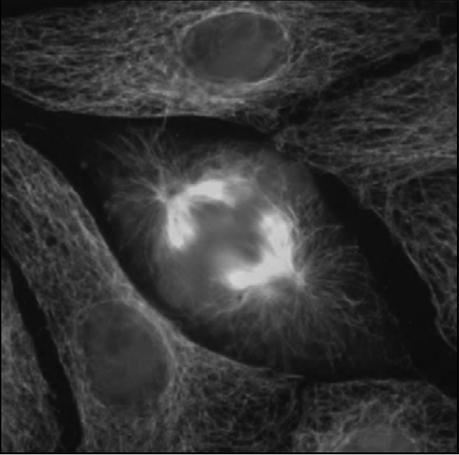
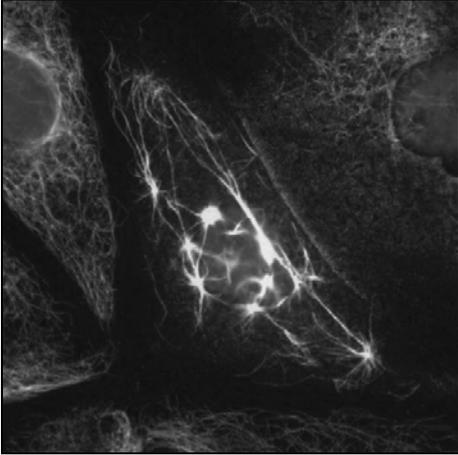
Normale Zellmorphologie	Morphologische Veränderungen
 <p data-bbox="352 779 584 813">ER und Zellkerne</p>	 <p data-bbox="948 779 1259 813">sichelförmige Zellkerne</p>
 <p data-bbox="376 1384 560 1417">Mitospindel</p>	 <p data-bbox="922 1384 1286 1417">multipolarer Spindelapparat</p>

Abbildung 3.14: Morphologische Veränderungen der Mausfibroblasten bei Inkubation mit Extrakten aus *Dendrodoa grossularia*.

3.2.3.3 Auftrennung des Essigesterextraktes von *Didemnum candidum*

Die Essigesterphase von *Didemnum candidum* wurde durch präparative HPLC aufgetrennt. Es ergaben sich neun Fraktionen. Fraktion 7 wurde wegen zu geringer Substanzmenge nicht getestet. Drei Fraktionen zeigten cytotoxische Aktivität mit MICs zwischen 21 und 62 µg/ml. Bei der Fraktion der geringsten MIC (21 µg/ml) wurde zudem eine Vakuolisierung des endoplasmatischen Retikulums (ER) beobachtet (Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17).

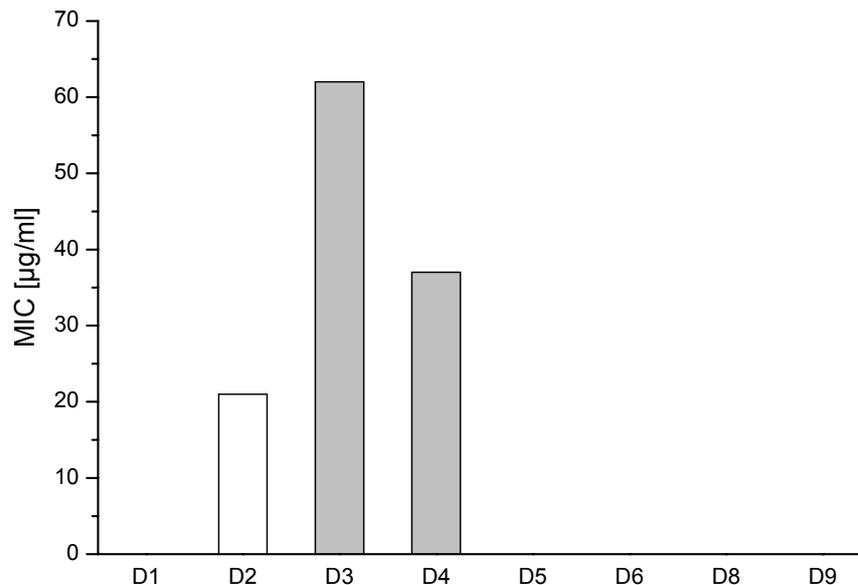


Abbildung 3.15: Cytotoxische Aktivität der aufgetrennten Essigesterphase von *Didemnum candidum*.

Dargestellt sind die minimalen inhibitorischen Konzentrationen der Fraktionen, die aus der Auftrennung der Essigesterphase resultierten. Der weißen Balken markiert die Fraktion, die eine Vakuolisierung des ER induzierte.

Das ER ist eine Zellorganelle, die in der Biosynthese von Proteinen und Lipiden eine zentrale Rolle einnimmt. Das Bild einer Vakuolisierung des ER ist als Folge einer Inkubation von Zellen mit Salicylhalamiden A und B aus dem Schwamm *Haliclona* sp. (Erickson *et al.* 1997) bekannt. Die Salicylhalamide wie auch die strukturverwandten Lobatamide A bis F aus der australischen Tunikate *Aplidium lobatum* (McKee *et al.* 1998) inhibieren die V-ATPase von Säugetierzellen (Boyd *et al.* 2001). V-ATPasen sind weit verbreitete membrangebundene Protonenpumpen, die Protonen aus dem Cytoplasma in die jeweilige Zellorganelle pumpen. Die Regulation des pH-Werts der Organelle ist für diverse physiologische Funktionen notwendig. So sind V-ATPasen an Proteinabbau, Neurotransmitteraufnahme, Rezeptorrecycling und sonstigen Abbauprozessen der Zelle beteiligt. Außerdem spielen sie bei allen Prozessen eine Rolle, für die eine Regulation der extrazellulären Azidität notwendig ist, wie Zellproliferation, Tumormetastasierung und Apoptose. Bei einer Hemmung der V-ATPase können die Abbauprozesse, die ein saures Milieu

im ER benötigen, nicht stattfinden. Vakuolen mit Abbauprodukten akkumulieren daher im ER. Bei einer Untersuchung der aktiven Extrakte mit HPLC-MS wurden die bekannten Massen der Salicylhalamide und Lobatamide nicht gefunden. Ein spezifischer Test auf V-ATPase-Hemmung könnte helfen, die vermutete molekulare Wirkung zu verifizieren und die Isolation der aktiven Substanz lenken.

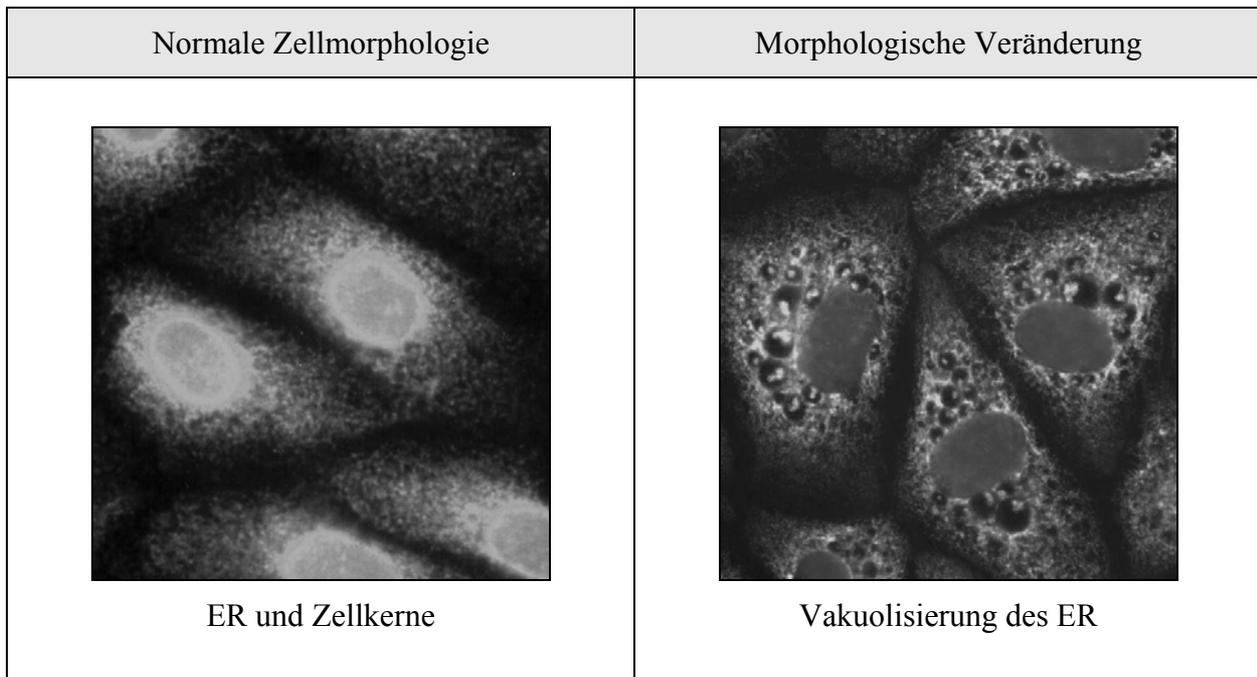


Abbildung 3.16: Morphologische Veränderung der Mausfibroblasten bei Inkubation mit Extrakten aus *Didemnum candidum*.

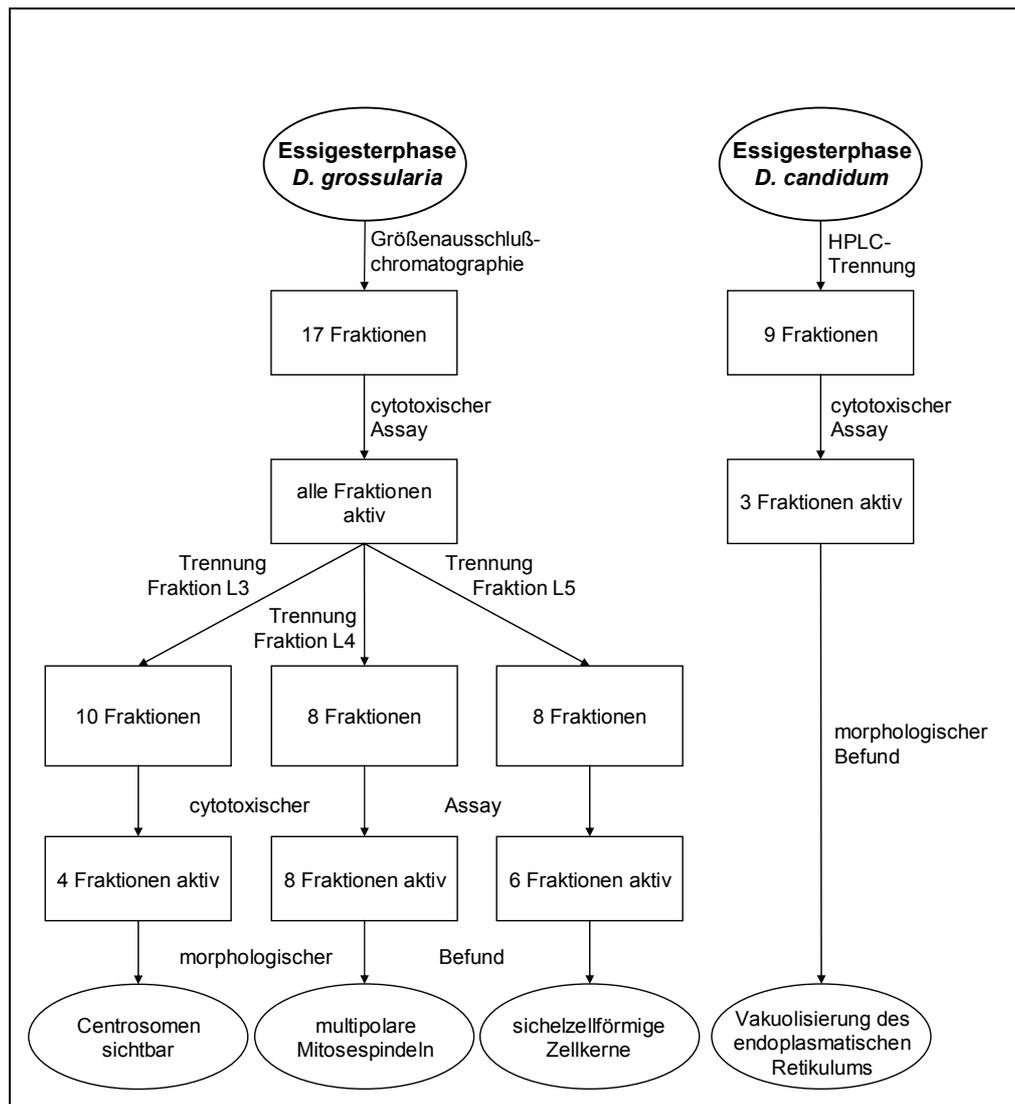


Abbildung 3.17: Auftrennung und Wirkung der cytotoxisch aktiven Extrakte.

Schematische Darstellung der Fraktionierung der Essigesterphasen von *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* und des morphologischen Befundes bei Inkubation mit den aktiven Substanzen. L3, L4 und L5 bezeichnen die Fraktionen, die aus der Größenausschlußchromatographie resultierten und weiter bearbeitet wurden.

3.2.4 Protein-Tyrosin-Kinase-Assay

Mit dem Protein-Tyrosin-Kinase-Assay können enzymhemmende Eigenschaften von natürlichen Extrakten nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testsystems geführt. Als spezielle Protein-Tyrosin-Kinase wurde der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) eingesetzt, der ein Zielmolekül in der Krebstherapie darstellt. Die Ascidiensextrakte der zwölf Arten der Orkney-Inseln wurden zusammen mit dem Enzym inkubiert und anschließend die Aktivität des Enzyms in Relation zu seiner unbeeinflussten Wirkung bestimmt. Die Berechnung lieferte einen Prozentwert der Restaktivität (siehe Kapitel 4.5.4).

Kein Rohextrakt der zwölf getesteten Ascidiensarten war in einer hemmenden Weise aktiv. Die *n*-Butanolphase von *Ascidella scabra*, die Essigesterphase von *Corella parallelogramma* sowie die *n*-Hexanphase von *Didemnum candidum* zeigten moderate hemmende Wirkung mit einer Enzyminibition auf 29% bis 46% (Tabelle 3.6, grau hinterlegte Werte). Die Essigester- und die *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia* zeigten mit Werten zwischen 6% und 9% eine sehr starke Hemmung der PTK (schwarz hinterlegte Werte). Sieben Fraktionen von drei Ascidiensarten, davon allein vier von *Ascidia mentula*, hatten eine leicht verstärkende Wirkung auf die Enzymaktivität (121% bis 141%, fett gedruckte Werte). Der bekannte Hemmstoff Piceatannol reduzierte die Enzymaktivität in diesem Versuch auf 5%. Die moderat und stark aktiven Ascidiensextrakte wurden weiter aufgetrennt und parallel getestet, um die aktive(n) Substanz(en) zu identifizieren.

Tabelle 3.6: Aktivität des EGFR bei Inkubation mit Extrakten von zwölf Ascidienarten der Sammlung 2001.

Art	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
<i>Asciidiella scabra</i>	108	113	86	46	84
<i>Ascidia virginea</i>	102	112	92	83	84
<i>Ascidia mentula</i>	129	121	94	131	138
<i>Aplidium punctum</i>	117	66	111	119	72
<i>Botrylloides leachi</i>	121	92	141	96	102
<i>Botryllus schlosseri</i>	125	81	73	108	89
<i>Corella parallelogramma</i>	93	82	32	86	101
<i>Dendrodoa grossularia</i>	107	89	6	9	103
<i>Didemnum candidum</i>	109	29	84	78	91
<i>Polyclinum aurantium</i>	113	82	89	69	86
<i>Sidnyum turbinatum</i>	85	83	75	89	73
<i>Trididemnum cereum</i>	63	61	57	85	65

Die Enzymaktivität wird als Prozent Aktivität in Bezug zu einer Positivkontrolle (100%) angegeben. Eine verstärkte Enzymaktivität ist in fett gedruckten Werten angegeben. Werte einer moderaten Enzymhemmung sind grau, Werte einer starken Enzymhemmung schwarz hinterlegt. Piceatannol reduzierte die Enzymaktivität in diesem Versuch auf 5%.

3.2.4.1 Moderate Inhibition: Auftrennung der Fraktionen und Sammlung 2003

Die drei moderat aktiven Fraktionen der Arten *Ascidiella scabra*, *Corella parallelogramma* und *Didemnum candidum* (Tabelle 3.6) wurden mittels präparativer HPLC aufgetrennt und bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml erneut getestet. Mit dieser Konzentration wurde dem ungefähren Anteil der einzelnen Fraktionen an der Ausgangsphase Rechnung getragen.

Innerhalb der zehn aus einer HPLC-Trennung resultierenden Fraktionen des *n*-Butanolextrakts von *Ascidiella scabra* wurde eine moderate Enzymhemmung von 37% in einer Fraktion wieder gefunden, die noch Verunreinigungen aufwies. Eine Strukturaufklärung war daher nicht möglich. Eine der aus *Dendrodoa grossularia* isolierten aktiven Reinsubstanz (siehe Kapitel 3.4) ähnliche Masse ($m/z = 194,1049 [M]^+$) war in der *n*-Butanolphase von *Ascidiella scabra*, aber nicht mehr in der aktiven Fraktion der oben genannten Trennung enthalten, so dass die Inhibierung nicht auf diese Substanz zurückgeführt werden konnte.

Die Aktivitäten der Essigesterphase von *Corella parallelogramma* und der *n*-Hexanphase von *Didemnum candidum* (Tabelle 3.6) ließen sich nach der Fraktionierung beider Extrakte nicht mehr nachweisen. Der Verlust einer Aktivität nach der Fraktionierung des Substanzgemisches war in anderen Trennungen ebenfalls zu beobachten und kann auf eine synergistische Wirkung zweier oder mehrerer Komponenten hindeuten, die durch ihre unterschiedliche chemische Beschaffenheit durch die Fraktionierung getrennt worden sind. Eine Aufklärung solcher kombinatorischer Wirkung und ihrer zugehörigen Substanzen ist allerdings ungleich schwieriger als die Isolierung einer einzelnen aktiven Substanz und war im Rahmen dieser Arbeit nicht zu erfüllen. Der Aktivitätsverlust könnte aber auch durch die Zersetzung der aktiven Substanz im Verlauf der weiteren Bearbeitung verursacht worden sein. Die Isolierung einer solchen Substanz würde eine Modifikation der Trenn- und Trocknungsmethoden erfordern.

Bei der Testung der Rohextrakte und der Phasen der im Jahr 2003 gesammelten Proben von *Ascidiella scabra* und *Didemnum candidum* zeigten sowohl die Essigester- als auch die *n*-Butanolphase von *Ascidiella scabra* eine moderate Enzymhemmung auf 48%. Wegen der relativ ähnlichen Polarität der beiden Lösungsmittel Essigester und *n*-Butanol ist es möglich, dass die gleiche Substanz für die hemmende Wirkung beider Fraktionen verantwortlich ist. Auch hier wurde eine Substanz der Masse gefunden, die dem des aus der Ascidie *Dendrodoa grossularia* isolierten Hemmstoff ähnlich ist. Diese enzymhemmende Substanz gehört also zur ständigen Sekundärmetaboliten-Ausstattung dieser Ascidienart. Ihre mögliche Bedeutung für den Organismus wird im Kapitel 3.3 diskutiert. In den Extrakten von *Didemnum candidum* der Sammlung 2003 war kein enzymhemmendes Potential mehr nachweisbar. Die zuvor beobachtete

Wirkung scheint daher kein kontinuierlicher Effekt zu sein, sondern könnte mit der Hauptlarvenzeit zur Zeit der Sammlung (Juli 2001) in Verbindung gebracht werden. Manche Ascidien akkumulieren cytotoxische Substanzen in ihren Gonaden, die nicht der eigenen Fraßabwehr dienen, sondern den Larven als Schutz gegen Fraßfeinde mitgegeben werden (Lindquist *et al.* 1992). Versuche zur Lokalisation der Aktivität im adulten Tier und zur Feststellung möglicher cytotoxischer Aktivität der Larven könnten helfen, diese Frage zu klären.

3.2.4.2 Starke Inhibition: Essigesterphase und *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia*

Die Essigesterphase und die *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia* wurden über Größenausschlußchromatographie aufgetrennt. Bei der Testung der resultierenden 17 Fraktionen der Essigesterphase und 15 Fraktionen der *n*-Butanolphase fanden sich in beiden Auftrennungen mehrere stark hemmende Fraktionen (Abbildung 3.18).

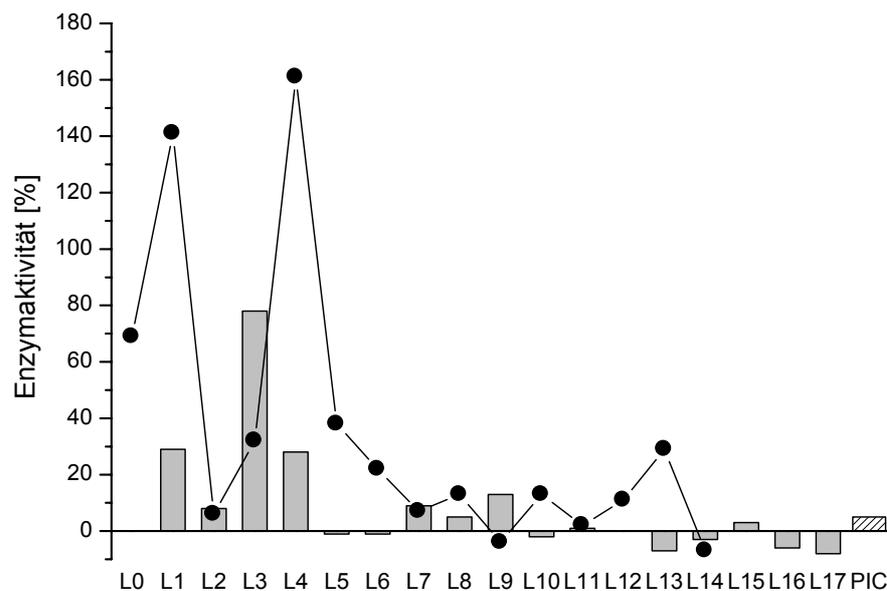


Abbildung 3.18: Restaktivität des EGFR bei Inkubation mit zwei fraktionierten Phasen von *Dendrodoa grossularia*.

Die Restaktivitäten des EGFR werden in Prozent angegeben. Inkubiert wurden die Fraktionen L1 bis L17 der Essigesterphase (Balken) und die Fraktionen L0 bis L14 der *n*-Butanolphase (Punkte) von *Dendrodoa grossularia* sowie der Hemmstoff Piceatannol (PIC).

Die weitere Auftrennung beider Fraktionen wurde durch PTK-Assays begleitet. So konnte die Aktivität verfolgt und die weitere Fraktionierung der Substanzgemische gesteuert werden. Diese

Bioassay-guided Fractionation zur Isolierung einer Reinsubstanz, der die enzymhemmende Aktivität zugeordnet werden konnte, und die Bedeutung von PTK-Inhibitoren in Organismen sind im Kapitel 3.4 beschrieben.

3.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse der Bioassays

Alle Ascidienarten zeigten in mindestens einem der durchgeführten Assays Aktivität. *Ascidia virginea* war in dem antimikrobiellen Assay nur sehr schwach aktiv und wies ansonsten nur noch einen algensporen-abwehrenden Effekt im Phytigel-Assay auf. Extrakte der koloniebildenden Arten *Botrylloides leachi*, *Botryllus schlosseri*, *Polyclinum aurantium*, *Sidnyum turbinatum* und *Trididemnum cereum* sowie der solitären Art *Ascidiella aspersa* waren lediglich in dem antimikrobiellen Assay wirksam (Tabelle 3.7).

Die postulierte höhere biologische Aktivität, die koloniebildenden Ascidien zugeschrieben wird (Paul 1992), konnte in diesen Assays nicht bestätigt werden. Vielmehr waren die stärksten Aktivitäten in allen Biotests bei den Arten *Aplidium punctum*, *Corella parallelogramma*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* zu finden und damit sowohl bei koloniebildenden als auch solitären Arten. Neben den in den jeweiligen Kapiteln diskutierten Erkenntnissen, die sich aus den Biotest für die Ökologie der Ascidien und ihre Interaktion mit Mikro- und Makroorganismen ableiten lassen, stellt die Gesamtheit aller Ergebnisse die Schwierigkeit der Interpretation anhand von Einzelergebnissen dar. Mit Ausnahme von *Ascidia virginea* war im antimikrobiellen Assay eine durchgängige Aktivität aller Ascidienarten zu beobachten, während die cytotoxische Aktivität auf wenige Ascidienarten beschränkt war. Dieser Befund impliziert auch im Hinblick auf die bei der Produktion von Sekundärmetaboliten notwendigen metabolischen Kosten, dass die Abwehr von Bakterien eine grundlegende Bedeutung besitzen muss. Die gängige Interpretation antimikrobieller Aktivität von Invertebraten beinhaltet die Abwehr des Primärfilms, um folgende epibiontische Besiedlung zu verhindern. Das Aktivitätsmuster von *Aplidium punctum* und *Corella parallelogramma*, die sich durch antimikrobielle Wirkung als auch geringen Algenbewuchs im Phytigel-Assay auszeichneten, könnte diese These bestätigen. Demgegenüber waren *Ascidiella aspersa*, *Ascidiella scabra* und *Didemnum candidum* zwar antimikrobiell aktiv, zeigten aber keine Abwehr von Algen oder Epibionten im Phytigel-Versuch, und Gele mit Extrakten von *Dendrodoa grossularia* wurden im Phytigel-Versuch gar nicht von Invertebraten besiedelt, ließen aber nur sehr schwache antimikrobielle Aktivität erkennen.

Tabelle 3.7: Biologische Aktivitäten der getesteten Ascidiensarten.

Art*	Bewuchshemmend		Antimikrobieller Assay		Cytotoxische Aktivität	Enzym-inhibition
	Algen	Epi-bionten	Effekt	Breitband		
<i>Ascidella scabra</i> (s)	–	+	++	+	–	++
<i>Ascidia virginea</i> (s)	++	–	(–)	(–)	–	–
<i>Ascidia mentula</i> (s)	–	+	+	+	++	–
<i>Aplidium punctum</i> (k)	++	–	++	++	+++	–
<i>Botrylloides leachi</i> (k)	n.g.	n.g.	+++	+	–	–
<i>Botryllus schlosseri</i> (k)	n.g.	n.g.	+	++	–	–
<i>Corella parallelogramma</i> (s)	+++	–	+++	+	–	++
<i>Dendrodoa grossularia</i> (s)	–	+++	+	+	+++	+++
<i>Didemnum candidum</i> (k)	–	–	++	+	+++	++
<i>Polyclinum aurantium</i> (k)	n.g.	n.g.	++	+	–	–
<i>Sidnyum turbinatum</i> (k)	n.g.	n.g.	++	+	–	–
<i>Trididemnum cereum</i> (k)	n.g.	n.g.	++	+	–	–
<i>Ascidella aspersa</i> (s)	–	–	+++	+++	–	–

Die Aktivität wurde mit fünf Zeichen dargestellt: + schwach, ++ moderat, +++ stark aktiv; – keine Aktivität, (–) Aktivität zu vernachlässigen. n.g. die Extrakte wurden nicht getestet

* In Klammern ist die Wuchsform angegeben: s: solitäre Art, k: koloniebildende Art.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Korrelation verschiedener Effekte nicht zwangsläufig einen ursächlichen Zusammenhang beinhalten muss. Der Effekt von im Labor durchgeführten Versuchen muss durch entsprechende Folgeversuche am Organismus und im Freiland untermauert werden, um andere Faktoren als Ursache auszuschließen. Antimikrobielle oder cytotoxische Aktivität zum Beispiel kann dem Tier nur dann als Schutz vor Epibiose oder gegen Fraßfeinde dienen, wenn die entsprechenden Substanzen an der Oberfläche des Tieres akkumuliert werden und diese Substanzen auch kontinuierlich vorhanden sind. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern Ascidien der Nordsee überhaupt Substanzen zum Fraßschutz synthetisieren müssen, da gemeinhin der Fraßdruck anders als in tropischen Breiten nur gering

ausgeprägt ist. Andererseits könnte die seltene Beobachtung von Fraßfeinden im Rückschluss auch durch gut ausgebildeten chemischen Fraßschutz bedingt sein, denn allesfressende Predatoren wie Seesterne, Krebse und Barsche sind auch in der Nordsee vertreten. Alles dies sind Parameter, die in Folgeversuchen untersucht werden müssen.

Die Chemie von Ascidien stellt sich als komplexes System dar. Während einerseits vielen Substanzen mehrere Funktionen zugewiesen werden können (Fahy *et al.* 1991), deutet der Verlust von Aktivität bei der Fraktionierung eines Substanzgemisches darauf hin, dass verschiedene Substanzen nur in Kombination eine bestimmte Funktion erfüllen können. Wie an *Ascidia virginea* deutlich wird, die lediglich algensporenabwehrende Aktivität besaß, in der Natur aber keinerlei Aufwuchs aufweist, gehen die Anpassungen der Tunikaten an ihre Umwelt über die in den Laborversuchen erfassbaren Effekte hinaus. Dabei besitzt jede Art eine eigene Gesamtstrategie, sich unter ähnlichen Umweltbedingungen zu behaupten.

Die Testergebnisse unterstreichen das in der Einleitung erwähnte chemische und pharmakologische Potential von Ascidien. Neben den bekannten antimikrobiellen oder cytotoxischen Wirkungen von *Aplidium* sp. oder *Dendrodoa grossularia* (Tabelle 1.1) konnten biologische Aktivitäten für *Corella parallelogramma*, *Ascidiella scabra*, die Styeliden und *Didemnum candidum* nachgewiesen werden. Die Assays selbst wiesen sowohl in der Durchführung als auch in der Interpretierbarkeit der Ergebnisse große Unterschiede auf. Der Phytigel-Versuch stellte den aufwändigsten Assay dieser Arbeit dar. Er ist wegen des technischen und materiellen Aufwands und der zeitlichen Beschränkung auf die Hauptlarvenzeit als Werkzeug zur Isolierung von Reinsubstanzen nicht geeignet. Freilandversuche dieser Art sind aber unverzichtbar, um die Laborergebnisse im ökologischen Zusammenhang interpretieren zu können. Der antimikrobielle und der cytotoxische Assay bieten die Möglichkeit, grundlegende chemische Eigenschaften von Ascidien zu dokumentieren. Sie sind mit wenig Aufwand durchzuführen und unter identischen Bedingungen reproduzierbar. Der PTK-Assay konnte im Vergleich zum antimikrobiellen Assay mit sehr geringen Substanzmengen und weniger zeitlichem Aufwand durchgeführt werden. Der Vorteil zum cytotoxischen Assay lag in der zeitlichen Unabhängigkeit von anderen Arbeitsgruppen. Diese Kriterien führten dazu, dass er als Leitfaden bei der Fraktionierung aktiver Substanzgemische bis hin zur Isolierung einer Reinsubstanz eingesetzt wurde, wie das nachfolgende Kapitel dokumentiert.

3.4 Isolierung von Reinsubstanzen aus *Dendrodoa grossularia*

3.4.1 Bioassay-guided Fractionation

Die enzyminhibierenden Fraktionen der *Dendrodoa grossularia*-Extrakte wurden schrittweise aufgereinigt, wobei die inhibitorische Aktivität durch den PTK-Test verfolgt wurde. Die Aufreinigungsschritte und die getesteten Fraktionen sind in den beiden Fließschemata aufgeführt (Abbildung 3.21 und Abbildung 3.24). Die Weiterbearbeitung einer Fraktion hing von ihrer Aktivität im Assay ab, aber auch von ihrer Reinheit und der verfügbaren Menge.

3.4.1.1 Fraktionierung der *n*-Butanolphase

Acht der 15 Fraktionen einer Größenausschlußchromatographie der *n*-Butanolphase zeigten eine starke Enzymhemmung (Abbildung 3.21). Drei dieser Fraktionen wurden durch HPLC oder weitere Größenausschlußchromatographie aufgereinigt und die Aktivität der resultierenden Fraktionen bestimmt. Fraktion L9 der ersten Größenausschlußchromatographie konnte über präparative HPLC in neun Fraktionen aufgetrennt werden, von denen drei starke Aktivität zeigten. Zwei folgende Aufreinigungen mittels HPLC führten zur Isolierung zweier Hauptfraktionen, L9D4D5 und L9D5D4, die NMR-spektroskopisch untersucht wurden. Die Analyse der ¹H-NMR-Spektren zeigte, dass es sich bei beiden Fraktionen um die gleiche Substanz handelte (Abbildung 3.19), die jedoch stark verunreinigt war. Diese Verunreinigungen waren im HPLC-Chromatogramm nicht erkennbar, erschwerten aber die Strukturaufklärung der Substanz mittels NMR. Fraktion L9D5D4 als die sauberere beider Fraktionen wurde in einer Konzentrationsreihe in sieben Konzentrationen zwischen 100 µg/ml und 5 µg/ml im PTK-Assay eingesetzt. Über eine graphische Auftragung der erhaltenen Werte wurde ein IC₅₀-Wert von 75 µg/ml ermittelt (Abbildung 3.20).

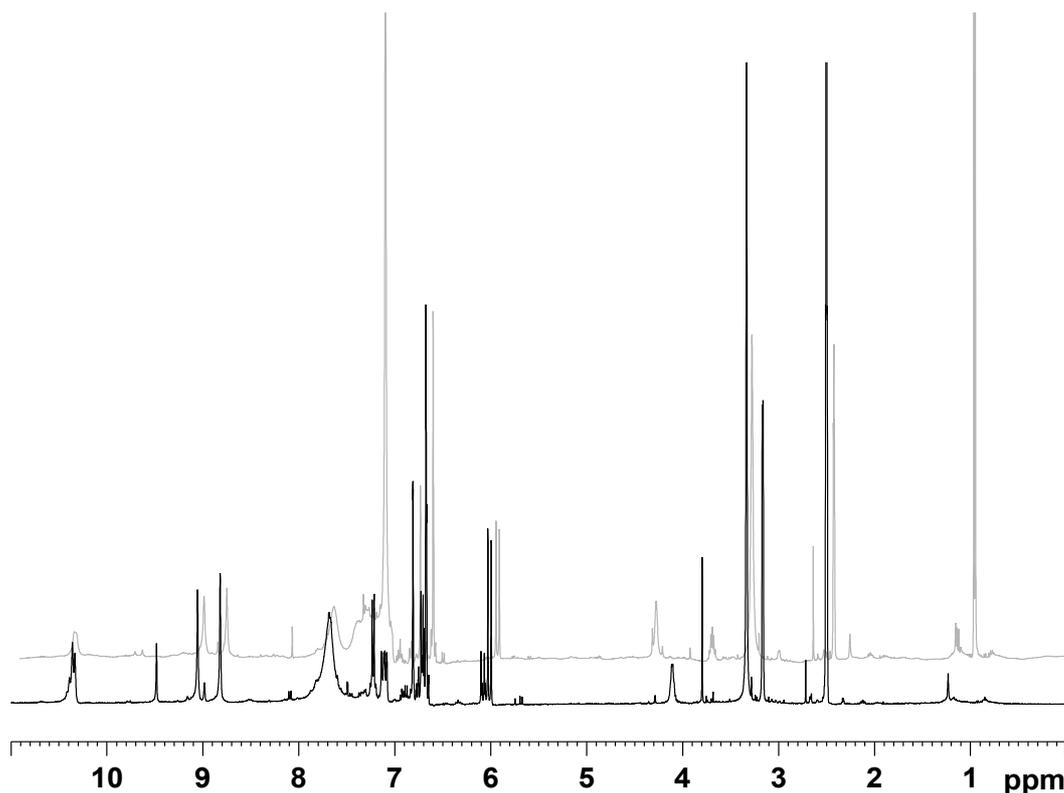


Abbildung 3.19: ^1H -NMR-Spektren der aktiven Fraktionen aus der *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia*.

Das Spektrum der Fraktion L9D4D5 ist schwarz, das der Fraktion L9D5D4 ist grau dargestellt. Die NMR-Messung erfolgte bei 400 MHz in $\text{DMSO-}d_6$.

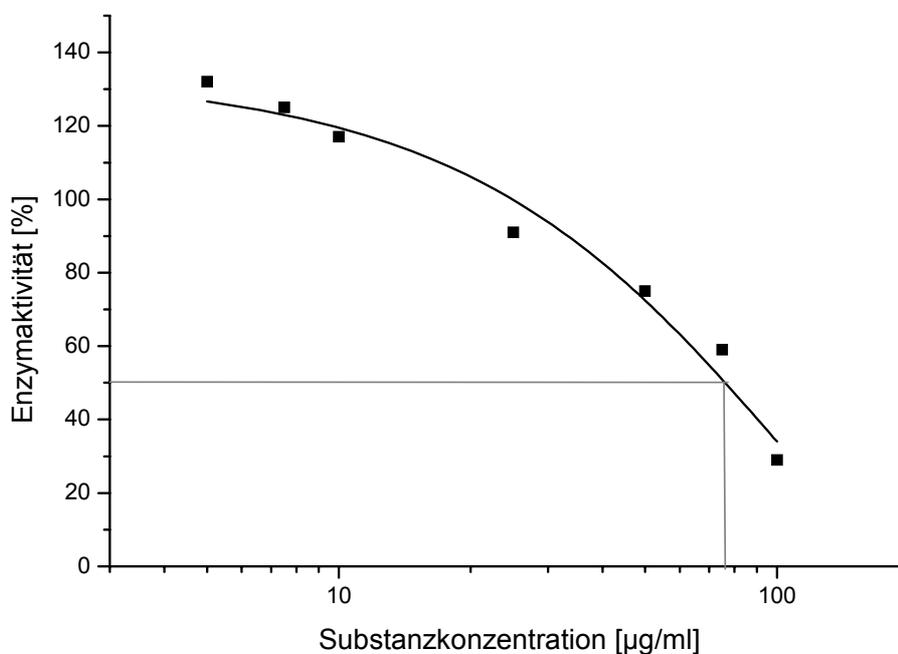


Abbildung 3.20: Enzymaktivität in Relation zur Substanzkonzentration der Substanz BL9D5D4 aus *Dendrodoa grossularia*.

Testdurchführung und Ermittlung der Enzymaktivität siehe Kapitel 4.5.4. Aus den Einzelwerten wurde mittels einer Fit-Funktion eine Aktivitätskurve (schwarz) erstellt und daraus bei $y = 50$ der IC_{50} -Wert abgelesen (grau).

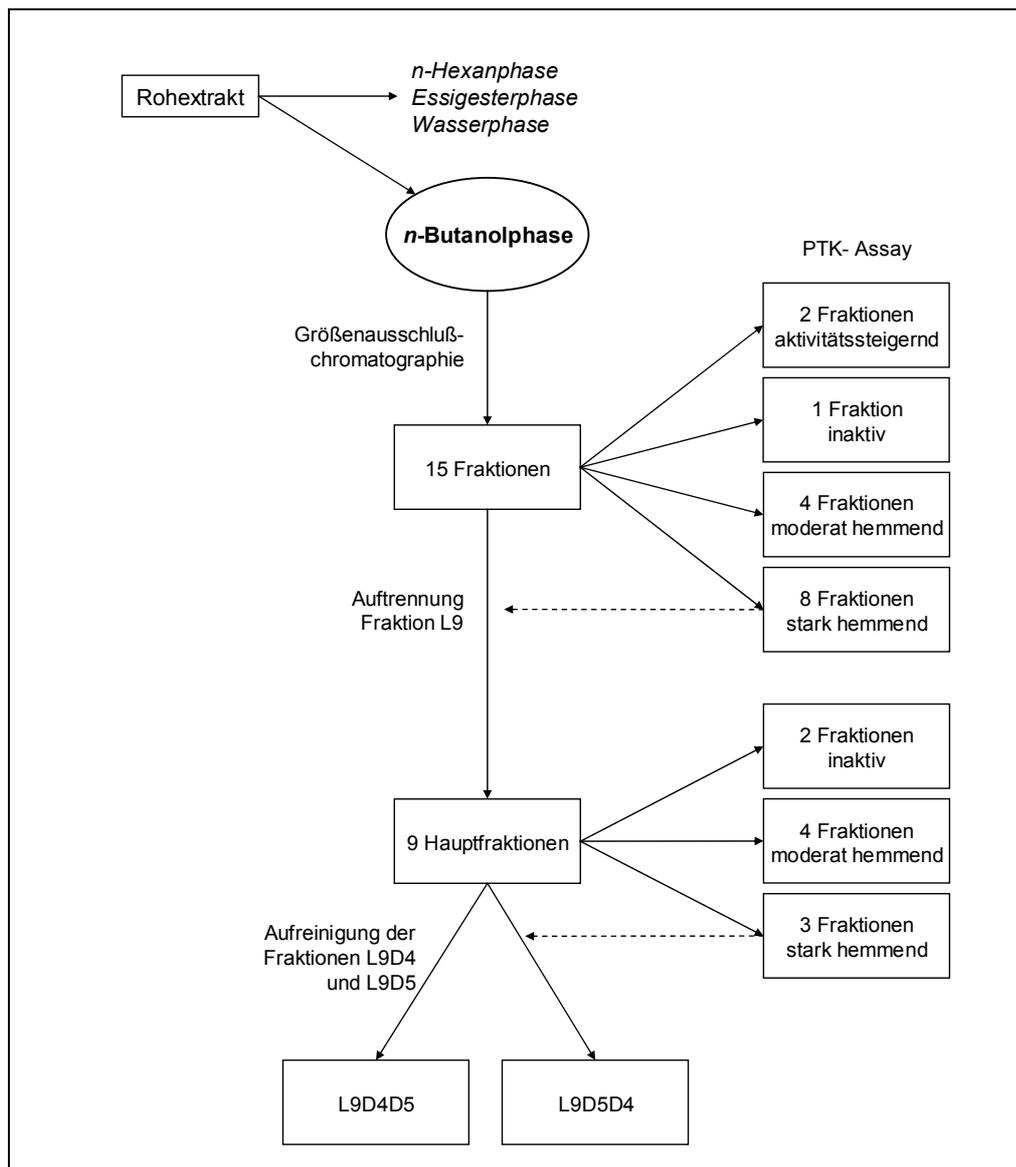


Abbildung 3.21: Bioassay-guided Fractionation der *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia* mittels PTK-Assay.

Schematische Darstellung der sich an der Enzymhemmung orientierenden Fraktionierung der *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia*. L9 bezeichnet eine stark enzyminhibitorische Fraktion, die aus der Größenausschlußchromatographie resultierte und weiter bearbeitet wurde.

3.4.1.2 Fraktionierung der Essigesterphase

Die Auftrennung der Essigesterphase über Größenausschlußchromatographie ergab 17 Fraktionen, von denen 14 Fraktionen starke enzymhemmende Eigenschaften besaßen (Abbildung 3.24). Sieben dieser Fraktionen wurden weiter aufgetrennt und erneut getestet. Die Trennung von Fraktion L10 mittels präparativer HPLC ergab zwölf Hauptfraktionen, von denen bei einer Testkonzentration von 100 µg/ml die Fraktionen X1, X3, X5 und X10 das Enzym am stärksten inhibierten (Abbildung 3.22).

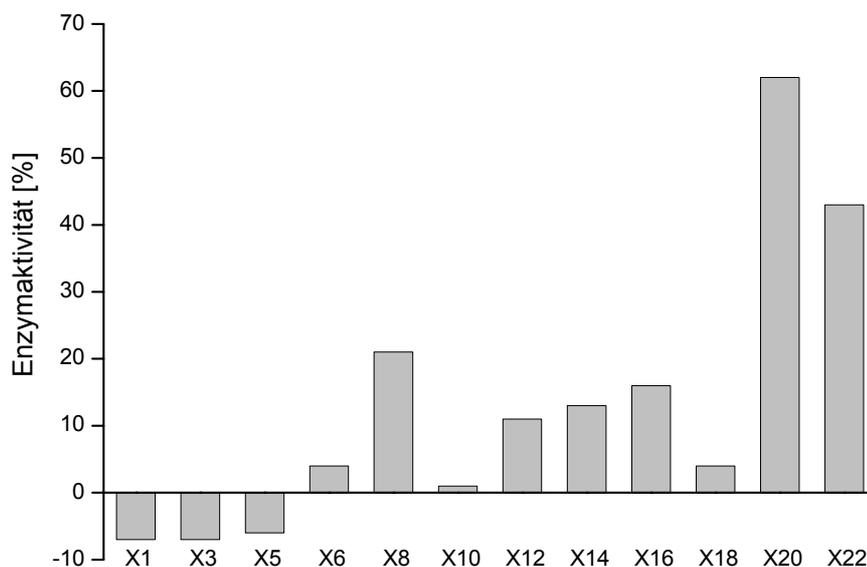


Abbildung 3.22: Restaktivität des EGFR bei Inkubation mit Fraktionen der Trennung EL10.

Die Restaktivitäten des EGFR werden in Prozent angegeben. Dargestellt ist die Enzymaktivität bei Inkubation mit den Hauptfraktionen der Trennung EL10 von *Dendrodoa grossularia*. Die Substanzkonzentration betrug 100 µg/ml.

Während die Fraktionen X1, X5 und X10 als Substanzgemische vorlagen, bestätigten NMR- und HPLC-Analysen die Reinheit der Fraktion X3. Analytische HPLC verdeutlichte, dass die gleiche Substanz in den Fraktionen L9 der Essigesterphase und der Fraktion L10 der *n*-Butanolphase enthalten und vermutlich für die beobachtete enzymhemmende Wirkung beider Fraktionen verantwortlich war (Abbildung 3.23). Die geringere Aktivität der Fraktion L9D5D4 im Vergleich zu der Fraktion EL10X3 ist durch ihre Verunreinigung zu erklären. Da sich die Konzentrationsreihe auf eine definierte Menge Substanz bezieht, die in DMSO-*d*₆ aufgenommen und schrittweise auf die einzelnen Konzentrationsstufen verdünnt wird, ist durch die Mitwaage der Verunreinigungen die tatsächliche Konzentration der aktiven Substanz bei L9D5D4 geringer als bei der Fraktion L10X3.

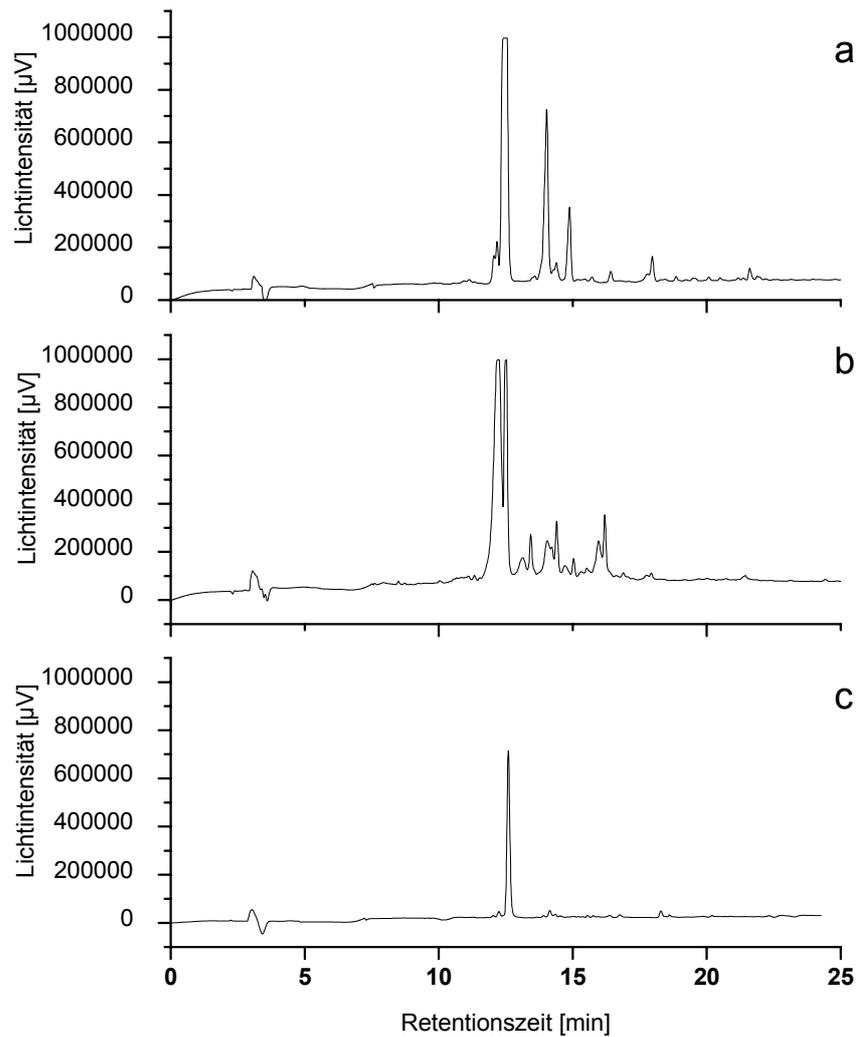


Abbildung 3.23: HPLC-Chromatogramme der im PTK-Assay aktiven und aufgereinigten Fraktionen von *Dendrodoa grossularia*.

Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen L9D4D5 (a) und L9D5D4 (b) der *n*-Butanolphase und der Fraktion L10X3 (c) der Essigesterphase.

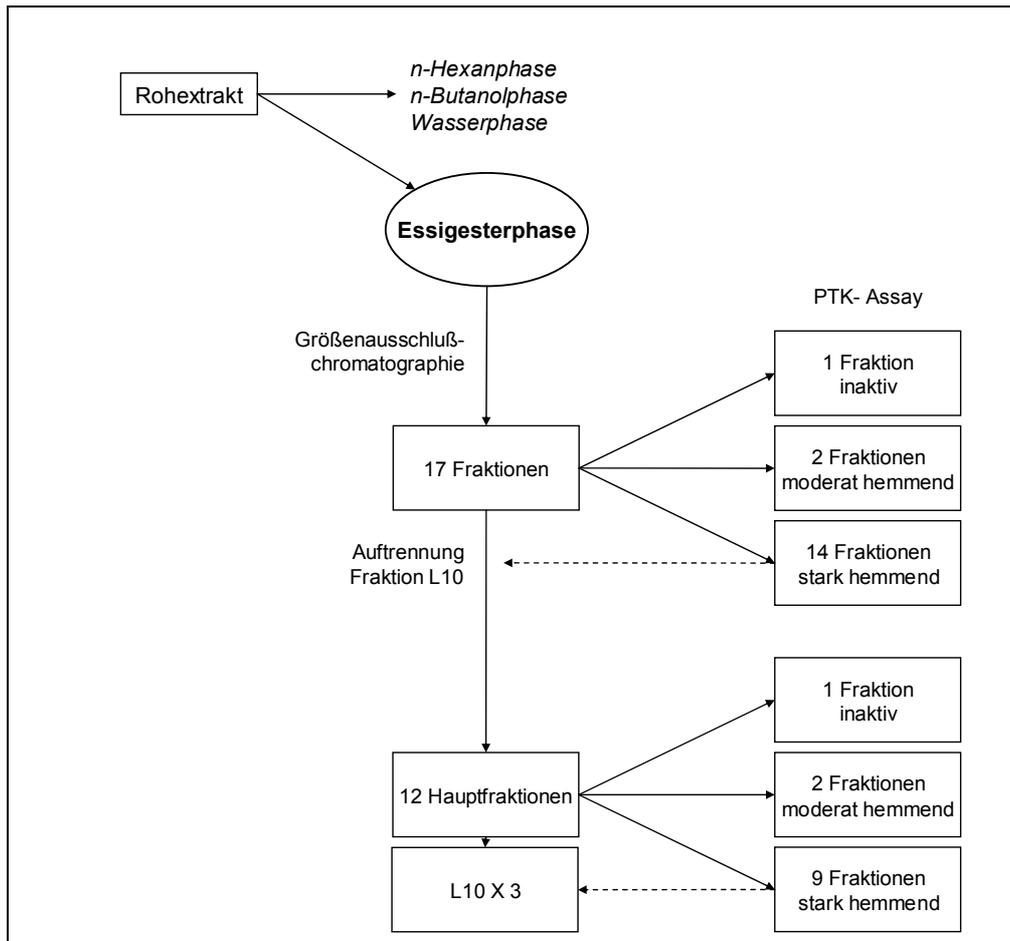


Abbildung 3.24: *Bioassay-guided Fractionation* der Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia* mittels PTK-Assay.

Schematische Darstellung der sich an der Enzymhemmung orientierenden Fraktionierung der Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia*. L10 bezeichnet eine stark enzyminhibitorische Fraktion, die aus der Größenausschlusschromatographie resultierte und weiter bearbeitet wurde, Fraktion L10X3 lag nach der ersten Auftrennung von Fraktion L10 als Reinsubstanz vor und musste nicht weiter aufgereinigt werden.

3.4.2 Identifizierung des EGFR-Inhibitors Tubastrin

Über HR-ESI-MS der Substanz EL10X3 wurde $C_9H_{11}N_3O_2$ ($m/z = 194,0922 [M]^+$, $\Delta m = 1,1$ ppm) als Summenformel ermittelt, aus der sich sechs Doppelbindungsäquivalente ableiten ließen. Die 1H -chemischen Verschiebungen (Abbildung 3.25) wiesen auf eine Verbindung mit einer aromatischen Gruppe hin. Die COSY-Korrelation sowie die Verschiebung der zugehörigen 1H -Daten ließen auf eine olefinische Bindung schließen, die gemäß der Kopplung der Signale in *E*-Konfiguration vorliegen musste (Tabelle 3.8). Das $^1H,^{15}N$ -Spektrum zeigte eine der Doppelbindung benachbarte NH-Gruppe. Die 1H -Verschiebung von Proton Nummer 9 wies auf eine Position im Ring hin, die wegen des Singulettts im 1H -Spektrum und fehlender COSY-Korrelation isoliert sein musste. Über die $^1H,^{13}C$ -Verschiebungen konnte die Grundstruktur des Ringes und der Seitenkette als ein 3,4-dihydroxyliertes Styrol-Derivat identifiziert werden.

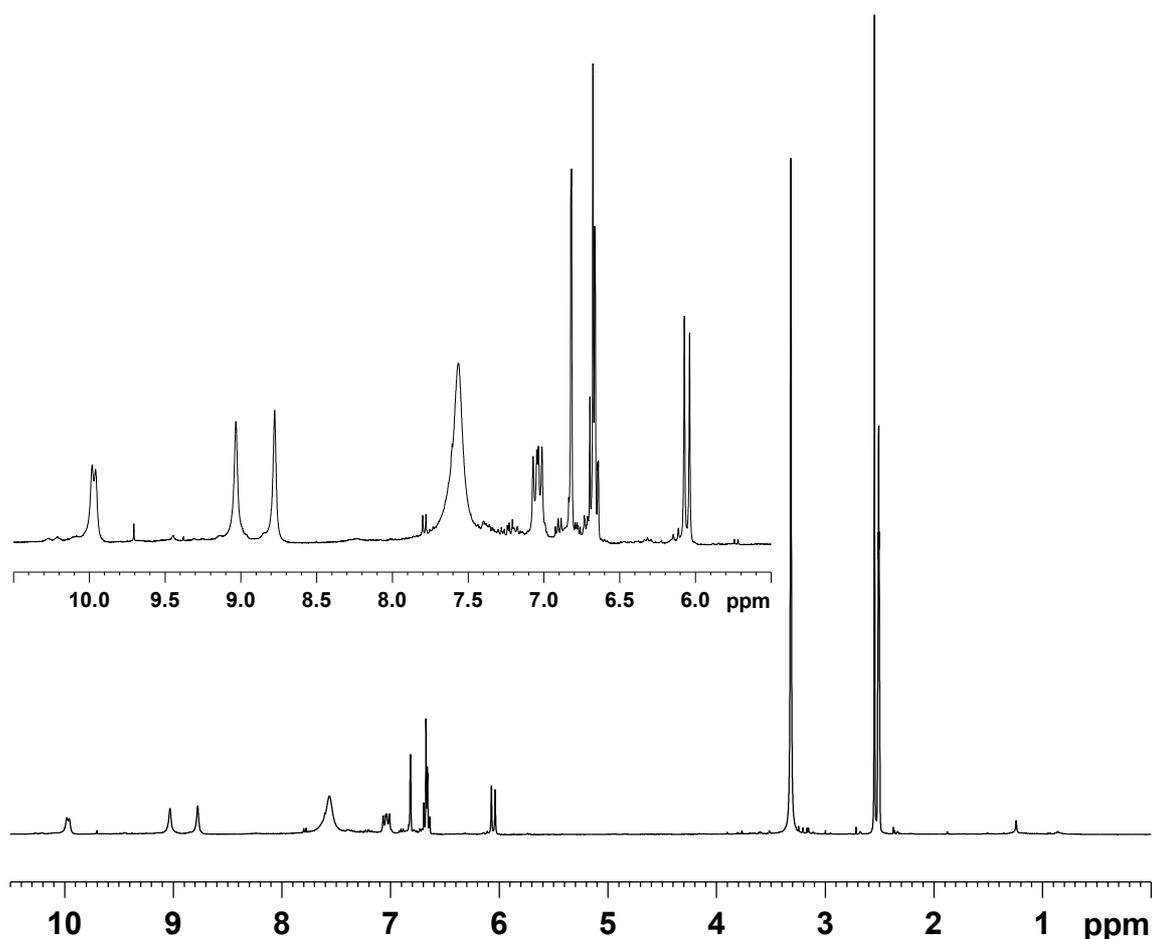


Abbildung 3.25: 1H -Spektrum der Fraktion EL10X3 von *Dendrodoa grossularia*.

Der Bereich zwischen 5,5 ppm und 10,5 ppm ist vergrößert dargestellt. Die NMR-Messung erfolgte bei 400 MHz in $DMSO-d_6$.

Die Stickstoffatome wurden in einer Guanidingruppe vermutet, die über einen Sakaguchi-Test (Auterhoff *et al.* 1977) nachgewiesen werden sollte. Der Nachweis wird über eine Farbreaktion von Hypohalogeniten und Phenolen mit dem Guanidin-Derivat im alkalischen Medium geführt. Die Reagenzien Natriumhydroxid, 1-Naphthol und Natriumhypobromit wurden nacheinander zu der Substanzlösung hinzupipettiert. Während in der Literatur erst bei der Zugabe von Hypohalogenit ein charakteristischer Farbumschlag stattfinden soll, induzierte in diesem Versuch schon Natriumhydroxid eine rotbraune Färbung der Substanzlösung. Die Zugabe von 1-Naphthol veränderte die Färbung nicht, Natriumhypobromit führte hingegen zu einem gelben Farbumschlag.

Erklärbar wäre der erste Farbumschlag mit der Bildung eines Benzochinons und weiteren Umlagerungen im Molekül bei der Reaktion mit Luftsauerstoff im alkalischen Milieu (Abbildung 3.26) analog einer Adenochrom-Reaktion. Das Endprodukt dieser Reaktion ist ein Polymethin-Farbstoff, dessen delokalisiertes π -Elektronensystem die Rotfärbung der Substanzlösung verursacht.

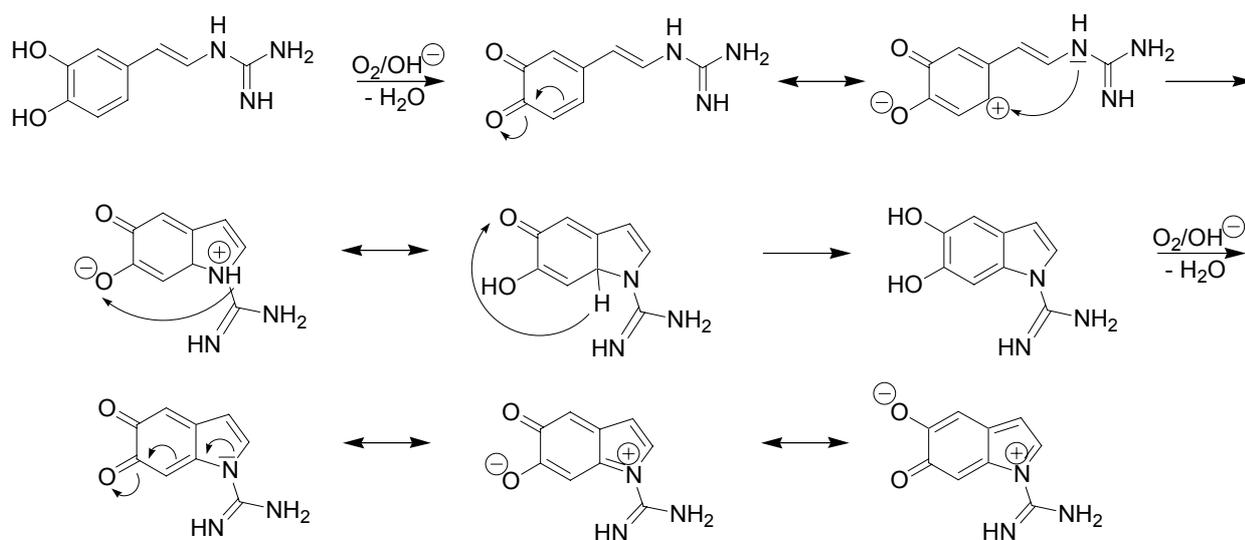


Abbildung 3.26: Vermuteter Reaktionsverlauf von Tubastrin mit Natriumhydroxid.

Die Zugabe von Natriumhypobromit verursachte vermutlich die Bromierung des Polymethins, was eine Unterbrechung des delokalisierten Elektronensystems und die Gelbfärbung des Reaktionsgemisches zur Folge hat. Der bei Guanidinderivaten zu erwartende Reaktionsverlauf einer Rotfärbung bei Zugabe des Natriumhypobromits wurde daher nicht beobachtet, und das Vorliegen einer Guanidingruppe konnte mit dem Versuch weder widerlegt noch bestätigt werden. Fraglich ist, wie Sakai *et al.* (1987) die Sakaguchi-Reaktion mit Tubastrin durchgeführt haben, um zu einem eindeutig positiven Ergebnis zu kommen, da in der Veröffentlichung keine genauen Angaben zur Durchführung enthalten sind. Ebenso ist das positive Ergebnis der

Sakaguchi-Reaktion mit einem aus einem Schwamm isolierten Tubastrin-Derivat (Urban *et al.* 1994, Abbildung 3.28) angesichts der vorliegenden Ergebnisse nicht nachzuvollziehen. Möglicherweise würde die Verwendung von Natriumhypochlorit, das im Gegensatz zu Natriumbromat in Lösung kein Natriumhydroxid enthält, und eine Umkehrung des Versuchsprotokolls zu einem aufschlussreicheren Ergebnis führen, da die Oxidation des Dihydroxybenzols zu Beginn der Reaktion vermieden würde. Die Interpretationsmöglichkeiten der beobachteten Färbungen sind allerdings sehr begrenzt, da der genaue Mechanismus der Sakaguchi-Reaktion bisher nicht eindeutig geklärt ist (Heesing *et al.* 1967). Gesichert ist der erste Reaktionsschritt, bei dem das Guanidin-Derivat mit dem Hypobromit zu einem N-Brom-Guanidin reagiert. Im Weiteren bildet sich vermutlich als instabile Zwischenstufe ein Anion der N-Brom-Verbindung, bei dem unter Abspaltung des Broms die Aminogruppe vom Kohlenstoff an den Stickstoff übertritt. Die Bildung des Sakaguchi-Farbstoffs wird auf eine Reaktion dieser zweiten Zwischenstufe mit einem bromierten Chinon zurückgeführt (Abbildung 3.27).

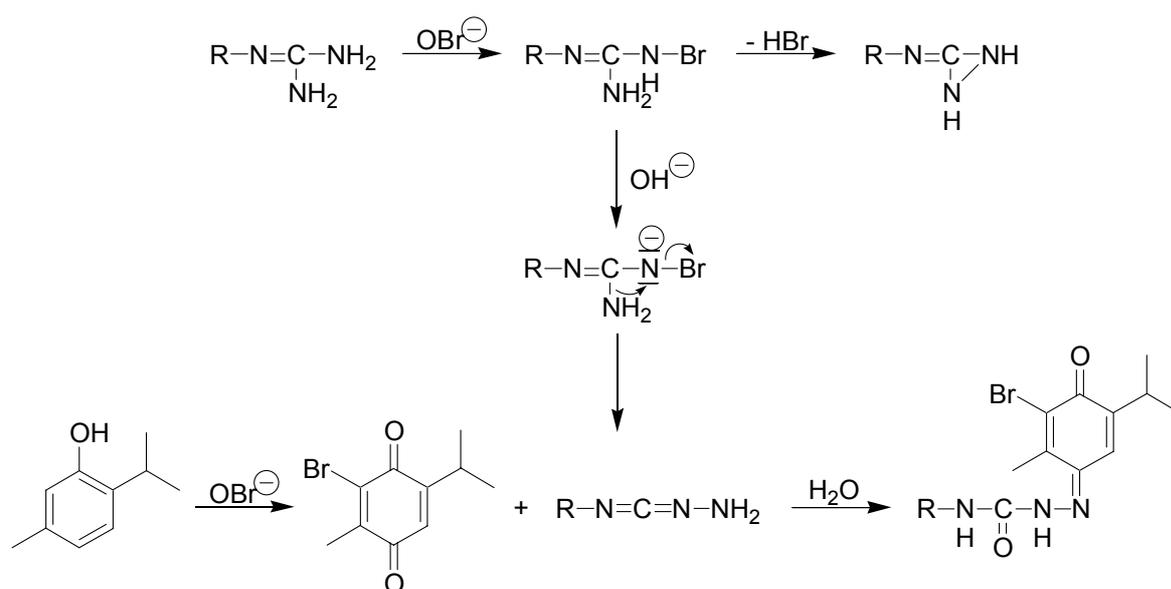


Abbildung 3.27: Vermuteter Mechanismus der Sakaguchi-Reaktion (nach Heesing *et al.* 1967).

Tabelle 3.8: NMR-Daten von Tubastrin aus der Koralle *Tubastrea aurea* a) (Sakai *et al.* 1987) und der Ascidie *Dendrodoa grossularia* b).

No.	a)		b)		Kopplung	Molekül- gruppe	COSY	¹ H, ¹³ C- HMBC	¹ H, ¹⁵ N- HMBC
	δ(¹³ C)	δ(¹ H)	δ(¹³ C)	δ(¹ H)					
1	155,9	–	153,9	–	–	C	–	–	–
2	146,5	–	145,4	–	–	C	–	–	–
3	146,2	–	144,7	–	–	C	–	–	–
4	128,7	–	126,9	–	–	C	–	–	–
5	120,0	6,67	120,0	7,04 (dd)	13,9 Hz 9,2 Hz	CH	8, 10	1, 4	10
6	119,2	6,80	117,4	6,65 (m)	–	CH	–	8, 9	–
7	118,5	7,10	115,6	6,67 (m)	–	CH	–	4	–
8	116,5	7,50	115,0	6,05 (d)	13,9 Hz	CH	5	5, 6, 9	10
9	113,7	7,70	112,7	6,81 (d)	1,5 Hz	CH	–	3, 6, 8	–
10	–	9,22	(103)	9,96 (d)	9,2 Hz	NH	5	–	–
11	–	–	(77)	7,55 (b)	–	NH ₂	–	–	–
2-OH	–	–	–	9,02 (s)	–	–	–	2, 7	–
3-OH	–	–	–	8,76 (s)	–	–	–	3, 9	–

a) Die Messung erfolgte mit dem Lösungsmittel Pyridin-*d*₅. b) Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben. Als interner Standard diente das Signal des Lösungsmittels DMSO-*d*₆ (2,50 ppm und 39,5 ppm). Die Multiplizität der Signale (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplet, m: Multiplett) sind in Klammern hinter δ(¹H) angegeben. Die ¹⁵N-NMR-Spektren wurden nicht kalibriert, δ(¹⁵N) sind in Klammern angegeben.

Durch die über NMR ermittelten Fragmente und eine Literaturrecherche zur Summenformel konnte die Substanz als Tubastrin identifiziert werden (Abbildung 3.28), einem Guanidinostyren, das Ende der 1980er Jahre aus der Koralle *Tubastrea aurea* isoliert wurde (Sakai *et al.* 1987). Dies ist der erste Nachweis von Tubastrin in Tunikaten.

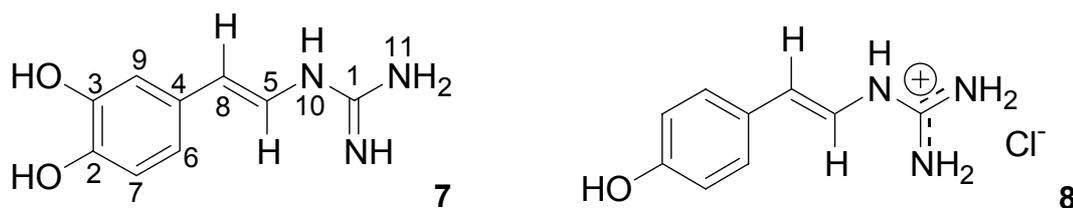


Abbildung 3.28: Strukturformeln von Tubastrin (7) und einem Tubastrin-Derivat (8).

Tubastrin wurde aus der Ascidie *Dendrodoa grossularia* sowie der indopazifischen Koralle *Tubastrea aurea* (Sakai *et al.* 1987), das Derivat aus einem australischen Schwamm *Spongosorites* sp. (Urban *et al.* 1994) isoliert.

Die Daten einer IR-Messung der Substanz (Abbildung 3.29) wiesen auf OH-Gruppen, eine olefinische Bindung und einen Aromaten hin, wobei der Fingerprint-Bereich des Aromaten sich als wenig aussagekräftig darstellte. Das Vorliegen einer Carbonylgruppe konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Werte deckten sich mit den Literaturwerten von Sakai *et al.* (1987) und konnten die Hypothese bestätigen (Tabelle 3.9).

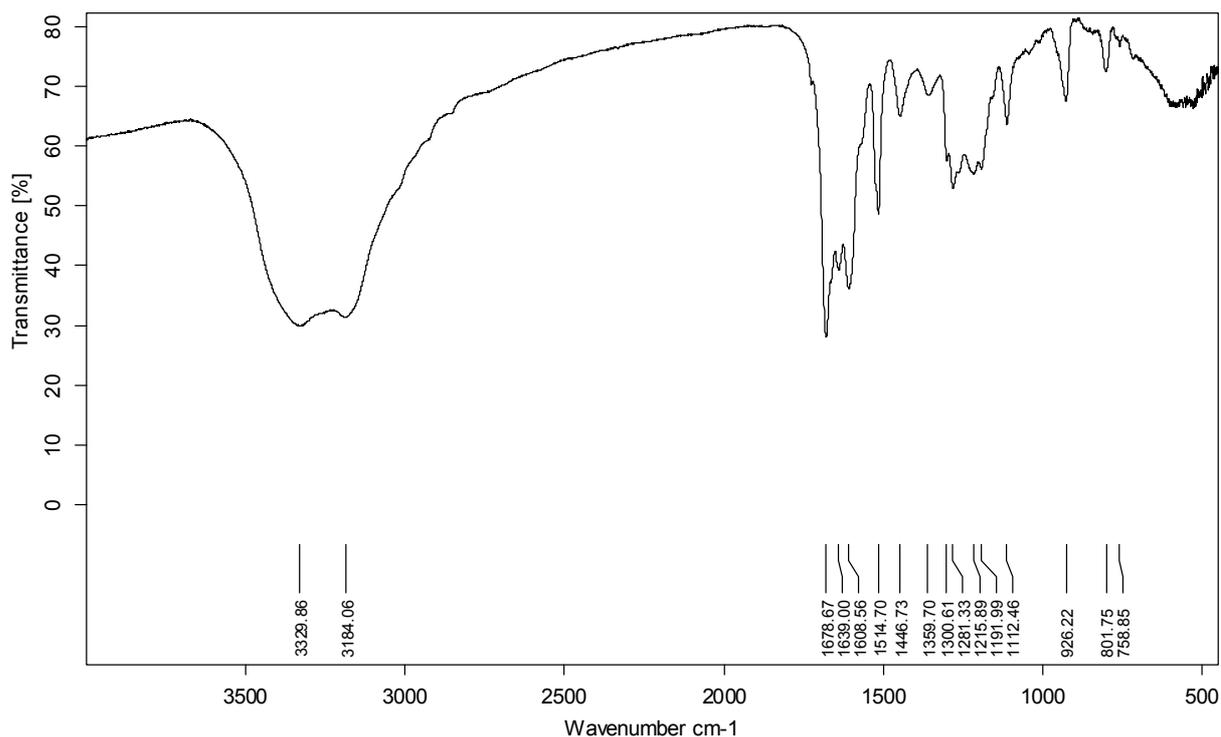


Abbildung 3.29: IR-Spektrum (KBr-Preßling) von Tubastrin.

Tabelle 3.9: IR-Daten von Tubastrin aus *Dendrodoa grossularia* im Vergleich zu den Literaturwerten von Sakai *et al.* (1987).

Sakai <i>et al.</i> (1987) [cm ⁻¹]	eigene Messung [cm ⁻¹]	
3320	3330	} -OH
3160	3184	
1670	1679	} Guanidingruppe
1640	1639	
1600	1609	} Aromat
1520	1515	
1440	1447	} -C=C-
1350	1360	
1300	1301	
1275	1281	
1190	1216	
1155	1192	
1110	1112	
930	926	} -C=C-

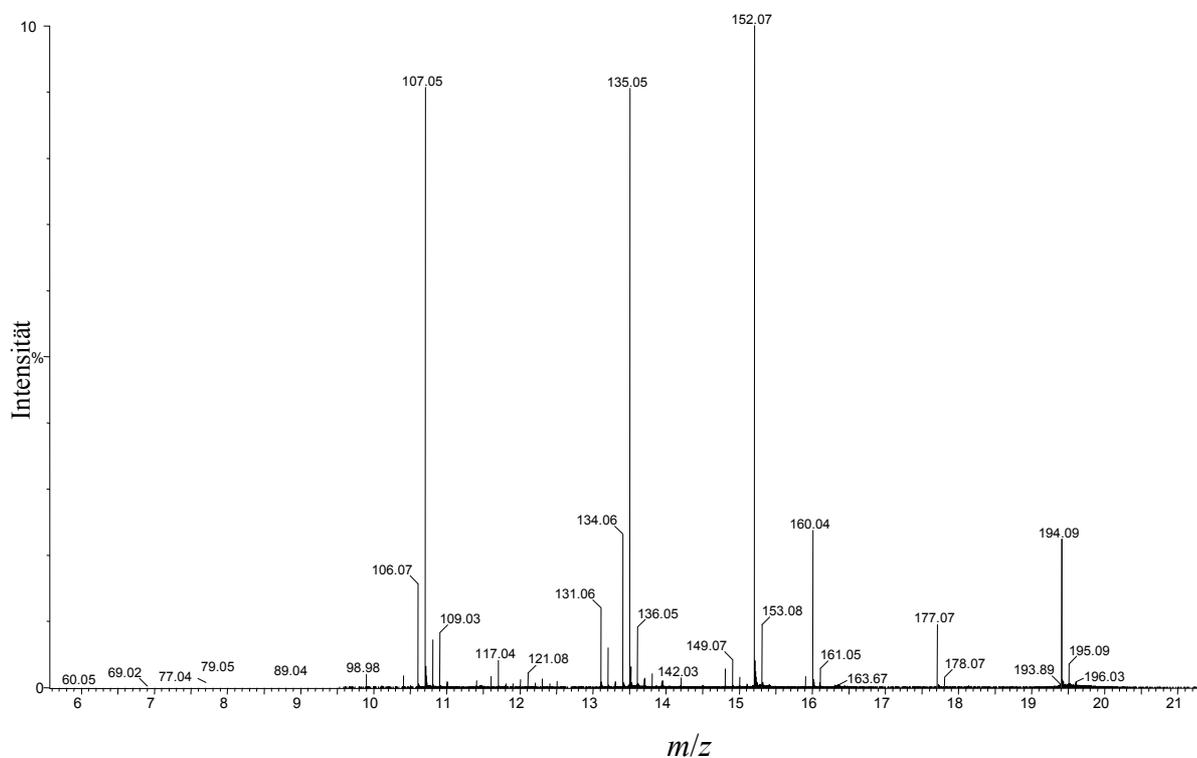


Abbildung 3.30: MS/MS-Fragmentierung von Tubastrin.

MS/MS-Spektrometrie führte zu Fragmenten von $m/z = 152$ $[M-CH_2N_2]^+$, 135 $[M-CH_5N_3]^+$ und 107 $[M-C_2H_5N_3O]^+$ (Abbildung 3.30), die den Strukturvorschlag untermauerten. Die postulierte Fragmentierung ist in Abbildung 3.31 dargestellt. Unter Verlust der Guanidingruppe entsteht ein Aminostyrol-Ion, das sich unter Abspaltung von Ammoniak zu einer Spiroverbindung umlagert. Die günstigere Ladungsverteilung führt zur Bildung eines Aromaten mit sieben Kohlenstoffatomen.

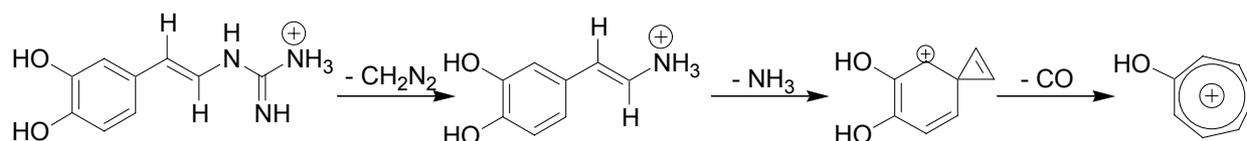


Abbildung 3.31: Postulierte MS/MS-Fragmentierung von Tubastrin.

Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten mit Bildung einer Spiroverbindung ist von N-Methyl-2,2'-diphenyl-diethylaminen bekannt (Weibel *et al.* 1973). Bei dieser Reaktion entsteht durch eine α -Spaltung ein Iminiumion, aus dem unter Verlust eines Methylenmethylamins eine Spiroverbindung hervorgeht (Abbildung 3.32).

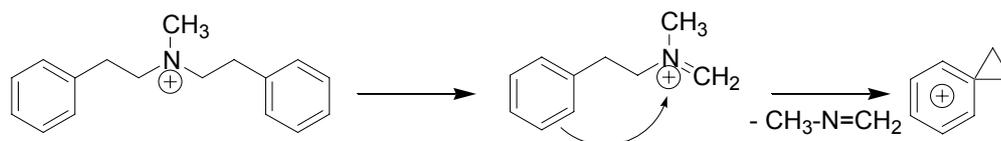


Abbildung 3.32: Fragmentierungsverhalten des N-Methyl-2,2'-diphenyl-diethylamins.

Eine Überprüfung des Rohextraktes und der vier Phasen der Sammlung 2003 von *Dendrodoa grossularia* zeigte sich wie bei der Sammlung des Jahres 2001 in der *n*-Butanolphase eine Enzymhemmung auf 2% Restaktivität. Über eine MS-Analyse der *n*-Butanolphase ließ sich ein Massenpeak von $194,8326$ $[M]^+$ identifizieren, der auf Tubastrin hinweist. Der Anteil des Metaboliten am Rohextrakt von *Dendrodoa grossularia* wurde durch quantitative HPLC bestimmt und betrug 3,8% bis 4,9% (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Anteil von Tubastrin im getrockneten Rohextrakt von *Dendrodoa grossularia*.

Jahr der Sammlung	Anteil am Rohextrakt [%]
2001	$3,75 \pm 0,27$
2003	$4,89 \pm 0,42$

Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, ermittelt aus jeweils vier Proben der beiden Rohextrakte.

Ein Konzentrationsversuch ergab einen IC_{50} -Wert von Tubastrin von $34,6 \mu\text{g/ml}$ ($179,2 \mu\text{M}$). Tubastrin zeigte damit eine deutlich schwächere Hemmwirkung als Piceatannol ($1,8 \mu\text{g/ml}$ bzw. $7,4 \mu\text{M}$, Abbildung 3.33).

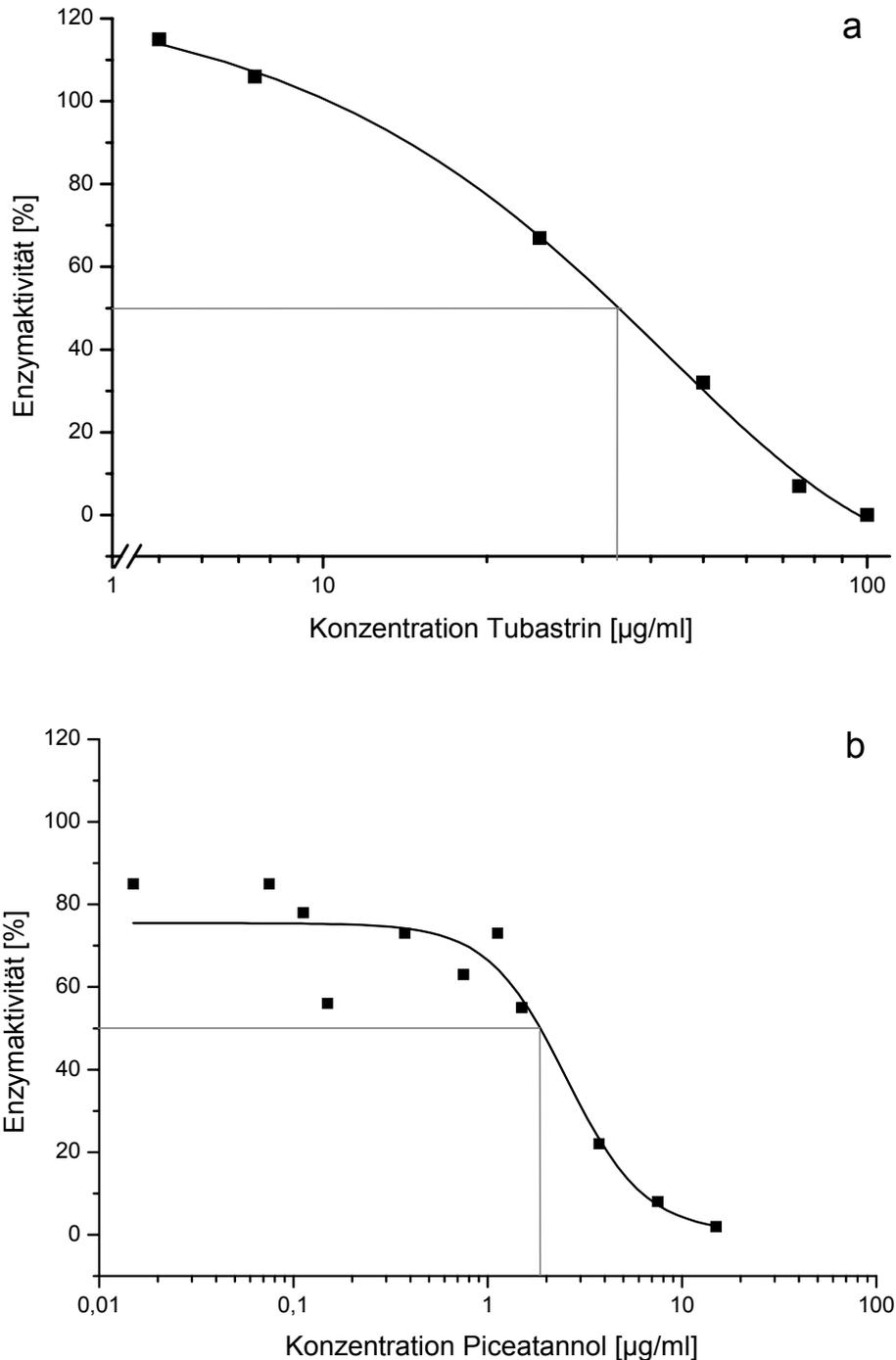


Abbildung 3.33: Enzymaktivität in Relation zur Konzentration von Tubastrin und von Piceatannol.

Angegeben sind die Restaktivitäten des Enzyms bei der jeweiligen Substanzkonzentration von Tubastrin (a) und Piceatannol (b). Testdurchführung und Ermittlung der Enzymaktivität siehe Kapitel 4.5.4. Aus den Einzelwerten wurde mittels einer Fit-Funktion eine Aktivitätskurve (schwarz) erstellt und daraus bei $y = 50$ der IC_{50} -Wert abgelesen (grau).

Ein weiterer in der Struktur ähnlicher EGFR-Hemmstoff ist das aus einem Actinomyceten isolierte Erbstatin. Der IC_{50} -Wert von Erbstatin gegen EGFR liegt bei $3 \mu\text{M}$ (Umezawa *et al.* 1986). Alle drei Verbindungen besitzen ein Styryl-Skelett als grundlegendes Element. Sie unterscheiden sich in der Anordnung der Hydroxylgruppen des Phenols und in der Substituierung, wobei Piceatannol ein weiteres Hydroxyphenol und Erbstatin und Tubastrin eine Formamid- bzw. eine Guanidingruppe aufweisen (Abbildung 3.34). Alle drei Substanzen zeigen sich kompetitiv zum Substrat, wobei die aromatischen Hydroxylgruppen für die inhibitorische Wirkung von grundlegender Bedeutung sind (Gazit *et al.* 1989), vermutlich weil sie das Hydroxyphenol tyrosinhaltiger Peptide imitieren (Burke *et al.* 1991).

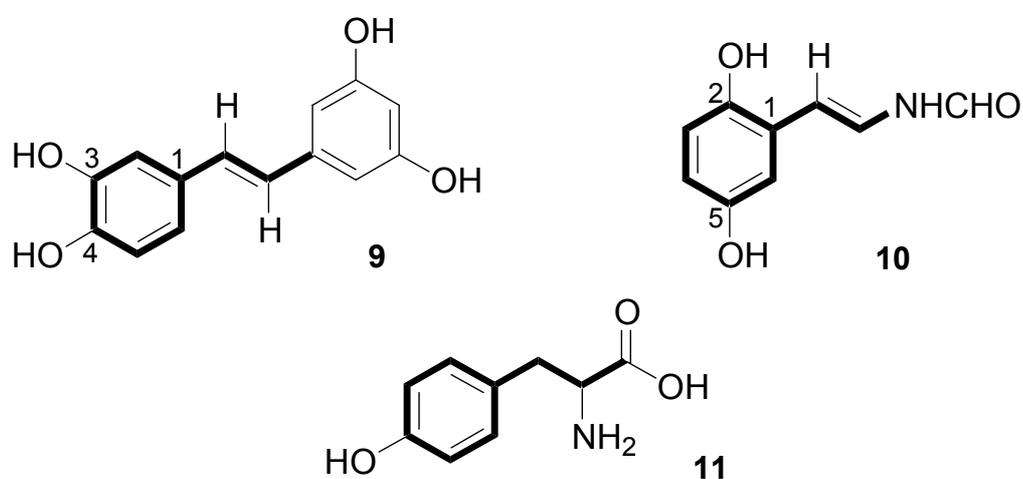


Abbildung 3.34: Strukturformeln von Piceatannol (9), Erbstatin (10) und Tyrosin (11).

Piceatannol und Erbstatin sind zwei bekannte Hemmstoffe des EGFR. Sie besitzen eine der Aminosäure Tyrosin ähnliche Grundstruktur.

Burke (1991) testete vier synthetische Analoga von Erbstatin auf den Einfluss ihrer strukturellen Komponenten, die sich im Substitutionsmuster des Aromaten und im Vinylrest unterschieden. Dabei zeigten die Strukturen mit einer 3,4-Substituierung des Aromaten mit IC_{50} -Werten von über $1000 \mu\text{M}$ eine deutlich geringere Hemmwirkung als diejenigen mit einer 2,5-Substituierung, während Unterschiede in den Seitenketten die inhibierende Wirkung nur gering beeinflussten. In anderen Versuchen (Yaish *et al.* 1988, Smyth *et al.* 1993) wurden an das Styryl-Skelett von Erbstatin und Piceatannol ein Salicylring angehängt, womit die einzigen strukturellen Unterschiede beider Verbindungen auf der Position der Hydroxylgruppen im Phenylrest lagen. Die IC_{50} -Werte beider Derivate lagen trotz der strukturellen Veränderung noch immer zwischen $2 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$. Eine Sättigung der Ethenogruppe ergab dagegen eine um bis zu 10-fach schwächere Hemmung des Enzyms.

Obwohl der 3,4-Dihydroxyphenylrest als auch die zentrale Doppelbindung bei Tubastrin vorhanden sind, liegt die Hemmwirkung deutlich unter der von Piceatannol und Erbstatin. Dies könnte auf eine abschwächende Wirkung der Guanidingruppe zurückzuführen sein. In welcher Art und Weise diese Gruppe die inhibierende Wirkung beeinflusst, müsste in weiterführenden Versuchen, möglicherweise mit synthetisierten Tubastrin-Derivaten, untersucht werden.

Das aus dem Schwamm isolierte Tubastrinderivat sowie weitere Guanidinoverbindungen aus Schwämmen zeigten antibakterielle, antivirale oder cytotoxische Aktivität (Nakamura *et al.* 1983, Jares-Erijman *et al.* 1993, Kourany-Lefoll *et al.* 1994, Urban *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit zeigte Tubastrin mit einer MIC von 37 µg/ml moderate cytotoxische Aktivität. In bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung durchgeführten antimikrobiellen Versuchen mittels eines Agar-Diffusions-Assays ließ Tubastrin bei einer Konzentration von 10 µg/Filterblättchen keine Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Micrococcus luteus* erkennen. Die Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* war so gering, dass der Hemmhof nicht ausgemessen werden konnte. Abgesehen von dem enzymhemmenden Effekt, der in den anderen Arbeiten nicht getestet wurde, zeigt Tubastrin in diesen Versuchen deutlich geringere Aktivität als andere Sekundärmetaboliten mit Guanidingruppen. Die strukturelle Ähnlichkeit zu Tyrosin legt nahe, dass Tubastrin wie diverse andere Naturstoffe aus Ascidien (McDonald *et al.* 1995, Smith *et al.* 1998, Davis *et al.* 1999) aus dieser Aminosäure synthetisiert wird.

3.4.3 Physiologische und ökologische Bedeutung von PTK-beeinflussenden Substanzen

Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) bilden eine Proteinklasse, deren Alter anhand von Genanalysen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* auf über 800 Millionen Jahre geschätzt wird. Diese hochkonservativen Enzyme erfüllen in allen multizellulären Organismen essentielle Funktionen bei der Kopplung von Signalen über eine Zellmembran ins Zellinnere und bei der Zellproliferation (Yarden *et al.* 1988). Der Zellzyklus ist hoch reguliert und von vielen regulativ aktivierenden und deaktivierenden Faktoren abhängig, deren Ausfall für eine Proliferation und damit für Tumorbildung verantwortlich sein kann (Noble *et al.* 2004). Bei pelagischen Invertebratenlarven sind PTKs besonders von Bedeutung, wenn die Larven von der freischwimmenden in die sessile Lebensweise übergehen, da der Übergang vom Larvenstadium zum sessilen Adulttier grundlegende Umstrukturierungen im Körperbau verlangt, die durch Zellteilung und geregeltes Zellsterben verwirklicht werden. Studien belegen, dass die Inhibierung von PTKs bei Ascidien- und Seepockenlarven die Anheftung und die Metamorphose stört (Okazaki *et al.* 2000, Green *et al.* 2002). Die Suche eines passenden Substrats, die Anheftung der Larve und die Metamorphose zum adulten Tier werden unter anderem durch Neurotransmitter reguliert (Baloun *et al.* 1984). Die Anheftung diverser sessiler Invertebraten wird durch Tyrosinderivate induziert (Pawlik 1990, Rodríguez *et al.* 1993), zu denen die Catecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin (Abbildung 3.35) zählen. Die strukturelle Ähnlichkeit der PTK-Hemmstoffe zu den Catecholaminen legt nahe, dass Tubastrin diese Neurotransmitter imitiert und an ihre Rezeptoren bindet, ohne ein entsprechendes intrazelluläres Signal auszulösen, und somit den Organismus gegen Bewuchs durch Epibionten schützt. Gleichermäßen wirksam könnten die Stoffe sein, die zu einer Verstärkung der PTK-Aktivität führen, denn jede Störung der bei Anheftung und Metamorphose stattfindenden Reaktionskaskaden kann zum Abbruch des Ablaufs führen.

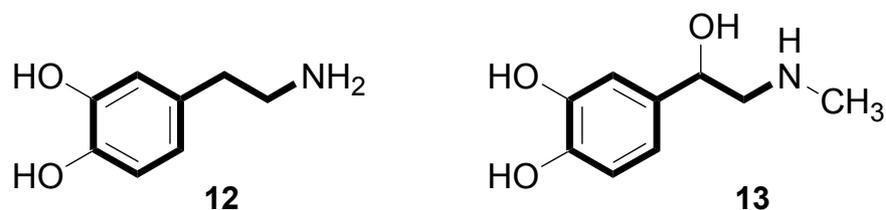


Abbildung 3.35: Strukturformeln von Dopamin (12) und Adrenalin (13).

3.4.4 Zusammenfassung der biologischen Aktivität von *Dendrodoa grossularia*

Extrakte aus *Dendrodoa grossularia* waren in allen vier biologischen bzw. pharmakologischen Assays aktiv (Tabelle 3.11). Im antibiotischen Assay wiesen alle Extrakte gegen das Bakterium *Comamonas testosteroni* und die Essigester- und die *n*-Butanolphase gegen das Bakterium Alpha proteobacterium [AJ244780.1] eine hemmende Wirkung auf. Obwohl die Essigester- und die *n*-Butanolphase auch im cytotoxischen Assay und im PTK-Assay Aktivität zeigten, lassen sich die Ergebnisse der drei Assays nicht korrelieren, da die für die Enzymhemmung verantwortliche Substanz Tubastrin als Reinsubstanz weder stark cytotoxische noch antimikrobielle Aktivität zeigte. Die Isolierung der in diesen Tests aktiven Substanzen ist Ziel weiterer Forschung an dieser Ascidiensart.

Tabelle 3.11: Übersicht über die biologische Aktivität von *Dendrodoa grossularia*-Extrakten.

Wirkung	Aktivität	Extrakt	Tubastrin
besiedlungshemmend	+++ ++	R, E B	n.g.
antimikrobiell	+ ++	R, H, W E, B	–
cytotoxisch	+++	E	++
enzymhemmend	+++	E, B	+++

Die Aktivität wurde mit vier Zeichen dargestellt: + schwach, ++ moderat, +++ stark aktiv; – keine Aktivität; n.g.: nicht getestet.

Die Aktivität der Extrakte gegen Mikroorganismen und eukaryontische Zellstrukturen lassen *Dendrodoa grossularia* als einen Organismus erscheinen, der sich mit chemischen Substanzen erfolgreich gegen die Besiedlung von Ein- und Mehrzellern zur Wehr setzen könnte. In der Natur stellt sich diese Ascidiensart aber alles andere als steril dar (Abbildung 3.36). Es wurden sessile Tiere wie spirorbide Polychaeten, Hydrozoen und Bryozoen auf und zwischen den Individuen der in Aggregaten vorkommenden Ascidie gefunden. Außerdem lebt *Dendrodoa grossularia* in dichter Assoziation mit dem Schwamm *Clathrina coriacea*. Als mobile Epibionten wurden Caprelliden, Isopoden und Amphipoden gefunden (Tabelle 3.12).

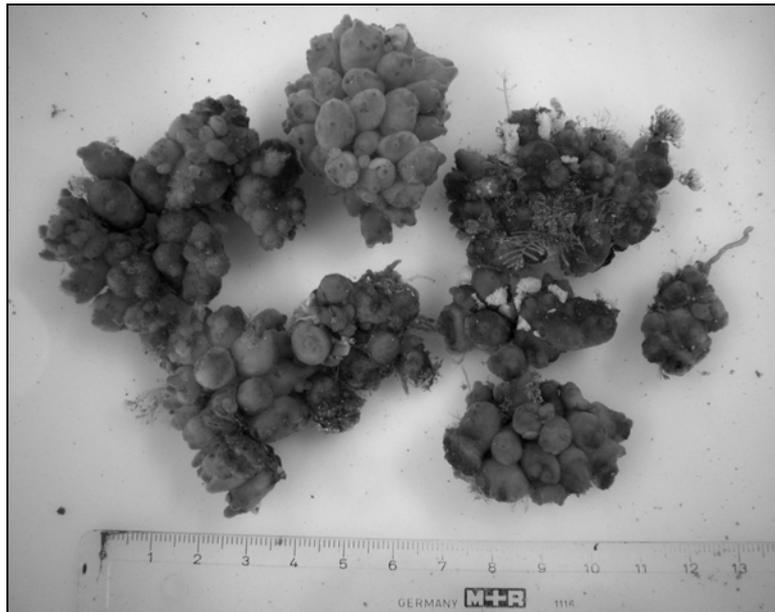


Abbildung 3.36: Aggregate von *Dendrodoa grossularia*.

Das Lineal dient als Referenz für die Größe der Aggregate, deren Bewuchs bestimmt wurde (Tabelle 3.12).

Ob die aktiven Substanzen in bestimmten Kompartimenten des Tiers akkumuliert werden, konnte nicht untersucht werden, da die Individuen zu klein für eine Trennung von Tunika und Körper oder die Untersuchung einzelner Organe waren. Erkenntnisse darüber könnten helfen, die Effekte ökologisch nachzuvollziehen. Alle in den Tests gefundenen Aktivitäten könnten dazu dienen, das Zusammenleben auf ein tolerierbares Maß oder hinsichtlich einer bestimmte Artzusammensetzung zu regulieren und ein komplettes Überwachsen der Ascidie zu verhindern. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass die mobilen Invertebraten als Weidegänger den Bewuchs der Ascidie gering halten. Wie schon an anderer Stelle erwähnt, wird die Ascidie neben einer chemischen Verteidigung andere Strategien zu ihrem Schutz entwickelt haben. Da sie in der Regel an Stellen mit großer Strömung und starker Wellenexposition zu finden ist, wird sie für viele Invertebratenlarven gar nicht als Substrat in Frage kommen, da großwachsende Epibionten durch den Wellenschlag vermutlich abgerissen würden. Diese Fragen müssen in Folgeversuchen geklärt werden, um ein Gesamtbild von der chemischen Ökologie von *Dendrodoa grossularia* zu bekommen.

Tabelle 3.12: Epibionten eines Aggregats von *Dendrodoa grossularia*.

sessil/mobil	Klasse	Art	Anzahl**
sessil	Calcarea (Kalkschwämme)	<i>Clathrina coriacea</i>	häufig
	Hydrozoa (Nesseltiere)	<i>Tubularia indivisa</i> <i>Abietinaria</i> sp. <i>Sertularia cupressina</i> <i>Sagartia elegans</i>	15 vereinzelt vereinzelt 1
	Bryozoa (Moostierchen)	<i>Crisia eburnea</i> <i>Crisidia cornuta</i> <i>Membranipora nitida</i> <i>Callopora lineata</i>	vereinzelt
mobil	Foraminiferida	<i>Globigerina</i> sp.	1
	Anopla (Schnurwürmer)	<i>Lineus ruber</i>	1
	Polychaeta (Borstenvwürmer)	<i>Typosyllis asmillaris</i> <i>Circeis spirillum</i> <i>Spirorbis spirorbis</i>	4 häufig häufig
	Bivalvia (Muscheln)	<i>Modiolula phaseolina</i> <i>Musculus</i> sp., juvenil	2 1
	Amphipoda* (Flohkrebse)	<i>Caprella linearis</i> nicht bestimmte Art	6 2
	Isopoda* (Asseln)	nicht bestimmte Art	2
	Ophiuroidea (Schlangensterne)	<i>Ophiopholis aculeata</i>	1

In der Tabelle sind die auf Aggregaten von *Dendrodoa grossularia* (Abbildung 3.36) gezählten sessilen und assoziierten Epibionten aufgelistet. Angegeben sind die Klasse und die Art der Epibionten, soweit sie bestimmt werden konnten. * Statt der Klasse wurde die Ordnung angegeben. **Angegeben ist in der Regel die Anzahl der Individuen. „vereinzelt“ bezeichnet das nur ein- oder zweimalige Auftreten von Kolonien dieser Art. Mit „häufig“ sind Arten bezeichnet, deren Individuen wegen der großen Anzahl und ihrer Bewegung nicht gezählt werden konnten.

3.5 Weitere Isolate aus Ascidien

Vier weitere Metaboliten wurden aus den untersuchten Ascidien isoliert und aufgeklärt. Die Substanzen fielen entweder durch ein Signal in HPLC-Chromatogrammen auf oder wurden als Reinsubstanz bei der Aufreinigung von Substanzgemischen genauer untersucht. Keine der im Folgenden beschriebenen Substanzen wurde durch ihre Aktivität in einem der Assays isoliert.

3.5.1 Homarin

Neben Tubastrin wurde aus *Dendrodoa grossularia* Homarin ($m/z = 160,0412$ $[M+Na]^+$) isoliert (Abbildung 3.37 und Tabelle 3.13), das ebenfalls in *Asciella scabra* gefunden wurde und analytischer HPLC zufolge in weiteren Ascidien vermutet wird. Homarin ist in marinem Phytoplankton (Yamaguchi *et al.* 1988, Keller *et al.* 1999) und einer Vielzahl von marinen Invertebraten, darunter sessilen Organismen wie Schwämmen, Bryozoen und Hydrozoen, zu finden (Beers 1966, Anthoni *et al.* 1989, McClintock *et al.* 1994, Urban *et al.* 1994, Bandaranayake *et al.* 1997), und besitzt dort vielfältige Funktionen.

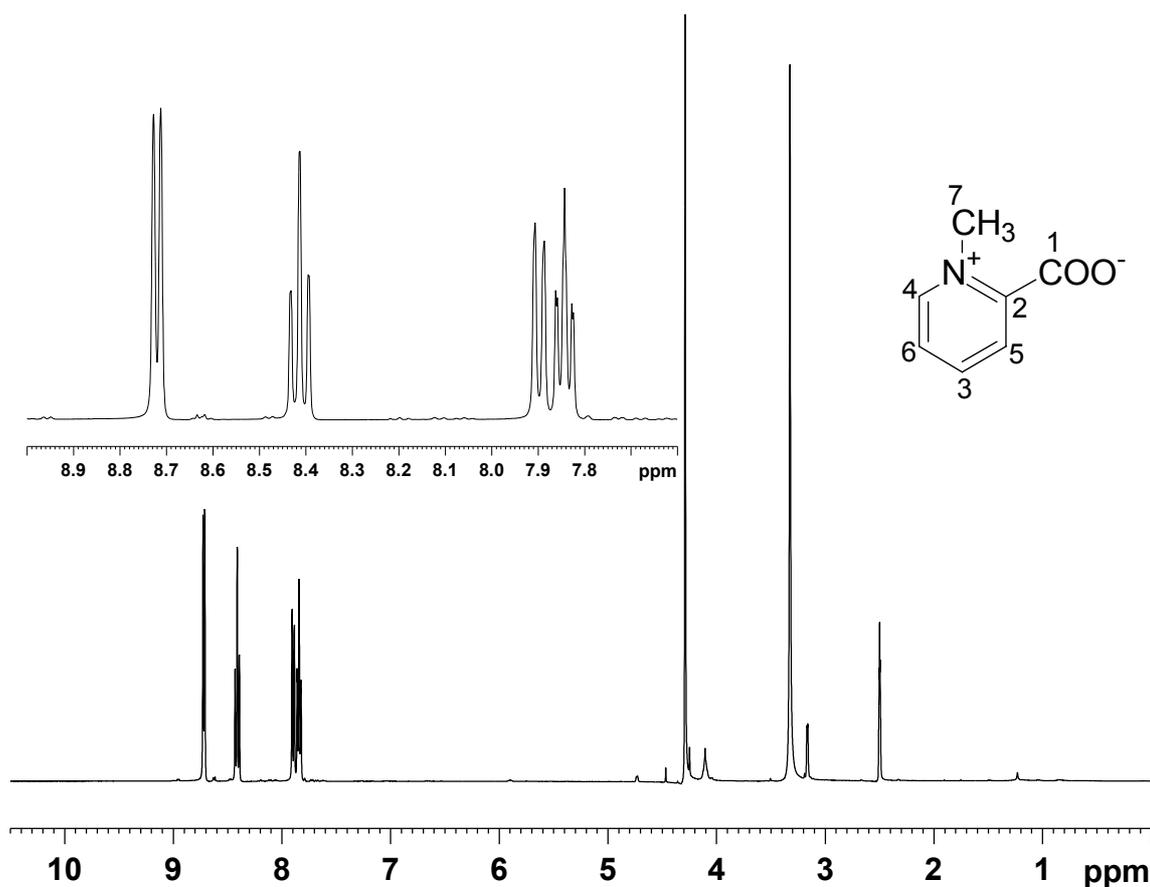


Abbildung 3.37: Strukturformel und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Homarin.

Homarin wurde aus *Dendrodoa grossularia* und *Asciella scabra* isoliert. Der Bereich zwischen 7,6 ppm und 9 ppm ist vergrößert dargestellt. Die NMR-Messung erfolgte bei 400 MHz in $\text{DMSO-}d_6$.

Tabelle 3.13: NMR-Daten von Homarin aus *Dendrodoa grossularia*.

No.	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	Molekülgruppe	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC
1	161,0	–	–	–	–
2	156,0	–	–	–	–
3	144,9	8,41 (t)	CH	5, 6	2, 4
4	144,3	8,72 (d)	CH	6	2, 3, 7
5	125,3	7,90 (d)	CH	3	1, 2
6	124,7	7,84 (t)	CH	3, 4	5
7	45,7	4,29 (s)	CH ₃	–	2, 4

Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben. Als interner Standard diente das Signal des Lösungsmittels DMSO-*d*₆ (2,50 ppm und 39,5 ppm). Die Multiplizität der Signale (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplet, m: Multiplett) sind in Klammern hinter $\delta(^1\text{H})$ angegeben.

Homarin wird von Coelenteraten als wasserlöslicher Stoff produziert, der bei Reizung des Organismus abgegeben wird (Cariello *et al.* 1970, Targett *et al.* 1983, Slattery *et al.* 1997) und vermutlich besiedlungshemmende Eigenschaften besitzt, wie aus der antimikrobiellen Wirkung des Homarin-haltigen Umgebungswassers der antarktischen Weichkorallenart *Gersemia antarctica* geschlossen wurde (Slattery *et al.* 1997). Aus Fächerkorallen der Gattung *Leptogorgia* isoliertes Homarin sowie drei strukturverwandte Verbindungen zeigten sich ebenfalls wachstumsinhibierend auf eine Diatomeenart, die als *Fouling*-Organismus an der Bildung von Biofilmen auf marinen Oberflächen beteiligt ist (Targett *et al.* 1983). Die antarktische Molluskenart *Marseniopsis mollis*, die Homarin über die Nahrung aufnimmt und in ihren Körpergeweben akkumuliert, nutzt Homarin vermutlich als Abwehrstoff gegenüber Fraßfeinden (McClintock *et al.* 1994). Hinweise darauf lieferten Futtermittelversuche mit dem antarktischen Seestern *Odontaster validus*, der als Räuber in dem Habitat gilt. Homarinpräparierte Pellets wurden von *Odontaster validus* nicht nur abgelehnt, sondern lösten bei hoher Substanzkonzentration sogar eine Fluchtreaktion aus. In Crustaceen ist Homarin vermutlich an der Osmoregulation beteiligt (Dall 1971). Bei Tunikaten wurde Homarin bisher nur von der solitären Ascidie *Halocynthia roretzi* berichtet (Watanabe *et al.* 1985). Über seine spezielle Funktion in diesem Organismus ist nichts bekannt.

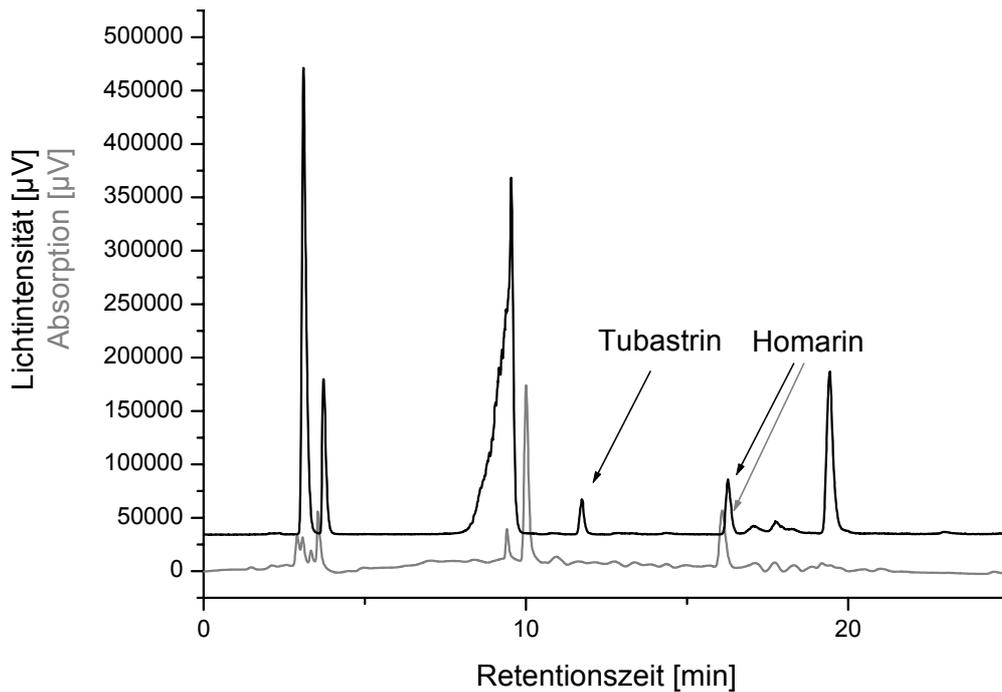


Abbildung 3.38: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Dendrodoa grossularia*.

Dargestellt sind die Streulicht- (schwarz) und die UV-Detektion (grau) von Homarin und Tubastrin in dem Rohextrakt von *Dendrodoa grossularia*.

In der in dieser Arbeit untersuchten Ascidie *Dendrodoa grossularia* lag die Homarinkonzentration zwischen 3,9% und 4,6% des Rohextraktes (Tabelle 3.14). Diese hohe Konzentration sowie die aus anderen Organismen berichtete Aktivität schließen ein Vorkommen von Homarin als Stoffwechsel-Abfallprodukt aus.

Tabelle 3.14: Anteil von Homarin im getrockneten Rohextrakt von *Dendrodoa grossularia*.

Jahr der Sammlung	Anteil am Rohextrakt [%]
2001	4,61 ± 0,21
2003	3,90 ± 0,33

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, ermittelt aus jeweils vier Proben der Rohextrakte.

Homarin zeigte weder im cytotoxischen noch im PTK-Assay Wirkung. Auch im antimikrobiellen Assay wurde kein Effekt von Homarin nachgewiesen, allerdings wurde der Test nur an zwei Bakterienstämmen (*Vibrio harveyi* und *Microbacterium barkeri*) durchgeführt (H. Zanker, persönliche Mitteilung), so dass eine Aussage bezüglich der antimikrobiellen Wirkung nur bedingt möglich ist. In dem Hydroid *Hydractinia echinata* wurde eine metamorphose-beeinflussende Funktion von Homarin nachgewiesen (Berking 1987). Homarin

könnte möglicherweise auch in Ascidien eine Hormon- oder Neurotransmitter-ähnliche Funktion innehaben, die entweder im eigenen Organismus Anwendung findet oder aber, wie bei Tubastrin vermutet, die Reaktionskaskaden benachbarter Organismen beeinflusst.

3.5.2 Aminosäuren und Nukleoside

Im HPLC-Chromatogramm der Essigesterphase von *Ascidiella scabra* (Bretagne) zeigte sich ein auffälliges UV-Signal bei einer Retentionszeit von 22 Minuten. Die Substanz konnte wegen der sehr geringen Menge der Fraktion und der noch enthaltenen Verunreinigungen nicht mittels NMR und MS analysiert werden. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Substanzen ließ auf die methylierte Aminosäure N,N,N-Trimethylglycin (Betain) schließen (Abbildung 3.39).

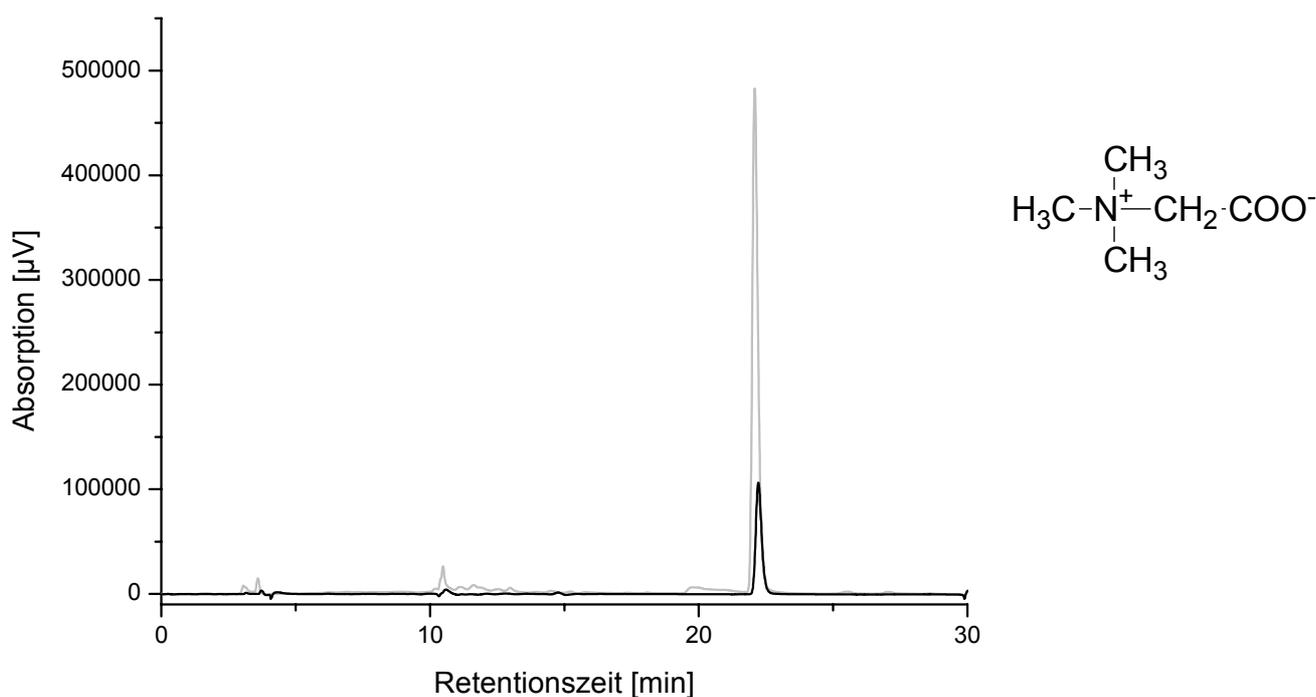


Abbildung 3.39: Strukturformel und HPLC-analytische Retentionszeit von Betain.

Vergleich der HPLC-analytischen Retentionszeiten einer unbekannt Substanz aus der Essigesterphase von *Ascidiella aspersa* (schwarz) und Betain (grau). Säule Eurospher DIOL 7 µm, 4,6 × 250 mm 1 ml/min; Gradient 100%MeCN 25 min - 50% MeCN/Wasser 30 min - 35 min 50% Wasser/Methanol - 40 min 100% Methanol 45 min.

Im Gegensatz zu anderen methylierten Aminosäuren, die bei dem Abbau von Proteinen entstehen und meist direkt mit dem Urin ausgeschieden werden, liegt diese Aminosäure auch in freier Form vor. Nicht an dem Aufbau von Proteinen beteiligte Aminosäuren sind oft toxisch. Sie können in anderen Organismen die Aufnahme und den Transport von Aminosäuren sowie die

Synthese von Proteinen stören (Luckner 1984). Pflanzen, halotolerante Cyanobakterien und vestimentifere Röhrenwürmer aus der Tiefsee nutzen Betain als Osmolyt (Luckner 1984, Yin *et al.* 2000, Waditee *et al.* 2003). Das Blut von Ascidien ist zwar isoosmotisch zum Seewasser, trotzdem könnte bei bestimmten physiologischen Prozessen eine osmotische Regulierung von Bedeutung sein.

Die beiden Nucleoside Adenosin ($m/z = 266,0901 [M]^-$) und Inosin ($m/z = 267,0778 [M]^-$) wurden aus den Ascidien *Dendrodoa grossularia* und *Ascidiella aspersa* (Doggerbank) isoliert (Abbildung 3.40 und Abbildung 3.41). Beide Substanzen stellen Zwischenprodukte im Biosyntheseweg von Sekundärmetaboliten dar. Sie entstehen aus einer Reaktionskaskade, bei der Ribose-5'-Phosphat in Inosin-5'-Monophosphat umgewandelt wird. Inosin-5'-Monophosphat stellt den zentralen Baustein zur Synthese von Adenosin-5'-Monophosphat und Guanosin-5'-Monophosphat dar, die ihrerseits zu den entsprechenden Di- und Tri-Phosphaten sowie ihren unphosphorylierten Nucleosiden umgewandelt werden (Luckner 1984). Das Nucleosid Adenosin ist als Bestandteil des Energieträgers Adenosintri-phosphat (ATP) für die Zelle besonders wichtig. Die Substanz 1-Methyladenin fungiert in Echinodermen als Hormon (Luckner 1984).

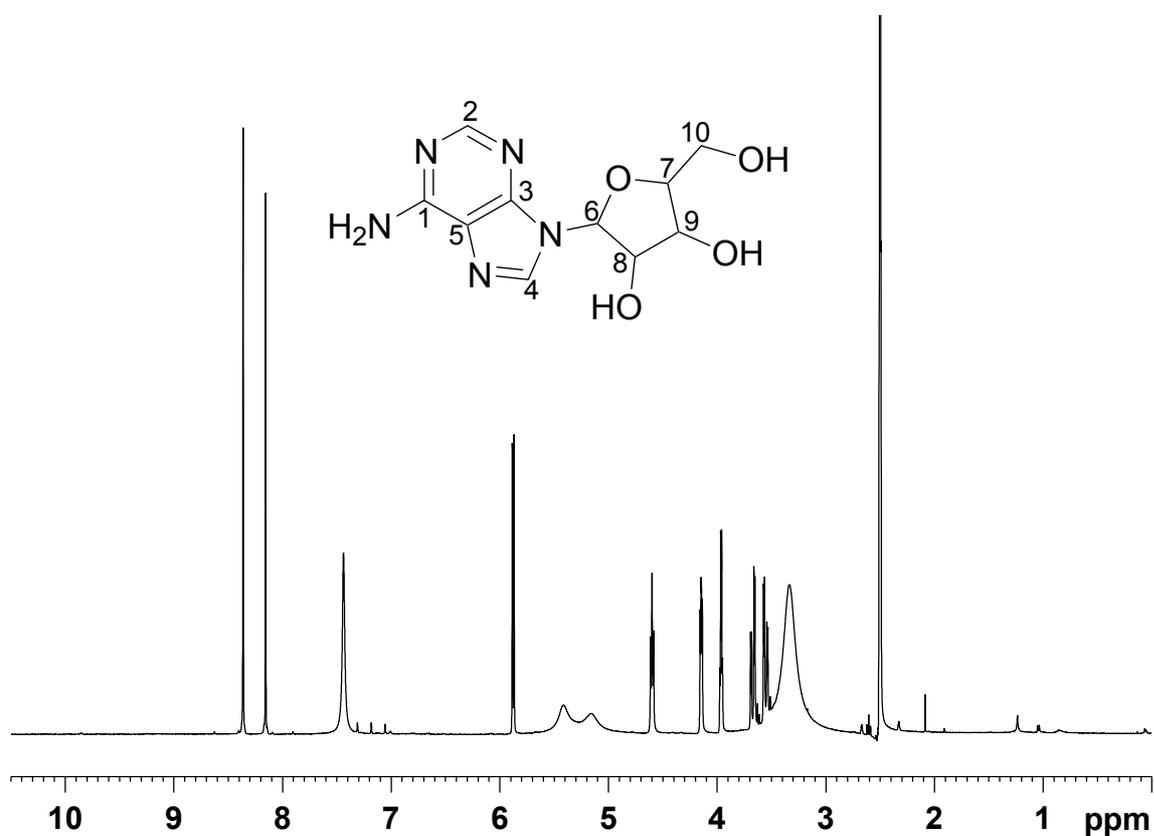


Abbildung 3.40: Strukturformel und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Adenosin.

Adenosin wurde aus *Dendrodoa grossularia* isoliert. Die NMR-Messung erfolgte bei 400 MHz in $\text{DMSO-}d_6$.

Tabelle 3.15: NMR-Daten von Adenosin aus der Ascidie *Dendrodoa grossularia*.

No.	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	Molekülgruppe	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC
1	155,7	–	C	–	–
2	151,8	8,15 (s)	CH	–	1, 3, 5
3	149,0	–	C	–	–
4	140,0	8,36 (s)	CH	–	3, 5, 6
5	119,2	–	C	–	–
6	87,8	5,88 (d)	CH	8	3, 4, 8
7	85,8	3,90 (q)	CH ₂	9, 10	–
8	73,4	4,60 (t)	CH	6, 9	6
9	70,5	4,15 (q)	CH	7, 8	6, 10
10	61,8	3,67 (dq) 3,55	CH ₂	7	7, 9
1-NH ₂	(82)	7,44 (s)	NH ₂	–	–
2-OH	–	5,41	OH	–	–
3-OH	–	5,16	OH	–	–

Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben. Als interner Standard diente das Signal des Lösungsmittels DMSO-*d*₆ (2,50 ppm und 39,5 ppm). Die Multiplizität der Signale (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplet, m: Multipllett) sind in Klammern hinter $\delta(^1\text{H})$ angegeben. Die ¹⁵N-NMR-Spektren wurden nicht kalibriert, $\delta(^{15}\text{N})$ sind in Klammern angegeben.

Inosin sowie vermutlich auch Guanosin sind als Bestandteile eines Pheromoncocktails des männlichen Polychaeten *Nereis succinea* identifiziert worden, der die Eiabgabe des Weibchens induziert (Zeeck *et al.* 1998). Welche Funktion die isolierten Nucleoside in den Ascidien tatsächlich besitzen, kann wegen der Vielfältigkeit der Synthesen und diversen Möglichkeiten der Nutzung dieser Substanzen bei dem derzeitigen Wissenstand nicht beantwortet werden.

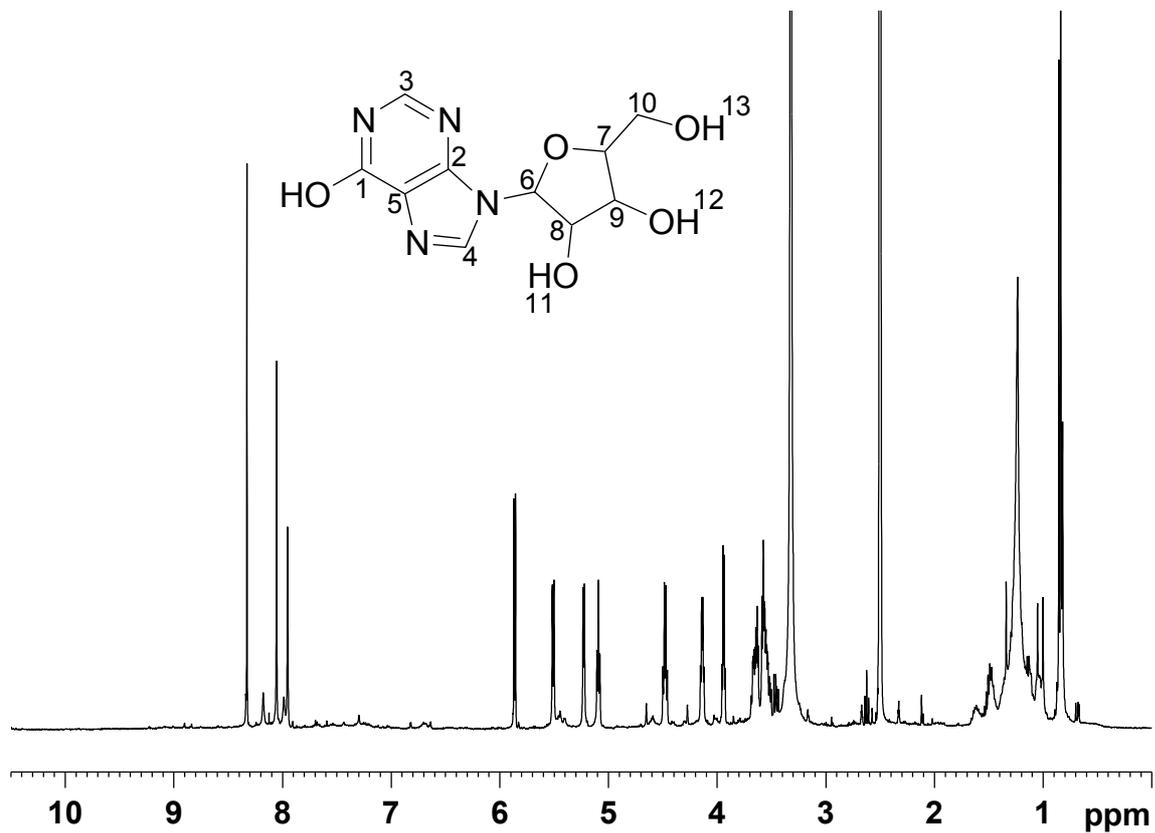


Abbildung 3.41: Strukturformel und ¹H-NMR-Spektrum von Inosin.

Inosin wurde aus *Ascidella aspersa* isoliert. Die NMR-Messung erfolgte bei 400 MHz in DMSO-*d*₆.

Tabelle 3.16: NMR-Daten von Inosin aus der Ascidie *Ascidiella aspersa*.

No.	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	Molekülgruppe	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC
1	156,4	–	C	–	–
2	148,2	–	C	–	–
3	145,5	8,05 (s)	CH	–	1, 2
4	138,4	8,32 (s)	CH	–	2, 5
5	124,5	–	C	–	–
6	87,3	5,86 (d)	CH	8	2, 4
7	85,4	3,94 (q)	CH	9	–
8	73,9	4,48 (q)	CH	6, 9, 11	7
9	70,1	4,14 (q)	CH	7, 8, 12	6, 10
10	61,1	3,59 (m)	CH ₂	13	–
11	–	5,51 (d)	8-OH	8	–
12	–	5,22 (d)	9-OH	9	–
13	–	5,09 (t)	10-OH	10	–

Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben. Als interner Standard diente das Signal des Lösungsmittels DMSO-*d*₆ (2,50 ppm und 39,5 ppm). Die Multiplizität der Signale (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multipllett) sind in Klammern hinter $\delta(^1\text{H})$ angegeben.

4. Experimenteller Teil

Im Folgenden werden die chemischen Methoden, die bei der Extraktion der Ascidien und der Aufreinigung der Extrakte zum Einsatz kamen, beschrieben. Es werden außerdem detaillierte Angaben zur Durchführung der Biotests gemacht.

4.1 Chemische Methoden

4.1.1 Extraktion

Die gesammelten Organismen wurden weitgehend von Seewasser befreit und eingefroren. Gefrorene Proben wurden gefriergetrocknet, per Hand zerdrückt und bei Raumtemperatur drei Mal eine Stunde unter Rühren sowie ein Mal stehend über Nacht mit Dichlormethan/Methanol (1:1) extrahiert. Die abfiltrierten organischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Eine Rohextraktprobe wurde für chromatographische Analysen zurückgestellt.

Eine Auftrennung des Rohextraktes nach Polarität wurde durch Ausschütteln erreicht. Dazu wurde der Dichlormethan/Methanol-Rohextrakt in Methanol (75 ml) aufgenommen und gegen *n*-Hexan (3×250 ml) ausgeschüttelt. Beide Phasen wurden bis zur Trockne eingengt. Die methanolische Phase wurde in Wasser (75 ml) aufgenommen und nacheinander gegen Essigsäureethylester und wassergesättigtes *n*-Butanol (jeweils 3×250 ml) ausgeschüttelt. Alle Phasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und unter Vakuum getrocknet.

4.1.2 Chromatographische Methoden

Chromatographische Methoden schlossen sich der Extraktion der Ascidien an und dienten der Analyse und Aufreinigung der Extrakte.

Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die Dünnschicht-Chromatographie kam vor Auftrennungen mit gelchromatographischen Methoden zum Einsatz, um die optimale Kombination von stationärer und mobiler Phase für die Auftrennung des jeweiligen Substanzgemisches zu ermitteln.

Es wurden Dünnschicht-Chromatographie-Fertigplatten aus Glas (Merck DC-Platten 5×10 cm RP8 F_{245s} und Merck HPTLC-Platten 10×10 cm DIOL F_{245s}) verwendet. Als Fließmittel wurden Gemische aus *n*-Hexan und Essigester sowie Methanol und Wasser eingesetzt. Die Substanzgemische wurden in Methanol gelöst und mit einer Kapillaren auf die Platten aufgetupft. Die DC-Platten wurden in einer DC-Kammer (10×12 cm) bis zu einer Laufhöhe von 7 cm entwickelt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurden die Platten im Tauchbad mit Kaliumpermanganat angefärbt. Die Platten wurden kurz mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und mit dem Heißluftfön erwärmt. Die untersuchten Substanzen konnten durch Reaktion mit der Färbelösung als weißliche oder braune Banden erkannt werden.

Größenausschluß-Chromatographie (GA)

Die Gelpermeations- oder Größenausschlußchromatographie diente zur Auftrennung von vorgetrennten Ascidienextrakten. Es wurden Glassäulen verschiedener Größe (eff. Länge 112 cm, \varnothing 7,5 cm bzw. eff. Länge 78 cm, \varnothing 2,8 cm) mit Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Korngröße 27-163 μ m in Methanol) als stationärer Phase verwendet. Als mobile Phase wurde immer Methanol eingesetzt. Der Durchlauf wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Reagenzgläser aufgenommen. Durch Einstellung des Fraktionssammlers wurde mit 40 bis 50 Tropfen pro Minute und einem Reagenzglaswechsel von 18 bis 20 Minuten eine maximale Füllmenge von 20 ml pro Reagenzglas festgelegt. Der Durchlauf wurde anschließend mit HPLC analysiert und zu Fraktionen zusammengefasst.

Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

Die Trennung durch VLC erfolgte mit einer Glasfritte (\varnothing 13 cm, 1000 ml, POR3), die bis zu einer Höhe von 4 cm mit Silicagel (Kieselgel 60) gepackt wurde. Das Substanzgemisch wurde in Dichlormethan gelöst und in einem Rundkolben mit Silicagel (Kieselgel 60) vermischt. Am Rotationsverdampfer wurde anschließend das Lösungsmittel bis zur Trockne abgezogen, so dass ein Kieselgel-Substanz-Pulver vorlag. Das Pulver wurde als dünne Schicht gleichmäßig auf das Kieselgel der Fritte aufgetragen und mit einem Rundfilter bedeckt. Es wurden 250 ml Laufmittel für jede Eluentenkonzentration angesetzt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe nacheinander in separate 500 ml-Kolben durchgesaugt. Abschließend wurde das Gel mit 100% Methanol gespült. Die Fraktionen wurden mittels HPLC analysiert und gegebenenfalls zusammengefasst.

Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC)

Zur Aufreinigung kleinerer Mengen vorgetrennter, polarer Fraktionen diente die LPLC- oder Flash-Chromatographie. In der LPLC kamen Glassäulen mit DIOL als stationärer Phase (Lobar Fertigsäule Größe B (310 - 25); LiChroprep DIOL (40 - 63 μm), Merck, bzw. selbstgepackte Glassäule gleicher Größe) zum Einsatz. Die Säule lief in einer CombiFlash 100/Foxy200-Anlage von ISCO. Der Druck betrug 2 - 4 bar. Als Laufmittel wurden Gemische aus *n*-Hexan, Essigester, Wasser oder Acetonitril verwendet, deren optimales Mischungsverhältnis in der Vorbereitung durch DC ermittelt wurde.

Der Durchlauf wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Reagenzgläsern aufgenommen. Die Einstellung des Fraktionssammlers variierte je nach Laufeigenschaft der jeweiligen Substanzen zwischen 120 und 140 Tropfen pro Glas, was einem Volumen von 10 - 15 ml entspricht. Der Durchlauf wurde mittels HPLC analysiert und zu Fraktionen zusammengefasst.

Hochleistungs-Chromatographie (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) diente der präparativen Trennung von Substanzgemischen sowie der qualitativen und quantitativen Analyse. Die Durchführung der Analysen und Trennungen erfolgte mit einem HPLC-System der Firma JASCO:

- Pumpe: JASCO PU - 1580 Intelligent HPLC Pump,
- Thermostat: JASCO CO - 1560 Intelligent Column Thermostat,
- Degaser: JASCO DG - 1580-54 4 - Line Degaser,
- Detektor: JASCO MD - 1510 Multiwavelength Detector,
- Probengeber: JASCO AS - 1555 Intelligent Sampler,
- Gradientenmischer: JASCO LG - 1580-04 Quaternary Gradient Unit,
- Streulichtdetektor: Sedere Sedex 75,
- Steuerung: BORWIN Version 3.4,
- Fraktionssammler: Advantec SF - 3120 Super Fraction Collector.

Als Säulenmaterial dienten Diol- oder Kieselgel-Säulen. Deren Bezeichnung sowie Gradienten und Flussraten sind Kapitel 4.3 zu entnehmen. Die Laufmittel wurden dem Substanzgemisch angepasst, um optimale Trenn- und Analysebedingungen zu schaffen.

Quantifizierung von Reinsubstanzen

Zur Quantifizierung von Inhaltsstoffen der Ascidie *Dendrodoa grossularia* wurden definierte Mengen an Rohextrakt eingewogen und in Methanol gelöst. Ein Volumen von 10 µl bis 30 µl der Lösung wurde in das in Kapitel 4.1.2 beschriebene HPLC-System eingespritzt. Die Trennung erfolgte mittels einer Kromasil RP18-Säule (4.6 × 250 mm, 5 µm), einem Gradienten von 0-80% Acetonitril/Wasser in 40 Minuten und einer Flussrate von 1 ml/min.

Es erfolgte zudem eine Kalibrierung mit einem externen Standard, indem mit definierten Substanzkonzentrationen eine Kalibriergerade erstellt wurde. Als Standard dienten die entsprechenden Reinsubstanzen, die zuvor aus *Dendrodoa grossularia* isoliert wurden. Eine Quantifizierung der Substanzen erfolgte durch Berechnung der Signalfläche und Abgleich mit der Steigung der Kalibriergeraden.

4.1.3 Spektroskopische Methoden

Zur Ermittlung der chemischen Struktur der isolierten Substanzen wurden die Methoden der kernmagnetischen Resonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), der Massenspektrometrie (MS) und der Infrarot-Spektroskopie (IR) verwendet.

Kernmagnetische Resonanz (NMR)

Die NMR-Messungen erfolgten bei 30°C mit einem Bruker Avance 400-Spektrometer. Als Lösungsmittel diente, wenn es nicht anders erwähnt wird, DMSO-*d*₆. Die Spektren wurden mit der Standardsoftware der Firma Bruker aufgenommen und auf das DMSO-*d*₆-Signal (¹H 2,50 ppm; ¹³C 39,5 ppm) geeicht.

Massenspektrometrie (MS)

ESI-MS Spektren wurden mit einem Bruker Daltonics microTOF LC ESI-source aufgenommen. Die Fraktionierung von Tubastrin wurde mit einem MS-Gerät der BASF Ludwigshafen (Q-TOF, Micromass) durchgeführt.

Infrarot-Spektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden als KBr-Preßlinge mit einem Bruker Equinox 55-Gerät aufgenommen. Als Software wurde Bruker OPUS/IR Version 4.0 verwendet.

4.2 Nachweis von Guanidiningruppen

Der Nachweis einer Guanidiningruppe in einer Reinsubstanz wurde nach der Anleitung von Auterhoff und Kovar (Auterhoff *et al.* 1977) durchgeführt. Guanidin-Derivate reagieren mit Hypohalogeniten in Gegenwart von Phenolen zu Chinonmonosemicarbazonen, die im alkalischen Reaktionsmedium farbige Anionen bilden. Als Kontrolle diente in diesem Versuch Streptomycin.

Reagenzien:

- 10%ige Natronlauge
- 0,05%ige 1-Naphthol-Lösung in Methanol
- Natriumhypobromit-Lösung
- methanolische Lösung der zu testenden Substanz (0,5 mg/ml)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma P-0781)

Zwei Tropfen der Kontroll- bzw. Substanzlösung wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorffcap 1,5 ml) vorgelegt. Es wurden fünf Tropfen Natronlauge und fünf Tropfen 1-Naphthol hinzupipettiert. Bei einer Reaktionstemperatur von 15°C (Eisbad) wurden drei Tropfen Natriumhypobromit-Lösung zugegeben. Die Farbreaktion zu einer rotviolettten Lösung findet bei vorliegenden Guanidinderivaten im letzten Reaktionsschritt statt.

4.3 Trennbedingungen

Die Trennbedingungen für die Größenausschlußchromatographie waren mit Sephadex LH-20 als stationäre Phase und Methanol als mobile Phase für alle Gemische identisch. Lediglich die Säulengröße wurde entsprechend der zur Verfügung stehenden Substanzmenge gewählt. Auch die nachfolgenden Trennungen richteten sich unter anderem an der Probenmenge aus. So konnten einige Gemische durch LPLC oder VLC aufgereinigt werden. Viele aus der Größenausschlußchromatographie resultierende Fraktionen waren aber in so geringer Menge vorhanden, dass weitere Aufreinigung nur mit HPLC zu bewerkstelligen war. In der HPLC standen Normalphasen-Kieselgelsäulen, Diol-Säulen und *Reversed Phase* (RP18)-Säulen zur Verfügung. Bei den polaren Kieselgelsäulen spricht man von Absorptionschromatographie, weil die zu trennenden Substanzen von der stationären Phase entsprechend ihrer Polarität absorbiert werden. Die Trennung erfolgt zunächst mit einem unpolaren Lösungsmittel, mit dem unpolare Substanzen schnell eluiert werden. Mit zunehmend polarem Lösungsmittel werden polare Substanzen von der stationären Phase getrennt und ausgewaschen. RP-Säulen besitzen eine

unpolare, hydrophobe stationäre Phase, als mobile Phase werden stark polare Lösungsmittel eingesetzt. Damit werden polare Substanzen schneller als unpolare Substanzen eluiert. Diol-Säulen stellen eine Kombination beider Säulenarten dar und können durch den Einsatz verschieden polarer Laufmittelgradienten optimiert werden.

Bei der Auftrennung der *n*-Butanolphasen, in denen die aktiven Substanzen hauptsächlich zu finden waren, ergaben sich bei der Normalphase- als auch bei der RP-Säule dahingehend Probleme, als die Substanzen entweder sehr schnell oder sehr langsam eluiert wurden. Eine Trennung der Komponenten war damit nicht möglich (Abbildung 4.1). Leider zeigte sich auch bei der Chromatographie mittels Diol-Säule, dass zwar einzelne, distinkte Signale detektierbar waren, diese aber durch Gemische gebildet wurden, die identisches Laufverhalten aufwiesen. Trotz ständiger Modifikation der Laufmittel war eine saubere Trennung von Substanzgemischen mit diesen Methoden nur selten erfolgreich, wodurch die Isolierung der aktiven Stoffe stark erschwert wurde.

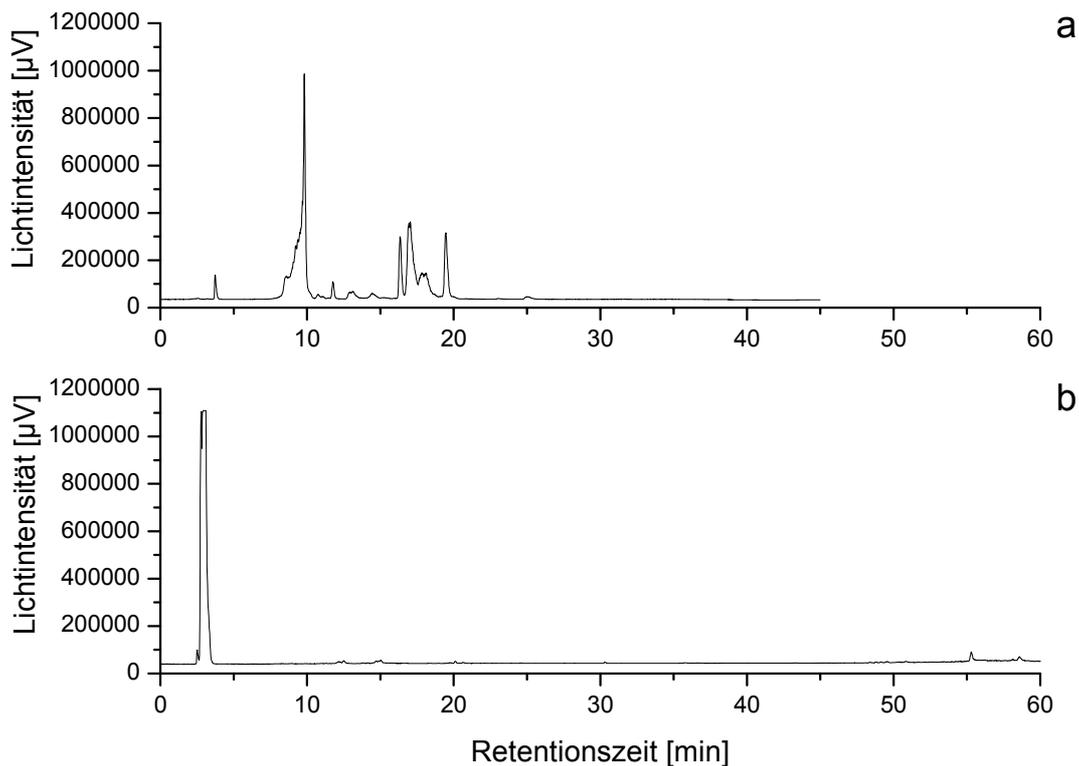


Abbildung 4.1: HPLC-Chromatogramme der *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia*.

Chromatogramm a zeigt den Lauf der *n*-Butanolphase über eine Diol-Säule (Eurospher Diol, 7 µm), Chromatogramm b den Lauf über eine RP18-Säule (Kromasil RP18, 5 µm).

Einzig bei der Trennung einiger *n*-Hexanphasen stellte die RP-Säule einen Vorteil dar. Gegenüber der Diol-Säule wurden die Stoffe des Gemischs deutlich getrennt (Abbildung 4.2). Allerdings war hier eine präparative HPLC wegen der Menge der Signale nur bedingt erfolgreich, und die Substanzmengen der resultierenden Fraktionen waren sehr gering. Gegenüber Organismen, die wenige Hauptmetaboliten in großer Menge produzieren, machten die ähnlichen Eigenschaften von vielen Metaboliten der Ascidien, die zur Überlagerung der Signale in der HPLC führen, eine Trennung sehr schwierig, so dass oft Substanzgemische vorlagen, die aufgrund ihrer geringen Menge nicht weiter aufgereinigt werden konnten. Bei der weiteren Bearbeitung von Ascidienextrakten der Nordsee wäre daher die Anwendung einer geeigneteren Methodik zur Trennung ähnlicher und nur in geringen Mengen vorliegender Substanzen, zum Beispiel durch LC-MS, notwendig.

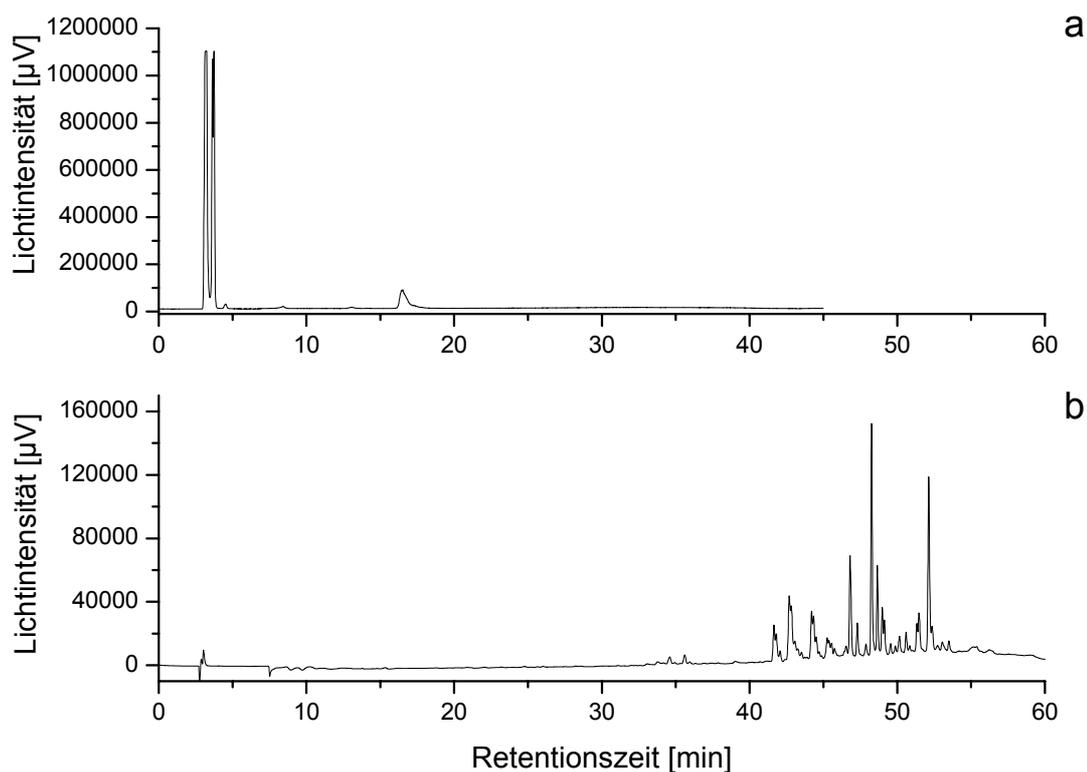


Abbildung 4.2: HPLC-Chromatogramme der *n*-Hexanphase von *Didemnum candidum*.

Chromatogramm a zeigt den Lauf der *n*-Hexanphase über eine Diol-Säule (Eurospher Diol, 7 µm), Chromatogramm b den Lauf über eine RP18-Säule (Kromasil RP18, 5 µm).

In den folgenden Tabellen sind die Trennbedingungen der Extrakte angegeben, die sich der Extraktion und der Auftrennung in vier Phasen anschlossen und in dieser Arbeit erwähnt wurden.

Tabelle 4.1: Trennungen einzelner Phasen von *Ascidia scabra*, *Corella parallelogramma* und *Didemnum candidum*.

Trennung	Menge [mg]	Methode	Säule	Gradient
<i>A. scabra</i> <i>n</i> -Butanolphase	135,0	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 1 ml/min	100-50% MeCN/H ₂ O 25 min - 30 min 50% MeCN/H ₂ O - 35 min 50% MeOH/H ₂ O - 40 min 100% MeOH
<i>C. parallelogramma</i> Essigesterphase	29,5	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 1 ml/min	100% MeCN 5 min - 30 min 80% MeCN/H ₂ O 35 min - 40 min 50% MeCN/H ₂ O - 45 min 50% H ₂ O/ MeOH - 50 min 100% MeOH
<i>D. candidum</i> <i>n</i> -Hexanphase	55	HPLC	Eurospher Diol 10 µm, 1 ml/min	100% MeCN 5 min - 40 min 50% MeCN/H ₂ O - 45 min 20% MeCN 50% H ₂ O 30% MeOH - 50% H ₂ O/ MeOH 55 min - 60 min 100% MeCN
<i>D. candidum</i> Essigesterphase	29,2	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 1 ml/min	95% MeCN/H ₂ O 5 min - 40 min 60% MeCN/H ₂ O 45 min - 50 min 20% H ₂ O/MeOH 55 min - 60 min 95% MeCN/H ₂ O

Tabelle 4.2: Weitere Auftrennungen der *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia*.

Trennung	Menge [mg]	Methode	Säule	Laufmittel/Gradient
<i>n</i> -Butanolphase	3554,4	GA	LH-20 112 cm/7,5 cm	MeOH
Fraktion L8	190,6	GA	LH-20 78 cm/2,8 cm	MeOH
Fraktion L9	125,5	LPLC	Lobar Fertigsäule Größe B, LiChro- prep DIOL (40 - 63 µm), Merck	MeCN/H ₂ O 9:1
Fraktion L9-D4	18,6	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 1 ml/min	100-50% MeCN/H ₂ O 25 min - 30 min 50% MeCN/H ₂ O - 35 min 50% MeOH/H ₂ O - 40 min 100% MeOH
Fraktion L9-D5	29,1	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 1 ml/min	100-50% MeCN/H ₂ O 25 min - 30 min 50% MeCN/H ₂ O - 35 min 50% MeOH/H ₂ O - 40 min 100% MeOH
Fraktion L14	40,7	HPLC	Eurospher Diol 10 µm, 1 ml/min	100% MeCN 5 min - 45 min 60% MeCN/H ₂ O

Tabelle 4.3: Weitere Auftrennungen der Essigesterphase von *Dendrodoa grossularia*.

Trennung	Menge [mg]	Methode	Säule	Laufmittel/Gradient
Essigesterphase	1481,1	GA	LH-20 112 cm/ 7,5 cm	MeOH
Fraktion L4	93,5	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 8 ml/min + Vorsäule	100% MeCN 5 min - 35 min 70% MeCN/H ₂ O - 40 min 20% MeCN 50% H ₂ O 30% MeOH - 50 min 100% MeOH 55 min - 60 min 100% MeCN
Fraktion L5	180,7	HPLC	Eurospher Diol 7 µm, 8 ml/min + Vorsäule	100% MeCN 5 min - 35 min 70% MeCN/H ₂ O - 40 min 20% MeCN 50% H ₂ O 30% MeOH - 50 min 100% MeOH 55 min - 60 min 100% MeCN
Fraktion L6	54,5	HPLC	Kromasil RP18 16 × 250 mm, 8ml/min	60% H ₂ O +0,1% TFA/MeCN +0,1% TFA 5 min - 45 min 20% H ₂ O +0,1% TFA/MeCN +0,1% TFA 50 min - 55 min MeCN +0,1% TFA/MeOH 60 min
Fraktion L9	113,8	HPLC	Eurospher Diol 10 µm, 1 ml/min	100% MeCN 5 min - 45 min 60% MeCN/H ₂ O
Fraktion L10	151,0	HPLC	Kromasil RP18 16 × 250 mm 8 ml/min	95% H ₂ O +0,1% TFA/MeCN +0,1% TFA 5 min - 50 min 40% H ₂ O +0,1% TFA/ MeCN +0,1% TFA - 55 min 50% MeCN +0,1% TFA/ MeOH 60 min - 63 min 95% H ₂ O +0,1%TFA/MeCN +0,1% TFA
Fraktion L12	56,0	HPLC	Eurospher Diol 10 µm, 1 ml/min	100% MeCN 5 min - 45 min 60% MeCN/H ₂ O

4.4 Artenvergleich *Ascidiella aspersa* und *Ascidiella scabra*

4.4.1 Morphologie

Im Mai 2003 wurden auf den Orkney-Inseln 50 Individuen der Art *Ascidiella scabra* in der Tuquoy Bay gesammelt und sezirt. Im Juni 2003 wurden 32 Individuen der Ascidiengattung *Ascidiella aspersa* von Helgoland (Nebelhorn) sezirt und beide Arten unter spezifischen morphologischen Gesichtspunkten verglichen. Als Merkmale dienten Länge, Breite und die Distanz zwischen den Siphonen, die Distanz zwischen Siphonöffnungen, die Form des dorsalen Tuberkels sowie die Anzahl der oralen Tentakel und der longitudinalen Gefäße des Kiemendarms. Als sicherstes Merkmal zur Unterscheidung der beiden Arten dienen die Eier, die den Individuen entnommen und unter dem Binokular untersucht wurden. Die Individuen wurden in intaktem Zustand vermessen und die Daten notiert. Zur Darstellung der oralen Tentakel, der longitudinalen Gefäße des Kiemendarms und zur Präparation der Eizellen wurden die Ascidien auf Eis sezirt. Der Mantel wurde ausgehend vom Atrialsiphon ventral bis zur Basis des Tieres geöffnet. Dadurch wird gleichzeitig der Kiemendarm eröffnet. Das Tier wurde aufgeklappt und auf einer Wachsschale fixiert. Es konnten die inneren morphologischen Daten erhoben werden (Abbildung 4.3).

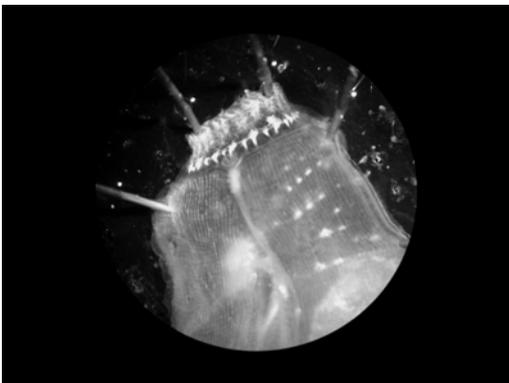


Abbildung 4.3: Aufsicht auf den apikalen Bereich des eröffneten Körpers von *Ascidiella aspersa*.

Präparation eines Individuums der Art *Ascidiella aspersa*. Dargestellt ist der Bereich des Atrialsiphons und des Kiemendarms nach Eröffnung des Mantels.

Anschließend wurde der Samenleiter mit einer zugespitzten Glaspipette angeritzt, Samenflüssigkeit abgesaugt und für eine spätere DNS-Analyse in Eppendorff-Reaktionsgefäßen eingefroren. Ebenfalls zur genetischen Analyse wurden kleine Teile des Kiemendarms entnommen, in sterilem Seewasser gespült und in Eppendorff-Reaktionsgefäßen eingefroren. Die

Eier wurden bei der Präparation meist schon ausgestoßen und konnten im Umkreis des Tieres mit einer Pipette eingesammelt und unter dem Binokular begutachtet werden. Es wurden außerdem Eier mit einer Pipette aus dem Eileiter entnommen.

4.4.2 Chemie

Die Tunika und der Körper der präparierten Ascidien beider Standorte wurden nach der morphologischen Untersuchung eingefroren, gefriergetrocknet und nach dem bekannten Schema extrahiert. Die 32 Ascidien von Helgoland stammten aus zwei Sammlungen von je 16 Individuen Mitte und Ende Juni. Diese Proben wurden getrennt bearbeitet. Die Rohextrakte wurden mit Hilfe von analytischer HPLC untersucht. Außerdem wurden zehn Individuen der Art *Ascidiella scabra* von den Orkney-Inseln einzeln extrahiert und mit analytischer HPLC untersucht. Als Säule wurde jeweils eine Eurospher Diol-Säule benutzt (7 μm , 4,6 \times 250 mm, 1 ml/min). Ein Gradient von 100% Acetonitril über 50% Acetonitril-Wasser (30 min) und 50% Acetonitril-Methanol (35 min) bis 100% Methanol (45 min) diente als Laufmittel.

4.5 Bioassays

4.5.1 Phytigel-Assay

Um Extrakte aus Ascidien und Schwämmen auf ihre besiedlungshemmende Wirkung zu testen, wurden Extrakte in Phytigel-Platten (Phytigel Sigma-Aldrich) eingegossen und an der Schwimmbadmole auf Helgoland angebracht. Der Bewuchs wurde nach definierter Zeit ausgewertet.

Es wurden sechs Platten (20 × 28 cm) mit jeweils zwölf Phytigelen bestückt. Die Gele wurden in Plastikpetrischalen (Volumen 28 ml) gegossen und die Petrischalen zwischen zwei Kunststoffplatten eingeklemmt. In die untere Kunststoffplatte wurde unterhalb jeder Petrischale eine Vertiefung gefräst (~1 mm Tiefe, Ø 28 mm). Durch ein Loch am Boden der Petrischalen (Ø 1 cm) konnte so ein Phytigelanker gegossen werden, um das Gel in der Schale zu fixieren.

Als Anleitung dienten die Versuche von Henrikson und Pawlik (Henrikson *et al.* 1995, 1998). Für jeweils drei parallele Extraktgele wurden 90 mg Extrakt abgewogen und in 1,5 ml Methanol in Eppendorff-Reaktionsgefäßen gelöst. Die gelösten Proben wurden im Wärmeschrank auf 40°C erwärmt. Die Probenkonzentration richtete sich nach in Antilarval-Tests ermittelten Werten (H. Zanker, persönliche Mitteilung). Pro Extrakt wurden 2,93 g Phytigel in 90 ml destilliertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und auf einem Magnetrührer erhitzt. Wenn sich das Phytigel auflöste, wurde das Gel unter Rühren auf 50-55°C abgekühlt und nach Zugabe der Substanzprobe auf die drei Petrischalen verteilt. Dabei wurde zunächst ein Gelanker mit Phytigel ohne Extrakt und darauf das Extraktgel gegossen. Für die Gele mit Frischmaterial von *Ascidiella aspersa* (Helgoland) wurden einige Individuen (Volumen 90 ml) zermörsert und 1,5 ml des Filtrats zum Gel gegeben. Die Extraktkonzentration der Extrakte im Phytigel betrug 1 mg/ml.

Da die Anzahl der im Assay eingesetzten Phytigel-Platten begrenzt war, wurden die Extrakte nach ihrer Aktivität in anderen Bioassays sowie der verfügbaren Substanzmenge ausgewählt. Im ersten Versuch wurden die Rohextrakte von *Aplidium punctum*, *Ascidiella scabra*, *Ascidia mentula*, *Ascidia virginea*, *Corella parallelogramma*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* sowie die Essigesterphase und die *n*-Butanolphase von *Dendrodoa grossularia* getestet. Im zweiten Versuch wurden die Rohextrakte von *Aplidium punctum*, *Ascidiella scabra*, *Ascidia mentula*, *Dendrodoa grossularia* und *Didemnum candidum* getestet. Es wurden zusätzlich drei Schalen mit Frischmaterial bestückt. Die Extrakte wurden in jedem Versuch in drei Replikaten ausgebracht (Ausnahme *Ascidiella scabra* zweiter Versuch:

2 Replikate). Als Kontrolle diente im ersten Versuch jeweils ein Gel pro Platte, dem ausschließlich 1,5 ml Methanol zugegeben wurde. Im zweiten Versuch wurden zusätzlich zwei der sechs Platten (24 Gele) nur mit Kontrollen bestückt. Diese bestanden aus jeweils Methanol-Phytagele sowie Gelen, denen der Rohextrakt von *Polyclinum aurantium* zugegeben wurde, anhand derer die Substanzdiffusion aus den Gelen verfolgt werden sollte.

Die gegossenen Platten wurden mit Folie abgedeckt über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am folgenden Tag von Tauchern an der Schwimmbadmole ausgebracht. Der Transport über und unter Wasser erfolgte in Plastiktüten, um die Phytagele vor Beschädigungen zu schützen. Die sechs Platten des ersten Versuchs wurden zwischen den Sprossen an der Basis der Leitern 1 bis 3 aufgehängt. Die Wassertiefe beträgt dort 6-7 Meter. Die Platten hingen 36 Tage im Wasser (28. April bis 4. Juni 2003). Im zweiten Versuch wurden sechs Platten, vier mit Extraktgelen und zwei mit Kontrollgelen, an vier Leitern ausgebracht. Die Platten wurden regelmäßig kontrolliert und befanden sich insgesamt 26 Tage im Wasser (Juni 2003).

Nach der Bergung der Platten wurden die Gele im Labor auf ihren Bewuchs untersucht. Dabei wurde der Bewuchs mit Algen visuell auf einer Skala von 1 bis 4 (kein Bewuchs bis sehr starker Bewuchs) abgeschätzt. Unter dem Binokular wurden die sessilen und assoziierten Epibionten gezählt und systematisch eingeordnet.

4.5.2 Antimikrobieller Assay

Mit Hilfe des Agar-Diffusions-Assays wurde die antimikrobielle Aktivität von Ascidienextrakten überprüft. Die Mikroorganismen stammten aus Kulturen der Biologischen Anstalt Helgoland (Isolate aus *Halichondria panicea*) bzw. aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Die Bakterienstämme werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellwandstruktur (Gramfärbung), der Stoffwechselprozesse und molekularbiologischer Unterschiede wie dem Gehalt an Guanin und Cytosin in der DNS charakterisiert (Schlegel *et al.* 1992, Madigan *et al.* 2003).

Tabelle 4.4: Charakterisierung der Bakterienstämme und ihre grundlegenden molekularbiologischen Unterschiede.

Gram-positiv
Die Zellwand dieser Bakterien besteht zu 90% aus Peptidoglycan (Murein). Innerhalb der Gruppe werden die Stämme nach ihrem Gehalt an Cytosin und Guanin in zwei Untergruppen eingeteilt.
Gram-negativ
Die Proteobacteria stellen das größte Phylum der Bakterien dar, das sich durch seine hohe Diversität in der Morphologie und Biochemie auszeichnet. Die Zellwand besteht nur zu 10% aus Peptidoglycan. Die äußere Zellwandschicht ist aus Lipopolysacchariden aufgebaut. Sie ist für die toxische Wirkung von Vertretern der Gram-negativen Bakterien verantwortlich. Die Proteobacteria werden aufgrund ihrer 16S-RNS in Cluster eingeteilt, die mit griechischen Lettern bezeichnet werden.
Flavobacteria/Cytophaga
Vertreter der Gattung <i>Cytophaga</i> leben aquatisch und terrestrisch. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Cellulose aerob abzubauen.
Archaea
Die meisten Vertreter der Archaea sind Extremophile und bewohnen Habitate, die sich durch hohe Temperatur, hohen Salzgehalt oder extreme pH-Werte auszeichnen. Ihre Zellmembran unterscheidet sich von der der anderen Bakteriengruppen durch Etherbindungen zwischen den Glycerolmolekülen und den Seitenketten, die nicht aus Fettsäuren, sondern aus Isoprenmolekülen gebildet werden. Die Zellwand besteht in einigen Stämmen aus Pseudopeptidoglycan, in anderen aus Polysacchariden, Glycoproteinen oder Protein.
Planctomyces
Vertreter dieser Gattung leben aquatisch. Die Zellwand besitzt kein Peptidoglycan, sondern besteht aus Proteinen. Die Bakterien besitzen ein Stielchen, Fortpflanzung erfolgt über Knospung.

Tabelle 4.5: Systematische Einordnung und Herkunft der in dem Agar-Diffusions-Test verwendeten Bakterienstämme.

Taxonomische Gruppe/Untergruppe		Mikroorganismus	Herkunft
Actinobacteria Gram +	High GC	Gram-positive bacterium str. 121 [AB008511.1]; 95%	<i>H. panicea</i>
	Low GC	<i>Micrococcus</i> sp. [X86608.1]; 97%	<i>H. panicea</i>
		<i>Microbacterium barkeri</i>	nicht-marin
		<i>Planococcus citreus</i>	nicht-marin
		<i>Streptomyces purpureus</i>	nicht-marin
		<i>Bacillus badius</i>	nicht-marin
	<i>Bacillus subtilis</i>	nicht-marin	
Proteobacteria Gram -	α	Alpha proteobacterium SOGA1 [AJ244780.1]; 98%	<i>H. panicea</i>
		<i>Roseobacter litoralis</i> [X78312.1]; 96%	<i>H. panicea</i>
		<i>Ruegeria algicola</i>	marin
	β	<i>Comamonas testosteroni</i>	nicht-marin
	γ	<i>Alteromonas macleodii</i> [Y18234.1]; 96%	<i>H. panicea</i>
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SW08 [U85861.1]; 97%	<i>H. panicea</i>
		<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	marin
		<i>Vibrio fischeri</i>	marin
		<i>Vibrio harveyi</i>	marin
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	nicht-marin
		<i>Escherichia coli</i>	nicht-marin
		<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	nicht-marin
	<i>Serratia rubidaea</i>	nicht-marin	
	<i>Xanthomonas campestris</i>	nicht-marin	
Flavobacteria/Cytophaga		<i>Cytophaga</i> sp. Gene [AB017046.1]; 92%	<i>H. panicea</i>
		<i>Zobellia uliginosa</i>	marin
Archaea		<i>Halobacterium salinarium</i>	nicht-marin
Planctomyces		<i>Planctomyces brasiliensis</i>	marin

Die Bakterien wurden in Flüssigmedien kultiviert. Zur Testung wurde ein Festagar des entsprechenden Nährmediums in Petrischalen vorbereitet. Nach Erkalten des Festmediums wurde die Platte mit 3,5 ml Weichagar überschichtet, der mit 1 ml Bakteriensuspension beimpft wurde. Nach dem Abkühlen konnten die Platten mit den Extrakt-Filterblättchen belegt werden. Dazu wurden die Ascidienextrakte in Aceton gelöst (24 mg/3 ml) und auf Filterblättchen (\varnothing 12,7 mm) aufgetragen. Das Auftragsvolumen betrug 50 μ l pro Blättchen, was einer Substanzmenge von 400 μ g entspricht. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurden die Blättchen auf die mit Bakterien beimpften Agarplatten aufgelegt. Die Platten wurden sieben Tage bei einer dem Bakterienstamm entsprechenden Temperatur inkubiert und täglich kontrolliert. Ausgewertet wurden nur Platten, die einen dichten, gleichmäßigen Bakterienrasen zeigten. Antimikrobielle Aktivität der aufgetragenen Substanzen konnte als Hemmhof um die Filterblättchen erkannt werden. Die Platte und die einzelnen Blättchen, um die sich Hemmhöfe ausgebildet hatten, wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Auswertung erfolgte am Computer (Adobe Photoshop 6.0), indem in die Einzelbilder der Filterblättchen ein Dreieck kopiert wurde, dessen Eckpunkte auf dem Rand des Blättchens lagen. Damit konnte der Mittelpunkt des Blättchens am Monitor festgelegt werden (Abbildung 4.4). An drei Positionen (0° , 120° , 240° bei Ansicht auf den Monitor) wurden die Distanz zwischen dem Mittelpunkt und dem Rand des Blättchens sowie die Distanz zwischen dem Mittelpunkt und dem Rand des Hemmhofs vermessen. Durch die Kenntnis des Blättchenradius (6,35 mm) konnte die Breite des Hemmhofs (in Millimeter) errechnet werden. Da die Hemmhöfe nur in seltenen Fällen symmetrisch waren, wurden die drei Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst. Bei mehrfachen Versuchsansätzen wurden die Hemmhofradien aller Versuche gemittelt.

Im ersten Ansatz wurden Ascidienextrakte in der Konzentration von 400 μ g an insgesamt 25 verschiedenen Bakterienstämmen getestet (Tabelle 5.3). Die Extrakte, die antimikrobielle Aktivität zeigten, wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (400 μ g, 200 μ g, 100 μ g) erneut getestet. Eingesetzt wurden die Rohextrakte und die *n*-Hexan-, Essigester-, *n*-Butanol- und Wasserphasen der in dem Methodikteil aufgeführten Ascidienarten. Von der bretonischen Sammlung von *Ascidiella aspersa* wurde aus Mangel an Substanz kein Essigesterextrakt getestet, so dass sich insgesamt 74 Fraktionen im Test befanden.

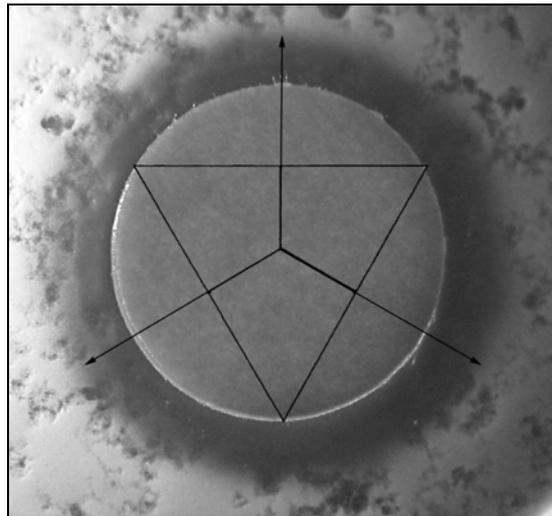


Abbildung 4.4: Ermittlung der Hemmhofbreite über die digitale Auswertung.

Foto eines Blättchens des Agar-Diffusions-Tests. Zu sehen ist der Hemmhof um das Blättchen sowie das digital eingefügte Dreieck, mit Hilfe dessen die Breite des Hemmhofs bestimmt wurde.

4.5.3 Cytotoxischer Assay

Als Testzellen wurden Mausfibroblasten aus dem Unterhautfettgewebe, Zelllinie L929, verwendet. Die Zellen wurden in kleinen Kulturgefäßen bei 37°C und 10% CO₂ gezüchtet. Als Kultur- und Anzuchtmedium wurde DMEM (Dulbeccos MEM, Gabco) verwendet. Das Medium enthält 10% fötales Kälberserum sowie einen roten pH-Indikator. Die Zellen werden ein Mal in der Woche überimpft. Dazu werden die am Boden des Kulturgefäßes anheftenden Zellen gelöst und in neues Medium überführt. Das Auszählen der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer so genannten Neubauer-Kammer (Abbildung 4.5). Auf einem rechteckigen Objektträger aus Spezialglas befinden sich in der Mitte drei Längsnuten. Der mittlere Steg liegt 0,1 mm tiefer als die beiden benachbarten Stege und ist in der Mitte durch eine kleine Spalte geteilt.

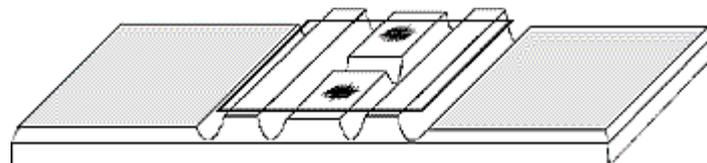


Abbildung 4.5: Neubauer-Kammer mit aufgelegtem Deckgläschen.

Schematische Darstellung aus: http://www.superior.de/infodat/inf4_zkd.htm.

Auf die beiden seitlichen Stege wird ein Deckglas aufgelegt, in das Zählnetze eingraviert sind. Dadurch entsteht an den Mittelstegen ein kleiner Hohlraum definierten Volumens. Mit einer Pipette werden 10 µl Zelllösung in diesen Hohlraum injiziert. Das Zählnetz besteht aus Quadraten mit definierten Kantenlängen. Eine Multiplikation der Zellzahl pro Quadrat mit einem Umrechnungsfaktor ergibt die Zellzahl pro ml. Daraus lässt sich die Verdünnung der Zellkultur bestimmen, die zum Erreichen einer gewünschten Zellzahl/ml notwendig ist.

Es wurden die Rohextrakte und die *n*-Hexan-, Essigester-, *n*-Butanol- und Wasserphasen der in dem Methodikteil aufgeführten Ascidienarten untersucht. Aktive Fraktionen wurden im Weiteren aufgereinigt und erneut getestet. 5 mg der Proben wurden in 1 ml Methanol aufgenommen und mit Hilfe eines Vortexers in Lösung gebracht. In eine 96-*well*-Platte wurden pro *well* 60 µl Medium vorgelegt. In die ersten acht *wells*, die erste Reihe der Schmalseite A bis H, wurden jeweils 30 µl Probenlösung bzw. Methanol als Kontrolle vorgelegt. 30 µl wurden in die jeweils folgende Reihe überpipettiert, so dass sich über die Platte 3-er-Verdünnungsschritte ergaben. In die Vorlagen aus Medium und Probe wurden jeweils 120 µl Zellsuspension gegeben. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C und 10% CO₂.

Die Platten wurden unter einem inversen Mikroskop mit einem 10er-Objektiv begutachtet. Als Referenz diente die Kontrolle mit Methanol. Die Dichte des Zellrasens bzw. der Grad des Absterbens der Zellen wurde abgeschätzt und die Morphologie der Zellen (Abrundung, Bildung von Filopodien oder ähnliche Veränderungen) begutachtet. Anhand der Konzentrationsreihe konnte eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) für aktive Extrakte angegeben werden. Als Nachweis von lebenden Zellen diente der MT-Assay (Scudiero *et al.* 1988). Eine Fragmentierung des Zellkerns als Hinweis auf induzierte Apoptose wurde durch die DAPI-Färbung dokumentiert.

Microculture Tetrazolium Assay (MTA)

Der Microculture Tetrazolium Assay (MTA) benutzt die Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in Formazan in lebenden Zellen zum Nachweis der Wirkung von Naturstoffen auf das Zellwachstum. Das lösliche gelbe Tetrazoliumsalz wird in intakten Zellen durch mitochondriale Enzyme metabolisch zum unlöslichen violetten Formazan umgesetzt, das Nadeln in den Zellen bildet (Scudiero *et al.* 1988).

20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, PBS: *phosphate buffered saline*) wurden jedem *well* der Probenplatte zugesetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Platte

(3000 Upm, 5 min) wurde der Überstand ausgeschlagen und die *wells* zwei Mal mit je 100 µl PBS gespült. Das gebildete Formazan wurde mit Hilfe von 100 µl Isopropanol-HCl (100 ml Isopropanol + 0,4 ml konzentrierte Salzsäure) in 10-30 min gelöst. Nach Mischung der Lösung in den *wells* mit Hilfe eines Plattenmixers wurde die Absorption bei 595 nm in einem Microplate-Reader gemessen.

DAPI-Färbung

Der DNS-spezifische Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI) bildet Komplexe mit doppelsträngiger DNS. Wenn eine Bindung an DNS stattgefunden hat, wird die Fluoreszenz von DAPI stark erhöht. Mit der DAPI-Färbung können morphologische Veränderungen des Zellkerns sichtbar gemacht werden.

Der Überstand in den *wells* wurde ausgeschlagen. Die Zellen in den *wells* wurden mit 50%iger Ethanollösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Ethanol anschließend ausgeschlagen. 50 µl DAPI (1 mg/ml PBS) wurden zugegeben und für ein paar Minuten inkubiert. Die Zellkerne konnten unter einem Fluoreszenzmikroskop (350 nm) begutachtet werden. Normale Zellkerne leuchteten hell und gleichförmig. Apoptotische Zellkerne konnten an der Verdichtung des Chromatins und an ihrer Fragmentierung erkannt werden.

Mikrotubuli- und ER-Färbung

Beide Färbungen beruhen auf Antikörperfärbungen der spezifischen Zellstrukturen. Das ER wurde mit einem Antikörper aus Ratten gegen GRP94, einem Markerprotein des ER, sichtbar gemacht. Die Mikrotubuli wurden mit einem Antikörper gegen Ratten-Immunglobuline, gekoppelt mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff, markiert.

4.5.4 Protein-Tyrosin-Kinase-Assay

PTK-hemmende Aktivität von Substanzen wurde über einen ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) nachgewiesen. Der Test wurde mit einem PTK-Assay der Firma Sigma Aldrich (PTK-101) durchgeführt. Die Dissertation von Gesa Kirsch diente als Anleitung bezüglich der Probenmengen (Kirsch 1999).

Die *wells* einer Mikrotiterplatte wurden über Nacht mit einem synthetischen Poly-Glu-Tyr-Substrat (PGT) beschichtet. Das Substrat enthält multiple Tyrosinreste und kann durch eine Vielzahl von PTKs phosphoryliert werden. Nach Inkubation wurde überschüssiges Substrat durch Waschen der *wells* entfernt und die Platte getrocknet. Das Enzym, der *Epidermal Growth*

Factor Receptor (EGFR), wurde in Tyrosin-Kinase-Puffer (TK-Puffer) verdünnt. Der Puffer enthält Magnesium, Mangan und ATP. EGFR und Puffer sowie die zu testenden Substanzen wurden in den *wells* zugegeben und entsprechend der Anleitung inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach Inkubation und Waschen der *wells* durch die Zugabe eines phosphotyrosin-spezifischen monoklonalen Antikörpers, der an die phosphorylierten Tyrosinreste bindet. Der Antikörper ist mit einer Peroxidase verbunden, die einen nachfolgend zugegebenen Farbstoff (OPD) umsetzte. Die entstehende Färbung konnte mit Hilfe eines ELISA-Readers (Anthos Lucy 1) bestimmt werden und stand im direkten Verhältnis zur Menge an phosphoryliertem Tyrosin und damit zur Enzymaktivität (Abbildung 4.6).

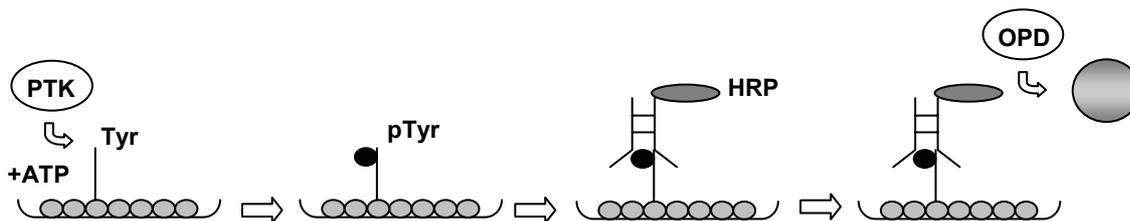


Abbildung 4.6: Funktionsweise des PTK-Assays als ELISA.

Schematische Darstellung der Reaktionsschritte des PTK-Assays. ATP: Adenosin-Triphosphat; (p)Tyr: (phosphorylierter) Tyrosinrest, HRP: Horse Radish Peroxidase, OPD: Farbstoff.

Es wurden im ersten Screening jeweils der Rohextrakt und die *n*-Hexan-, Essigester-, *n*-Butanol- und Wasserphase der zwölf bei den Orkney-Inseln gesammelten Ascidienarten getestet. Die Substanzen wurden in DMSO gelöst und mit TK-Puffer bis zu einer Konzentration von 1,5 mg/ml verdünnt. Als Kontrollen wurden Blindproben (Puffer ohne Enzym und Hemmstoff), Positivproben (Puffer + Enzym) und positive Hemmungen (Puffer + Enzym + Hemmstoff) auf jeder Platte mitgetestet. Als Hemmstoff diente Piceatannol. Lyophilisiertes Piceatannol wurde wie die Substanzen in DMSO gelöst und mit TK-Puffer auf die Konzentration von 1,5 mg/ml verdünnt. Aufgereinigte Fraktionen wurden in weiteren Screenings in Konzentrationsreihen getestet. Die Testreagenzien wurden vor dem Assay aliquotiert, und die Substanzproben wurden eingewogen und in DMSO gelöst. Die Durchführung des Assays sowie der Umgang mit den Reagenzien richteten sich nach der Beschreibung, die dem Kit beilag.

Die Messung erfolgte mit einem ELISA-Reader (Anthos Lucy 1) bei 492 nm, womit jedem *well* eine optische Dichte (OD) zugeordnet wurde. Da jede Fraktion in drei Parallelen getestet wurde, ergaben sich jeweils drei Adsorptionswerte für eine Probe, die gemittelt (OD_{MW}) und zur weiteren Berechnung herangezogen wurden. Die Adsorption der Blindproben (Puffer) wurde von allen Werten subtrahiert. Die Adsorption der Positivproben (Puffer + Enzym) wurde als 100%-

Referenz gewählt und die PTK-Aktivität in den *wells* mit den Substanzproben und dem Hemmstoff als Restaktivität in Relation gesetzt:

$$\left[OD_{MW} \text{ Substanz} - OD_{MW} \text{ Blind}\right] \times 100 / OD_{MW} \text{ Positiv} = \text{Restaktivität [\%]}$$

Diese Berechnung führte dazu, dass einige sehr inhibitorische Fraktionen Werte im negativen Prozentbereich aufwiesen.

Der Einfluss der Substanzen auf das Enzym wurde anhand der Enzymaktivität beurteilt (nach Kirsch 1999). Eine Restaktivität von 0 - 20% wurde als starke Hemmwirkung, eine Restaktivität zwischen 21 - 50% als schwache Hemmwirkung interpretiert. Aktivitätsraten von über 120% wurden als Enzymverstärkung beurteilt. Enzymaktivitäten zwischen 50% und 120% wurden als „kein Effekt“ klassifiziert.

Die IC_{50} -Werte von Reinsubstanzen wurden in Konzentrationsversuchen ermittelt. Dazu wurden die Substanzen in definierten Verdünnungsschritten gelöst, im PTK-Assay eingesetzt und die errechneten Enzym-Restaktivitäten aller Substanzkonzentrationen in eine Grafik eingetragen. Durch eine exponentielle Fit-Funktion wurde aus den Einzelwerten eine Aktivitätskurve erstellt. Aus dieser grafischen Darstellung konnte der IC_{50} -Wert bei $y = 50$ abgelesen werden.

4.6 Statistik

Zur statistischen Bewertung der Ergebnisse wurden zwei verschiedene Tests angewendet. Der t-Test wurde mit dem Programm Origin, die einfaktorielle ANOVA und der Tukey HSD-Test mit dem Programm Statistika berechnet. Es wurde in beiden Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von 5% angenommen.

5. Literaturverzeichnis

- Aiello A, Carbonelli S, Esposito G, Fattorusso E, Iuvone T & Menna M, 2001a. Turbinamide, a new selective cytotoxic agent from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *Organic Letters* **3** (19). 2941-2944.
- Aiello A, Carbonelli S, Fattorusso E, Iuvone T & Menna M, 2001b. New bioactive sulfated metabolites from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *Journal of Natural Products* **64**. 219-221.
- Aiello A, Fattorusso E & Menna M, 1997. Novel antiproliferate alkyl sulfates from the Mediterranean tunicate *Ascidia mentula*. *Tetrahedron* **53** (16). 5877-5882.
- Amade P, Charroin C, Baby C & Vacelet J, 1987. Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea. *Marine Biology* **94**. 271-275.
- Amade P, Pesando D & Chevolut L, 1982. Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. *Marine Biology* **70**. 223-228.
- Anthoni U, Larsen C, Nielsen PH, Christophersen C & Lindgren G, 1989. Hydrophilic organic nitrogenous metabolites from marine bryozoans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **92** (4). 711-713.
- Atkins SM, Jones AM & Simpson JA, 1985. The fauna of sandy beaches in Orkney: an overview. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B* **87**. 27-45.
- Aune GJ, Furuta T & Pommier Y, 2002. Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action. *Anticancer Drugs* **13** (6). 545-555.
- Auterhoff H & Kovar KA, 1977. *Identifizierung von Arzneistoffen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart.
- Aygün A & Pindur U, 2003. Chemistry and biology of new marine alkaloids from the indole and annelated indole series. *Current Medicinal Chemistry* **10**. 1113-1127.
- Ballantine JA, Lavis A & Roberts JC, 1977. Marine Sterols. V. Sterols of some tunicata. The occurrence of saturated ring sterols in these filter-feeding organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **30**. 29-44.
- Ballarin L, Cima F & Sabbadin A, 1998. Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Developmental and Comparative Immunology* **22** (5-6). 479-492.
- Baloun AJ & Morse DE, 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biological Bulletin* **167**. 124-138.

- Bandaranayake WM, Bourne DJ & Sim RG, 1997. Chemical composition during maturing and spawning of the sponge *Dysidea herbacea* (Porifera: Demospongiae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **118** (4). 851-859.
- Barnes RSK & Hughes RN, 1982. *An Introduction to Marine Ecology*. Second Edition. Blackwell Science.
- Baxter JM, Jones AM & Simpson JA, 1985. A study of long-term changes in some rocky shore communities in Orkney. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B* **87**. 47-63.
- Beccero MA, Lopez NI, Turon X & Uriz MJ, 1994. Antimicrobial activity and surface bacteria film in marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **179**. 195-205.
- Beers JR, 1966. The species distribution of some naturally occurring quaternary ammonium compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology* **21**. 11-21.
- Benoit J, 1998. Langzeiteffekte solarer UV-Strahlung auf marine Braunalgen der Gattung *Fucus*, insbesondere deren frühe ontogenetische Stadien, und die mögliche Bedeutung für die Zonierung im Eulitoral von Helgoland. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie der Universität Freiburg.
- Bergmann T, Schories D & Steffan B, 1997. Alboinon, an oxadiazone alkaloid from the ascidian *Dendrodoa grossularia*. *Tetrahedron* **53** (6). 2055-2060.
- Bergmann W & Feeney RJ, 1949. Sterols from sponges of the family Halicionidae. *Journal of Organic Chemistry* **14**. 1078-1084.
- Bergmann W & Feeney RJ, 1950. The isolation of a new thymidine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society* **72**. 2809-2810.
- Bergmann W & Feeney RJ, 1951. Nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry* **16**. 981-987.
- Bergquist PR & Bedford JJ, 1978. The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae: systematic and geographic considerations. *Marine Biology* **46**. 215-221.
- Bergquist PR & Wells RJ, 1983. Chemotaxonomy of the Porifera: The development and current status of the field. In: *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*. PJ Scheuer. Academic Press, 1-50.
- Berking S, 1987. Homarine (N-methylpicolinic acid) and trigonelline (N-methylnicotinic acid) appear to be involved in pattern control in a marine hydroid. *Development* **99** (2). 211-220.
- Berrill NJ, 1950. The Tunicata, with an account of the British Species. The Ray Society, London. **Vol 133**, No 354.

- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT & Prinsep MR, 2004. Marine Natural Products. *Natural Products Report* **21**. 1-49.
- Boyd MR, Farina C, Belfiore P, Gagliardi S, Kim JW, Hayakawa Y, Beutler JA, McKee TC, Bowman BJ & Bowman EJ, 2001. Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-Type (H⁺)-ATPases. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* **297**. 114-120.
- Burke TRJ, Li Z-H, Bolen JB & Marquez VE, 1991. Structural influences of styryl-based inhibitors on epidermal growth factor receptors and p56^{lck} tyrosine-specific protein kinases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1** (3). 165-168.
- Burkholder PR & Ruetzler K, 1969. Antimicrobial activity of some marine sponges. *Nature* **222**. 983-984.
- Cariello L & Carotenuto N, 1970. The isolation and identification of homarine from gorgonians of the genus *Eunicella*. *Publications of the Zoological Station of Naples* **38** (2). 262-266.
- Carter GT & Rinehart KL, Jr., 1978. Aplidiasphingosine, an antimicrobial and antitumor terpenoid from an *Aplidium* species (marine tunicate). *Journal of the American Chemical Society* **100** (23). 7441-2.
- Cheng MT & Rinehart KL, Jr., 1978. Polyandrocarpidines: antimicrobial and cytotoxic agents from a marine tunicate (*Polyandrocarpa* species) from the Gulf of California. *Journal of the American Chemical Society* **100** (23). 7409-11.
- Cleaveland JS, Kiener PA, Hammond DJ & Schacter BZ, 1990. A microtiter-based assay for the detection of protein tyrosine kinase activity. *Analytical Biochemistry* **190**. 249-253.
- Coleman AW & Mai JC, 1997. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *Journal of Molecular Evolution* **45**. 168-177.
- Corey EJ, Gin DY & Kania RS, 1996. Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society* **118**. 9202-9203.
- Crisp DJ & Ryland JS, 1960. Influence of filming and of surface texture on the settlement of marine organisms. *Nature* **185** (9). 119.
- Cuevas C, Pérez M, Martín MJ, Chicharro JL, Fernández-Rivas C, Flores M, Francesch A, Gallego P, Zarzuelo M, de la Calle F, García J, Polanco C, Rodríguez I & Manzanares I, 2000. Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin. *Organic Letters* **2** (16). 2545-2548.
- Dall W, 1971. The role of homarine in decapod Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **39** (1). 31-44.

- Davis AR, Targett NM, McConnell OJ & Young CM, 1989a. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. In: *Bioorganic Marine Chemistry*. PJ Scheuer. Springer-Verlag,
- Davis AR & Wright AE, 1989b. Interspecific differences in fouling two congeneric ascidians (*Eudistoma olivaceum* and *Eudistoma capsulatum*): is surface acidity an effective defense? *Marine Biology* **102**. 491-497.
- Davis RA, Carroll AR, Pierens GK & Quinn RJ, 1999. New lamellarin alkaloids from the Australian ascidian *Didemnum chartaceum*. *Journal of Natural Products* **62** (3). 419-424.
- de Kluijver MJ, 1993. Sublittoral hard-substratum communities off Orkney and St Abbs (Scotland). *Journal of the Marine Biological Association UK* **73**. 733-754.
- Delrio G, D'Istria M, Milone M & Chhieffi G, 1971. Identification and biosynthesis of steroid hormones in the gonad of *Ciona intestinalis*. *Experientia* **27** (11). 1348-1350.
- Dematté N, Guerriero A, de Clauser R, de Stanchina G, Lafargue F, Cuomo V & Pietra F, 1985. A Screening of some colonial Ascidiacea of Banyuls-Sur-Mer for antimicrobial and antifungal activities and, preliminary, for natural products: 2'-deoxyribonucleosides from *Trididemnum cereum* (Giard, 1872). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **81** (2). 479-484.
- Erickson KL, Beutler JA, Cardellina II JH & Boyd MR, 1997. Salicylhalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. *Journal of Organic Chemistry* **1997** (62). 8188-8192.
- Fahy E, Potts BCM & Faulkner DJ, 1991. 6-bromotryptamine derivatives from the Gulf of California tunicate *Didemnum candidum*. *Journal of Natural Products* **54** (2). 564-569.
- Faulkner DJ, 2000. Marine Natural Products. *Natural Product Reports* **17**. 7, 40-43.
- Fenical W, 1976. Geranyl hydroquinone, a cancer-protective agent from the tunicate *Aplidium* sp. *Food-Drugs from the Sea* **4**. 388-394.
- Garson MJ, 1994. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why is it important. In: *Sponges in Time and Space*. RWM van Soest, TMG van Kempen & J-C Braekmann. Balkema, Rotterdam. 427-440.
- Gazit A, Yaish P, Gilon C & Levitzky A, 1989. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Medical Chemistry* **32** (10). 2344-2352.
- Goodbody I, 1974. The physiology of ascidians. *Advanced Marine Biology* **12**. 1-149.

- Green KM, Russell BD, Clark RJ, Jones MK, Garson MJ, Skilleter GA & Degnan BM, 2002. A sponge allelochemical induces ascidian settlement but inhibits metamorphosis. *Marine Biology* **140**. 355-363.
- Guyot M & Meyer M, 1986. An 3-Indolyl-imidazol-4-one from the tunicate *Dendrodoa grossularia*. *Tetrahedron Letters* **27** (23). 2621-2622.
- Harris CL, 1996. *Concepts in Zoology*. Second Edition. Harper Collins College Publishers, New York.
- Harvey AL, 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Science* **20**. 196-198.
- Heesing A & Hoppe K, 1967. Sakaguchi- und Fearon-Reaktion: Die Struktur der Farbstoffe, ihr Bildungsmechanismus und die Spezifität der Reaktion. *Chemische Berichte* **100**. 3649-3654.
- Heitz S, Durgeat M, Guyot M, Brassy C & Bachet B, 1980. Nouveau derive indolique du Thiadiazole-1,2,4, isole d'un unicier (*Dendrodoa grossularia*). *Tetrahedron Letters* **21**. 1457-1458.
- Helbecque N, Moquin C, Bernier J-L, Morel E, Guyot M & Henichart J-P, 1987. Grossularine-1 and grossularine-2, α -carbolines from *Dendrodoa grossularia*, as possible intercalative agents. *Cancer Biochemistry and Biophysics* **9**. 271-279.
- Henrikson AA & Pawlik JR, 1995. A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **194**. 157-165.
- Henrikson AA & Pawlik JR, 1998. Seasonal variation in biofouling of gels containing extracts of marine organisms. *Biofouling* **12** (1-3). 245-255.
- Hirose E, Yamashiro H & Mori Y, 2001. Properties of tunic acid in the ascidian *Phallusia nigra* (Asciidae, Phlebobranchia). *Zoological Science* **18** (3). 309-314.
- Hollósy F & Kéri G, 2004. Plant-derived protein tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Current Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* **4**. 173-197.
- Holmström C, Rittschof D & Kjelleberg S, 1992. Inhibition of settlement by larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (7). 2111-2115.
- Hooper JNA, Capon RJ, Keenan CP, Parry DL & Smit N, 1992. Chemotaxonomy of marine sponges: families Micronidae, Raspailiidae and Axinellidae, and their relationships with other families in the orders Poecilosclerida and Axinellida (Porifera: Demospongiae). *Invertebrate Taxonomy* **6** (2). 261-301.

- Issa HH, Tanaka J, Rachmat R & Higa T, 2003. Floresolidos, new metacyclophane hydroquinone lactones from an ascidian *Aplidium* sp. *Tetrahedron Letters* **44**. 1243-1245.
- Jares-Erijman EA, Ingrum AL, Carney JR, Rinehart K & Sakai R, 1993. Polycyclic guanidine-containing compounds from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: the structure of 13,14,15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidines. *Journal of Organic Chemistry* **58**. 4805-4808.
- Jenkins KM, Jensen PR & Fenical W, 1998. Bioassays with marine microorganisms. In: *Methods in chemical ecology*. KFH J. G. Millar. Chapman & Hall, New York. 1-38.
- Jiménez C, Quinoá E, Castedo L & Riguera R, 1986. Epidioxy sterols from the tunicates *Dendrodoa grossularia* and *Asciadiella aspersa* and the Gastropoda *Aplysia depilans* and *Aplysia punctata*. *Journal of Natural Products* **49** (5). 905-909.
- Jiménez PC, Fortier SC, Lotufo TMC, Pessoa C, Moraes MEA, Odorico de Moraes M & Costa-Lotufo LV, 2003. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **287**. 93-101.
- Jimeno J, Faircloth G, Sousa-Faro JMF, Scheuer P & Rinehart K, 2004. New marine derived anticancer therapeutics- a journey from the sea to clinical trial. *Marine Drugs* **1**. 14-29.
- Jimeno JM, 2002. A clinical armamentarium of marine-derived anti-cancer compounds. *Anti-Cancer Drugs* **13**. S15-S19.
- Kaufmann SH & Hengartner MO, 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* **11** (12). 526-534.
- Kaul PN, 1982. Biomedical potential of the sea. *Pure and Applied Chemistry* **54** (10). 1963-1972.
- Keller MD, Kiene RP, Matrai PA & Bellows WK, 1999. Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. II. N-limited chemostat cultures. *Marine Biology* **135**. 249-257.
- Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Ilan M, Ifrach I & Loya Y, 2001. Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. *Aquatic Microbial Ecology* **24**. 9-16.
- Keough MJ & Raimondi PT, 1995. Responses of settling invertebrate larvae to bioorganic films: effects of different types of films. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **185**. 235-253.
- Kirsch G, 1999. Marine Makro- und Mikroorganismen als Quellen für HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Inhibitoren. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

- Kourany-Lefoll E, Laprévotte O, Sévenet T, Montagnac A & Pais M, 1994. Phloeodictines A1-A7 and C1-C2, antibiotic and cytotoxic guanidine alkaloids from the New Caledonian sponge, *Phloeodictyon* sp. *Tetrahedron* **50** (11). 3415-3426.
- Kumar N, 1981. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry* **256**. 10435-10441.
- Lichter W, Wellham LL, Van der Werf BA, Middlebrook RE, Sigel MM & Weinheimer AJ, 1972. Biological activities exerted by extracts of *Ecteinascidia turbinata*. In: *Food-Drugs from the Sea. Proceedings 1972-1973*. Washington DC, Marine Technology Series.
- Lindquist N & Fenical W, 1989. Ascidiatrienolides A-C, novel lactonized eicosanoids from the colonial marine ascidian *Didemnum candidum*. *Tetrahedron Letters* **30**. 2735-2738.
- Lindquist N, Hay M & Fenical W, 1992. Defense of ascidians and their conspicuous larvae: adult versus larval chemical defenses. *Ecological Monographs* **62** (4). 547-568.
- Lindsay BS, Battershill CH & Copp BR, 1999. 1,3-dimethylguanidine, a new purine from the New Zealand ascidian *Botrylloides leachi*. *Journal of Natural Products* **62**. 638-639.
- López-Pinón MJ, Insua A & Mendez J, 2002. Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology* **4**. 495-502.
- Luckner M, 1984. *Secondary metabolites in microorganisms, plants, and animals*. Second Edition. Springer-Verlag.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J, 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Tenth Edition. Pearson Education.
- Martinez EJ & Corey EJ, 2000. A new, more efficient, and effective process for the synthesis of a key pentacyclic intermediate for production of ecteinascidin and phthalascidin antitumor agents. *Organic Letters* **2** (7). 993-996.
- May RM, 1988. How many species are there on earth? *Science* **241**. 1441-1449.
- McCaffrey EJ & Endean R, 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Marine Biology* **89**. 1-8.
- McClintock JB, Baker BJ, Hamann MT, Yoshida W, Slattery M, Heine JN, Bryan PJ, Jayatilake GS & Moon BH, 1994. Homarine as a feeding deterrent in common shallow-water antarctic lamellarian gastropod *Mersenioopsis mollis*: A rare example of chemical defense in a marine prosobranch. *Journal of Chemical Ecology* **20** (10). 2539-2549.
- McDonald LA, Swersey JC & Ireland CM, 1995. Botryllamides A-D, new brominated tyrosine derivatives from styelid ascidians of the genus *Botryllus*. *Tetrahedron* **51** (18). 5237-5244.

- McKee TC, Galinis DL, Pannell LK, Cardellina JH, Laakso J, Ireland CM, Murray L, Capon RJ & Boyd MR, 1998. The lobatamides, novel cytotoxic macrolides from Southwestern Pacific tunicates. *Journal of Organic Chemistry* **63**. 7805-7810.
- Mebs D, 1989. *Gifte im Riff-Toxikologie und Biochemie eines Lebensraumes*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Mendola D, 2000. Aquaculture production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743. In: *Drugs from the Sea*. N Fusetani. Karger, Basel. 120-133.
- Mendola D, 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economies. *Biomolecular Engineering* **20**. 441-458.
- Millar RH, 1970. *British Ascidians*. 1st. Academic Press London and New York, London.
- Montgomery DW & Zukoski C, 1985. Didemnin B: A new immunosuppressive cyclic peptide with potent activity in vitro and in vivo. *Transplantation* **40** (1). 49-56.
- Moquin C & Guyot M, 1984. Grossularine, a novel indole derivative from the marine tunicate, *Dendrodoa grossularia*. *Tetrahedron Letters* **25** (44). 5047-5048.
- Moquin-Patthey C & Guyot M, 1989. Grossularine-1 and Grossularine-2, cytotoxic α -carboline derivatives from the tunicate *Dendrodoa grossularia*. *Tetrahedron* **45** (11). 3445-3450.
- Muhradt PF & Sasse F, 1997. Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Research* **57** (16). 3344-3346.
- Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, Battershill CN & Duckworth AR, 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* **70**. 15-25.
- Murray L, Lim TK, Currie G & Capon RJ, 1995. Aplidites (A-G): Macrocyclic orthonitrites from an Australian tunicate, *Aplidium* sp. *Australian Journal of Chemistry* **48** (7). 1253-1256.
- Nakamura H, Wu H, Kobayashi J & Ohizumi Y, 1983. Agelasidine-A, a novel sesquiterpene possessing antispasmodic activity from the Okinawa Sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Letters* **24** (38). 4105-4108.
- Newman DJ, Cragg GM & Snader KM, 2003. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* **66**. 1022-1037.
- Noble MEM, Endicott JA & Johnson LN, 2004. Protein kinase inhibitors: Insight into drug design from structure. *Science* **303**. 1800-1805.
- Nuijen B, Bouma M, Henrar REC, Manada C, Bult A & Beijnen JH, 1999. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion

- devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. *Anti-Cancer Drugs* **10**. 879-887.
- Okazaki Y & Shizuri Y, 2000. Effect of inducers and inhibitors on the expression of bcs genes involved in cypris larval attachment and metamorphosis of the barnacles *Balanus amphitrite*. *International Journal of Developmental Biology* **44**. 451-456.
- Pawlik JR, 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Sabelliidae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. *Bulletin of Marine Science* **46** (2). 512-536.
- Pawlik JR, 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanography and marine biology : an annual review*. **30**. 273-335.
- Pawlik JR, 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews* **93**. 1911-1922.
- Pereira RC, Carvalho AGV, Gaba BAP & Coutinho R, 2002. Field experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants. *Brazilian Journal of Biology* **62** (2). 311-320.
- Pirie BJS & Bell MV, 1984. The localization of inorganic elements, particularly vanadium and sulphur, in haemolymph from the ascidians *Ascidia mentula* (Mueller) and *Ascidella aspersa* (Mueller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **74** (2). 187-194.
- Pisut DP & Pawlik JR, 2002. Anti-predatory chemical defenses of ascidians: secondary metabolites or inorganic acids? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **270**. 203-214.
- Raftos DA & Hutchinson A, 1995. Cytotoxicity reactions in the solitary tunicate *Styela plicata*. *Developmental and Comparative Immunology* **19** (6). 463-471.
- Ramasamy MS & Murugan A, 2003. Chemical defense in ascidians *Eudistome viride* and *Didemnum psammathodes* in Tuticorin, southeast coast of India: Bacterial epibiosis and fouling deterrent activity. *Indian Journal of Marine Science* **32** (4). 337-339.
- Reynolds P, 1985. Orkney's seabirds and coastal otters. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B* **87**. 83-94.
- Rietdorf D, 2001. Studien zur Taxonomie und Physiologie der Ascidien vor Helgoland (Nordsee). Diplomarbeit. Biologische Anstalt Helgoland.
- Rinehart K, Gloer JB & Cook JCJ, 1981a. Structures of the didemins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. *Journal of the American Chemical Society* **103**. 1857-1859.

- Rinehart K, Sakai R, Holt TG, Fregeau NL, Perun TJJ, Seigler DS, Wilson GR & Shield LS, 1990a. Biologically active natural products. *Pure and Applied Chemistry* **62** (7). 1277-1280.
- Rinehart KL, 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews* **20** (1). 1-27.
- Rinehart KL, Holt TG, Fregeua NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH & Martin DG, 1990b. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry* **55**. 4512-4515.
- Rinehart KL, Jr., Shaw PD, Shield LS, Gloer JB, Harbour GC, Koker MES, Samain D, Schwartz RE, Tymiak AA & et al., 1981b. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure and Applied Chemistry* **53** (4). 795-817.
- Rinehart KL, Kishore V, Bible KC, Sakai R, Sullins DW & Li KM, 1988. Didemnins and tunichlorin: Novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *Journal of Natural Products* **51** (1). 1-21.
- Rodríguez SR, Ojeda FP & Inestrosa NC, 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* **97**. 193-207.
- Romanenko LA, Kalinovskaya NI & Mikhailov VV, 2001. Taxonomic composition and biological activity of microorganisms associated with a marine ascidian *Halocynthia aurantium*. *Russian Journal of Marine Biology* **27** (5). 291-295.
- Rowley AF, 1983. Preliminary investigations on the possible antimicrobial properties of tunicate blood cell vanadium. *Journal of Experimental Zoology* **227** (2). 319-22.
- Rudi A, Aknin M, Gaydou EM & Kashman Y, 1998. Four new cytotoxic cyclic hexa- and heptapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. *Tetrahedron* **54** (43). 13203-13210.
- Ruggieri GD, 1976. Drugs from the Sea. *Science* **194**. 491-497.
- Ruppert EE & Barnes RD, 1994. *Invertebrate Zoology*. Sixth Edition. Saunders College Publishing.
- Russell FE, 1984. Marine toxins and venomous and poisonous marine plants and animals (invertebrates). *Advanced Marine Biology* **21**. 59-217.
- Sakai R & Higa T, 1987. Tubastrine, a new guanidinostyrene from the coral *Tubastrea aurea*. *Chemistry Letters*. 127-128.
- Sakai R, Rinehart KL, Kishore V, Kundu B, Faircloth G, Gloer JB, Carney JR, Namikoshi M, Sun F, Hoghes RG, Grávalos DG, de Quesada TG, Wilson GR & Heid RM, 1996.

- Structure-activity relationships of the didemnins. *Journal of Medical Chemistry* **39**. 2819-2834.
- Schlegel HG & Zaborosch C, 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Siebte Auflage. Thieme.
- Schlick W, 2000. *Orkney & Shetland*. DuMont Reisetaschenbuch.
- Schupp P, Steube K, Meyer C & Proksch P, 2001. Anti-proliferative effects of new staurosporine derivatives isolated from a marine ascidian and its predatory flatworm. *Cancer Letters* **174**. 165-172.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ & Boyd MR, 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* **48**. 4827-4833.
- Shao P, Chen Y-Q, Zhou H, Yuan J, Qu L-H, Zhao D & Lin Y-S, 2004. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis. *Marine Biology* **144**. 215-224.
- Sigel MM, 1969. Anticellular and antitumor activity of extracts from tropical marine invertebrates. In: *Food-Drugs from the Sea Proceedings*. HW Youngken. 281-294.
- Slattery M, Hamann MT, McClintock JB, Perry TL, Puglisi MP & Yoshida WY, 1997. Ecological roles for water-borne metabolites from Antarctic soft corals. *Marine Ecology Progress Series* **161**. 133-144.
- Smith CJ, Hettich RL, Jompa J, Tahir A, Buchanan MV & Ireland CM, 1998. Cadiolides A and B, new metabolites from an ascidian of the genus *Botryllus*. *Journal of Organic Chemistry* **63**. 4147-4150.
- Smith MJ & Dehnel PA, 1971. The composition of tunic from four species of ascidians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **40**. 615-622.
- Smyth MS, Stefanova I, Hartmann F, Horak ID, Osherov N, Levitzki A & Burke TRJ, 1993. Non-amine based analogues of lavendustin A as protein tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Medical Chemistry* **36**. 3010-3014.
- Stoecker D, 1978. Resistance of a tunicate to fouling. *Biological Bulletin* **155**. 615-626.
- Stoecker D, 1980. Relationship between chemical defense and ecology in benthic ascidians. *Marine Ecology Progress Series* **3**. 257-265.
- Targett NM, Bishop SS, McConnell OJ & Yoder JA, 1983. Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola*. Homarine from the gorgonians *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs. *Journal of Chemical Ecology* **9** (7). 817-830.

- Teo SL-M & Ryland J, 1995. Potential antifouling mechanisms using toxic chemicals in some British ascidians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **188**. 49-62.
- Teo S-M & Ryland JS, 1994. Toxicity and palatability of some British ascidians. *Marine Biology* **120** (2). 297-303.
- Thakur NL & Anil AC, 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: Importance of its surface-associated bacteria. *Journal of Chemical Ecology* **26** (1). 57-70.
- Thiel V, Blumenberg M, Hefter J, Pape T, Pomponi S, Reed J, Reitner J, Wörheide G & Michaelis W, 2002. A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**. 60-66.
- Todd CD & Keough MJ, 1994. Larval settlement in hard substratum epifaunal assemblages: a manipulative field study of the effects of substratum filming and the presence of incumbents. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **181**. 159-187.
- Umezawa H, Imoto M, Sawa T, Isshiki K, Matsuda N, Uchida T, Inuma H, Hamada M & Takeuchi T, 1986. Studies on a new epidermal growth factor receptor kinase inhibitor, erbastatin, produced by MH435-hF3. *The Journal of Antibiotics* **39** (1). 170-173.
- Unabia CRC & Hadfield MG, 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biology* **133** (1). 55-64.
- Urban S, Capon RJ & Hooper JNA, 1994. A new alkaloid from an Australian marine sponge, *Spongosorites* sp. *Australian Journal of Chemistry* **47**. 2279-2282.
- Urdiales JL, Morata P, De Casto IN & Sánchez-Jiménez F, 1996. Antiproliferative effect of dehydrodidemnin B (DDB), a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. *Cancer Letters* **102**. 31-37.
- Vera MD & Joullie MM, 2002. Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. *Medicinal Research Reviews* **22** (2). 102-145.
- Waditee R, Tanaka Y, Aoki K, Hibino T, Jikuya H, Takano J & Takabe T, 2003. Isolation and functional characterization of N-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*. *Journal of Biological Chemistry* **278** (7). 4932-4942.
- Wahl M, 1995. Bacterial epibiosis on Bahamian and Pacific ascidians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **191**. 239-255.
- Wahl M, Jensen PR & Fenical W, 1994. Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Marine Ecology Progress Series* **110** (1). 45-57.

- Watanabe K, Uehara H, Sato M & Konosu S, 1985. Seasonal variation of extractive nitrogenous constituents in the muscle of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **51** (8). 1293-1298.
- Watters DJ & van den Brenk AL, 1993. Toxins from Ascidiaceae. *Toxicon* **31** (11). 1349-1372.
- Weibel PA & Hesse M, 1973. Substituenteneinfluß bei der massenspektrometrischen Fragmentierung: Untersuchungen an N-Methyl- β,β' -diphenyl-diäthylaminen. *Helvetica Chimica Acta* **56**. 2460-2479.
- White TJ, Bruns T & Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*. 315-322.
- Wieczorek SK & Todd CD, 1997. Inhibition and facilitation of bryozoan and ascidian settlement by natural multi-species biofilms: effects of film age and the roles of active and passive larval attachment. *Marine Biology* **128**. 463-473.
- Wilson L, Panda D & Jordan MA, 1999. Modulation of microtubule dynamics by drugs: A paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Structure and Function* **24**. 329-335.
- Wörheide G, Hooper JNA & Degnan BM, 2002. Phylogeography of western Pacific *Leucetta 'chagosensis'* (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef Heritage Area (Australia). *Molecular Ecology* **11**. 1753-1768.
- Yaish P, Gazit A, Gilon C & Levitzki A, 1988. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* **242** (4880). 933-935.
- Yamaguchi K, Kawamata M, Murakami M, Konosu S & Ben-Amotz A, 1988. Extractive nitrogenous components of the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **54** (2). 239-243.
- Yarden Y & Ullrich A, 1988. Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* **57**. 443-478.
- Yasuda S, 1975. Sterol composition of sea squirts (Ascidiacea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **50**. 399-402.
- Yin M, Palmer HR, Fyfe-Johnson AL, Bedford JJ, Smith RA & Yancey PH, 2000. Hypotaurine, N-ethyltaurine, taurine, and glycine betaine as dominant osmolytes of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold seeps. *Physiological and Biochemical Zoology* **73** (5). 629-637.
- Zeeck A, Bach G & Terlau H, 2001. Das medizinische Potential von Naturstoffen. *Der Internist* **42** (10). 1422-1427.

- Zeeck E, Harder T & M. B, 1998. Inosine, L-glutamic acid and L-glutamine as components of a sex pheromone complex of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelidae: Polychaeta). *Chemoecology* **8**. 77-84.
- ZoBell CB & Allen EC, 1934. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology* **29**. 239-251.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer solitären Ascidie.....	5
Abbildung 1.2: Stammbaum der Ascidiacea.	6
Abbildung 1.3: Strukturformel von Ecteinascidin 743 (1).	10
Abbildung 1.4: Strukturformel von Didemn B (2).	11
Abbildung 1.5: <i>Ecteinascidia turbinata</i> in Aquakultur.	12
Abbildung 1.6: Dendrodoin (3) und Alboinon (4) sowie die Grossularine 1 (5) und 2 (6).....	14
Abbildung 2.1: Karte der Sammelorte um die Orkney-Inseln.....	18
Abbildung 2.2: Tuquoy Bay, Westray. Blick von der Öffnung der Bucht zum Land hin.....	19
Abbildung 2.3: <i>Ascidiella scabra</i> (a) und <i>Didemnum candidum</i> (b) an Laminarienstängeln.....	19
Abbildung 2.4: Steilküste des Red Nev an der Westseite der Insel Westray.....	20
Abbildung 2.5: <i>Dendrodia grossularia</i> (a) und <i>Aplidium punctum</i> (b).	20
Abbildung 2.6: Westliche Seite der Saviskaill Bay mit Blick in den Westray Firth.....	21
Abbildung 2.7: <i>Ascidia mentula</i> (a) und <i>Ascidia virginea</i> (b) in Felsspalten der Saviskaill Bay.	21
Abbildung 2.8: Geographische Lage von Helgoland und der Doggerbank.....	22
Abbildung 2.9: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes und der vier Phasen von <i>Didemnum candidum</i>	24
Abbildung 2.10: Karte von Helgoland und der Düne.....	27
Abbildung 2.11: Versuchs-Agarschale mit Filterpapierblättchen.....	29
Abbildung 3.1: <i>Ascidiella scabra</i> (a) und <i>Ascidiella aspersa</i> (b) in ihrem natürlichen Habitat... ..	33
Abbildung 3.2: Schema zur Vermessung der äußeren Morphologie.....	34
Abbildung 3.3: Daten des morphologischen Vergleichs der beiden <i>Ascidiella</i> -Populationen.	35
Abbildung 3.4: Morphologische Merkmale von <i>Ascidiella aspersa</i> und <i>Ascidiella scabra</i>	36
Abbildung 3.5: Dorsales Tuberkel eines <i>Ascidiella</i> -Individuums von Helgoland (a) und von den Orkney-Inseln (b).	36
Abbildung 3.6: HPLC-Analyse der Rohextrakte von zehn Individuen der Art <i>Ascidiella scabra</i>	37
Abbildung 3.7: HPLC-Analyse der Rohextrakte von Individuen der Orkney-Inseln und Helgoland.	38
Abbildung 3.8: Eine der Phytigel-Platten vor und nach der Inkubation.	40
Abbildung 3.9: Anzahl der Epibionten in Relation zum Algenbewuchs.....	44
Abbildung 3.10: Induziertes Bakterienwachstum um Filterblättchen mit Ascidienextrakten.....	51
Abbildung 3.11: Durch Inkubation mit Ascidienextrakten verfärbte Bakterienkolonien.....	52
Abbildung 3.12: Cytotoxizität der fraktionierten <i>n</i> -Hexanphase von <i>Aplidium punctum</i>	57

Abbildung 3.13: Cytotoxische Aktivität der aufgetrennten Essigesterphase von <i>Dendrodoa grossularia</i>	58
Abbildung 3.14: Morphologische Veränderungen der Mausfibroblasten bei Inkubation mit Extrakten aus <i>Dendrodoa grossularia</i>	60
Abbildung 3.15: Cytotoxische Aktivität der aufgetrennten Essigesterphase von <i>Didemnum candidum</i>	61
Abbildung 3.16: Morphologische Veränderung der Mausfibroblasten bei Inkubation mit Extrakten aus <i>Didemnum candidum</i>	62
Abbildung 3.17: Auftrennung und Wirkung der cytotoxisch aktiven Extrakte.....	63
Abbildung 3.18: Restaktivität des EGFR bei Inkubation mit zwei fraktionierten Phasen von <i>Dendrodoa grossularia</i>	67
Abbildung 3.19: ¹ H-NMR-Spektren der aktiven Fraktionen aus der <i>n</i> -Butanolphase von <i>Dendrodoa grossularia</i>	72
Abbildung 3.20: Enzymaktivität in Relation zur Substanzkonzentration der Substanz BL9D5D4 aus <i>Dendrodoa grossularia</i>	72
Abbildung 3.21: <i>Bioassay-guided Fractionation</i> der <i>n</i> -Butanolphase von <i>Dendrodoa grossularia</i> mittels PTK-Assay.....	73
Abbildung 3.22: Restaktivität des EGFR bei Inkubation mit Fraktionen der Trennung EL10. ...	74
Abbildung 3.23: HPLC-Chromatogramme der im PTK-Assay aktiven und aufgereinigten Fraktionen von <i>Dendrodoa grossularia</i>	75
Abbildung 3.24: <i>Bioassay-guided Fractionation</i> der Essigesterphase von <i>Dendrodoa grossularia</i> mittels PTK-Assay.....	76
Abbildung 3.25: ¹ H-Spektrum der Fraktion EL10X3 von <i>Dendrodoa grossularia</i>	77
Abbildung 3.26: Vermuteter Reaktionsverlauf von Tubastrin mit Natriumhydroxid.....	78
Abbildung 3.27: Vermuteter Mechanismus der Sakaguchi-Reaktion (nach Heesing <i>et al.</i> 1967).79	
Abbildung 3.28: Strukturformeln von Tubastrin (7) und einem Tubastrin-Derivat (8).....	81
Abbildung 3.29: IR-Spektrum (KBr-Preßling) von Tubastrin.....	81
Abbildung 3.30: MS/MS-Fragmentierung von Tubastrin.....	82
Abbildung 3.31: Postulierte MS/MS-Fragmentierung von Tubastrin.....	83
Abbildung 3.32: Fragmentierungsverhalten des N-Methyl-2,2'-diphenyl-diethylamins.....	83
Abbildung 3.33: Enzymaktivität in Relation zur Konzentration von Tubastrin und von Piceatannol.....	84
Abbildung 3.34: Strukturformeln von Piceatannol (9), Erbstatin (10) und Tyrosin (11).	85
Abbildung 3.35: Strukturformeln von Dopamin (12) und Adrenalin (13).....	87

Abbildung 3.36: Aggregate von <i>Dendrodoa grossularia</i>	89
Abbildung 3.37: Strukturformel und ¹ H-NMR-Spektrum von Homarin.....	91
Abbildung 3.38: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Dendrodoa grossularia</i>	93
Abbildung 3.39: Strukturformel und HPLC-analytische Retentionszeit von Betain.....	94
Abbildung 3.40: Strukturformel und ¹ H-NMR-Spektrum von Adenosin.....	95
Abbildung 3.41: Strukturformel und ¹ H-NMR-Spektrum von Inosin.	97
Abbildung 4.1: HPLC-Chromatogramme der <i>n</i> -Butanolphase von <i>Dendrodoa grossularia</i>	104
Abbildung 4.2: HPLC-Chromatogramme der <i>n</i> -Hexanphase von <i>Didemnum candidum</i>	105
Abbildung 4.3: Aufsicht auf den apikalen Bereich des eröffneten Körpers von <i>Ascidiella aspersa</i>	108
Abbildung 4.4: Ermittlung der Hemmhofbreite über die digitale Auswertung.....	115
Abbildung 4.5: Neubauer-Kammer mit aufgelegtem Deckgläschen.....	115
Abbildung 4.6: Funktionsweise des PTK-Assays als ELISA.....	118

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Bisher aus den in dieser Arbeit eingesetzten Ascidien isolierte Verbindungen und deren biologische Wirkung.....	13
Tabelle 2.1: Ascidienarten mit Sammeldatum und Sammelort, die in den biologischen Tests eingesetzt wurden.	16
Tabelle 3.1: Algendichte und Anzahl der sessilen bzw. assoziierten Epibionten der Extraktgele der Versuche 1 und 2.	42
Tabelle 3.2: Anzahl der durch jede Ascidienart gehemmten Bakterienstämme.	46
Tabelle 3.3: Anzahl der die jeweiligen Bakterienstämme hemmenden Ascidienarten.....	48
Tabelle 3.4: Bewertung der ausgemessenen Hemmhöfe nach ihrer Breite.....	49
Tabelle 3.5: Cytotoxische Aktivität der untersuchten Ascidien.....	55
Tabelle 3.6: Aktivität des EGFR bei Inkubation mit Extrakten von zwölf Ascidienarten der Sammlung 2001.	65
Tabelle 3.7: Biologische Aktivitäten der getesteten Ascidienarten.	69
Tabelle 3.8: NMR-Daten von Tubastrin aus der Koralle <i>Tubastrea aurea</i> a) (Sakai <i>et al.</i> 1987) und der Ascidie <i>Dendrodoa grossularia</i> b).	80
Tabelle 3.9: IR-Daten von Tubastrin aus <i>Dendrodoa grossularia</i> im Vergleich zu den Literaturwerten von Sakai <i>et al.</i> (1987).	82
Tabelle 3.10: Anteil von Tubastrin im getrockneten Rohextrakt von <i>Dendrodoa grossularia</i>	83
Tabelle 3.11: Übersicht über die biologische Aktivität von <i>Dendrodoa grossularia</i> -Extrakten. .	88
Tabelle 3.12: Epibionten eines Aggregats von <i>Dendrodoa grossularia</i>	90
Tabelle 3.13: NMR-Daten von Homarin aus <i>Dendrodoa grossularia</i>	92
Tabelle 3.14: Anteil von Homarin im getrockneten Rohextrakt von <i>Dendrodoa grossularia</i>	93
Tabelle 3.15: NMR-Daten von Adenosin aus der Ascidie <i>Dendrodoa grossularia</i>	96
Tabelle 3.16: NMR-Daten von Inosin aus der Ascidie <i>Asciidiella aspersa</i>	98
Tabelle 4.1: Trennungen einzelner Phasen von <i>Asciidiella scabra</i> , <i>Corella parallelogramma</i> und <i>Didemnum candidum</i>	106
Tabelle 4.2: Weitere Auftrennungen der <i>n</i> -Butanolphase von <i>Dendrodoa grossularia</i>	106
Tabelle 4.3: Weitere Auftrennungen der Essigesterphase von <i>Dendrodoa grossularia</i>	107
Tabelle 4.4: Charakterisierung der Bakterienstämme und ihre grundlegenden molekularbiologischen Unterschiede.....	112
Tabelle 4.5: Systematische Einordnung und Herkunft der in dem Agar-Diffusions-Test verwendeten Bakterienstämme.	113

8. Beschreibung der bearbeiteten Ascidienarten

Die Darstellung der Arten basiert auf Literaturbeschreibungen (Berrill 1950, Millar 1970, Rietdorf 2001) und auf eigenen Beobachtungen. Weitere Informationen sowie einige der Bilder sind dem Internet entnommen und unter den Adressen www.habitas.org.uk/marinelife/, www.marlin.ac.uk/ und <http://www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/> nachzulesen. Die Angabe des Verbreitungsgebietes beschränkt sich in Ermangelung entsprechender Literatur auf Europa.

In den Tabellen neben den Abbildungen finden sich die Arbeitsbezeichnung der Ascidienart sowie die Mengenangaben der Extraktion mit Daten zu Rohextrakt und den vier Phasen verschiedener Polarität. Soweit vorhanden, sind jeder Artbeschreibung ein HPLC-Chromatogramm mit Streulicht- und UV-Detektion sowie ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohextraktes angefügt. Die HPLC-Analyse erfolgte mit einer Eurospher-100 Diol-Säule (7 μm , 1 ml/min) und folgendem Gradienten: 100 – 50% Acetonitril/Wasser 25 – 30 min 50% Acetonitril/Wasser – 35 min 50% Methanol/Wasser – 40 min 100% Methanol. Die NMR-Spektren wurden mit der Software IconNMR von Bruker bei 30°C gemessen (400 MHz, 16 scans) und auf das Lösungsmittel DMSO- d_6 kalibriert.

Ascidiella aspersa (Müller, 1776)

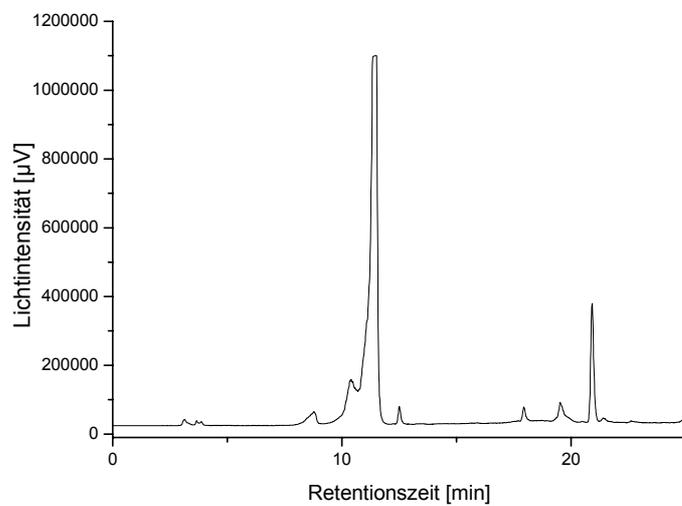
Biologie



Wuchsform	Solitär, meist mehrere Individuen in dichten Aggregaten, auch aufeinander wachsend.
Verbreitung	Großbritannien und Nordsee bis zur Westküste Norwegens, Mittelmeer.
Habitat/Substrat	An geschützten, schluffigen Stellen. Sublittoral bis etwa 80 m. Jedes Hartsubstrat wie Molenwände, Muschelschalen, große Steine, aber auch an Algen.
Morphologie	Körper oval, anterior schmaler werdend, bis 10 cm Größe. Oraler Siphon flötenartig, terminal, Atrialsiphon $\frac{1}{3}$ der Körperlänge entfernt. Tunika derb-fest, derb, warzig. Sehr häufig dicht mit Detritus, Algen und kleinen Epibionten besetzt.
Bemerkungen	Ähnlichkeit mit großen Individuen der Art <i>Ascidiella scabra</i> .

Ascidiella aspersa* (Müller, 1776)*Chemie****ja058, ja183, ja184**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
129,01 g	25,09 g	0,9482 g	1,6115 g	3,0630 g	14,4018 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), Streulichtdetektion.**¹H-NMR-Spektrum**

—

Ascidiella scabra (Müller, 1776)

Biologie

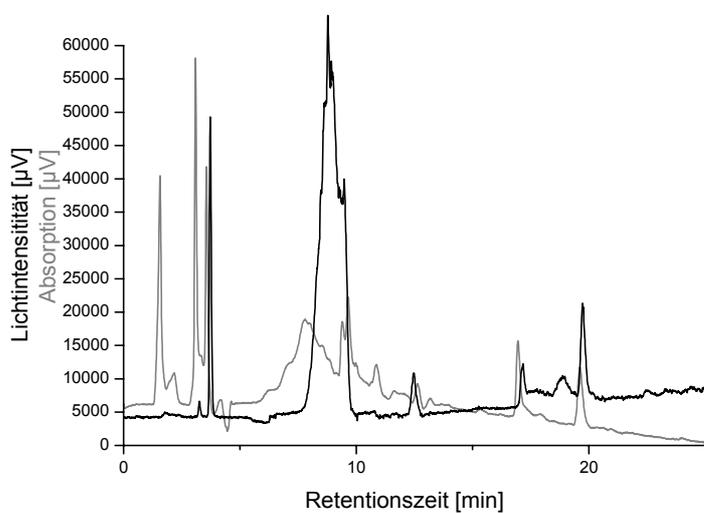
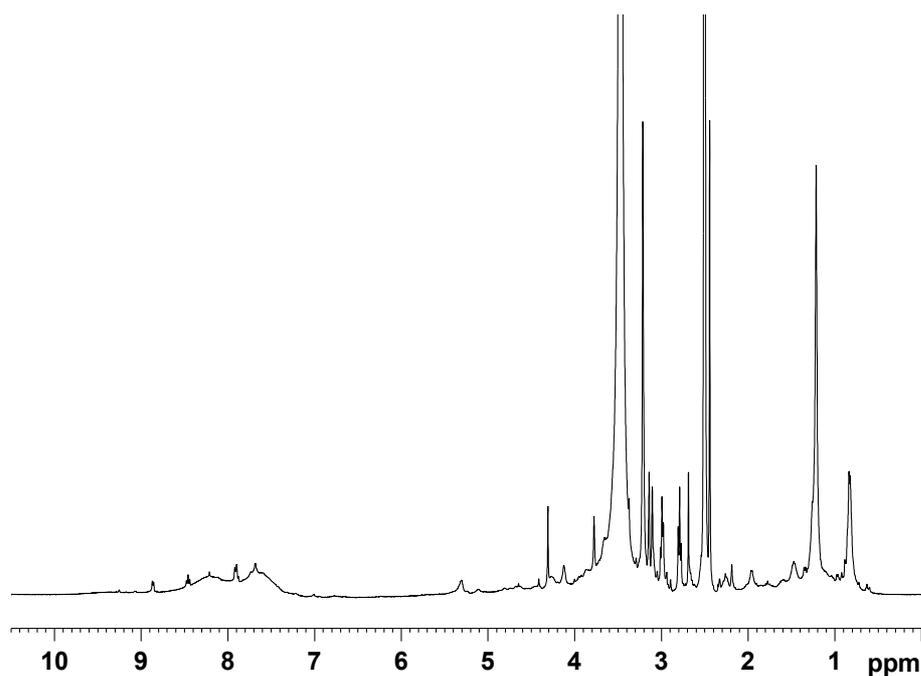


Wuchsform	Solitär.
Verbreitung	Irland, Irische See, Großbritannien und Nordsee bis zu den Färöer-Inseln, Norwegen bis in den Kattegatt. Selten auch mediterran.
Habitat/Substrat	Sehr tolerant bezüglich Strömung und Salinität. Sublittoral bis 300 m Tiefe. Jedes Hartsubstrat und oft an andere Ascidien, Bryozoen oder Algen angeheftet.
Morphologie	Körper oval bis elliptisch, 3 - 4 cm Größe, Siphone etwa $\frac{1}{4}$ der Körperlänge voneinander entfernt. Anheftung auf der ventralen Seite. Tunika derb-fest, grau bis semi-transparent, mit roter Pigmentierung nahe der Siphone und roter Pigmentierung des Körpers.
Bemerkungen	Individuen von bis zu 7,5 cm Körperlänge wurden auf der Doggerbank gefunden. Ähnlichkeit mit kleinen Individuen der Art <i>Ascidiella aspersa</i> .

Ascidiella scabra* (Müller, 1776)*Chemie****ja101**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
57,15 g	9,46 g	0,2761 g	0,3785 g	1,2417 g	6,1510 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

 ^1H -NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in $\text{DMSO-}d_6$.

Ascidia virginea Müller, 1776

Biologie

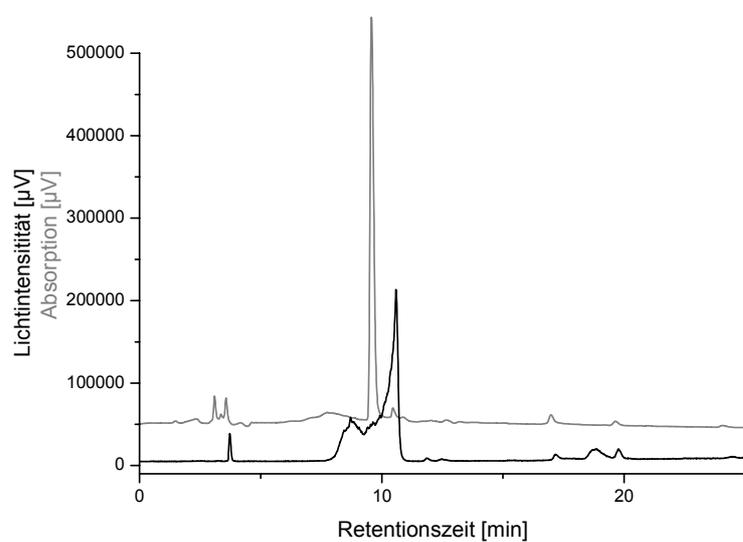
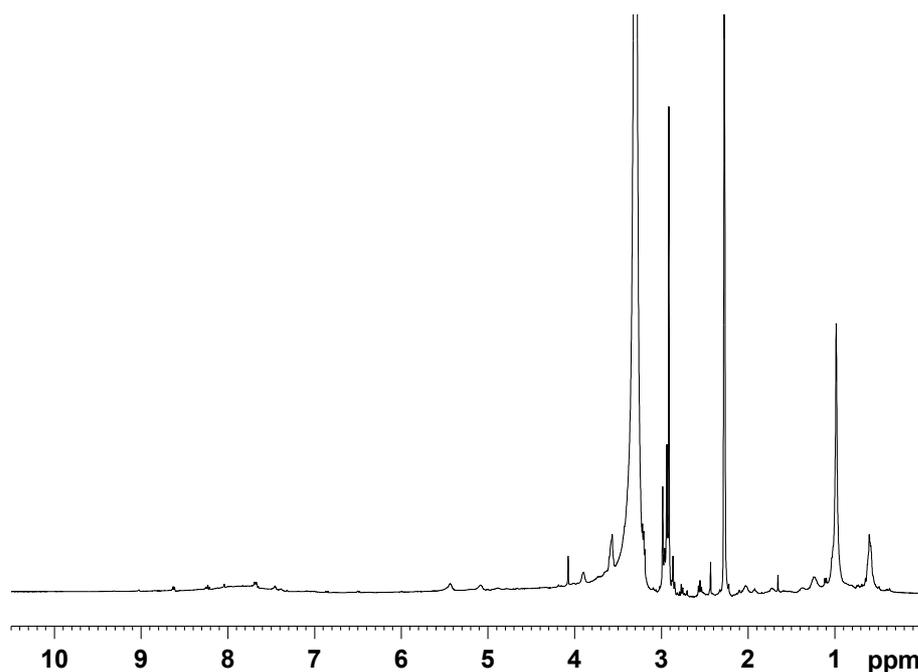


Wuchsform	Solitär.
Verbreitung	Irland, Irische See, Großbritannien, Norwegen. Nördlich bis Spitzbergen, südlich bis zum Mittelmeer.
Habitat/Substrat	Auf Harts substrat, Steinen, an Überhängen und Felswänden an geschützten oder semi-exponierten, sandigen Stellen. Flachwasser bis 400 m Tiefe.
Morphologie	Körper rechteckig, bis zu 8 cm. Siphone kurz, oraler Siphon terminal, Atrialsiphon eng daneben. Anheftung auf einer Seite. Tunika sehr glatt und sauber, fest, semi-transparent, rosa bis milchweiß gefärbt.
Bemerkungen	Sammlung ohne Verletzung der Tunika nicht möglich!

Ascidia virginea* Müller, 1776*Chemie****ja102**

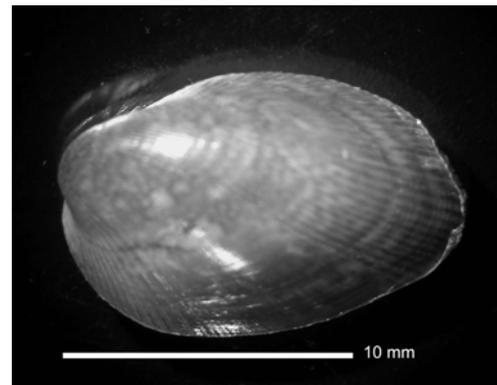
Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
3,87 g	1,31 g	0,0809 g	0,0798 g	0,2581 g	0,8340 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

 ^1H -NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in $\text{DMSO-}d_6$.

Ascidia mentula Müller, 1776

Biologie

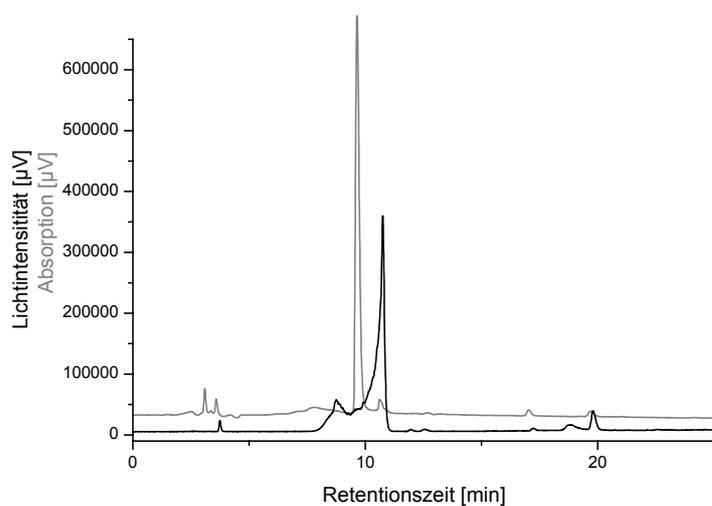
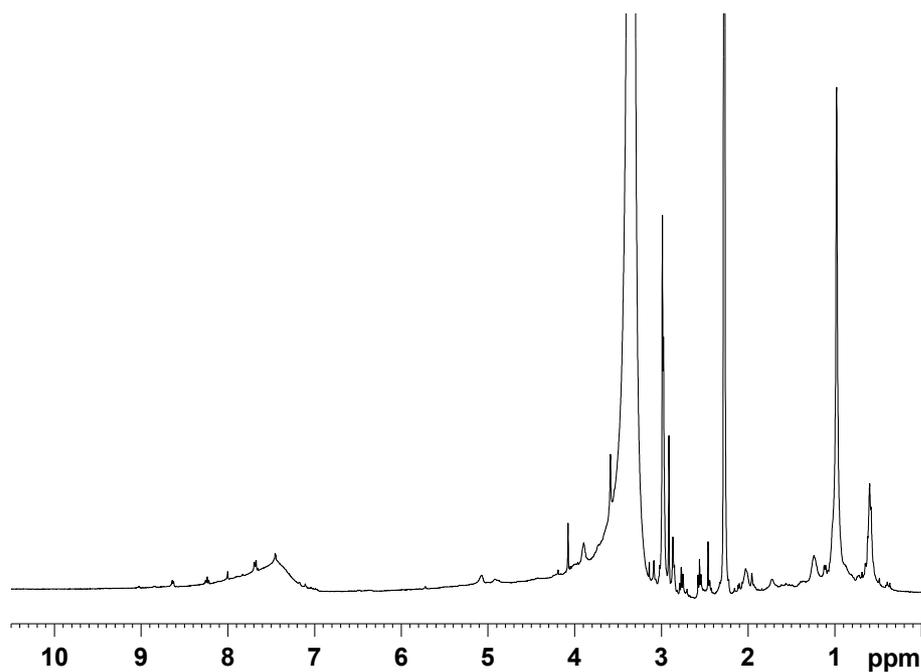


Wuchsform	Solitär.
Verbreitung	Irland, Irische See, Großbritannien, seltener aber an der Ostküste. West-Norwegen bis zum Mittelmeer und dem Schwarzen Meer.
Habitat/Substrat	Sublittoral bis 200 m Tiefe, an Überhängen und vertikalen Felswänden.
Morphologie	Körper 10 cm oder länger, Oberfläche glatt mit kleinen runden Schwellungen. Oraler Siphon kurz und terminal, Atrialsiphon $\frac{1}{2}$ des Körpers entfernt. Sehr häufig dicht mit Detritus, Algen und kleinen Epibionten besetzt. Tunika dick und knorpelig und durchscheinend rosa oder gräulich.
Bemerkungen	In der Tunika leben je nach Größe der Ascidie bis zu 60 Muscheln der Art <i>Modiolarca subpicta</i> (Abbildung siehe oben).

Ascidia mentula* Müller, 1776*Chemie****ja103**

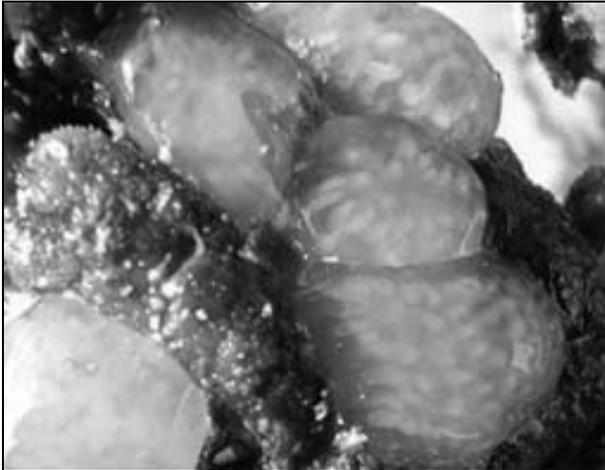
Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
30,86 g	8,70 g	0,4554 g	0,3927 g	0,6161 g	0,5755 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Aplidium punctum (Giard, 1873)

Biologie

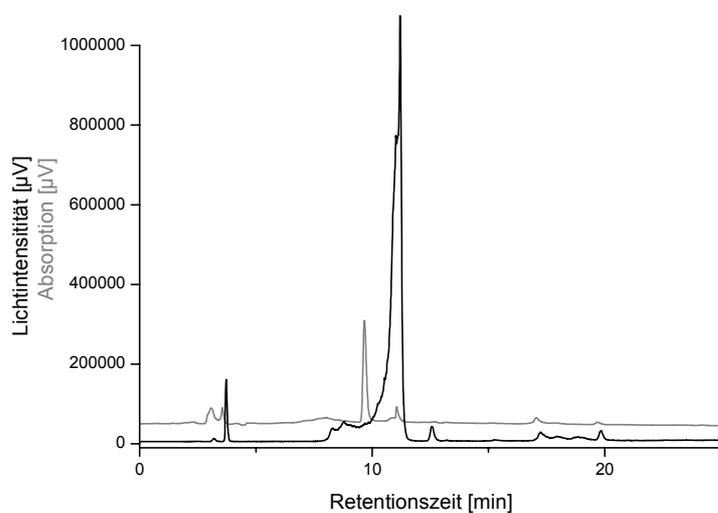
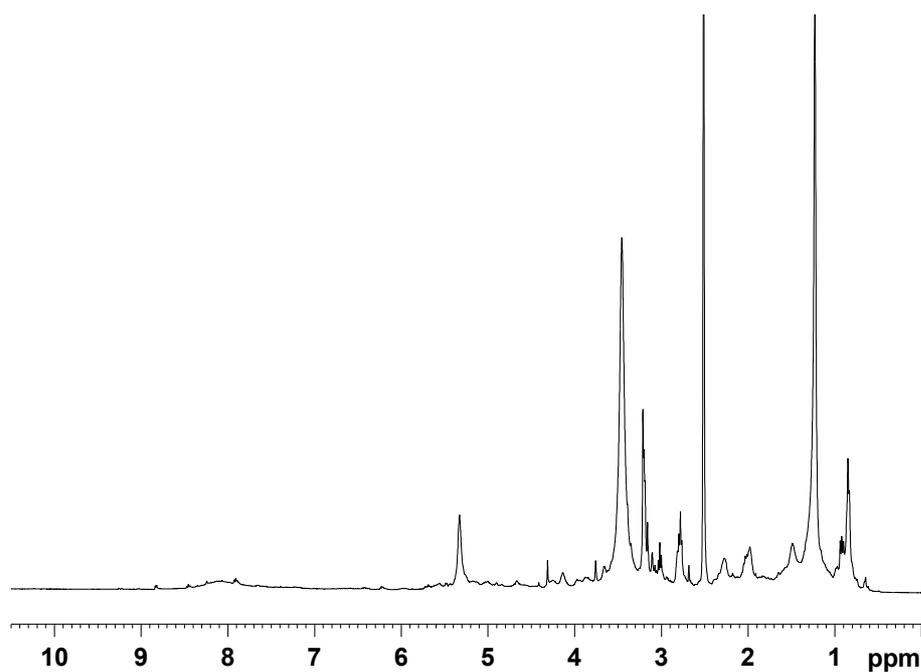


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Süd- und Westküste Großbritanniens.
Habitat/Substrat	Sehr verbreitet in Gebieten mit sehr viel Wasserbewegung, an vertikalen Felswänden, aber auch an Steinen und Muschelschalen. Untere Gezeitenzone bis 20 m Tiefe.
Morphologie	<p>Kolonien keulenförmig mit einem gut entwickelten Stiel und einem kugeligen Kopf. Kolonien untereinander an der Basis verbunden. Bis 4 cm Größe und 1 cm Durchmesser.</p> <p>Tunika transparent. Zooide länglich, anterior der Kiemendarm, darunter der Magen mit sechs Falten, langes Postabdomen, das in den Stiel hineinzieht. Farblos, grau oder hell orange. Apikal eine rote Pigmentierung.</p>
Bemerkungen	<p>Ähnlich <i>Sidnyum turbinatum</i>.</p> <p>Unterscheidungsmerkmale: 6 Oralloben, 6 Magenfalten.</p>

Aplidium punctum* (Giard, 1873)*Chemie****ja104/ja116**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
24,11 g	4,60 g	0,8150 g	0,2627 g	1,4679 g	1,5582 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

 ^1H -NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in $\text{DMSO-}d_6$.

Botrylloides leachi (Savigny, 1816), Mäander-Seescheide

Biologie

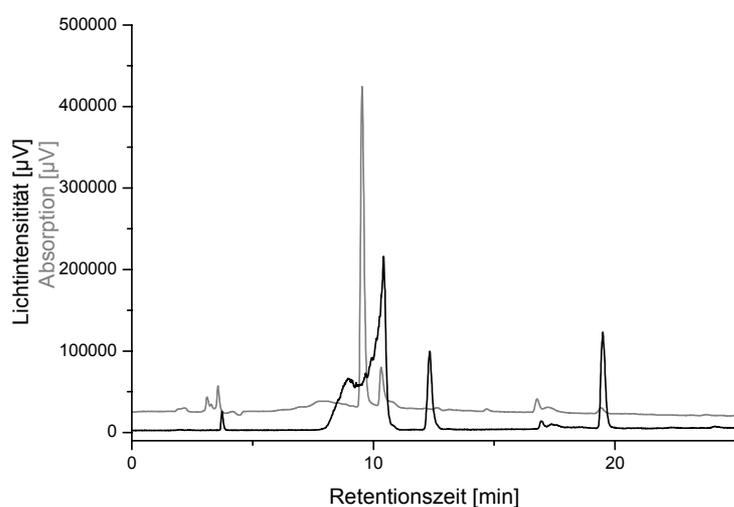
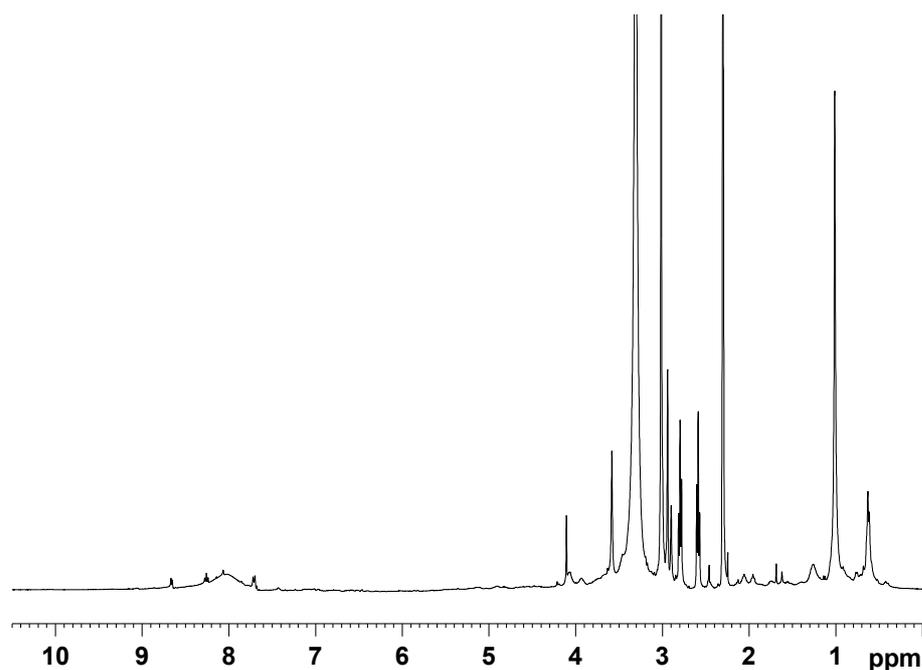


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Großbritannien, Nord-Norwegen bis Mittelmeer.
Habitat/Substrat	Weit verbreitet auf Algen, Steinen, Felswänden, anderen Ascidien in Gebieten mit größerer Wasserbewegung. Untere Gezeitenzone und Flachwasser, selten tiefer.
Morphologie	Kolonien flach, kompakt. Zooide in langen, mäandernden Reihen angeordnet, die durch die zahlreichen Einströmöffnungen getrennt werden. Wenige Ausströmöffnungen, wie bei Schwämmen. Kolonien 4 mm dick, bis zu 7 cm Durchmesser. Kolonien braun bis orange-rot oder gelblich.
Bemerkungen	Von <i>Botryllus schlosseri</i> durch die Anordnung der Individuen in Reihen und die Ausströmöffnungen zu unterscheiden.

Botrylloides leachi* (Savigny, 1816)*Chemie****ja105**

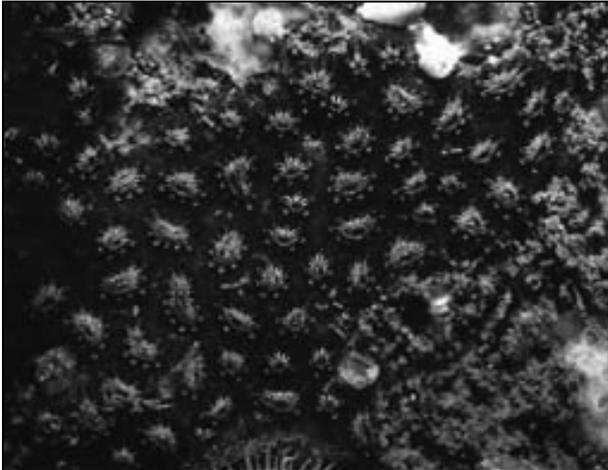
Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
51,03 g	14,97 g	1,4125 g	0,6186 g	1,9913 g	12,7446 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

***Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766), Sternascidie**

Biologie

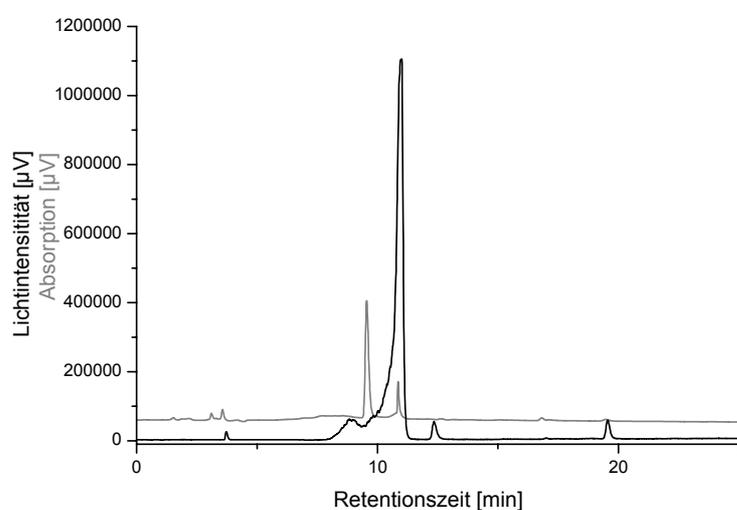
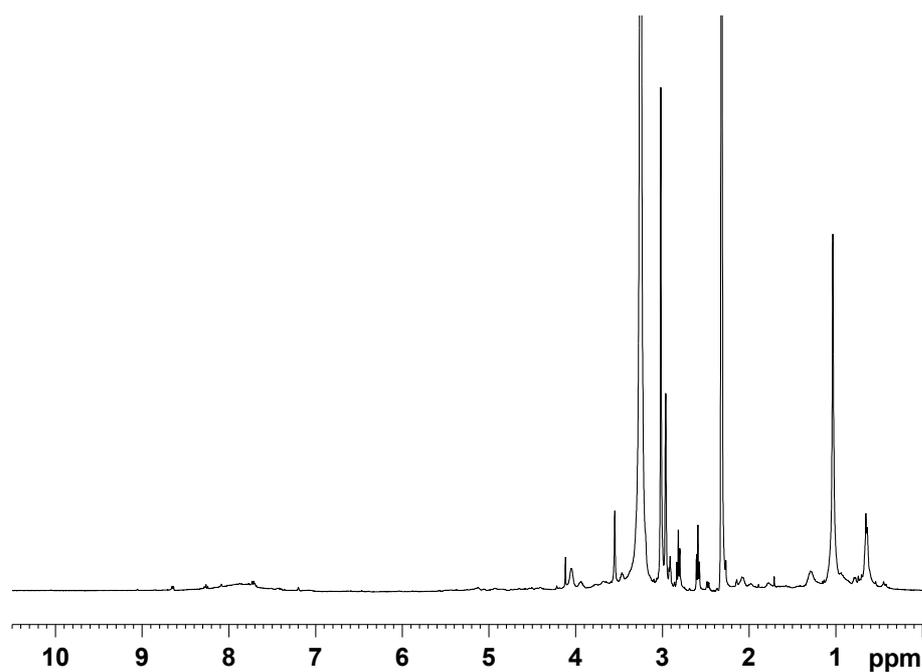


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Großbritannien, Nord-Norwegen bis Mittelmeer.
Habitat/Substrat	Weit verbreitet auf Algenstängeln, Steinen, Felswänden, anderen Ascidien in Gebieten mit starker Wasserbewegung. Untere Gezeitenzone und Flachwasser, selten auch bis zu über 100 m Tiefe.
Morphologie	Kolonien flach, kompakt oder als Traube an Algenenden. Zooide elliptisch, 6-12 Zooide in sternförmiger Anordnung um eine zentrale Ausströmöffnung. Kolonien 0,4 cm dick, bis zu 7 cm Durchmesser. Die Farbe der Kolonien variiert stark: braun, gelblich, grün.
Bemerkungen	Von <i>Botrylloides leachi</i> durch die sternförmige Anordnung der Individuen zu unterscheiden.

Botryllus schlosseri* (Savigny, 1816)*Chemie****ja106**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
3,32 g	1,35 g	0,0809 g	0,0668 g	0,2667 g	0,8697 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Corella parallelogramma (Müller, 1776), Gasmantelascidie

Biologie

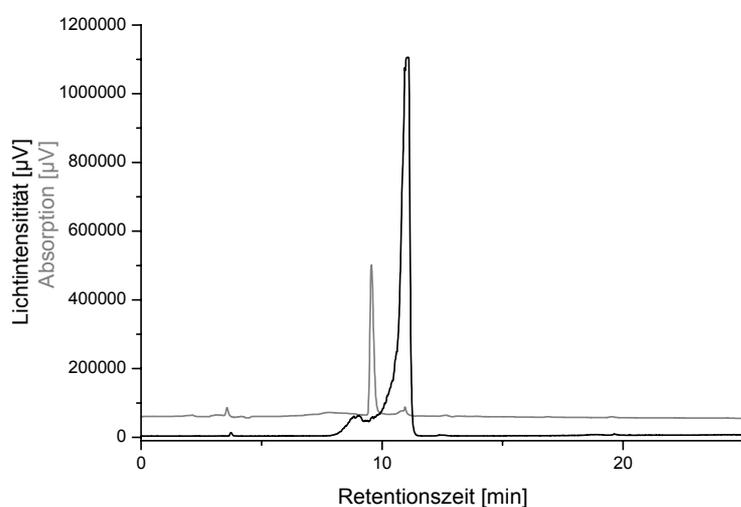
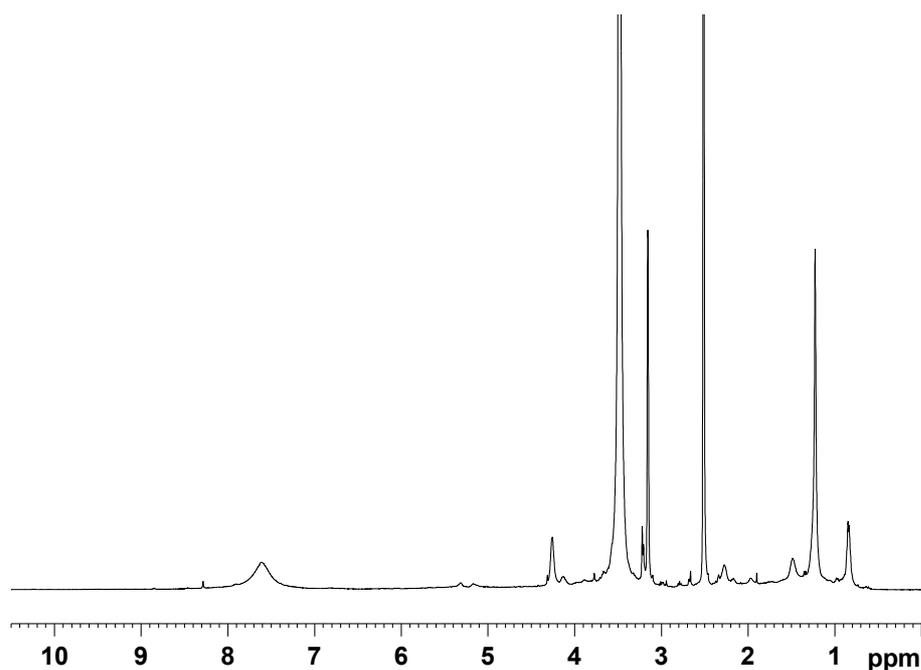


Wuchsform	Solitär.
Verbreitung	Großbritannien, Norwegen bis Mittelmeer.
Habitat/Substrat	In einer Vielzahl an Habitaten heimisch. Auf Steinen und Felsen auch in Gebieten mit starker Wasserbewegung und starker Strömung. Flachwasser bis 200 m Tiefe.
Morphologie	Körper seitlich betrachtet rechteckig, lateral abgeflacht. Beide Siphone kurz und \pm apikal. Bis 5 cm Größe und 2-3 cm Breite. Anheftung basal. Tunika dünn und durchsichtig. Der Branchialsack und der Darm sind gut zu erkennen. Branchialsack mit gelben oder roten schmalen, gitterförmigen Pigmentierungen.
Bemerkungen	An der durchsichtigen Tunika und der gitterförmigen Pigmentierung gut zu erkennen.

Corella parallelogramma* (Müller, 1776)*Chemie****ja107**

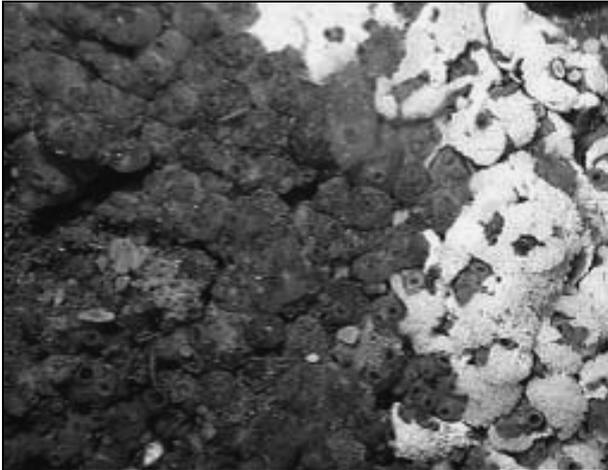
Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
9,53 g	2,27 g	0,1177 g	0,1298 g	0,8486 g	0,8498 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

***Dendrodoa grossularia* (van Beneden, 1846), Tangbeere**

Biologie

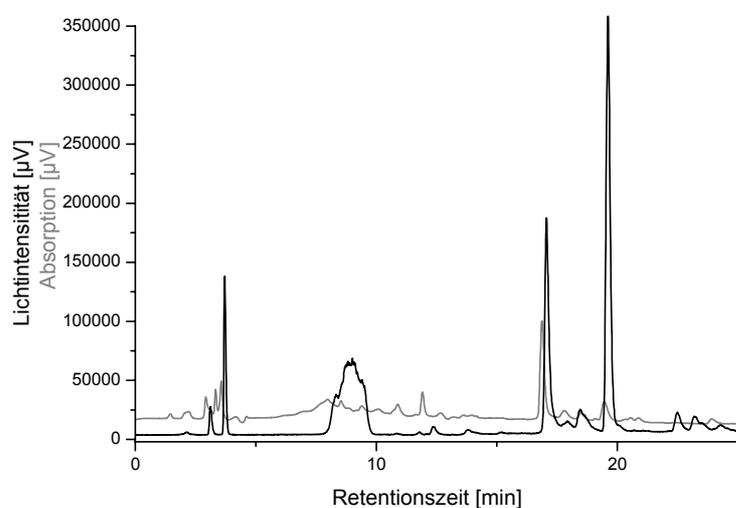
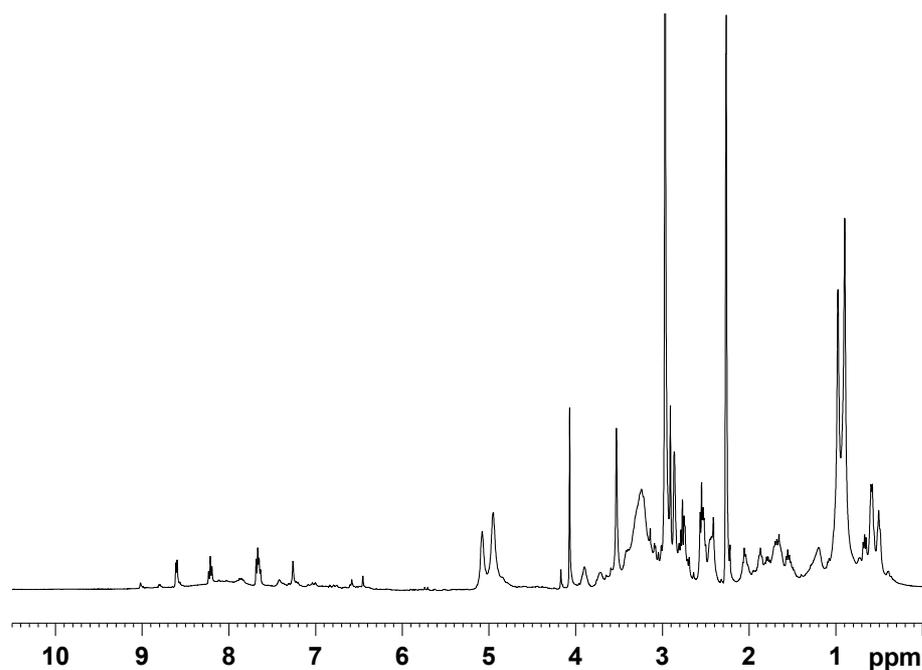


Wuchsform	Solitär, in dichten Aggregaten.
Verbreitung	Großbritannien, europäische Gewässer bis zur Arktis, auch an der Nordostküste Amerikas.
Habitat/Substrat	In einer Vielzahl an Habitaten heimisch. Häufig auf sehr exponierten Felsen, in Strömungskanälen, aber auch in geschützteren Bereichen. Unterer Gezeitenbereich bis zu 600 m Tiefe.
Morphologie	Individuen rundlich, beerenförmig, aber auch zylindrisch-länglich oder flach. Beide Siphone kurz und apikal mit runder Öffnung. Bis 2 cm Größe. Tunika dünn und fest. Rot bis orange rot gefärbt, in schluffigen Gebieten oft farblos oder braun bis schwärzlich.
Bemerkungen	Lebt in Assoziation mit dem Schwamm <i>Clathrina coriacea</i> .

Dendrodoa grossularia* (van Beneden, 1846)*Chemie****ja108, ja120**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
123,15 g	29,28 g	5,0576 g	4,5620 g	4,6925 g	16,0856 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Didemnum candidum Savigny, 1816, “White Sponge Tunicate”

Biologie

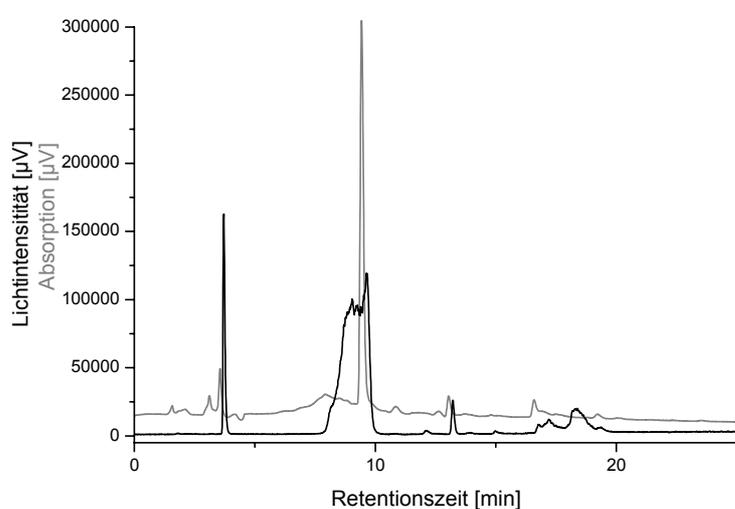
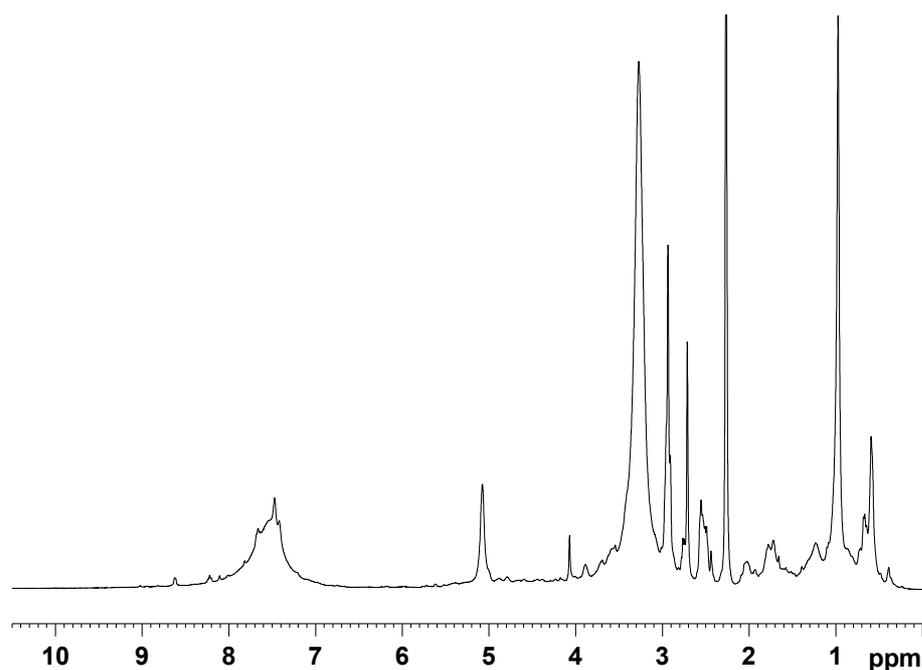


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	West- und Südküste Großbritannien, Nordsee und Mittelmeer bis zum Roten Meer und vermutlich andere warme Gewässer. In Hawaii als eingeschleppte Art geführt.
Habitat/Substrat	Hauptsächlich im Flachwasser, selten tiefer, geschützte Bereiche mit moderater Strömung. Auf jedem Hartsubstrat, Steinen, Felsen, aber auch an Algenstängeln und anderen lebenden Organismen.
Morphologie	Kolonien hart oder ledrig und krustenbildend, können Schwämme, Ascidien und Algen überwuchern. Weiß, grau oder violett und/oder mit schwarzen Linien gezeichnet. Mit weißen sternförmigen Nadeln. Zooide mit einem apikalen Branchialsack, folgenden inneren Organen und einer breiten Basis. Bis 1 mm groß. Kolonie entsprechend flach.
Bemerkungen	Die Kolonie kann als Blättchen vom Untergrund abgezogen werden.

Didemnum candidum* Savigny, 1816*Chemie****ja109, ja121**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
47,24 g	4,12 g	0,6865 g	0,2300 g	0,7834 g	2,1838 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

 ^1H -NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in $\text{DMSO-}d_6$.

***Polyclinum aurantium* Milne-Edwards, 1841**

Biologie

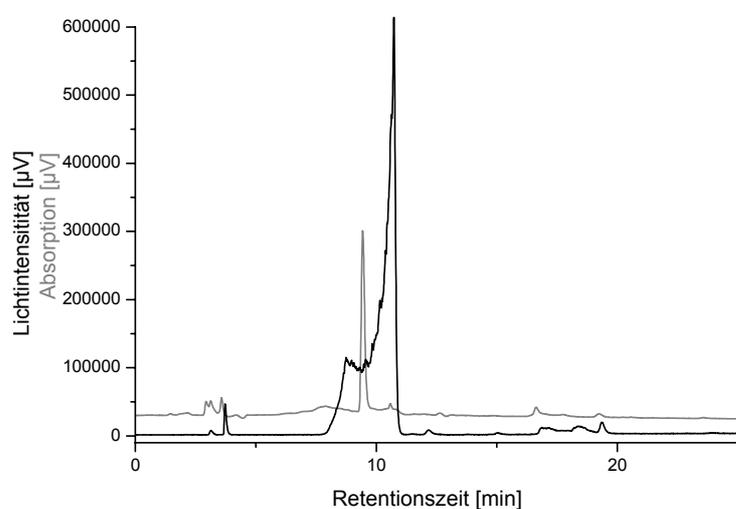
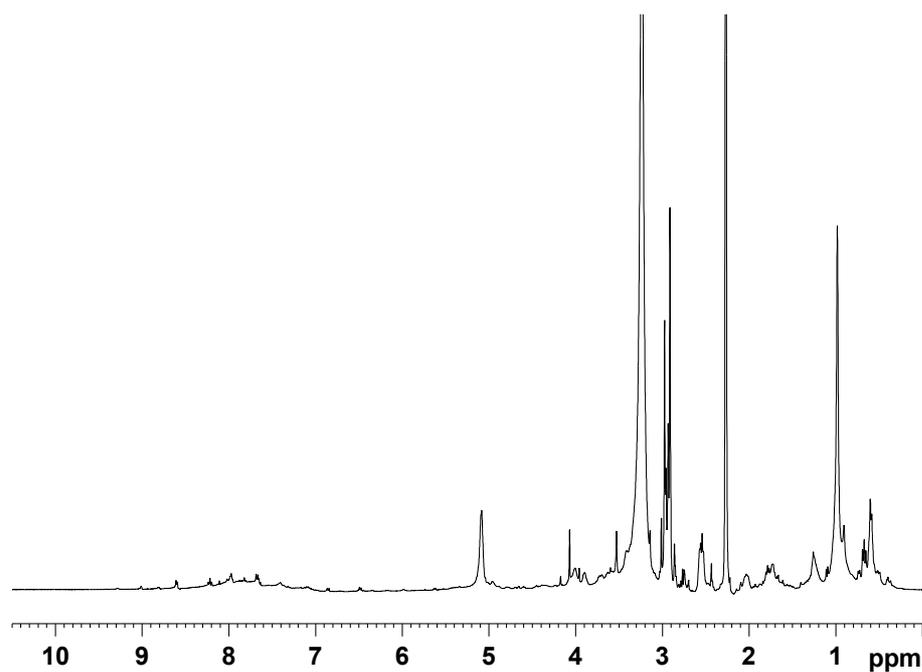


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Großbritannien, West-Norwegen bis Mittelmeer.
Habitat/Substrat	Sehr verbreitet in exponierten Gebieten mit starker Strömung oder Wellenschlag. Auf Algen, Tangstengeln, auch auf Felsen und anderem Hartsubstrat. Oberes Sublittoral bis 100 m Tiefe.
Morphologie	Kolonien bilden irreguläre Bällchen, die gräulich, schmutzig-gelb bis olivgrün gefärbt und oft mit Detritus und Sand besetzt sind. Zooide länglich, verstreut um eine gemeinsame Ausströmöffnung verteilt. Kolonien 10-15 mm Dicke und 20-50 mm Durchmesser.
Bemerkungen	Typische Wuchsform.

Polyclinum aurantium* Milne-Edwards, 1841*Chemie****ja110**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
54,12 g	17,96 g	1,8789 g	0,4396 g	2,4377 g	4,2688 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Sidnyum turbinatum Savigny, 1816

Biologie

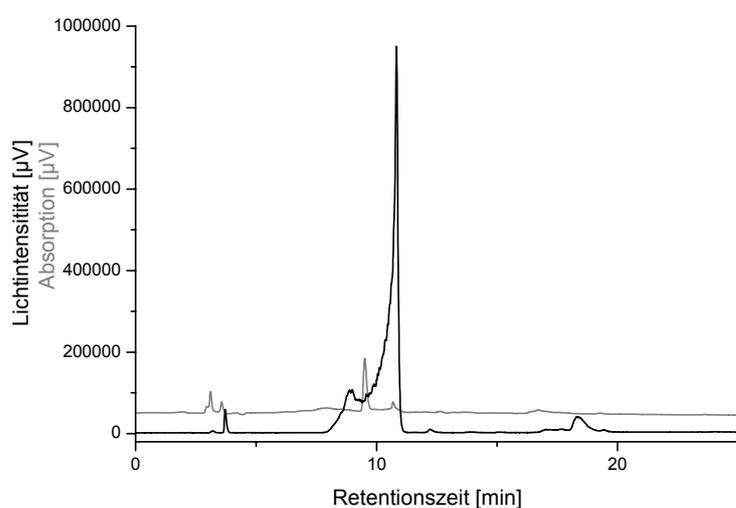
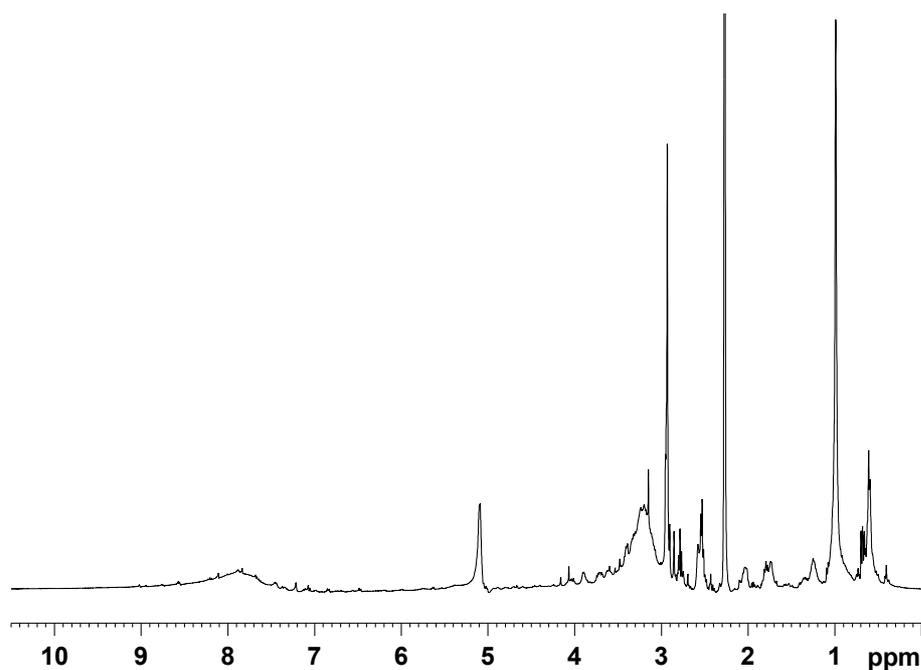


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Großbritannien, Norwegen bis Mittelmeer.
Habitat/Substrat	Entweder hauptsächlich in geschützten (Millar 1970) oder exponierten Gebieten (www.habitas.org), vermutlich aber in beiden. Auf Felswänden und Steinen. Untere Gezeitenzone bis 200 m Tiefe.
Morphologie	Kolonie aus keulenförmigen Köpfchen mit schmalen Stielen, die an der Basis miteinander verbunden sind. Jedes Köpfchen aus 6-12 Zooiden besitzt eine Ausströmöffnung. Zooide weiß gefärbt, mit orangener Pigmentierung an der Basis des oralen Siphons. Kolonien 10-20 mm groß und 5 mm im Durchmesser.
Bemerkungen	Ähnlich <i>Aplidium punctum</i> . Unterscheidungsmerkmale: 8 Oralloben, 10-15 Magenfalten. Weißer Kranz am oralen Siphon. Andere Polycliniden sind aber ähnlich.

Sidnyum turbinatum* Savigny, 1816*Chemie****ja111**

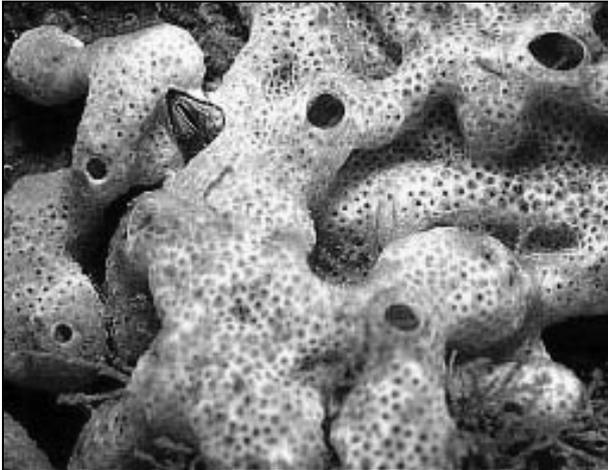
Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
24,26 g	9,32 g	0,9730 g	0,3834 g	1,3362 g	5,6774 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Trididemnum cereum (Giard, 1872)

Biologie

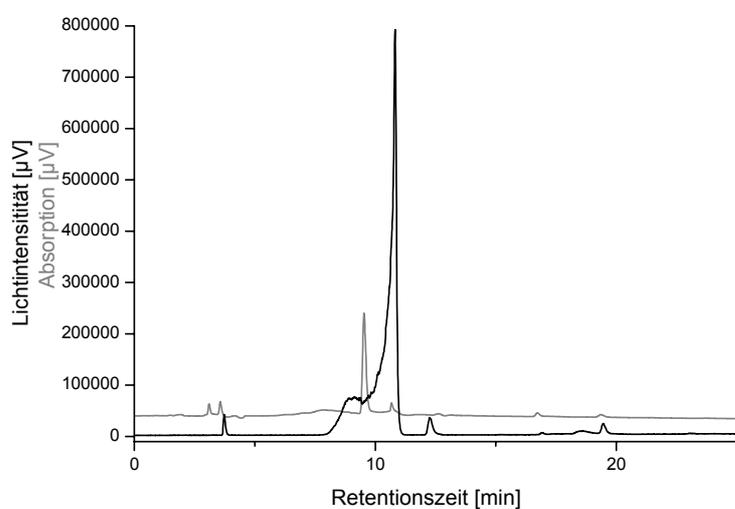
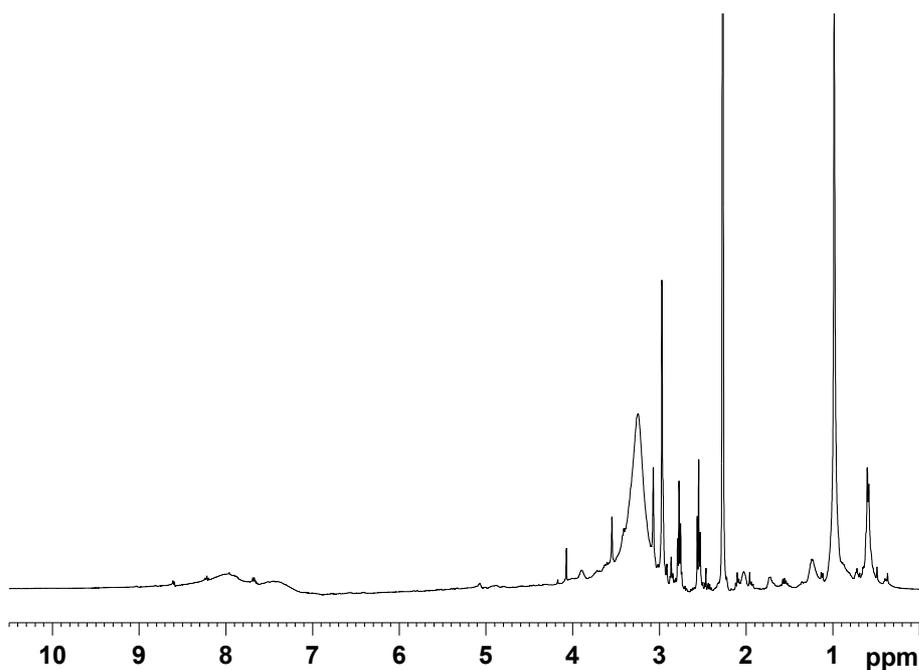


Wuchsform	Koloniebildend.
Verbreitung	Großbritannien.
Habitat/Substrat	Unterer Gezeitenbereich und Flachwasser. Bildet locker angeheftete Blättchen über anderen sessilen Organismen wie Bryozoen und Schwämme. Auch frei hängend über Felsabhängen.
Morphologie	Kolonien als flache Blättchen runzelig. Einströmöffnungen gleichmäßig, größere Ausströmöffnungen unregelmäßig über die Kolonie verteilt. Schmutzig-weiß oder beige. Kolonien 3 mm dick und bis zu 15 cm im Durchmesser.
Bemerkungen	Zooiden besitzen 3 Reihen Stigmata; andere Didemniden besitzen 4 Reihen.

Trididemnum cereum* (Giard, 1872)*Chemie****ja112**

Probenmenge, getrocknet	Ausbeute				
	Rohextrakt	<i>n</i> -Hexan	Essigester	<i>n</i> -Butanol	Wasser
26,94 g	8,81 g	0,8011 g	0,4746 g	1,7451 g	5,9825 g

HPLC-Chromatogramm (Diol-Säule), schwarz: Streulichtdetektion, grau: UV-Detektion.

¹H-NMR-Spektrum, 400 MHz, 16 scans, in DMSO-*d*₆.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger und am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven unter Leitung von Herrn PD Dr. Matthias Köck in der Zeit von Januar 2001 bis November 2004 angefertigt.

Die Arbeit wäre nicht das, was sie ist, wenn nicht folgende Menschen Interesse am ihrem Fort- und Ausgang gehabt hätten:

Herrn PD Dr. Matthias Köck danke ich für die Betreuung, die Bereitstellung des Themas, sein Interesse am Verlauf der Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen. Vielen Dank für die Möglichkeit, eigene Ideen in die Durchführung und Ausrichtung der Arbeit einbringen und Forschungsaufenthalte auf Helgoland und der FS *Heincke* durchführen zu können.

Ein großer Dank geht an Ellen Lichte für die Durchführung der zahlreichen HPLC-Analysen sowie ihre spontanen theoretischen und praktischen Hilfestellungen bei chromatographischen Problemen.

Heidi Zanker und Maren Lieneweg danke ich für die produktive und lustige Zeit nicht nur während der Forschungsaufenthalte auf Helgoland. Vielen Dank, Maren, für die gekonnten Berechnungen, wann immer welche anfielen, und für das offene Ohr bei Freud und Leid.

Sven Meyer und Achim Grube haben mir mit großer Geduld zur Seite gestanden, wenn chemische Probleme meinen Biologenhorizont zu sprengen drohten. Dank auch für die Messung diverser MS-Spektren und das Korrekturlesen der Arbeit.

Christian Volk verdanke ich viele feine Labortage und Abende und die Einführung in die chemische Laborpraxis, die mir zum sicheren Umgang mit den täglichen Gefahren dieser Arbeit verhalf. Michael Assmann danke ich für hilfreiche Diskussionen und Anleitungen, für nette Unterhaltungen sowie die Korrektur dieser Arbeit.

Florenz Sasse und Bettina Hinkelmann von der GBF in Braunschweig danke ich herzlich für die Durchführung der cytotoxischen Tests und die lehrreichen Tage in ihrem Labor, die mir diese Methodik näher gebracht haben. Ein Dank an die Mitarbeiter der BASF-AG für die Messung der MS-Spektren.

Gunnar Gerdts und Antje Wichels möchte ich für die wertvollen Ideen und die Unterstützung während der Aufenthalte auf Helgoland danken, ebenso wie Melanie Sapp für ihren tatkräftigen Einsatz bei der Auffindung aller Geräte. Vielen Dank an die Taucher Udo Schilling und Carsten Wanke sowie an Ralph Kuhlenkamp und Mario de Kluijver für ihren Einsatz im Namen der Ascidienforschung auf der *Heincke* und auf Helgoland. An Andreas Wagner und alle Mitarbeiter der Biologischen Anstalt Helgoland ein großes Dankeschön für die Aufnahme in die helgoländer Forschungswelt und die vielen großen und kleinen Hilfen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Griesinger für die schöne Zeit in Frankfurt sowie den Arbeitsgruppen-, Flur- und Institutskollegen des AWI für drei schöne Jahre Fishtown bedanken. Ebenso geht ein Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des AWI für all die Hilfen, ohne die ein wissenschaftliches Arbeiten gar nicht möglich wäre.

Ein besonderer Dank geht an Uli formerly known as Schneider, der trotz aller Umstände nie ganz die Hoffnung verlor, dass dieses Unternehmen in absehbarer Zeit ein ansehnliches Ende erreicht. Die Literaturliste wäre ohne seinen Einsatz bei der Paperbeschaffung weniger lang und die Arbeit ohne seine Kommentare und Anmerkungen weniger vollständig. Für seine Unterstützung und seinen Zuspruch möchte ich mich durch das Versprechen erkenntlich zeigen, dass dies zweifellos meine letzte Promotion war.