

# Untersuchungen zur chemischen Verteidigung der invasiven Grünalge *Caulerpa taxifolia*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Chemikerin (Umweltchemie) Verena Jung

geboren am 25. April 1974 in Kassel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dieter Klemm
2. Prof. Dr. Wilhelm Boland

Tag der öffentlichen Verteidigung: \_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Systematik der Algen und Pflanzen	1
1.2	Verteidigungsstrategien in Algen und Pflanzen	2
1.3	Die Gattung <i>Caulerpa</i>	5
1.4	Invasive und nicht-invasive <i>Caulerpa</i> -Arten aus dem Mittelmeer	7
1.4.1	<i>C. taxifolia</i>	7
1.4.2	<i>C. racemosa</i>	10
1.4.3	<i>C. prolifera</i>	11
1.5	Sekundärmetabolite in Bryopsidophyceae	12
1.5.1	Sekundärmetabolite der Gattung <i>Caulerpa</i>	12
1.6	Biologische Aktivität von Aldehyden	15
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
3.1	Kultivierung von <i>Caulerpa</i> spp.	20
3.2	Caulerpeninaufreinigung zur Gewinnung eines Standards	21
3.3	Vorgänge in <i>C. taxifolia</i> nach Verwundung	22
3.4	Optimierte Extraktions- und Detektionsmethoden zum Nachweis von Caulerpeninfolgeprodukten	24
3.4.1	Entwicklung einer Extraktionsmethode	24
3.4.2	Entwicklung einer NP-HPLC-Methode	25
3.4.3	Evaluation unterschiedlicher Extraktionsmethoden	26
3.5	Verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung in <i>C. taxifolia</i>	27
3.5.1	Derivatisierung der labilen Caulerpeninfolgeprodukte	32
3.5.2	Derivatisierung von Caulerpeninfolgeprodukten in verwundeten Algen	38
3.5.3	Nachweis der enzymatischen Deacetylierung	39
3.5.4	Kompartimentierung von Enzym und Substrat in der Alge	42
3.5.5	Zusammenfassende Betrachtung der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in <i>C. taxifolia</i>	45
3.6	Rolle der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in der Verteidigung von <i>C. taxifolia</i>	46
3.7	Vergleichende Studie invasiver und nicht-invasiver <i>Caulerpa</i> -Arten	48

<b>3.8 Wundverschlussreaktion in <i>C. taxifolia</i></b>	<b>52</b>
3.8.1 Massenspektrometrische Untersuchung des Wundverschlusses	57
3.8.2 Gelelektrophoretische Untersuchung der Proteine im Wundverschluss	57
3.8.3 Entwicklung eines Modellsystems zur mechanistischen Untersuchung von Dialdehyd-Protein-Wechselwirkungen	63
3.8.4 Caulerpenin als Esteraseinhibitor	64
3.8.5 Untersuchung zum Inhibierungsmechanismus	67
3.8.6 Zusammenfassende Betrachtung der Quervernetzungs- und Wund verschlussreaktionen	68
<b>3.9 Untersuchungen zur Biosynthese von Terpenen in <i>C. taxifolia</i></b>	<b>69</b>
3.9.1 Versuche zur Aufklärung der frühen Schritte der Caulerpeninbiosynthese	70
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>74</b>
<b>5 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>6 Experimenteller Teil</b>	<b>79</b>
<b>6.1 Materialien und Geräte</b>	<b>79</b>
6.1.1 Versuche zur Aufklärung der frühen Schritte der Caulerpeninbiosynthese	79
6.1.2 Massenspektrometrie (MS)	79
6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	79
6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)	79
6.1.3 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)	80
6.1.4 Säulenchromatographie	80
<b>6.2 Methoden</b>	<b>80</b>
6.2.1 Haltung der Algen	80
6.2.1.1 Herstellung von künstlichem Seewasser	80
6.2.1.2 Herstellung von Seewasser nach Maier	81
6.2.1.3 Kultivierung von <i>Caulerpa taxifolia</i>	82
6.2.1.4 Haltung von <i>Caulerpa taxifolia</i> , <i>Caulerpa racemosa</i> und <i>Caulerpa prolifera</i>	82
6.2.1.5 Kultivierung der unialgalen <i>C. taxifolia</i> Kultur	83
6.2.2 Extraktion von Caulerpenin aus <i>C. taxifolia</i> :	83
6.2.3 Aufreinigung von Caulerpenin aus:	84
6.2.4 Untersuchung verwundeter <i>C. taxifolia</i> mit RP-HPLC-UV	84
6.2.5 Quantifizierung von Caulerpenin:	85
6.2.6 Bestimmung des Extraktionserfolges unterschiedlicher Extraktionsmethoden	86
6.2.7 Nachweis von Oxytoxin 2 (41) in verwundeten <i>C. prolifera</i>	89

6.2.8 Herstellung des semisynthetischen Hydrazonstandards	90
6.2.8.1 Derivatisierung der Algenextrakte mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	91
6.2.9 Enzymatische Umwandlung von Farnesyl- und Geranylacetat durch Algen	91
6.2.10 Umsetzungen mit Esterasen	92
6.2.11 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	92
6.2.11.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	94
6.2.11.2 Vorbereitung der Proteinproben aus CLE	95
6.2.12 Markierungsexperimente zur Terpenbiosynthese in <i>C. taxifolia</i>	96
6.2.13 Herstellung der Zweikomponenten Diät	98
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>Anhang</b>	<b>111</b>

# 1 Einleitung

Das Überleben von sessilen Organismen, wie Pflanzen und Algen, wird direkter als bei Tieren durch ihre unmittelbare Umgebung bestimmt. Da durch ihren festen Standort ihr Aktionsradius eingeschränkt ist, müssen sie sich den dort herrschenden Bedingungen anpassen.

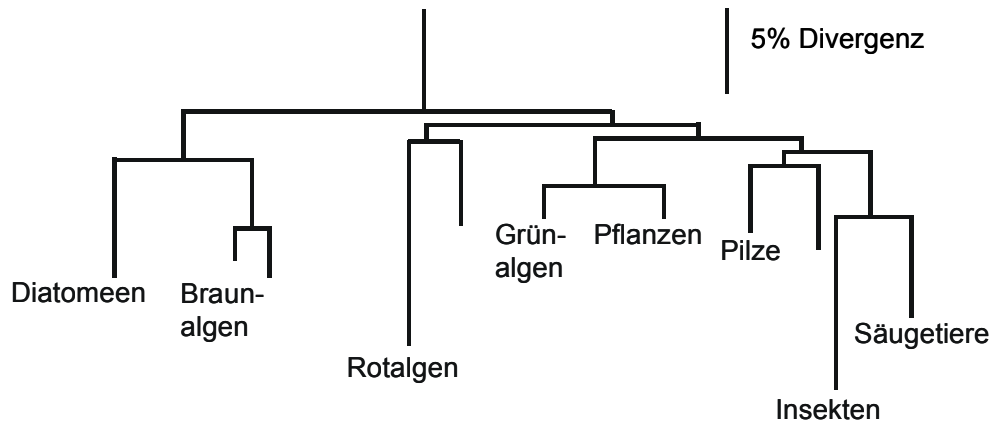
Sessile Lebewesen besitzen keine Möglichkeit zur Flucht. Aus diesem Grund sind sie auf eine effektive Verteidigung angewiesen. Im Verlauf der Evolution haben sie daher vielfältige Mechanismen zur Abwehr von Mikro- und Makroorganismen entwickelt. Durch eine physikalische Barriere in Form von Stacheln und Dornen oder die Verstärkung des äußeren Gewebes können Pflanzen für Fraßfeinde unkonsumierbar werden. Allgemein muss eine Abwehr erfolgen, bevor die Abnahme der Biomasse durch Fraß die Biomasseproduktion überwiegt und dem Organismus ein irreversibler Schaden zugefügt wird. Viele Pflanzen nutzen daher auch eine chemische Verteidigung, die auf dem Einsatz von Verbindungen beruht, die entweder toxisch oder abschreckend auf Angreifer wirken. Diese Substanzen gehen aus dem Sekundärstoffwechsel hervor und werden deshalb Sekundärmetabolite genannt.

Mechanische und chemische Verteidigung können dabei nicht nur in terrestrischen Pflanzen, sondern auch in aquatischen Pflanzen nachgewiesen werden. Obwohl die Lebensräume unterschiedlich sind, sind die Faktoren, die das Leben der höheren Pflanzen und der Algen limitieren oft ähnlich.

## 1.1 Systematik der Algen und Pflanzen

Algen sind einfach gebaute, so genannte niedere Pflanzen, die an das Leben im Wasser angepasst sind. Dieser Oberbegriff umfasst eine Reihe in sich weitgehend einheitlicher, untereinander aber sehr verschiedener Gruppen autotropher Organismen.

Die Einteilung der Algen erfolgt nach unterschiedlichen biochemischen Merkmalen in die Abteilungen der Rot-, Braun-, Kiesel- und Grünalgen. Mit Ausnahme der Grünalgen haben sich die Algen schon sehr früh im Lauf der Evolution unabhängig von terrestrischen Pflanzen entwickelt, was ein Vergleich des Verwandtschaftsgrads anschaulich zeigt (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Durch 18S-rRNA Analyse ermittelter Verwandtschaftsgrad ausgewählter Abteilungen nach Mc Fadden *et al.*<sup>[1]</sup>

## 1.2 Verteidigungsstrategien in Algen und Pflanzen

Während im terrestrischen Bereich sehr viel über pflanzliche Sekundärmetabolite und ihre Wirkungsweise in der chemischen Verteidigung gegen Herbivore und Pathogene bekannt ist, beginnen wir erst jetzt Verteidigungsstrategien in Algen genauer zu verstehen. Dabei kann die Verteidigung in Analogie zur chemischen Verteidigung in terrestrischen Pflanzen ablaufen, jedoch sind aufgrund der evolutiv schon sehr früh getrennten Entwicklung und der unterschiedlichen Lebensräume, auch neue Strategien denkbar.

Die chemische Verteidigung in höheren Pflanzen und Algen kann allgemein in statische und dynamische Verteidigungsprozesse unterteilt werden. Bei der konstitutiven Verteidigung handelt es sich um eine statische Verteidigung, bei der die Verteidigungsmetabolite permanent produziert oder gespeichert werden. Die permanente Verfügbarkeit der Abwehrstoffe bietet jedoch nicht nur Schutz, sondern bedeutet auch einen hohen stoffwechsel-physiologischen Aufwand der zu Lasten von Wachstum, Fortpflanzung und allgemeiner Fitness geht.<sup>[2]</sup> Außerdem besteht bei einer Anreicherung eines toxischen Metaboliten im Gewebe die Gefahr einer Selbstvergiftung. Das größte Problem bei dieser Art der Verteidigung stellt jedoch die Resistenzbildung der Angreifer dar. So gibt es, bedingt durch die gleich bleibende Zusammensetzung und den konstanten Gehalt der Verteidigungsmetabolite in den Pflanzen und Algen, mittlerweile eine Vielzahl von Herbivoren und Pathogenen, die in der Lage sind diese Verteidigungsmechanismen zu umgehen. Umfangreiche Studien haben gezeigt, dass eine solche Anpassung von einer Detoxifizierung der Verteidigungsmetabolite bis hin zu Veränderungen im Fraßverhalten der Angreifer reichen kann.<sup>[2]</sup>

Bei der induzierten Verteidigung, die einen dynamischen Verteidigungsprozess darstellt, werden diese Nachteile dadurch umgangen, dass die Verteidigungsmetabolite erst als

Antwort auf Veränderungen im Umfeld der Pflanzen und Algen, also nur im Bedarfsfall gebildet werden.<sup>[3]</sup>

Einen Spezialfall stellt die aktivierte chemische Verteidigung dar, die zwischen den beiden oben genannten Verteidigungsformen steht. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass ein vergleichsweise inaktiver Metabolit bei einer Verwundung oder Verletzung des Gewebes in einen toxischen umgewandelt wird. Diese Verteidigungsstrategie nutzt damit einige Vorteile der beiden vorhergehenden. Die inaktive Form des Verteidigungsmetaboliten kann ohne das Risiko der Selbstvergiftung gespeichert werden und wird im Bedarfsfall sehr schnell in die aktive Form überführt.

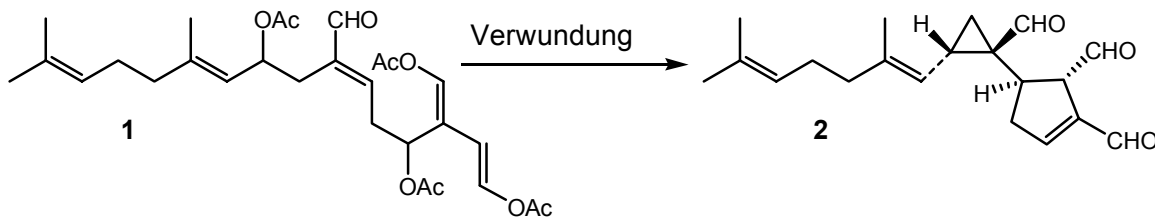
Während diese Mechanismen in der Verteidigung von terrestrischen Pflanzen sehr gut untersucht sind, steht das Wissen über Verteidigungsstrategien in Algen noch immer am Anfang. Denn obwohl mittlerweile eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Sekundärmetabolite nachgewiesen wurde, die im Labor an ausgesuchten Testorganismen biologische Aktivität zeigten, gibt es nur wenige Studien zu dynamischen Verteidigungsstrategien.

Aus diesem Grund wurde lange Zeit angenommen, dass Algen sich ausschließlich konstitutiv verteidigen. Dass dazu nicht immer strukturell aufwendige Sekundärmetabolite notwendig sind, zeigt das Beispiel einiger Braunalgen der Gattung *Desmarestia*. Sie sind in der Lage Schwefelsäure in spezialisierten Vakuolen zu speichern, die sie nachweislich vor Fraß durch Herbivore wie Seeigel schützt.<sup>[4]</sup>

Erst in den letzten Jahren erschienen erste Berichte über dynamische Verteidigungsstrategien in aquatischen Systemen.<sup>[5]</sup> Das erste gut untersuchte Beispiel für eine induzierte Verteidigung findet sich in der Rotalge *Chondrus crispus*. In ihrem Lebenszyklus durchläuft die Rotalge Entwicklungsstadien, in denen sie unterschiedlich auf die parasitische Grünalge *Acrochaete operculata* reagiert. Tritt die Infektion durch die Grünalge in der gametophytischen Phase auf, so ist die Rotalge in der Lage, die Grünalge zu erkennen und wirkungsvoll zu bekämpfen. Erfolgt der Befall in der sporophytischen Entwicklungsphase kommt es zu einer Penetration der Rotalgenzellwand und zu einer Parasitierung, also einer vollständigen Entwicklung der Grünalge in der Rotalge. Ebenfalls aufgeklärt ist mittlerweile der Verteidigungsmechanismus. Die Grünalge setzt in Gegenwart der gametophytischen Oligokarragenane aus *C. crispus* die Aminosäure L-Asparagin frei, die von der Rotalge durch eine Aminosäureoxidase zu  $H_2O_2$ ,  $NH_3$  und der korrespondierenden  $\alpha$ -Ketosäure des Asparagins umgesetzt wird. Durch  $H_2O_2$  wird die Grünalge abgetötet und die Parasitierung verhindert. Die Rotalge reagiert dabei ganz spezifisch ausschließlich auf die Aminosäure L-Asparagin und nutzt damit das Signal des Angreifers für die eigene Verteidigung.<sup>[6]</sup>



Der erste Nachweis einer aktivierten Verteidigung in Algen gelang Paul und Van Alstyne 1992. Bei der Untersuchung einiger *Halimeda*-Arten konnten sie nachweisen, dass diese bei Verwundung ihren für Fraßfeinde vergleichsweise harmlosen Sekundärmetabolit Halimedatetraacetat (**1**), vermutlich enzymatisch in den fraßhemmenden Metaboliten Halimedatrial (**2**) umwandeln (Abb. 2).<sup>[7]</sup>



**Abbildung 2:** Nach Verwundung wird das gespeicherte Halimedatetraacetat (**1**) in *Halimeda* spp. vermutlich enzymatisch in das fraßhemmende Halimedatrial (**2**) umgewandelt.

Beispiele für dynamische Verteidigungsstrategien finden sich nicht nur in Makro-, sondern auch in Mikroalgen wie z.B. Diatomeen<sup>I</sup>. Diese stehen als wichtigster Bestandteil des Phytoplanktons an unterster Stelle der marinen Nahrungskette. Sie dienen dem Zooplankton als Nahrung und werden allgemein als gute Nährstoffquelle angesehen. Im Widerspruch hierzu stehen Beobachtungen über eine Herabsetzung des Fortpflanzungserfolges von Copepoden<sup>II</sup>, die eintritt, wenn sie auf einer Diatomeenreichen Diät der Arten *Thalassiosira rotula* oder *Skeletonema costatum* fressen. Verantwortlich für die toxischen Effekte sind dabei ungesättigte Aldehyde, die aus den verwundeten Diatomeen freigesetzt werden.<sup>[8], [9]</sup> Diese Aldehyde inhibieren in Konzentrationen von einigen Milligramm pro Liter die Zellteilung von Copepodeneiern wobei noch nicht vollständig geklärt ist, wie diese hohen lokalen Konzentrationen erreicht werden. Als Möglichkeiten wird die Freisetzung im Verdauungstrakt oder in der Nähe der Krebse diskutiert.

Diese Beispiele zeigen, dass auch Algen eine Vielzahl unterschiedlicher Verteidigungsstrategien und verschiedenste Verteidigungsmetabolite nutzen, um sich gegen Angreifer in Form von Herbivoren oder Pathogenen zur Wehr zu setzen. Im Unterschied zu den terrestrischen Systemen stellen die Beispiele zu den dynamischen Verteidigungstrategien in aquatischen Systemen noch immer Einzelfälle dar. Wie bereits erwähnt, liegen noch keine umfassenden systematischen Studien zu der Verteidigung in aquatischen Systemen vor. Eine Ausnahme bildet eine Arbeit von Cetrulo und Hay aus dem Jahr 2000<sup>[10]</sup>, in der Algen aus tropischen und gemäßigten Regionen hinsichtlich ihrer Sekundärmetabolit Zusammensetzung vor und nach einer Verwundung deskriptiv verglichen

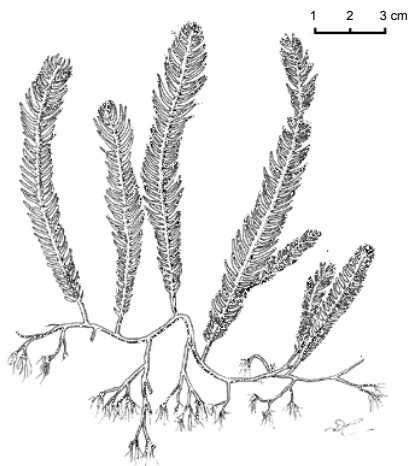
<sup>I</sup> Kieselalgen

<sup>II</sup> Ruderfußkrebse

wurden. Um Veränderungen und damit dynamische Verteidigungsreaktionen nachweisen zu können, wurden Extrakte der Algen dünnschichtchromatographisch getrennt und ihre Metabolitzusammensetzungen qualitativ verglichen. In 14 der untersuchten 42 Algen konnten signifikante Veränderungen nachgewiesen werden. In parallel dazu durchgeführten Fraßversuchen beobachteten sie in sechs der 42 untersuchten Arten erhöhte Verteidigungspotentiale nach einer Verwundung.

### 1.3 Die Gattung *Caulerpa*

Die Unterabteilung der Chlorophyta<sup>III</sup> weist die engste Verwandtschaft der Algen mit den höheren Pflanzen auf. Diese Abteilung enthält rund 500 Gattungen und etwa 8000 Arten, die sowohl in Süß-, Brack- und Salzwasser als auch terrestrisch leben.<sup>[11]</sup> Zu der ausschließlich marin vorkommenden Klasse der Bryopsidophyceae gehören alle 60 *Caulerpa* Arten<sup>IV</sup> (Abb. 3).



**Abteilung:** Chlorophyta

**Klasse:** Bryopsidophyceae

**Ordnung:** Halimedales

**Gattung:** *Caulerpa*

**Art:** *taxifolia*

**Abbildung 3:** Links: Zeichnung *C. taxifolia* (Quelle: D. Chiaverini, LEML-UNSA,1996), Rechts: Klassifizierung von *C. taxifolia*.

Sie kommen in tropischen und subtropischen Meeren vor und sind die größten Grünalgen, denn sie weisen fast unbegrenztes Thalluswachstum auf.

Ein besonderes Merkmal ist ihr siphonales Organisationsniveau. Jedes Individuum besteht aus einer einzigen polyploiden<sup>V</sup> Riesenzelle. Im Inneren der schlauchförmigen Zelle wird eine große zentrale Vakuole von einer dünnen Schicht Cytoplasma umgeben, in dem sich die

<sup>III</sup> Grünalgen

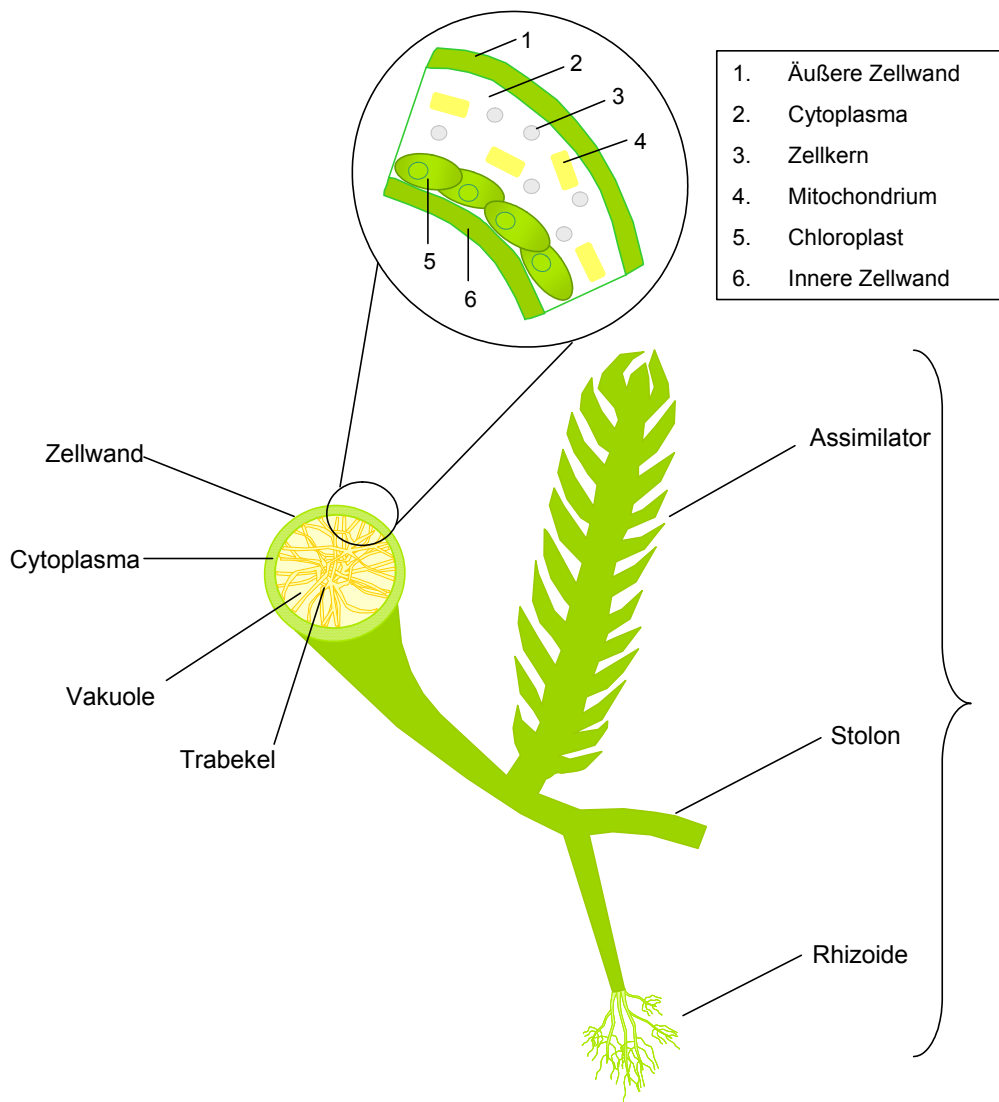
<sup>IV</sup> griechisch Caulos = Stamm, herpo = kriechen

<sup>V</sup> vielkernig

Zellkerne und Organellen befinden (Abb. 4). Um die Stabilität der Zellwand zu erhöhen und der Alge zusätzlichen Halt zu geben, sind die Innenseiten der Zellwände mit bis zu 850 Zellwandausstülpungen pro  $\text{mm}^2$ , so genannter Trabekel, quervernetzt. Diese morphologische Besonderheit gibt der Alge ihre Form.<sup>[12]</sup>

Obwohl es sich um eine einzige Zelle handelt, lässt sich der Thallus in drei funktionelle Abschnitte unterteilen (Abb. 4):

- der Stolon, ein kriechender, schlauchförmiger Hauptstamm.
- die Assimilatoren oder Phylloide, von der Oberseite des Stolons abzweigende „Blätter“, deren unterschiedliche Formen charakteristisch für die verschiedenen Arten sind.
- die Rhizoide, haarfeine, pigmentlose Haftorgane, den Wurzeln der terrestrischen Pflanzen vergleichbar, die die Alge im Substrat verankern.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung von *C. taxifolia* mit Querschnitt durch den Stolon. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Zusammensetzung des Cytoplasmas.

## 1.4 Invasive und nicht-invasive *Caulerpa*-Arten aus dem Mittelmeer

Ein Organismus, der in eine Umgebung außerhalb seines natürlichen Habitats freigesetzt wird, kann große Auswirkungen auf die Flora und Fauna in dieser Region haben. Besonders kritisch wird die Situation, wenn es sich um eine invasive Spezies handelt. Eine eingeschleppte Spezies wird im marinen Bereich als invasiv angesehen, wenn sie die folgenden Merkmale erfüllt<sup>[13]</sup>:

- Ansprüche an den Lebensraum sind sehr flexibel
- hohe Toleranz gegenüber Umweltveränderungen und -extremen
- keine natürlichen Feinde und Krankheiten
- vegetative Reproduktion überwiegt die geschlechtliche oder ist die einzig fruchtbare

Eine solche invasive Spezies, die sich mit großen ökologischen Auswirkungen im Mittelmeer verbreitet, ist *C. taxifolia*.

### 1.4.1 *C. taxifolia*<sup>VI</sup>

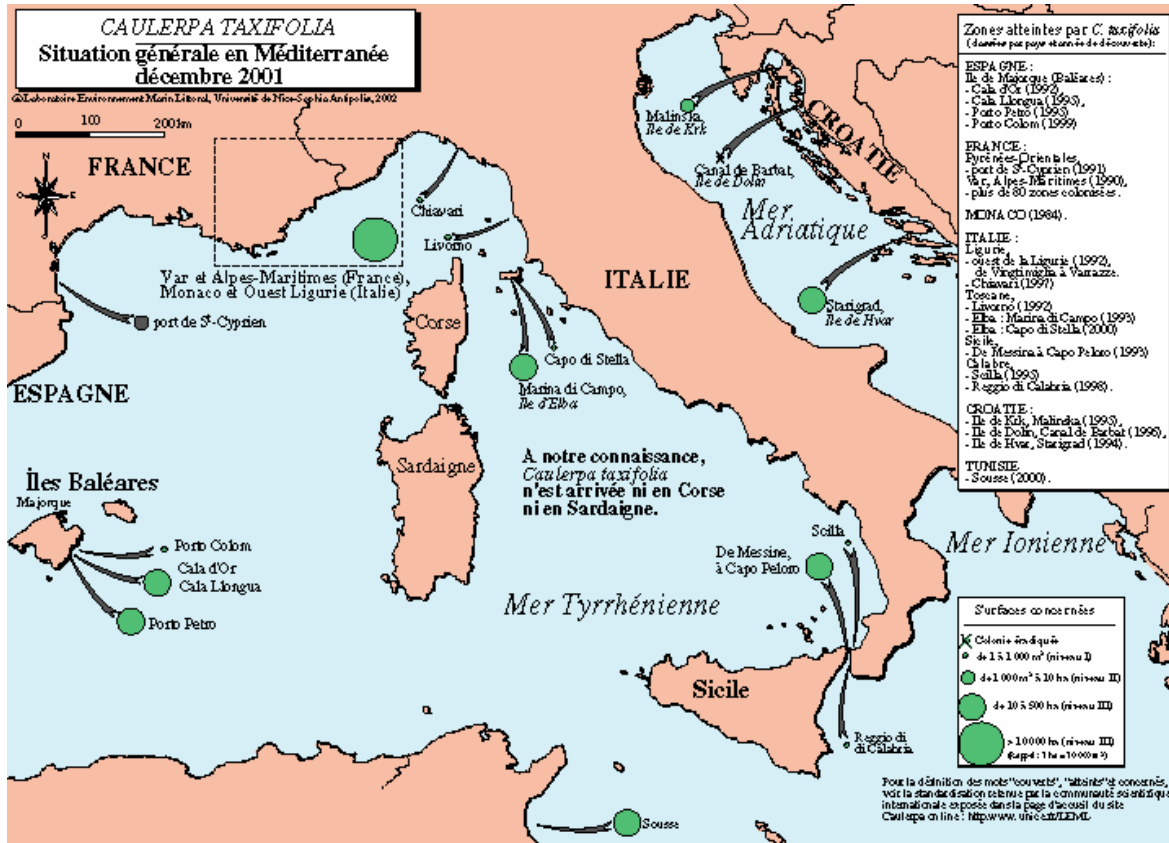
Die 1984 vor der Küste Monacos entdeckte, ursprünglich in den Tropen beheimatete Grünalge *C. taxifolia* (Abb. 5) breitet sich seit ihrer Entdeckung mit exponentiellem Wachstum aus. Die im Jahre 1984 entdeckte besiedelte Fläche betrug 1m<sup>2</sup>, 1990 waren schon 3 ha von der Alge bewachsen, 1993 wurden 1000-2000 ha gemessen und das Wachstum setzt sich bis heute ungebremst fort (Abb. 6).<sup>[14]</sup> Die Herkunft dieser Population wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Eine Herkunftstheorie besagt, dass es sich bei dieser Alge um eine Mutante von *C. mexicana* handelt, die aus dem Roten Meer über den Suez Kanal in das Mittelmeer gelangt ist.<sup>[15]</sup> Die andere Theorie vermutete die Einschleppung durch das Abwasser des Ozeanographischen Instituts Monaco. Bei Reinigungsarbeiten an den Aquarien könnten Bruchstücke oder ganze Algen in das Meer gelangt sein und sich dort angesiedelt haben.<sup>[16]</sup> Erst kürzlich konnte in drei unabhängig voneinander durchgeführten vergleichenden genetischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei der Mittelmeer Population um einen Stamm der Alge handelt, der seit 1970 als Zierpflanze in Aquarien eingesetzt wird und aus dem australischen Raum stammt.<sup>[17], [18], [19]</sup> Der Weg der



Abbildung 5: *Caulerpa taxifolia*

<sup>VI</sup> *taxifolia* = eibenblättrig

Mittelmeer *C. taxifolia* lässt sich so von tropischen Gewässern (Australien), über die erfolgreiche Kultivierung im Zoologisch-Botanischen Garten Stuttgart bis in die Aquarien des Ozeanographischen Institutes in Monaco zurückverfolgen.



**Abbildung 6:** Ausbreitung der invasiven Grünalge *C. taxifolia* im Mittelmeer (Stand Dezember 2001, Quelle: LEML-UNSA).

Morphologische, physiologische und ökologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Mittelmeer Art in wichtigen Eigenschaften von tropischen Populationen unterscheidet. Die auffälligsten Unterschiede sind die Größe sowohl der einzelnen Individuen als auch der gesamten Populationen und das Ausbreitungsverhalten. Assimilatoren der mediterranen Population können bis zu 1m hoch werden und die Stolone können eine Länge von wenigen Metern erreichen (Abb. 7). In tropischen Populationen werden die Algen nur einige Zentimeter hoch, und ihr Längenwachstum ist ebenfalls geringer als das der Mittelmeer Population.<sup>[20]</sup> Die Alge besitzt eine hohe Substrattoleranz und besiedelt im Mittelmeer jeden Untergrund, während sie in tropischen Gewässern sandigen Boden bevorzugt. Sie wächst nicht nur endemisch an definierten Stellen, wie in den Tropen, sondern bildet weitläufige zusammenhängende „Wiesen“, die die ursprüngliche Flora überwuchern (Abb. 7).<sup>[16]</sup>



**Abbildung 7:** Links: *C. taxifolia* breitet sich in einer Posidonia<sup>VII</sup>-Wiese aus. Rechts: Thallus einer Mittelmeer *C. taxifolia*, zum Größenvergleich ein Eurostück.

Ihre vertikale Ausbreitung beginnt direkt unter der Wasseroberfläche, durchläuft zwischen zwei und sechs Metern ein Maximum<sup>[14]</sup> und erstreckt sich in Tiefen von bis zu 100 m.<sup>[21]</sup> Funde in tropischen Gewässern berichten von einem Wachstum bis in maximal 50 m Tiefe.<sup>[21]</sup> Die mediterrane Art besitzt eine große Temperaturtoleranz, die es ihr ermöglicht, Wassertemperaturen von 7 bis 15°C und bis 30°C im Sommer zu überleben.<sup>[20]</sup> Die Mittelmeerpopulation zeichnet sich vor allen Dingen durch ein ungebremstes Wachstum und eine den vorherrschenden Bedingungen gut angepasste Lebensweise aus.

Während in den Tropen in erster Linie sexuelle Vermehrung beobachtet wird, ist diese Art der Fortpflanzung im Mittelmeer nicht möglich, da alle Algen uniclonal männlich sind und es zu keiner Ausbildung weiblicher Gameten kommt.<sup>[22]</sup> Die Vermehrung im Mittelmeer erfolgt ungeschlechtlich, vegetativ durch Fragmentierung. Das bedeutet, dass sich aus kleinen Bruchstücken der Algen, die bereits die gesamte genetische Information enthalten, neue Individuen entwickeln.

Nach der Entdeckung von *C. taxifolia* vor der Küste Monacos wurde ein unregelmäßiges, sprunghaftes Ausbreitungsverhalten beobachtet. Neue Kolonien wurden mehrere hundert Kilometer entfernt an der kroatischen Küste, der Küste der Balearen, Italiens und der Insel Elba gefunden. Dorthin sind Fragmente oder ganze Algen in den Ankerkästen oder Netzen von Schiffen gelangt. Bei absoluter Dunkelheit, 18°C Umgebungstemperatur und 85% Luftfeuchtigkeit ist die mediterrane *C. taxifolia* in der Lage, 10 Tage an der Luft zu überleben und nach dem Zurücksetzen ins Meer weiterzuwachsen.<sup>[23]</sup>

---

<sup>VII</sup> Seegras



Die schnelle Ausbreitung der Alge hat große Auswirkungen auf das Ökosystem Mittelmeer. Veränderungen in der Biodiversität und Artenzusammensetzung konnten sowohl für das Phyto- als auch das Zoobenthon<sup>VIII</sup> beobachtet werden. So zeigt Verlaque in einer vergleichenden Studie zwischen einer Phytalgemeinschaft ohne und mit *C. taxifolia*, dass letztere mit der Zeit eine schrittweise Verarmung an anderen Spezies aufweist und in einer *C. taxifolia* Monokultur endet.<sup>[24]</sup> Einen Rückgang in der Artenvielfalt der gesamten Fauna berichten Bellan-Santini *et al.*<sup>[14]</sup> Besonders großen Einfluss nimmt *C. taxifolia* auf die im Mittelmeer heimischen Posidoniefelder,<sup>[25]</sup> die als Laichplätze und „Kinderstube“ für zahlreiche Fischarten eine große ökologische Bedeutung für das Ökosystem Mittelmeer besitzen.

Ein ähnliches ökologisches Problem wie im Mittelmeer könnte auch an der kalifornischen Küste entstehen. In der Bucht von Huntington Harbour (Kalifornien) wurde vor knapp drei Jahren eine Population von *C. taxifolia* entdeckt,<sup>[26]</sup> die mittels genetischer Analyse als derselbe Klon wie der Mittelmeerstamm von *C. taxifolia* identifiziert werden konnte.<sup>[27]</sup> Mit dem Wissen um die schnelle Verbreitung und die daraus resultierenden ökologischen Probleme wurden intensive Versuche unternommen, die Alge bereits in diesem frühen Stadium auszurotten. Doch wie schon im Mittelmeer schlugen diese Bemühungen auch in Kalifornien fehl. Mittlerweile wurden entlang der nord- und mittelamerikanischen Pazifikküste zahlreiche neue *C. taxifolia* Felder entdeckt (persönliche Mitteilung Prof. Meinesz).

### 1.4.2 *Caulerpa racemosa*

Auch bei *C. racemosa* (Abb. 8) handelt es sich um eine *Caulerpa* Art, die in tropischen und subtropischen Meeren weit verbreitet ist. Ihre Assimilatoren bilden traubenförmige Ausstülpungen, was ihr den englischen Namen „Grape Caulerpa“ einbrachte. Ihr Vorkommen im Mittelmeer wurde 1926 von Hamel zum ersten Mal berichtet. 1978 stellte man fest, dass es sich um eine eingeschleppte Spezies handelt, die aus dem Roten Meer stammt.<sup>[28]</sup> Im Gegensatz zu *C. taxifolia* breitete sich diese Alge jedoch zunächst nicht aus, sondern behielt



**Abbildung 8:** *Caulerpa racemosa*

ein stationäres Wachstum ohne invasive Tendenzen bei. 1990 änderte sich diese Situation und *C. racemosa* begann sich sehr schnell im gesamten Mittelmeer von Ost nach West auszubreiten. In eingehenden morphologischen Untersuchungen unter Berücksichtigung der

<sup>VIII</sup> Benthos = Lebensgemeinschaft auf dem Meeresgrund

Taxonomie, der Ausbreitungsgeschwindigkeit und der Vermehrung schlugen Verlaque *et al.* das Vorkommen von drei unterschiedlichen *C. racemosa* Taxa vor, von denen nur eine das offensive Ausbreitungsverhalten aufweist.<sup>[29]</sup> In vergleichenden molekularbiologischen Untersuchungen, ähnlich denen an *C. taxifolia*, konnten die Ergebnisse von Verlaque *et al.* bestätigt werden. Darüber hinaus wird für die invasive *C. racemosa* von einer Hybrid-Herkunft ausgegangen, was bedeutet, dass es sich um eine Kreuzung mehrerer Arten handelt.<sup>[30]</sup>

Im Gegensatz zu *C. taxifolia* kann bei *C. racemosa* nicht nur eine vegetative, sondern auch eine sexuelle Vermehrung im Mittelmeer beobachtet werden.<sup>[31]</sup> Erst kürzlich berichteten Meinesz *et al.* von einer weiteren effektiven Art der vegetativen Vermehrung in *C. racemosa*. Sie konnten das selektive „Abschnüren“ einzelner Thallusabschnitte und das Anwachsen dieser Bruchstücke beobachten.<sup>[32]</sup> *C. racemosa* ist damit in der Lage, sich selbstständig, ohne äußere Einwirkungen vegetativ zu vermehren. Durch das Vorkommen gleich zweier invasiver *Caulerpa* Arten, konnten vergleichende Untersuchungen des invasiven Potentials durchgeführt werden. Erste Ergebnisse lassen ein größeres invasives Potential in *C. racemosa* vermuten.<sup>[33]</sup> Im direkten Wettbewerb der beiden wird ebenfalls ein größeres Durchsetzungsvermögen für *C. racemosa* vorhergesagt.<sup>[34]</sup>

### 1.4.3 *Caulerpa prolifera*<sup>IX</sup>

Eine weitere im Mittelmeer ansässige allerdings nicht-invasive *Caulerpa*-Art ist *C. prolifera* (Abb. 9). Sie besiedelt fast den gesamten Mittelmeerraum und findet nur in den kälteren Bereichen des Mittelmeers wie der nördlichen Adria und der Nordägäis ihre Verbreitungsgrenzen.<sup>[35]</sup> Ihre dunkelgrünen Assimilatoren sind länglich gestreckt, blattförmig-elliptisch und können vielfache Verzweigungen ausbilden. Sie bevorzugt geschützte Standorte ohne starke Strömung wie z.B. Lagunen mit sandigem Untergrund und ist in Tiefen bis zu 20 m zu finden.<sup>[36-38]</sup> Wie bei *C. taxifolia* erfolgt auch bei *C. prolifera* keine Ausbildung weiblicher Gameten, was eine ausschließlich vegetative Vermehrung zur Folge hat.<sup>[36-38]</sup>



**Abbildung 9:** *Caulerpa prolifera*

---

<sup>IX</sup> *prolifera* von Proliferation = Verzweigung

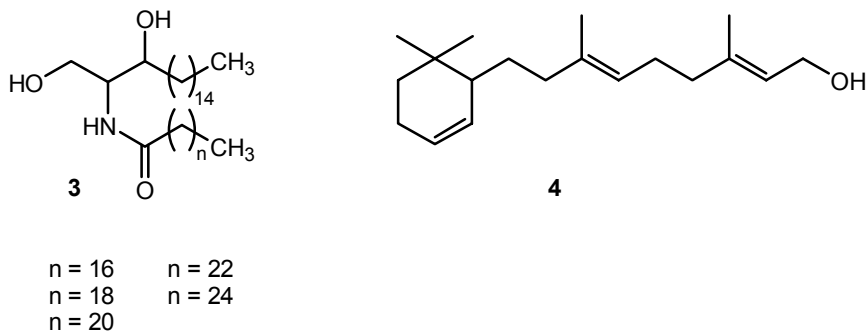


## 1.5 Sekundärmetabolite in Bryopsidophyceae

*Caulerpa*-Arten sind neben *Udotea*- und *Halimeda*-Arten die häufigsten Algen in tropischen Riffhabitaten. Dieser Lebensraum zeichnet sich durch einen besonders hohen Fraßdruck aus. Trotz ihrer Häufigkeit wurde mit der Aufklärung der Sekundärmetabolite aus *Caulerpa* erst in den 60er Jahren begonnen.<sup>[39]</sup> Mittlerweile sind die Sekundärmetabolite dieser Klasse jedoch sehr gut untersucht. Die Arbeiten beschränken sich in erster Linie auf die klassische Strukturaufklärung, bei der die Metabolite isoliert und spektroskopisch untersucht werden. In Bioassays an ausgewählten Testorganismen werden einzelne Metabolite auf definierte toxikologische Eigenschaften getestet. Da die Versuchsbedingungen in den wenigsten Fällen den natürlichen Bedingungen in den Algen entsprechen, können die Ergebnisse nur selten direkt auf die Reaktionen im Ökosystem übertragen werden.

### 1.5.1 Sekundärmetabolite der Gattung *Caulerpa*

1966 berichteten Doty *et al.* über die Isolierung einer Mischung dreier N-Acylsphingosine aus tropischen *C. racemosa*, die sie Caulerpicin nannten und für Vergiftungserscheinungen an Menschen verantwortlich machten, die nach dem Verzehr einiger *Caulerpa* Arten auftraten.<sup>[39]</sup> Nielsen *et al.* korrigierten die angegebenen Strukturen 1982 nach eingehenden NMR Untersuchungen zu den folgenden Ceramiden (**3**) (Abb. 10).<sup>[40]</sup>



**Abbildung 10:** Caulerpicin (**3**) und Caulerpol (**4**).

Das Diterpen Caulerpol (**4**) (Abb. 10) wurde von australischen Wissenschaftlern 1976 aus *C. brownii* isoliert.<sup>[41]</sup> Es ist in seiner Struktur dem Vitamin A verwandt. Aus weiteren Untersuchungen folgten das Sesquiterpen Flexilin (**5**), extrahiert aus *C. flexilis* und das Diterpen Trifarin (**6**) aus *C. trifaria*.<sup>[42]</sup> Diese beiden Metabolite waren die ersten Naturstoffe, in denen eine terminale 1,4-bis-Enolacetat-Einheit nachgewiesen wurde (Abb. 11).

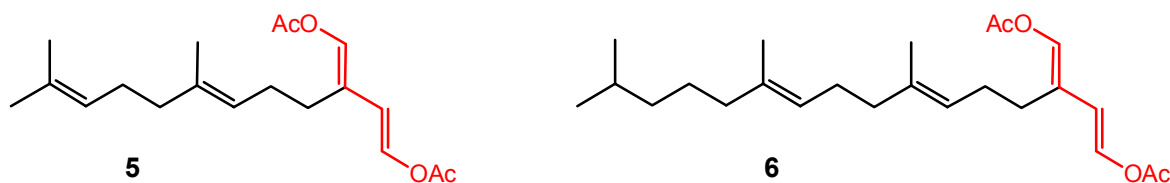


Abbildung 11: Flexilin (5) und Trifarlin (6); rot: 1,4-bis-Enolacetat-Einheit

Etwa zeitgleich mit der Isolierung des Flexilins (5) aus *C. flexilis*, gelang Amico die Isolierung und Charakterisierung des acetylenischen Sesquiterpens Caulerpenin (7) aus der im Mittelmeer beheimateten *C. prolifera* (Abb. 12).<sup>[43]</sup> Paul wies Caulerpenin (7) in späteren Untersuchungen in neun überwiegend tropischen *Caulerpa*-Arten als Hauptsekundärmetabolit nach.<sup>[44]</sup>

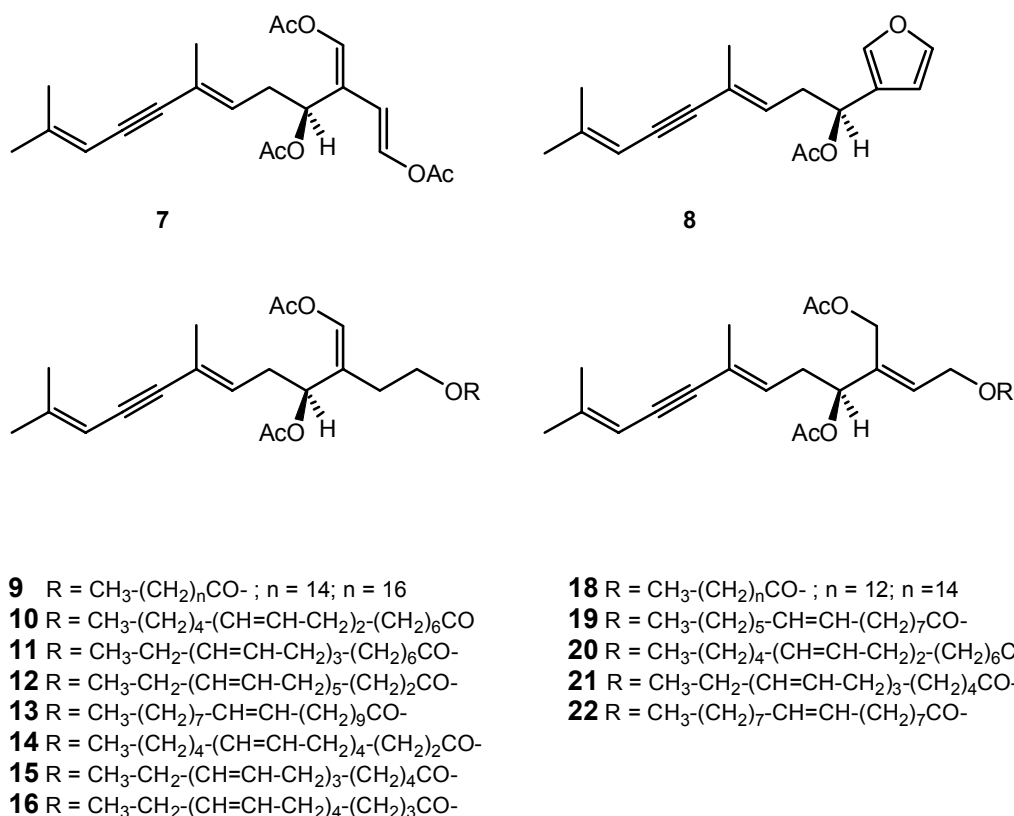
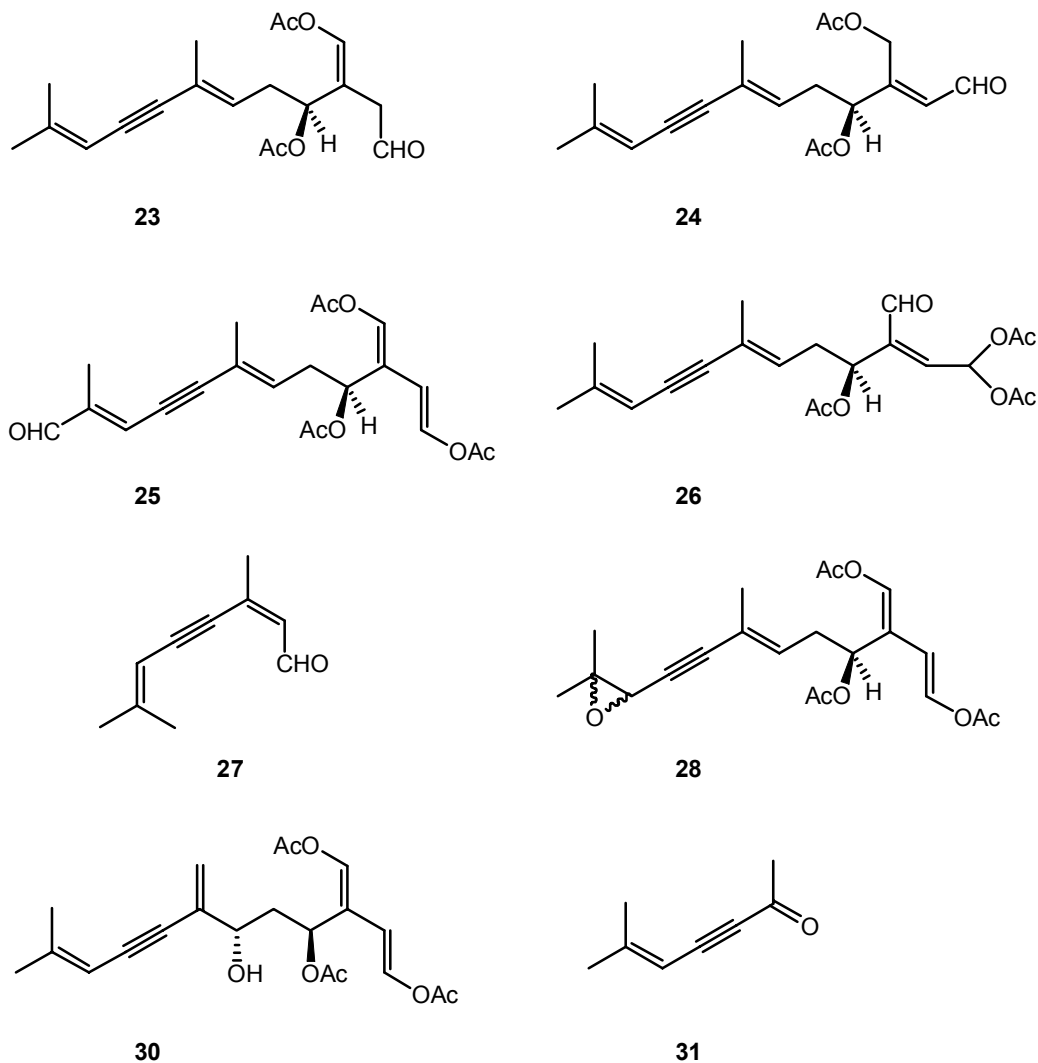


Abbildung 12: Caulerpenin (7), Furocaulerpenin (8) und caulerpeninverwandte Fettsäureester (9-22).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen an *C. prolifera* isolierten De Napoli *et al.* darüber hinaus folgende dem Caulerpenin (7) verwandte Verbindungen: Furocaulerpin (8) (Abb. 12)<sup>[45]</sup>, in dem die 1,4-bis-Enolacetat-Einheit durch einen Furan Ring ersetzt ist, und die caulerpeninverwandten Fettsäureester,<sup>[46]</sup> die vor kurzem zu den folgenden (9-22) komplettiert wurden (Abb. 13).<sup>[47]</sup> Zusätzliche caulerpeninabgeleitete acetylenische Sesquiterpene Oxytoxin 1 (23), die Taxifoliale a-d (24-27) und Epoxycaulerpenin (28) wurden

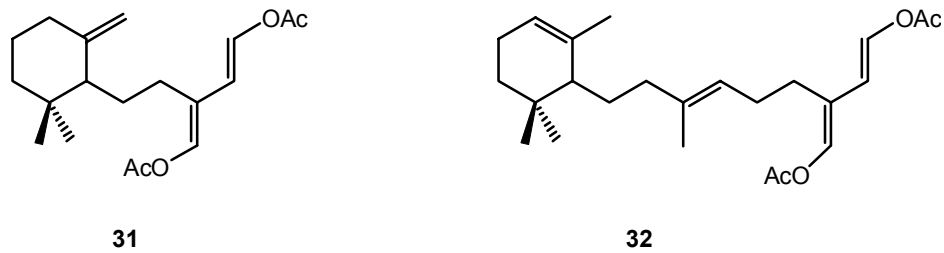
aus *C. taxifolia* extrahiert.<sup>[48]</sup> Weitere verwandte Strukturen sind Dihydrocaulerpenin (**29**) und Taxifolion (**30**) (Abb. 13).<sup>[49]</sup>



**Abbildung 13:** Oxytoxin 1 (**23**), Taxifolial a-d (**24-27**), 10,11-Epoxycaulerpenin (**28**), Dihydrocaulerpenin (**29**) und Taxifolion (**30**).

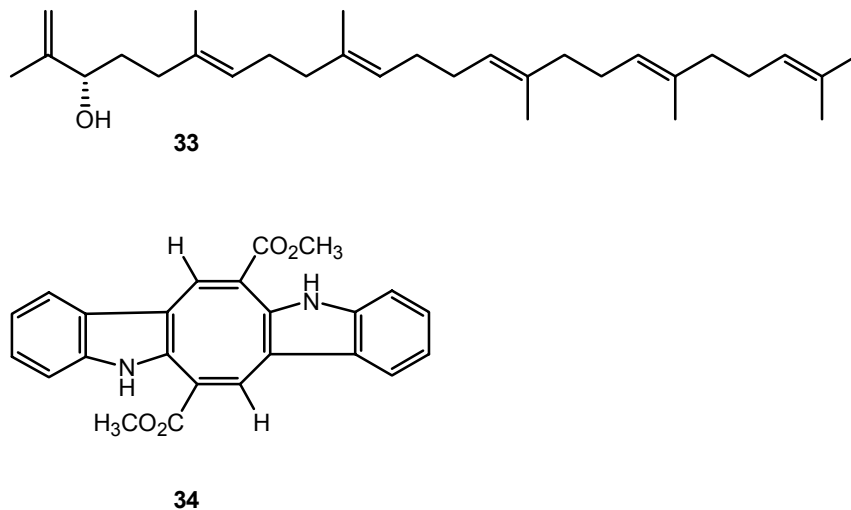
Ein monocyclisches Sesquiterpen (**31**), mit 1,4-*bis*-Enolacetat-Einheit, isolierten Paul und Fenical 1982 aus tropischen *C. bikinensis* (Abb. 14).<sup>[50]</sup>

Ein cyclisches Diterpen (**32**) mit 1,4-*bis*-Enolacetat Gruppierung wies Handley in *C. trifaria* nach (Abb. 14).<sup>[51]</sup>



**Abbildung 14:** Monocyclisches Sesquiterpen (**31**) und Diterpen (**32**) mit 1,4-*bis*-Enolacetat-Einheit.

Des Weiteren konnten unterschiedlichfunktionalisierte Squalene (**33**) von denen beispielhaft nur eins dargestellt ist,<sup>[46]</sup> und orangefarbene Pigmente, wie Caulerpin (**34**),<sup>[52],[53]</sup> nachgewiesen werden (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Funktionalisiertes Squalen (**33**) und Caulerpin (**34**).

Bei den isolierten Sekundärmetaboliten handelt es sich in erster Linie um funktionalisierte meist acyclische Sesqui- und Diterpene. Ein besonderes Strukturelement, der Metaboliten aus *Caulerpa*, *Udotea* und *Halimeda* Arten, ist eine terminale 1,4-*bis*-Enolacetat-Einheit. Maskierte und freie Aldehyde sind als häufigste funktionelle Gruppen zu nennen.

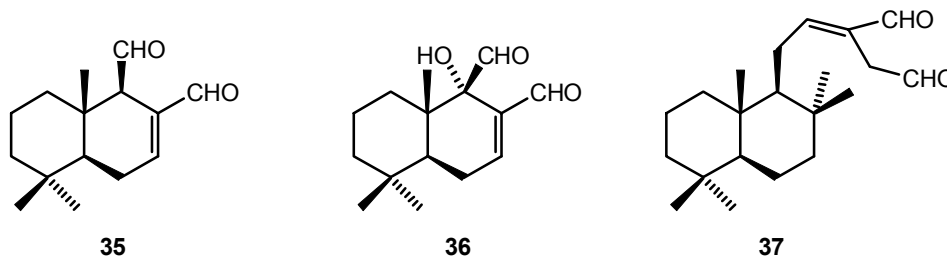
## 1.6 Biologische Aktivität von Aldehyden

Aldehyde und insbesondere  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde sind potente Elektrophile, die mit Nucleophilen auf verschiedene Art reagieren können. Mit primären Aminogruppen können sie Schiffsche Basen (Imine) bilden.  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde können darüber hinaus durch Nucleophile im Sinne einer Michael-Addition angegriffen werden.

In einer Studie zur chemischen Verteidigung in tropischen *Caulerpa* verglichen Paul und Fenical die Wirkung von Sekundärmetaboliten, die eine maskierte Aldehydfunktion besaßen,

mit den korrespondierenden freien Aldehyden.<sup>[54]</sup> Dabei zeigte sich, dass Verbindungen, die eine oder mehr freie Aldehydfunktionen besitzen, höhere biologische Aktivität in Fraßassays mit potentiellen Herbivoren und Tests zur antibakteriellen und toxischen Wirkung aufweisen, als ihre maskierten oder nicht-funktionalisierten Homologen.

Ungesättigte 1,4-Dialdehyde wie (-)-Polygodial (**35**) aus dem Wasserpfeffer (*Polygonium hydropiper*)<sup>[55]</sup> und (-)-Warburganal (**36**) aus dem ostafrikanischen Pfeffer-Rinden Baum (*Warburgia ugandensis*)<sup>[56]</sup> sind natürliche Insektenrepellentien und zeigen starke Antifraßaktivität bei Schmetterlingslarven<sup>[57]</sup>, Blattläusen<sup>[58]</sup> und anderen Schadinsekten.



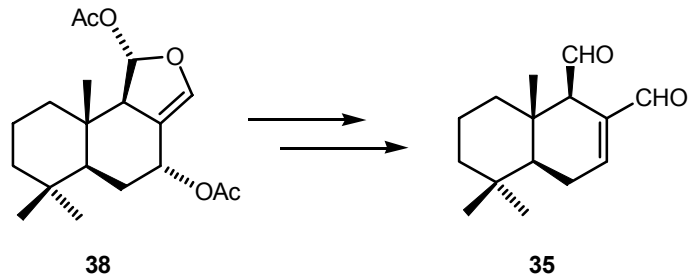
**Abbildung 16:** Polygodial (**35**), Warburganal (**36**) und Aframodial (**37**).

Beide Sesquiterpenaldehyde werden auch im marinen Lebensraum gefunden. Polygodial (**35**) wurde aus dem Wehrsekret von *Dendrodoris limbata* und einiger weiterer Arten mariner Schnecken isoliert.<sup>[59]</sup> Im Assay mit Salz- und Süßwasserfischen zeigt es auch hier sehr starke Antifraßaktivität.<sup>[60]</sup> Bei diesen Fraßassays wurde beobachtet, dass die Fische die mit Polygodial dotierte Nahrung zunächst aufnahmen, dann aber sofort wieder ausspuckten. Elektrophysiologische Untersuchungen an den Geschmacksrezeptoren von *Spodoptera exempta* Larven haben gezeigt, dass der Geschmackssinn durch die wiederholte Gabe von Warburganal (**36**) irreversibel blockiert wird.<sup>[61]</sup> An menschlichen Geschmacksrezeptoren rufen 1,4-Dialdehyde mit bestimmter Geometrie einen scharfen Geschmack hervor.<sup>[62]</sup>

Einige ungesättigte 1,4-Dialdehyde finden Anwendung in der Medizin. So senkt z.B. Aframodial (**37**) den Cholesterinspiegel, inhibiert die Leukotrienbildung und wirkt entzündungshemmend.<sup>[63]</sup>

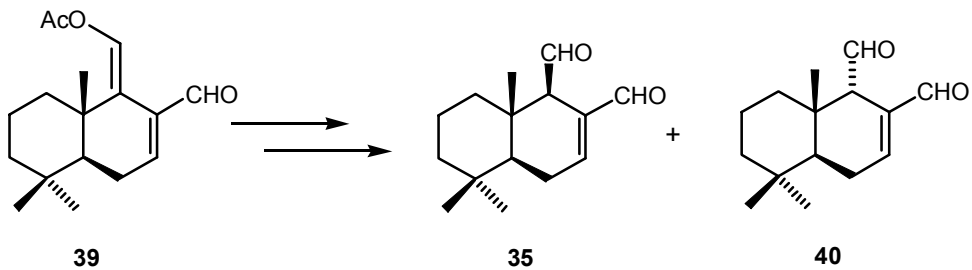
Polygodial (**35**) findet als Lebensmittelzusatzstoff Anwendung. Es verlängert den „minzigen“ Geschmack in Kaugummis und Getränken und mildert bitteren Geschmack in Lebensmitteln und Pharmazeutika ab.<sup>[63]</sup>

Da die ungesättigten 1,4-Dialdehyde sehr reaktiv sind, liegen sie in den Organismen meist in geschützter Form vor. Marine Schnecken der Arten *Dendrodoris limbata* und *D. grandiflora* speichern Oleopupuan (**38**), welches im Falle eines Angriffs schnell zu Polygodial (**35**) umgewandelt werden kann.<sup>[64]</sup>



**Abbildung 17:** Oleopupuan (**38**) wird in *Dendrodoris* spp. schnell zu Polygodial (**35**) umgewandelt.

In der marinen Schnecke *Chromodoris albonotata* werden Polygodial (**35**) und das Isomer Isotadeonal (**40**) durch Hydrolyse von Puulenal (**39**) freigesetzt.<sup>[65]</sup>



**Abbildung 18:** Durch Hydrolyse von Puulenal (**39**) entstehen in *Chromodoris albonotata* Polygodial (**35**) und Isotadeonal (**40**).

Das *Halimeda* spp. ihren frasshemmenden Sekundärmetabolit Halimedatrial (**2**) als Halimedatetraacetat (**1**) speichern, in dem die Aldehydfunktionen durch Acetatgruppen geschützt vorliegen und diese vermutlich enzymatisch bei einer Verwundung abgespalten werden,<sup>[7]</sup> wurde bereits auf Seite vier beschrieben.

## 2 Aufgabenstellung

Zu Beginn der Arbeit war wenig über die Wehrchemie von *C. taxifolia* bekannt. Diese, so wurde angenommen, basiere nahezu ausschließlich auf dem Sesquiterpen Caulerpenin (**7**), das als fraßhemmender Metabolit zum Durchsetzungsvermögen der Alge beiträgt. Es lagen bis dahin jedoch nur Untersuchungen vor, bei denen Caulerpenin (**7**) in den Algen quantifiziert<sup>[66]</sup> oder aus den Algen extrahiert und nach Aufreinigung in Bioassays verwendet wurde. In keiner der Untersuchungen wurde bisher die Frage nach einer dynamischen Verteidigung adressiert. Weil somit keine Rückschlüsse auf den Ablauf der Verteidigung im ökologischen Umfeld der Algen und unter physiologischen Bedingungen möglich sind, war ein Ziel dieser Arbeit, die Wehrchemie in *C. taxifolia* nach Zellverletzung zu untersuchen. In ersten Versuchen wurde ein Caulerpeninabbau nach Verwundung der Alge beobachtet.

- Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte zunächst untersucht werden, wie die Wundreaktion in *C. taxifolia* im Detail abläuft und welche Art der chemischen Verteidigung vorliegt. Die beteiligten chemischen oder biochemischen Transformationen sollten dabei untersucht werden, und eventuelle labile Caulerpeninfolgeprodukte charakterisiert werden.
- Ein Nachweis der beteiligten Enzyme und Informationen darüber, wie es *C. taxifolia* gelingt, Caulerpenin (**7**) und caulerpeninabbauende Enzyme zu speichern oder zu deaktivieren, so dass es nicht zu Abbaureaktionen in der intakten Alge und damit zur Selbstvergiftung kommt, sollte diese Untersuchungen komplettieren.
- Aufbauend auf den so erhaltenen Ergebnissen sollten Vergleiche mit anderen *Caulerpa*-Arten durchgeführt werden, um die Bedeutung der Verteidigungsstrategie in der Gattung *Caulerpa* beurteilen zu können.
- Es sollten Methoden erarbeitet werden, die es Ökologen erlauben, die im Labor erhaltenen Ergebnisse in Freilandversuchen zu verifizieren und darüber hinaus ihre Bedeutung im Ökosystem zu evaluieren.

Während der Arbeit zeigte sich, dass der Ablauf der Wundverschlussbildung mit dem zeitlichen Verlauf der Caulerpeninumwandlung übereinstimmte. Basierend auf den Korrelationen der kinetischen Verwundungsexperimente, mit der Ausbildung des Wundverschlusses sollte deshalb überprüft werden, inwiefern Caulerpenin (**7**) und Caulerpeninfolgeprodukte an der Wundverschlussbildung in verletzten Algen beteiligt sind.

- Die Biopolymere, die den Wundpfropf ausbilden sollten charakterisiert, und dabei die Rekrutierung von Caulerpenin (**7**) und seinen Folgeprodukten in den Wundpfropf verifiziert werden.
- Da zu Beginn der Arbeit noch keine Untersuchungen zur Terpenbiosynthese in siphonalen Grünalgen vorlagen, sollte durch Fütterungsexperimente mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen die Biosynthese von Caulerpenin (**7**) untersucht und deren Grad der Analogie zu terrestrischen Systemen herausgefunden werden.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

In den letzten Jahren sind vielfältigste Versuche unternommen worden, die schnelle Ausbreitung der invasiven Grünalge *C. taxifolia* im Mittelmeer zu stoppen. Keine der Strategien, die vom einfachen Ausreißen der Alge bis zur gezielten Vergiftung durch Kupfer-, Natrium- und Kaliumionen reichten, führte zum Erfolg.<sup>[67]</sup> Um die Ausbreitung wirkungsvoll und dauerhaft unterbinden zu können, ist es notwendig, alle Faktoren, die sie positiv beeinflussen, zu kennen. Ein Aspekt, den es näher zu verstehen gilt, ist die chemische Verteidigung von der angenommen wird, dass sie nahezu ausschließlich auf dem Sesquiterpen Caulerpenin (**7**) basiert. In Fraßassays mit Seeigeln stellten Lemee *et al.* fest, dass *C. taxifolia*, deren Hauptsekundärmetabolit Caulerpenin (**7**) ist, nicht oder nur selten als Nahrung akzeptiert wurde.<sup>[68]</sup> Die Vermeidung der Alge als Futterquelle konnte besonders während der Sommermonate, in denen der Caulerpeningehalt am höchsten war, beobachtet werden. Im Rest des Jahres wurde die Alge zwar konsumiert, sie stellte jedoch keine gute Nahrungsquelle dar, was in einem deutlichen Rückgang der allgemeinen Fitness der Seeigel erkennbar war. In Laboruntersuchungen konnten Boudouresque *et al.* diese Ergebnisse bestätigen.<sup>[69]</sup>

Beobachtungen, die bei Toxizitätstest an Seeigellarven gemacht wurden, schränken die Annahme, dass die Verteidigung und ihre Toxizität ausschließlich auf **7** beruht, ein. In diesen Untersuchungen waren methanolische *C. taxifolia* Extrakte aktiver als methanolische Lösungen, die gleiche Konzentrationen reines Caulerpenin (**7**) enthielten.<sup>[70]</sup> Die Toxizität der Alge ist also nicht ausschließlich auf Caulerpenin (**7**) zurückzuführen, sondern möglicherweise tragen noch andere Substanzen oder Vorgänge in der Alge zur Erhöhung der toxischen Wirkung bei. Die chemische Verteidigung könnte folglich ebenfalls nicht nur auf Caulerpenin (**7**) basieren und wäre damit komplexer als bisher angenommen. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung von Caulerpenin (**7**) für den Mittelmeer Stamm von *C. taxifolia* in der vorliegenden Arbeit gründlich mit neuen Methoden untersucht.

#### 3.1 Kultivierung von *Caulerpa* spp.

Um Untersuchungen an *C. taxifolia* durchführen zu können, ist es notwendig, sie vor Ort zu halten. Unter Bedingungen die in Temperatur- und Lichtverhältnissen ihrem natürlichen Umfeld nachempfunden sind, wachsen aus Villefranche-sur-mer eingeführte Algen in Aquarien mit künstlichem Seewasser in Jena sehr gut. Durch den regelmäßigen Austausch des Mediums werden die Algen optimal mit Nährstoffen versorgt und wachsen so schnell, dass ausreichend Biomasse für chemische und biochemische Untersuchungen zur

Verfügung steht. Etwas schwieriger ist die Haltung von *C. racemosa* und *C. prolifera*, die für vergleichende Studien benötigt wurden. Ihre Population konnte zwar unter Verwendung der *C. taxifolia* Parameter über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil gehalten werden, die Kultur der beiden *Caulerpa*-Arten, insbesondere von *C. prolifera*, gelang jedoch nicht über ein Jahr hinaus.

Aus Studien an anderen Algenarten ist bekannt, dass diese die Fähigkeit zur Sekundärmetabolit Synthese außerhalb ihres natürlichen Habitats einstellen.<sup>[71]</sup> In ersten Vorversuchen konnte Caulerpenin (**7**) in etherischen Extrakten der im Aquarium gehaltenen *C. taxifolia* gaschromatographisch als Hauptsekundärmetabolit nachgewiesen werden. Auch in Algen, die schon längere Zeit im Aquarium gehalten wurden, konnte weiterhin Caulerpenin (**7**) als Hauptkomponente nachgewiesen werden. Um dem Phänomen dennoch vorzubeugen, wurden die bestehenden Kulturen regelmäßig durch neue Algen aus dem Mittelmeer ergänzt.

Für Fütterungsexperimente im Rahmen der Biosyntheseversuche stand eine unialgale *C. taxifolia* Sterilkultur zur Verfügung, die von Prof. Müller in Konstanz aus dem Mittelmeerisolat herangezogen wurde.

Damit ist die Grundvoraussetzung für eine umfangreiche chemische und biochemische Untersuchung der Algen in Jena gegeben.

### 3.2 Caulerpeninaufreinigung zur Gewinnung eines Standards

Zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche ist es notwendig, Caulerpenin (**7**) als Reinstoff vorliegen zu haben. Daher wurde ein Protokoll zur Aufreinigung des Sesquiterpens aus den Algen erarbeitet. Da Caulerpenin (**7**) mit bis zu 1,3 % des Feuchtgewichts<sup>[66]</sup> in den Algen enthalten ist, können mehrere Milligramm Caulerpenin (**7**) aus der Aufreinigung einiger Gramm Algen gewonnen werden. Die Extraktion des Caulerpenins (**7**) erfolgt aus frischem oder gefrorenem Algenmaterial, das direkt im Mittelmeer gesammelt wurde. Die Algen werden zunächst mit flüssigem Stickstoff gefroren und dann zermörsert. Das kalte Homogenisat wird mit Ethylacetat, zur Gewinnung reinen Caulerpenins (**7**), oder nach Bligh und Dyer<sup>[72]</sup>, wenn neben Caulerpenin (**7**) auch Sterole für Untersuchungen benötigt werden, extrahiert. Zur vollständigen Extraktion (>95%) wird der Ethylacetat Ansatz etwa eine Stunde bei Raumtemperatur, und der Bligh und Dyer Ansatz über Nacht bei 4 °C gerührt. Danach werden die Algenrückstände abfiltriert und das tiefgrüne Ethylacetat-Filtrat wird direkt über Natriumsulfat getrocknet. Der Bligh und Dyer Ansatz muss, bevor die organische Phase ebenfalls über Natriumsulfat getrocknet werden kann, zur Phasentrennung mit Wasser und Chloroform behandelt werden. Nach einer

säulenchromatographischen Reinigung über Kieselgel erhält man bei der Extraktion mit Ethylacetat sauberes Caulerpenin (7). Bei der Extraktion nach Bligh und Dyer müssen nach der Säulenchromatographie an Kieselgel zur Gewinnung der Reinstoffe weitere Reinigungsschritte folgen. Dazu werden die Caulerpeninfraktionen zur Abtrennung von Fettsäuren mit Kaliumcarbonat-Lösung geschüttelt, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch über Florisil aufgetrennt. Nach diesen zusätzlichen Reinigungsschritten erhält man neben gereinigtem Sitosterol, das für die Biosyntheseversuche benötigt wird, auch hier reines Caulerpenin (7).

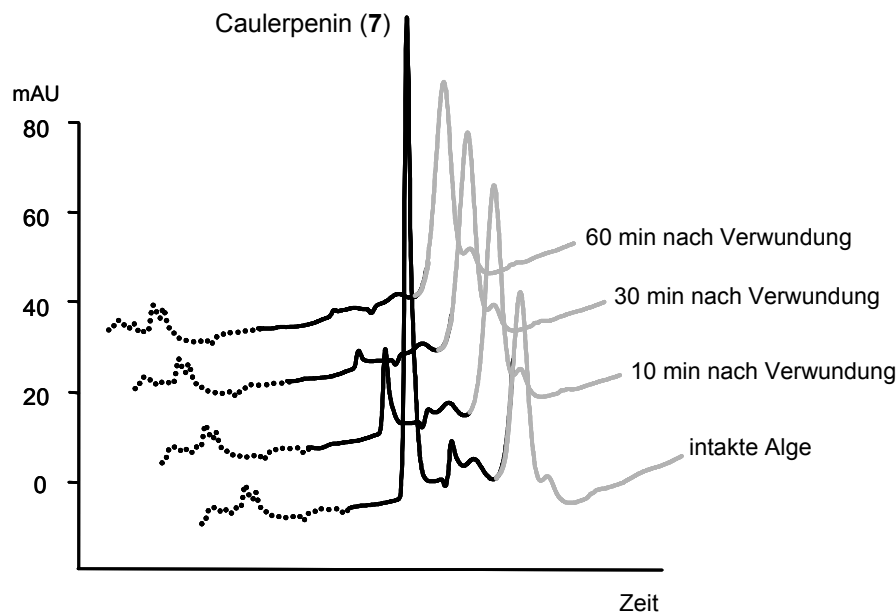
### 3.3 Vorgänge in *C. taxifolia* nach Verwundung

Zur Untersuchung der chemischen Prozesse, die nach einer Verletzung in der Alge ablaufen, wurden wässrige Extrakte mechanisch verwundeter Algen mittels Reversed Phase-HPLC (RP-HPLC) aufgetrennt und durch Messung der Absorption im Diodenarraydetektor (220 bis 340 nm) detektiert. RP-HPLC wurde ausgewählt, um das wässrige Algenhomogenisat direkt analysieren zu können. Es stellte sich heraus, dass die Detektion bei 254 nm die Erfassung eines Großteils der Analyten erlaubt.

Die Verwundung der siphonalen Algen wurde durch das Zerkleinern intakter Thalli im Mörser simuliert. Hierbei wird die Zellwand zerstört und das austretende milchige Cytoplasma und der Vakuoleninhalt vermischen sich mit dem übrigen Zellhomogenisat. Diese Art der Verwundung kann nur in grober Näherung mit einer Verwundung in der Natur verglichen werden. Fressen beispielsweise Schnecken auf den Algen, wird die Zellwand nur in kleinen Regionen punktförmig verwundet, auch ein Befraß durch andere Herbivore wie z.B. Seeigel hätte nicht die komplette Zerstörung der Alge zur Folge. In allen Fällen wird allerdings die Zellintegrität zerstört. Für die mechanistische Untersuchung der verwundungsaktivierten Verteidigung im Labor musste eine reproduzierbare Verletzung der Alge erfolgen, und diese konnte ausschließlich durch das Zermörsern der gesamten Alge erreicht werden. Die Verwundungsgeschwindigkeit, das bedeutet die Zeit, die bis zur vollständigen Homogenisierung des Thallus im Mörser benötigt wird, gibt deshalb auch die Zeit für die erste Messung nach der Verwundung vor und beträgt 30 s. In dieser Zeit kann der Thallus einheitlich zerkleinert werden, und die flüssigen Bestandteile der Alge, Cytoplasma und Vakuoleninhalt, haben sich vollständig mit den festen zermörserten Bestandteilen, d.h. der Zellwand, vermischt.

In Proben, die direkt nach der Verwundung analysiert wurden, konnte wie bereits in den etherischen Extrakten, Caulerpenin (7) als Hauptsekundärmetabolit nachgewiesen werden. Eine wiederholte Probennahme aus dem wässrigen Zellhomogenisat über einen Zeitraum

von einer Stunde zeigte im UV eine deutliche Abnahme der ursprünglichen Caulerpeninmenge. Bereits 10 Minuten nach der Verwundung wurden weniger als 50% der ursprünglichen Caulerpeninmenge nachgewiesen, und nach etwas mehr als 30 min war kein Caulerpenin (7) mehr detektierbar (Abb. 19).



**Abbildung 19** RP-HPLC zeigt den zeitlichen Verlauf des Caulerpeninabbaus in verwundeten *C. taxifolia*; schwarz: Caulerpenin (7), grau: „quasi“-interner Standard aus der Alge. RP-HPLC: Wasser mit 0%, 5 min 65%, 15 min 100%, 17,5 min 0% Acetonitril.

In Abwesenheit von *Caulerpa*-Homogenisat ist Caulerpenin (7) in reinem Meerwasser über mehrere Stunden stabil<sup>[66]</sup>, so dass eine spontane Zersetzung ausgeschlossen werden kann.

Mit den gewählten analytischen Bedingungen war es nicht möglich, Caulerpeninabbauprodukte zu erfassen, und es konnten auch keine anderen Veränderungen in der Zusammensetzung der Extrakte nachgewiesen werden. Da aber gerade durch die Folgeprodukte Rückschlüsse auf den Verlauf der Reaktion möglich wären, war es für eine Aufklärung des Mechanismus wichtig, diese zu erfassen. Als mögliche Ursachen für das Nachweisproblem wurde angenommen, dass Produkte entstehen, die ein oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllen:

1. Sie reagieren im Zellhomogenisat weiter und sind der Analytik nicht mehr zugänglich.
2. Sie zersetzen sich bei den Bedingungen der Chromatographie und Analytik.
3. Sie können mit UV-Detektion nicht erfasst werden.

## 3.4 Optimierte Extraktions- und Detektionsmethoden zum Nachweis von Caulerpeninfolgeprodukten

### 3.4.1 Entwicklung einer Extraktionsmethode

Aus diesen Gründen erschien es zunächst notwendig, eine Extraktionsmethode zu entwickeln, die geeignet ist mögliche Caulerpeninfolgeprodukte aus der Algenmatrix zu entfernen und der Analytik zugänglich zu machen. Darüber hinaus sollte mit der neuen Methode eine exakte Caulerpenin Quantifizierung möglich werden, da bei früheren Messungen des Caulerpeningehaltes kein Caulerpeninabbau berücksichtigt wurde. Eine exakte Quantifizierung ist dabei nicht nur für die Bestimmung des Gehaltes in intaktem Gewebe unumgänglich, sondern auch zur Bestimmung der Caulerpeninrestgehalte während der Abbaureaktion erforderlich.

Aufgrund des schnellen Caulerpeninabbaus und der potentiellen Labilität der Produkte nach der Verwundung muss die Extraktions- und Aufarbeitungszeit sehr kurz sein, so dass aufwendige Fraktionierungen nicht in Frage kommen. Ein weiteres Ziel ist ein hoher möglichst selektiver Extraktionserfolg in einem Schritt, d.h. ohne die Extraktion störender Nebenprodukte.

Die selektive Extraktion eines Metaboliten hängt in erster Linie vom Extraktionsmittel ab. Aus der Literatur ist Methanol als Extraktionsmittel für Caulerpenin (7) bekannt. Es wurde von Amade und Lemee bei der Untersuchung der jahreszeitlichen Schwankungen des Caulerpeningehaltes in *C. taxifolia* verwendet.<sup>[66]</sup> Die Verwendung dieser Extraktionsmethode lieferte in den hier durchgeführten Untersuchungen keine zufrieden stellenden Ergebnisse. Ein Grund dafür war die vollständige Mischbarkeit von Methanol mit Wasser. Durch den variierenden Wassergehalt von *C. taxifolia* kam es zu einer unterschiedlich starken Verdünnung des Methanols und damit zu stark schwankenden Probenzusammensetzungen. Da die Extrakte ohne vorheriges langwieriges Einengen vermessen werden sollten, stellte diese Probenheterogenität ein Problem dar. Diese Ungenauigkeit spiegelte sich auch in einem unreproduzierbaren Extraktionserfolg im ersten Extraktionsschritt wieder, der zwischen 78 und 91% lag.

Um eine schnellere, vollständigere und reproduzierbarere Extraktion zu erreichen, wurde die Methode der Extraktion nach Bligh und Dyer angewendet.<sup>[72]</sup> Hierbei handelt es sich um eine Methode, die vor allen Dingen zur Extraktion von Lipiden angewendet wird. Eingesetzt wird ein ternäres Gemisch aus Wasser, Methanol und Chloroform, das durch die Wahl genau aufeinander abgestimmter Volumina zunächst einphasig ist. Nach der Extraktion wird eine Entmischung durch Zugabe von Wasser und/oder Chloroform herbeigeführt. Caulerpenin (7)

befand sich nach der Extraktion ausschließlich in der organischen Phase. Die Extraktion der Algen nach dieser Methode lieferte mit ca. 95% einen guten Extraktionserfolg in einem Extraktionsschritt. Nachteile entstanden allerdings durch die Parallel-Extraktion vieler anderer Substanzen wie z. B. Lipide, die bei der Quantifizierung störten. Insgesamt war die Aufarbeitungszeit, insbesondere bedingt durch die Wartezeiten bei der Phasentrennung, zu lang.

Eine selektivere Extraktion des Caulerpenins (**7**) als mit der Bligh und Dyer Methode wurde durch Ethylacetat erreicht. Dazu wurden die Algen gemörsert und mit Ethylacetat extrahiert. In sehr guter Reproduzierbarkeit wird in einem Extraktionsschritt ein Extraktionserfolg von mehr als 95% für Caulerpenin (**7**) erreicht. Darüber hinaus kann Ethylacetat schnell und vollständig durch Zentrifugation von den gemörserten wässrigen Algenrückständen abgetrennt werden. Die gesamte Extraktion ist sehr schnell durchführbar, und die Extrakte können direkt sowohl mit GC als auch mit HPLC analysiert werden.

Für eine exakte Caulerpeninquantifizierung ist es notwendig, **7** sehr schnell vom Algenhomogenisat abzutrennen, um mögliche enzymatische Umsetzungen oder Reaktionen mit reaktiven Gruppen aus z.B. Proteinen, DNA etc. in der Algenmatrix zu verhindern. Am wirkungsvollsten wurde das durch die Überführung in ein organisches Lösungsmittel erreicht. Ein Grund dafür kann sein, dass Caulerpenin (**7**) im organischen Lösungsmittel nicht mehr von Enzymen angegriffen werden kann, da diese darin nicht mehr aktiv sind. Um eine enzymatische Caulerpeninumwandlung während der Extraktion komplett auszuschließen, wurde als zusätzlicher Schritt das Schockgefrieren des Algenmaterials mit flüssigem Stickstoff dem Extraktionsprotokoll hinzugefügt. Dabei werden Algen, in denen der Caulerpeningehalt in intaktem Gewebe bestimmt werden soll, vor der Extraktion schockgefroren und das kalte Algenmaterial extrahiert, während zum Nachweis des Caulerpenins (**7**) und seiner Folgeprodukte in verwundetem Algengewebe die Algen zunächst gemörsert und erst nach der gewünschten Reaktionszeit mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und extrahiert werden.

### **3.4.2 Entwicklung einer NP-HPLC-Methode**

Nach der Modifizierung der Extraktionsmethode war es auch notwendig, die Analysen- und Detektionsmethode umzustellen. Weil die neue Extraktionsmethode Ethylacetat als Extraktionsmittel einsetzt, wurde die HPLC-Methode von Reversed- auf Normalphase (NP) umgestellt. In Analogie zu der Methode von Valls *et al.* wurden Hexan und Ethylacetat als mobile Phasen verwendet.<sup>[73]</sup> Um mögliche Folgeprodukte erfassen zu können, werden die Extrakte mit Gradientenelution vermessen. Als Detektoren werden DAD/UV und APCI-MS eingesetzt. Der DAD Detektor ermöglicht die Detektion der Analyten bei mehreren

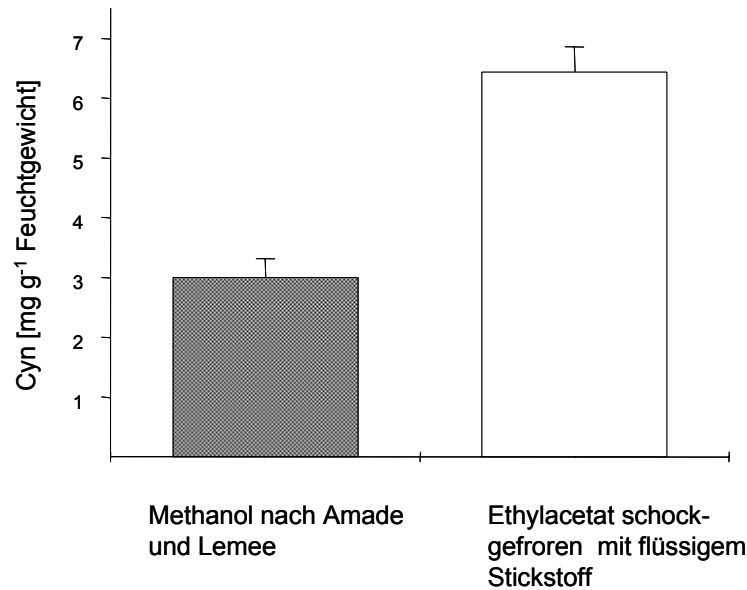
Wellenlängen, der Massendetektor gibt über die Molekülionen und das Fragmentierungsmuster Hinweise auf die Natur der Folgeprodukte. Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) ist die Ionisierungsmethode der Wahl, da sie im Gegensatz zu Elektrosprayionisation (ESI) problemlos in Verbindung mit NP-HPLC einsetzbar ist. Der Grund hierfür sind die unterschiedlichen Ionisierungstechniken. Bei ESI-MS erfolgt die Ionisierung in der flüssigen Phase und ist deshalb stark von der Ionisierbarkeit und der Polarität des Laufmittels, d.h. der mobilen Phase abhängig. Bei APCI-MS werden die Analyt Moleküle erst in der Gasphase ionisiert, was sie von den Eigenschaften des Lösungsmittels unabhängig macht.<sup>[74]</sup>

Die Caulerpeninquantifizierung erfolgte anhand der charakteristischen UV-Absorption bei 252 nm unter Verwendung von 4-Methoxyacetophenon als internem Standard.<sup>[73]</sup>

### 3.4.3 Evaluation unterschiedlicher Extraktionsmethoden

Um die neue Extraktionsmethode mit der in der Literatur etablierten Methode vergleichen zu können, wurde der Caulerpeningehalt in *C. taxifolia* mit der neu erarbeiteten Methode und nach dem Extraktionsprotokoll von Amade und Lemee bestimmt.<sup>[66]</sup> Für die Quantifizierung nach Amade und Lemee wurden intakte *C. taxifolia* eingewogen, in Methanol (10 ml/g Feuchtwicht) überführt und, um einen kompletten Aufschluss des Gewebes zu erreichen, über Nacht bei – 20 °C tiefgefroren. Für die Extraktion nach der neuen Methode wurden ebenfalls intakte Algen eingewogen, dann jedoch wie oben beschrieben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Ethylacetat extrahiert. Die Quantifizierung erfolgte bei beiden Methoden mit NP-HPLC-UV bei 252 nm unter Verwendung von 4-Methoxyacetophenon (**39**) als internem Standard. Es wurden Algen verwendet, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden, um die natürliche Schwankung im Caulerpeningehalt so gering wie möglich zu halten. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Algen keine Verwundung aufwiesen.

Der direkte Vergleich der neu entwickelten Extraktionsmethode mit der Methanolextraktion zeigte einen deutlichen Unterschied in der extrahierten Caulerpeninmenge. Der Caulerpeningehalt wird mit der Methanol-Methode<sup>[66]</sup> signifikant niedriger bestimmt als mit der Ethylacetat-Methode. Der nachgewiesene Caulerpeningehalt bei Ethylacetatextraktion in intaktem Algengewebe ist im Vergleich zur Methanolextraktion etwa doppelt so hoch (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden. Links: Caulerpeningehalt der methanolischen Extrakte nach einem Protokoll von Amade und Lemee.<sup>[66]</sup> Rechts: Nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff und Ethylacetatextraktion. Es ist jeweils der Mittelwert ( $\pm$  SE; N=10) angegeben.

Ausschlaggebend für den höheren Caulerpeningehalt in den Ethylacetatproben dürfte das Schockgefrieren der Algen vor der Extraktion sein. Hierdurch werden alle enzymatischen Prozesse in der Alge gestoppt. Im Gegensatz dazu könnten, bedingt durch die lange Extraktionszeit, den hohen Wassergehalt und die Anwesenheit des Algenmaterials in den Methanolproben, Folgereaktionen ablaufen, die den Caulerpeningehalt reduzieren.

Dieses Ergebnis lässt außerdem vermuten, dass der Caulerpeningehalt in vorangegangenen Untersuchungen, die nach dem Methanol Extraktionsprotokoll durchgeführt wurden, zu niedrig bestimmt wurde. Diese Revision sollte durchaus auch Konsequenzen für die allgemeine Diskussion zur Toxizität der Alge und der fraßhemmenden Eigenschaft von Caulerpenin (**7**) in natürlichen Konzentrationen haben.

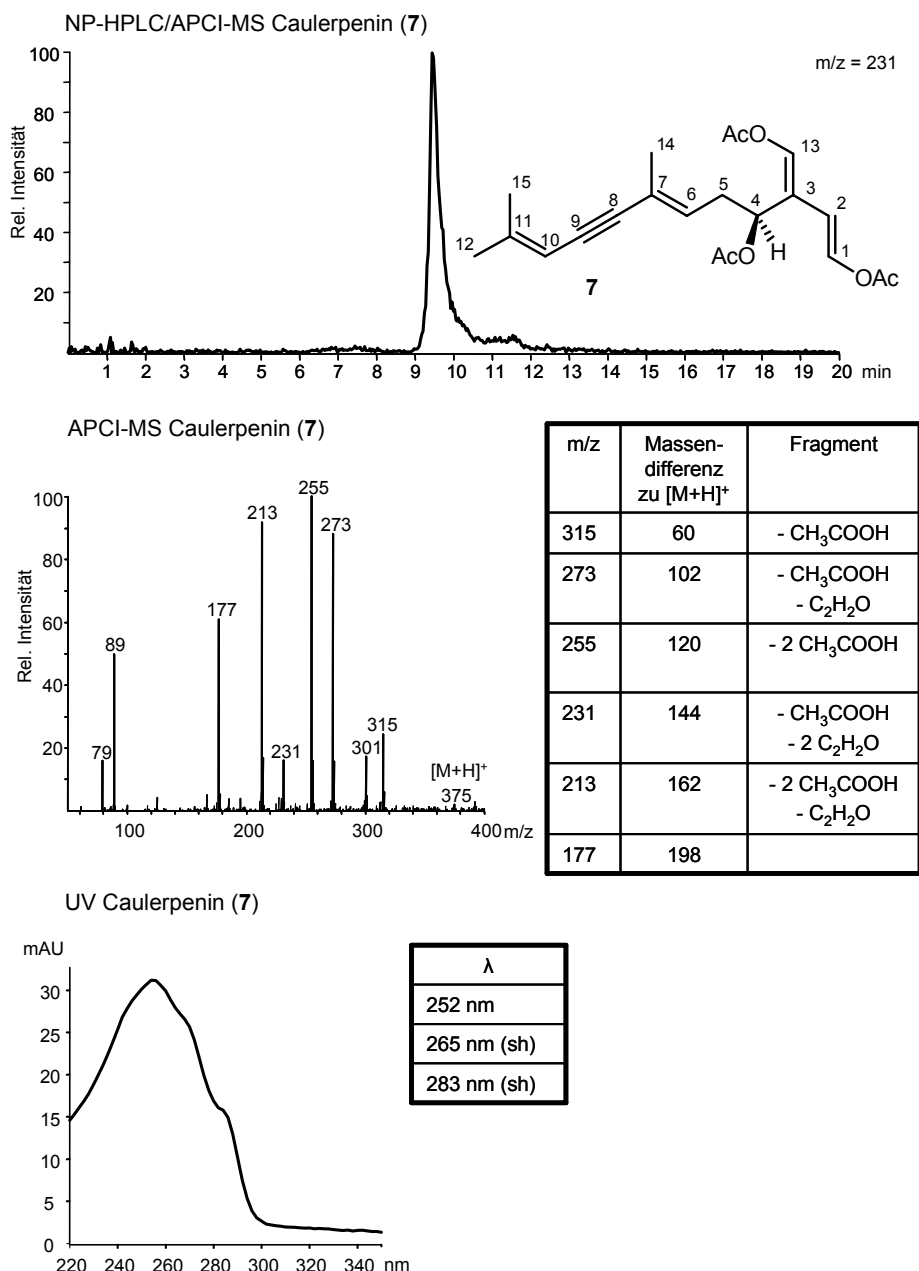
### 3.5 Verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia*

Nachdem das modifizierte Extraktionsprotokoll in den Quantifizierungsversuchen eingehend an intaktem Algengewebe getestet wurde, sollte die Methode auf verwundete Algen übertragen werden. Im direkten Vergleich der Ergebnisse könnten Gemeinsamkeiten oder Unterschiede Hinweise auf mögliche Reaktionen während der Gewebeverletzung geben.

Die Analyse des Caulerpeningehaltes in intaktem Algengewebe, das vor der Extraktion mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, um Folgereaktionen zu verhindern und labile Produkte zu stabilisieren, zeigte Caulerpenin (**7**) als Hauptsekundärmetabolit. Das UV-



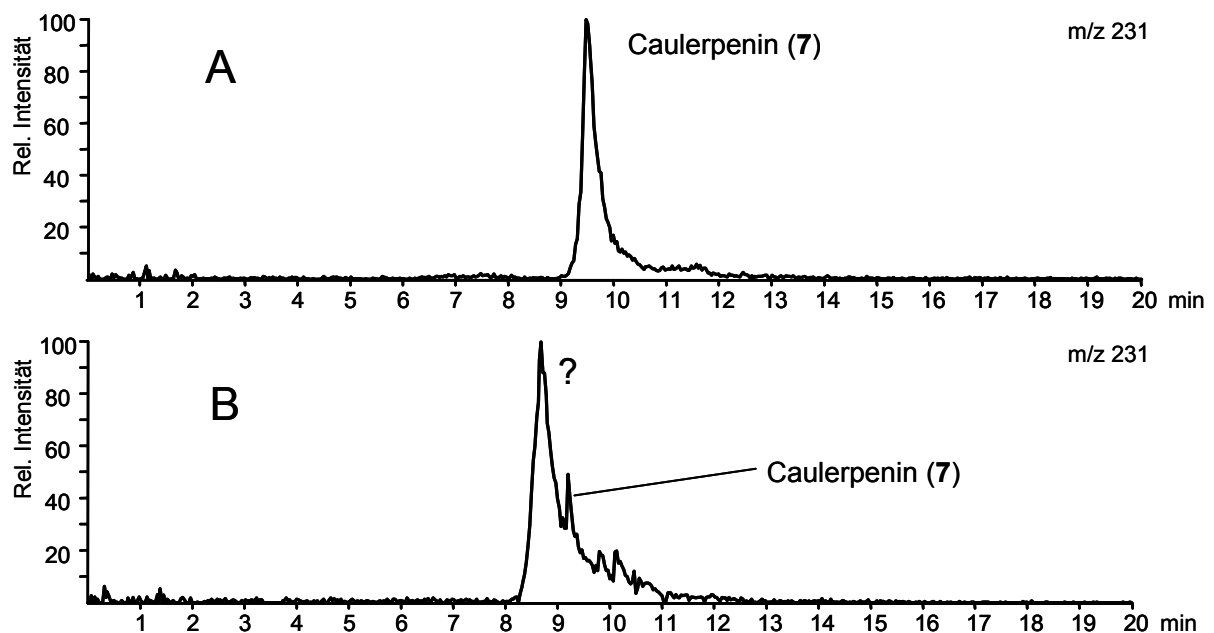
Spektrum stimmte mit den charakteristischen Maxima des Caulerpenins (**7**) bei 252 nm und den Schultern bei 265 und 280 nm überein.<sup>[73]</sup> Dieses Absorptionsspektrum ist charakteristisch für die Dien-in Einheit C6 bis C11 in Caulerpenin (**7**). Im APCI-Massenspektrum ließen sich die einzelnen Fragmentationen eindeutig Caulerpenin (**7**) zuordnen (Abb. 21). Das  $[M+H]^+$ -Ion bei 375 m/z stimmt mit dem Molekulargewicht des Caulerpenins (**7**) überein. Im Massenspektrum konnte die Abspaltung von drei Acetylgruppen beobachtet werden.



**Abbildung 21:** NP-HPLC/APCI-MS von Ethylacetatextrakten intakter *C. taxifolia*. Caulerpenin (**7**) ist die Hauptkomponente. Dargestellt sind das NP-HPLC/APCI-MS bei  $m/z = 231$ , das APCI-MS von **7** und das UV-Spektrum von **7**.

NP-HPLC: Hexan mit 10%, 25 min 100%, 26 min 10% Ethylacetat.

Für die Untersuchung der verwundeten Algen wurden diese 30 s lang zermörsert, das Homogenisat direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann mit Ethylacetat extrahiert. Die direkte Analyse des Extrakts mit DAD/UV und APCI-MS zeigte, dass nach dieser kurzen Reaktionsdauer bereits eine große Menge Caulerpenin (7) abgebaut, bzw. umgewandelt wurde. Im Gegensatz zu den RP-HPLC Untersuchungen konnte ein neuer Peak bei kürzerer Retentionszeit beobachtet werden (Abb. 22). Dieser Peak konnte nur bei der direkten Vermessung des Extrakts nachgewiesen werden. Wartete man nach der Extraktion mit der Analyse, so ließ sich dieses Signal nicht mehr detektieren.

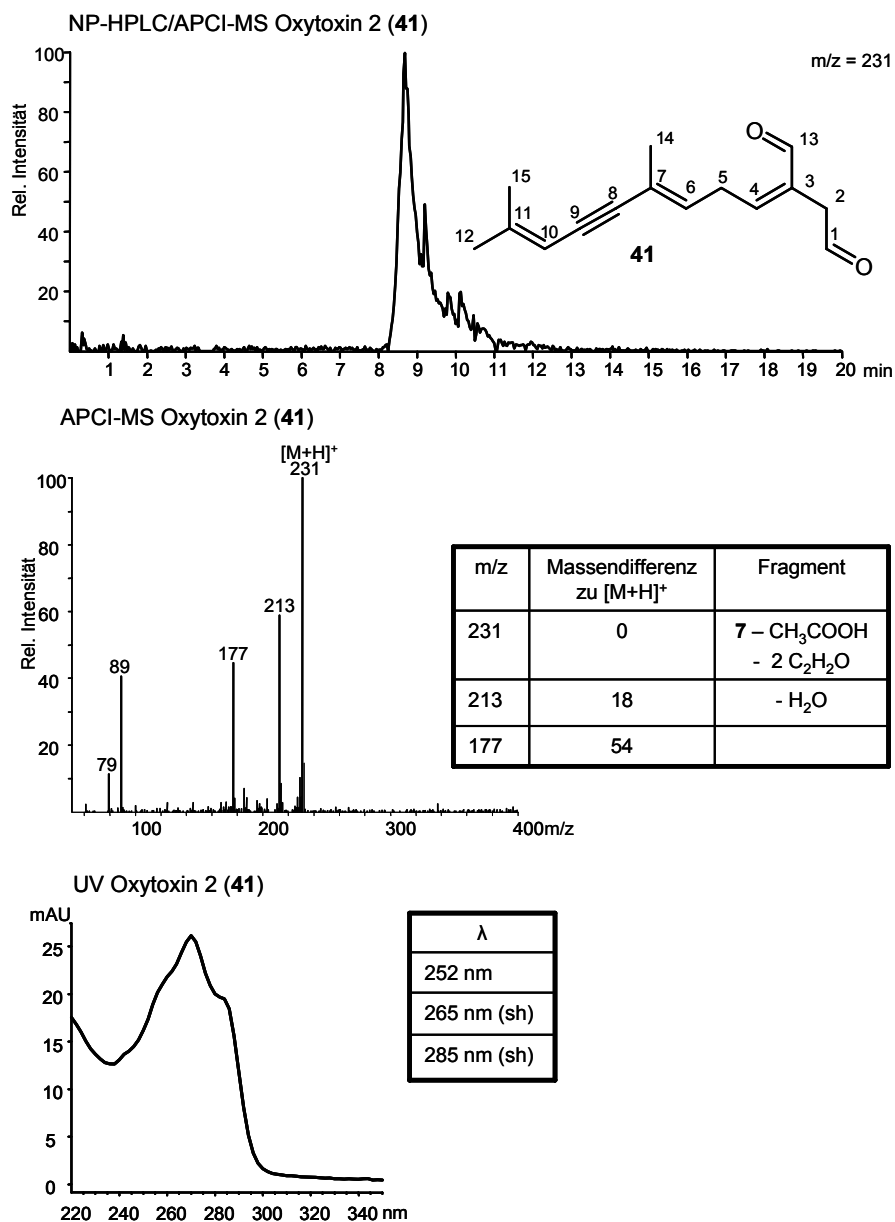


**Abbildung 22:** NP-HPLC/APCI-MS von *C. taxifolia* Ethylacetatextrakten A: aus intakten Algen, Caulerpenin (7) ist der Hauptsekundärmetabolit; B: 30 s nach Verwundung erscheint ein neuer Peak bei kürzerer Retentionszeit. Caulerpenin (7) ist nahezu quantitativ umgewandelt

NP-HPLC: Hexan mit 10%, 25 min 100%, 26 min 10% Ethylacetat

Daraus konnte abgeleitet werden, dass es sich um eine labile Verbindung handelt, die in ihren chromatographischen Eigenschaften Caulerpenin (7) vergleichbar war. Die kürzere Retentionszeit deutete auf eine geringere Polarität hin. Die strukturelle Ähnlichkeit bestätigte auch das DAD-UV-Spektrum, das fast mit den charakteristischen Maxima des Caulerpenins (7) übereinstimmte (Abb. 23). Die charakteristischen Absorptionen zeigten, dass das Dien-in System des Caulerpenins (7) intakt blieb. Beobachtet wurde aber ein im Vergleich zum Caulerpenin (7) insgesamt schmaleres Signal, was durch den Wegfall der Absorption durch die *bis*-Enolacetat-Einheit bei 245 nm zu erklären war.<sup>[75]</sup> Das APCI-Massenspektrum ergab für die neue Verbindung ein Molekulargewicht von 230 (Abb. 23). Die Fragmentationen waren mit denen des Caulerpenins (7) identisch, was wiederum eine nahe strukturelle

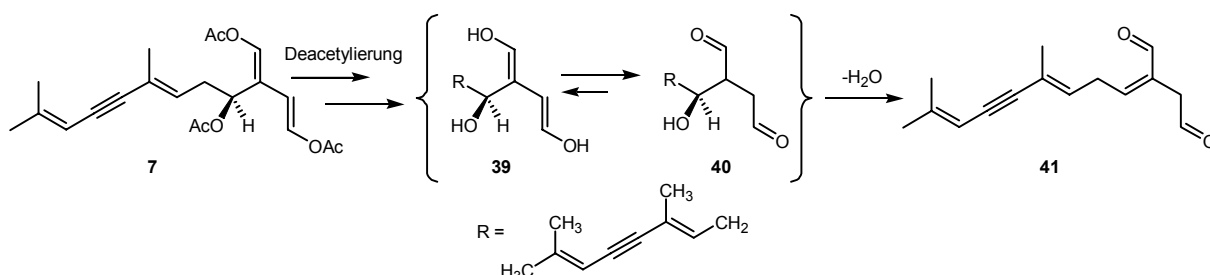
Verwandtschaft zum Caulerpenin (**7**) vermuten ließ. Es konnten keine Abspaltungen von Acetatgruppen beobachtet werden, was vermuten ließ, dass das Molekül diese funktionellen Gruppen nicht mehr enthielt. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Differenz der Molmasse der neuen Verbindung im Vergleich zu Caulerpenin (**7**) von 144. Aus all diesen Ergebnissen wurde für die neue Verbindung als Struktur ein 1,4-Dialdehyd mit dem Sesquiterpen Grundgerüst des Caulerpenins (**7**) vorgeschlagen (Abb. 23).



**Abbildung 23:** NP-HPLC/APCI-MS von *C. taxifolia* Ethylacetatextrakten nach Verwundung. Oxytoxin 2 (**41**) ist die Hauptkomponente. Dargestellt sind das NP-HPLC/APCI-MS bei m/z = 231, das APCI-MS von **41** und das UV-Spektrum von **41**.

NP-HPLC: Hexan mit 10%, 25 min 100%, 26 min 10% Ethylacetat.

Die Entstehung des Dialdehyds (**41**) könnte durch die Abspaltung aller drei Acetylgruppen erklärt werden. Dabei würde die einzige nach Tautomerisierung verbleibende Hydroxygruppe unter Wasserabspaltung eliminiert, und es entstünde eine ungesättigte terminale 1,4-Dialdehydfunktion am Caulerpeningrundgerüst (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Postulierter Mechanismus zur Entstehung von Oxytoxin 2 (**41**) aus Caulerpenin (**7**): Nach enzymatischer Deacetylierung kommt es zur Wasserabspaltung mit dem acideren Proton an C4.

Die Lage der zusätzlichen Doppelbindung, die durch die Eliminierung von Wasser entsteht, wurde aus den UV-Daten eindeutig bestimmt. Sie liegt nicht in Konjugation zum dien-in System vor, da in diesem Fall eine bathochrome Verschiebung der Signale und ein weiterer  $\Pi - \Pi^*$  Übergang auftreten müsste, was hier jedoch nicht beobachtet werden konnten.<sup>[75]</sup>

Der Dialdehyd (**41**) wurde bereits neben dem Monoaldehyd (**23**) im Abwehrsekret mariner Schnecken, die ausschließlich auf Grünalgen der Gattung *Caulerpa* fressen, nachgewiesen.<sup>[76]</sup> Bisher wurde angenommen, dass die Schnecken Caulerpenin (**7**) über die Nahrung aufnehmen und in die Aldehyde Oxytoxin 1 (**23**) und Oxytoxin 2 (**41**) umwandeln, um sie dann im Angriffsfall zu ihrer Verteidigung einzusetzen. Der Nachweis der Aldehyde in den Algen selbst weist nun die Möglichkeit einer biosynthetischen Alternativroute über die direkte Aufnahme der Aldehyde aus der Nahrung auf und macht biosynthetische Untersuchungen zur Herkunft der Aldehyde in den Schnecken notwendig. Hierzu wurde mit Untersuchungen an *Oxynoe olivacea* und *Lobiger serradifalci* (Abb. 25) in Nizza begonnen, bei denen die Schnecken mit einer künstlichen Diät ernährt wurden, die definierte Mengen Caulerpenin (**7**) oder Caulerpeninvorstufen enthielt. Eine Quantifizierung des Caulerpenins (**7**) und der Aldehyde im Wehrsekret, sollte Hinweise auf die Aufnahme und Metabolisierung geben. Weil es sich bei diesen Schnecken jedoch um spezialisierte Herbivore handelt, die ausschließlich auf siphonalen Grünalgen der Gattung *Caulerpa* fressen, akzeptierten sie das künstliche Futter nicht. Darüber hinaus standen, weil ihre Haltung und Nachzucht im Aquarium nur bedingt möglich ist, nicht genug Versuchstiere zur Verfügung, so dass die Versuche abgebrochen werden mussten.



**Abbildung 25:** *Oxynoe olivaceae* und *Lobiger serradifalci* auf *C. taxifolia*.

Der Strukturvorschlag des entstandenen Dialdehyds **41** sollte durch NMR Daten komplettiert werden. Doch scheiterte sowohl die Isolierung als auch die Anreicherung dieses Metaboliten mit HPLC-Methoden an seiner Instabilität. Auch Cimino *et al.* berichteten, dass die Aufnahme eines  $^1\text{H-NMR}$  Spektrums von **41** nur durch die direkte Extraktion der Schnecken in deuteriertem Lösungsmittel gelang. Weitere NMR Spektren konnten nicht erhalten werden, da Oxytoxin 2 (**41**) nicht über eine längere Messdauer stabil war.<sup>[76]</sup> Die direkte Extraktion von *C. taxifolia* in Analogie zu den Untersuchungen von Cimino *et al.* lieferte kein  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Oxytoxin 2 (**41**). Ursache hierfür waren vermutlich Matrixeffekte, bei denen es zu einer Reaktion des Dialdehyds mit reaktiven Gruppen in den verwundeten Algen kam. Nach welchem Mechanismus eine Stabilisierung der Aldehyde in den Schnecken erreicht wird, ist bisher nicht bekannt.

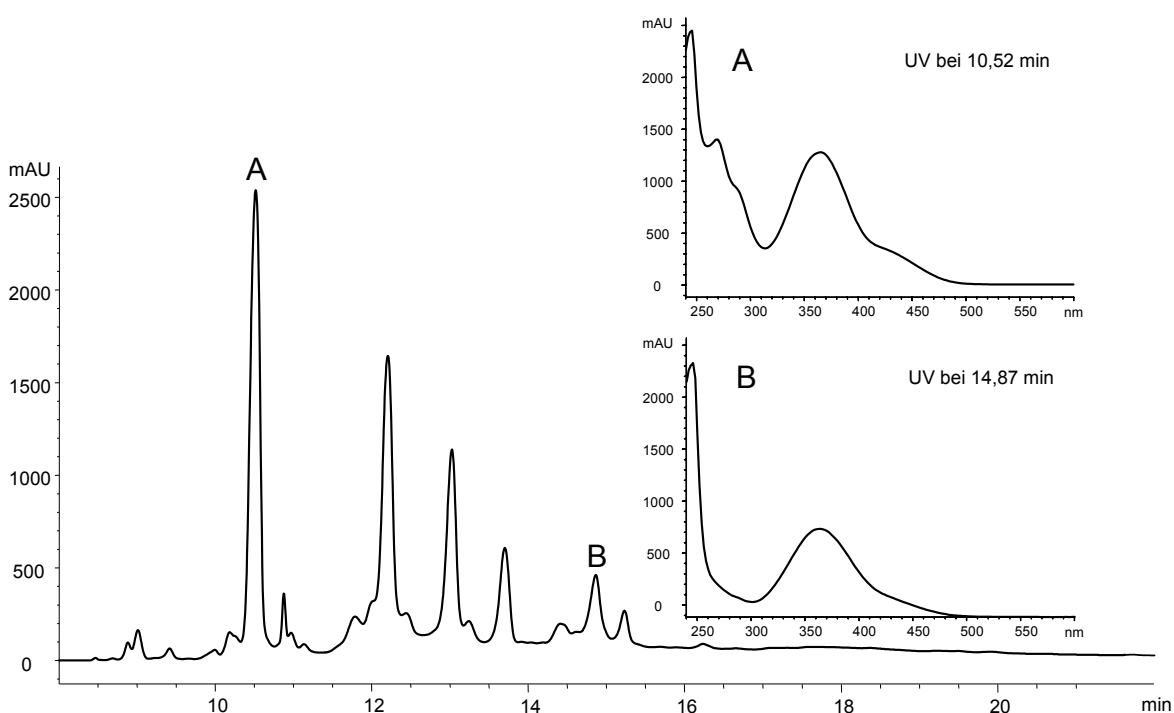
### 3.5.1 Derivatisierung der labilen Caulerpeninfolgeprodukte

Zur Absicherung des Strukturvorschlags des postulierten Dialdehyds (**41**) war es notwendig, diesen labilen Metaboliten durch Derivatisierung zu stabilisieren, um die Struktur in NMR-spektroskopischen Messungen eindeutig bestimmen zu können. Der Dialdehyd (**41**) entsteht formal durch die Abspaltung der drei Acetylgruppen aus Caulerpenin (**7**), Tautomerisierung und Wasserabspaltung. Die Abspaltung der Acetylgruppen könnte dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass alle drei Acetylgruppen auf einmal abgespalten werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass sie nacheinander abgespalten werden. Die schrittweise Abspaltung könnte eine Vielzahl intermediärer Aldehyde zur Folge haben. Bei einer direkten Derivatisierung im verwundeten Algenmaterial würde in diesem Fall nicht nur der Dialdehyd **41** derivatisiert werden, sondern es könnten auch alle weiteren intermediären freien Aldehyde erfasst werden. Der Nachweis von Intermediaten könnte gleichzeitig zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus genutzt werden.

Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) werden Aldehyde in Hydrazone überführt, die stabil chromatographierbar sind und sowohl mit LC- als auch mit GC-Techniken analysiert werden

können.<sup>[77]</sup> Zusätzliche Information erhält man durch die starke, charakteristische UV-Absorption der 2,4-Dinitrophenylhydrazone zwischen 360 und 380 nm, was sie zu einem hervorragenden Analyten für die UV-Detektion macht. Massenspektren dieser Derivate liefern intensive Molekülionen, die für eine Strukturaufklärung hilfreich sind.<sup>[77]</sup> Charakteristische Fragmente können mit sanften Ionisierungstechniken, d.h. unter CI Bedingungen in der GC/MS und API Methoden in der HPLC/MS, erhalten werden. Aus diesen Gründen war die Methode der Wahl zur Analyse der Hydrazone erneut die NP-HPLC mit DAD-UV und APCI/MS Detektion.

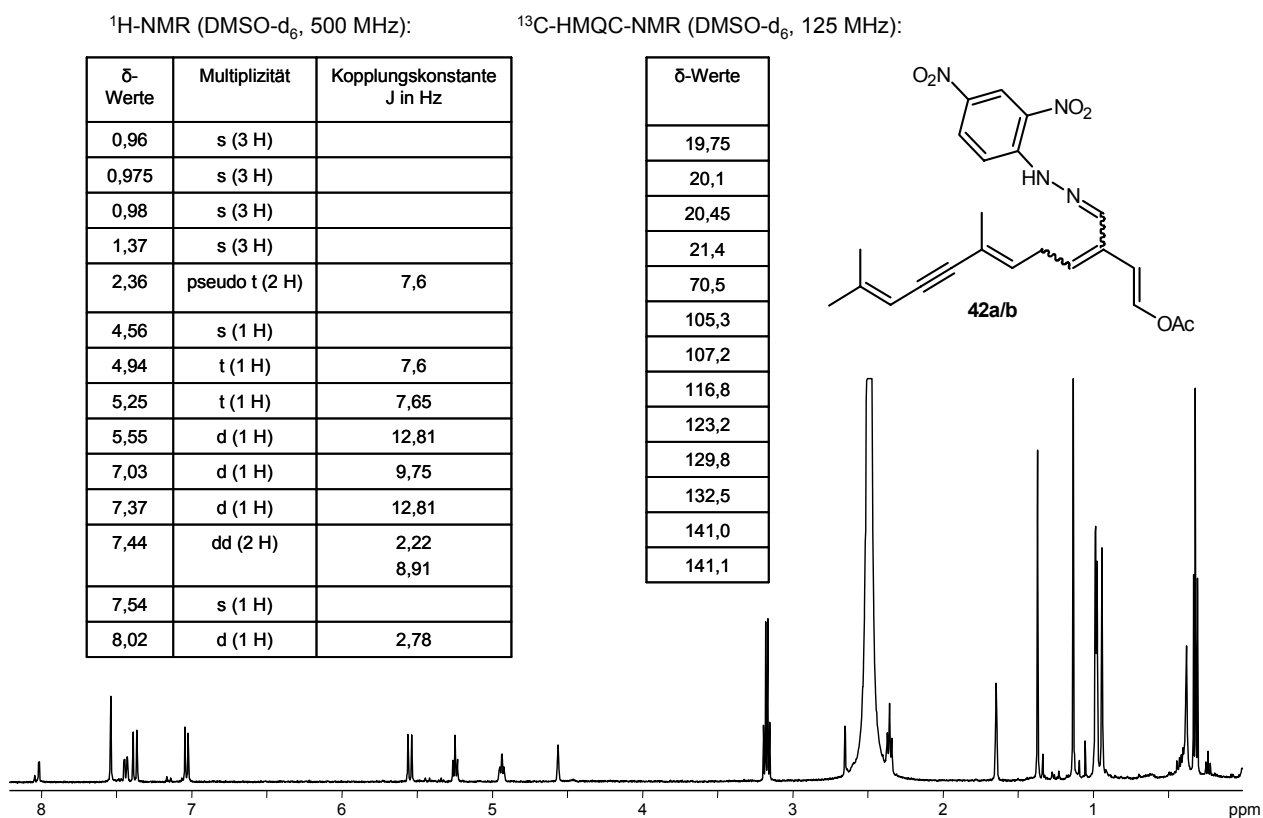
Um eine HPLC-Methode mit APCI-MS für Hydrazone erstellen zu können, wurde zunächst ein semipräparativer Standard hergestellt. Dazu wurde aus *C. taxifolia* extrahiertes und säulenchromatographisch aufgereinigtes Caulerpenin (**7**) zu einer sauren ethanolischen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) gegeben. Säurekatalysiert wurden die Acetatgruppen des Caulerpenins (**7**) (Abb. 26) abgespalten und die entstandenen Aldehyde als Hydrazone abgefangen. Diese fielen aus der Lösung aus, wurden in Ethylacetat gelöst und an der HPLC vermessen.



**Abbildung 26:** NP-HPLC-UV des semisynthetischen Hydrazone-Standards bei 380 nm; A: UV-Spektrum von **42** bei 10,5 min. B: UV-Spektrum von **50 a/b** bei 14,9 min.  
NP-HPLC: 0%, 25 min 100%, 27 min 100%, 27,5 min 0% Ethylacetat

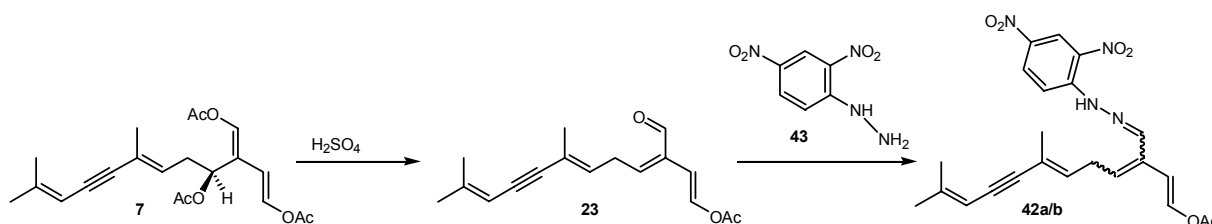
Dabei wurde eine Vielzahl strukturell eng verwandter Hydrazone detektiert (Abb. 26). Durch präparative NP-HPLC wurden 150 µg der Hauptkomponente des Standards gesammelt und damit NMR-Experimente durchgeführt (Abb. 27). Aus dem Massenspektrum wurde für die

Verbindung eine Masse von 452 bestimmt, die den Verlust von zwei Acetylgruppen aus Caulerpenin (**7**) und Derivatisierung einer Aldehydfunktionalität vermuten lässt. In Einklang mit den spektroskopischen Eigenschaften konnte die Struktur **42** für diese Komponente aufgeklärt werden.



**Abbildung 27:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **42**. Durch Einbeziehung der Werte aus dem <sup>13</sup>C-HMQC-Experiment gelang die Strukturaufklärung.

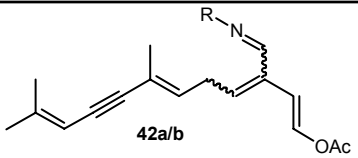
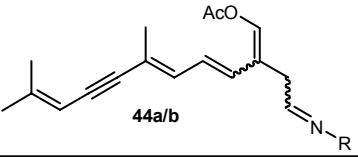
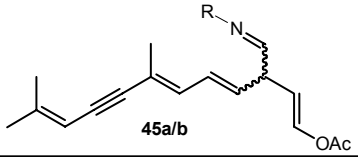
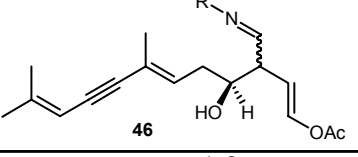
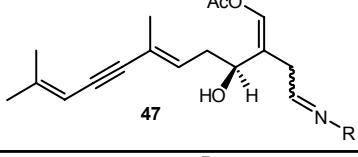
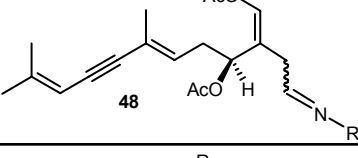
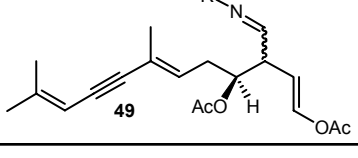
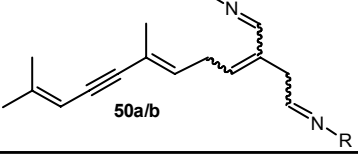
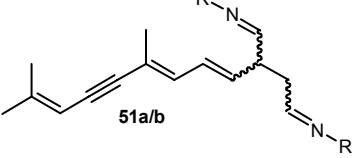
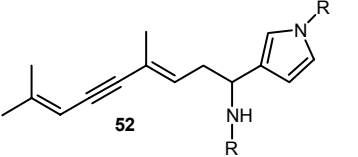
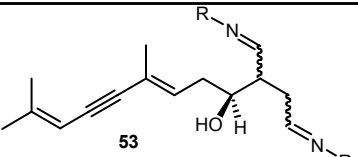
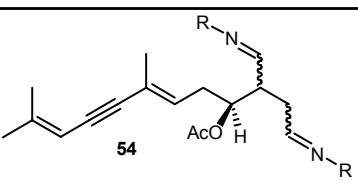
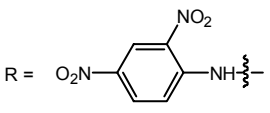
Es handelte sich um einen caulerpeninabgeleiteten Aldehyd **42**, der durch die Abspaltung der Acetylgruppe an C4 und einer Acetylgruppe aus der Enolacetat-Einheit an C13, Tautomerisierung und nachfolgender säurekatalysierter Wasserabspaltung entstanden war (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Säurekatalysierte Deacetylierung von Caulerpenin (**7**) zu Oxytoxin 1 (**23**) und Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) zu **42**.

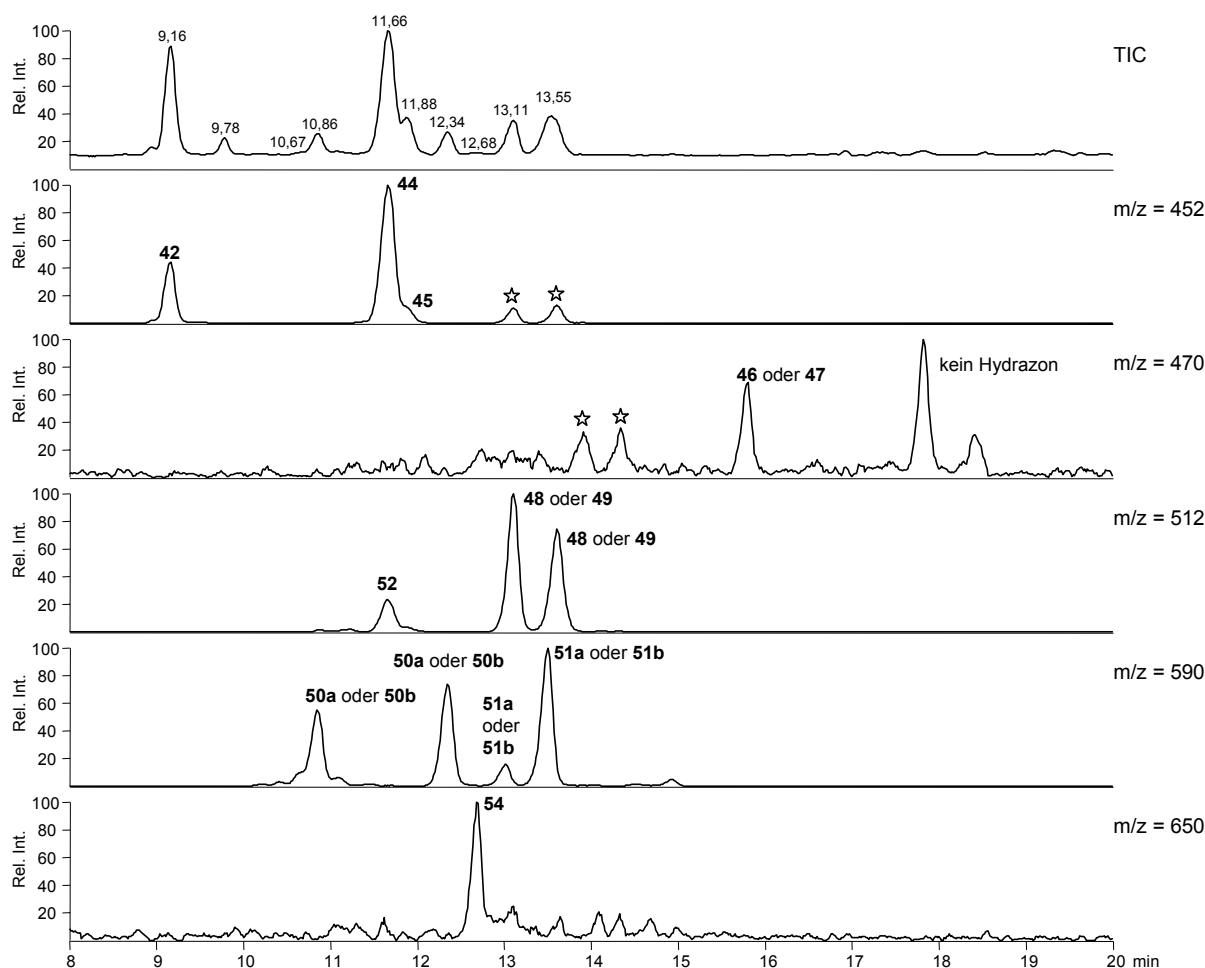
Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der anderen Fraktionen aus der präparativen HPLC zeigten, dass es sich um Gemische handelte. Weil diese Gemische nicht weiter aufgetrennt und ihre einzelnen Komponenten isoliert werden konnten, mussten die Strukturen mit Hilfe der Massenspektren und UV-Daten von **42** abgeleitet und unter Berücksichtigung der chromatographischen Eigenschaften zugeordnet werden. Da es sich bei **42** um einen Aldehyd handelt, der durch die Abspaltung von zwei Acetylgruppen entstanden ist, wurde davon ausgegangen, dass auch weitere Aldehyde, die durch die Abspaltung einer, zwei oder aller drei Acetylgruppen aus unterschiedlichen Positionen im Caulerpeningerüst entstehen, in dem Standard nachgewiesen werden könnten. Mögliche Strukturen der Hydrazone sind auf der nächsten Seite dargestellt (Tab. 1).



Abspaltung von:	m/z	Strukturvorschlag	Strukturvorschlag
zwei Acetylresten von C4 und C13, Doppelbindung zwischen C3 und C4	452		
zwei Acetylresten von C4 und C1 oder C4 und C13, Doppelbindung zwischen C4 und C5	452		
zwei Acetylresten von C4 ohne Wassereliminierung und C1 oder C13	470		
einem Acetylrest von C1 oder C13	512		
drei Acetylresten Doppelbindung zwischen C3 und C4	590		
drei Acetylresten Doppelbindung zwischen C4 und C5	590		
drei Acetylresten unter Ausbildung eines Pyrrolrings	590		
drei Acetylresten ohne Wasser-eliminierung	608		
zwei Acetylresten von C1 und C13	650		

**Tabelle 1:** Darstellung möglicher Hydrazone, die bei der säurekatalysierten Caulerpenin-umwandlung entstehen können.

Eine erste Zuordnung der Strukturen wurde über die molaren Massen der Hydrazone erreicht. Im APCI-MS konnten die in Tabelle 1 postulierten Molekülonen nachgewiesen werden, die dazugehörigen Peaks sind in den Massenspuren dargestellt (Abb. 29).



**Abbildung 29:** NP-HPLC/APCI-MS Detektion der Hydrazone des semisynthetischen Standards. Dargestellt sind die Massenspuren für die einzelnen Molekülonen. Mit \* bezeichnete Signale sind Fragmentationen und keine Molekülonen.

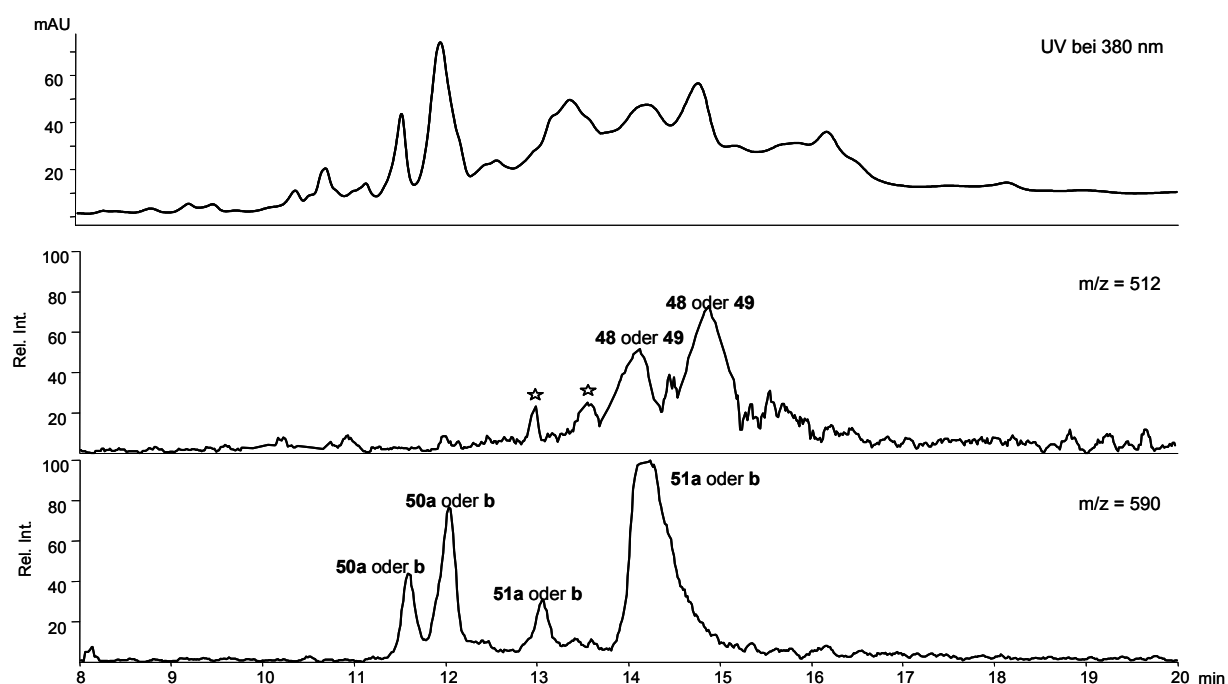
NP-HPLC: 0%, 25 min 100%, 27 min 100%, 27,5 min 0% Ethylacetat

Bis auf das Ion mit der Massenzahl 608 konnten alle Massen der postulierten Hydrazone tatsächlich im semisynthetischen Standard nachgewiesen werden. Durch die Einbeziehung der UV Daten konnte teilweise zwischen den einzelnen Isomeren unterschieden werden. Ausschlaggebend hierfür ist die Lage der Doppelbindung. Während bei z.B. **42 a/b** das Grundgerüst des Caulerpenins (**7**) intakt bleibt, entsteht durch die Einführung der Doppelbindung zwischen C4 und C5 in **51 a/b** ein konjugiertes Trien-in System, was sich durch den Wegfall des Caulerpeninanteils am Gesamtspektrum zeigt (Abb. 26, Inserts A und B). Die Hydrazone des semisynthetischen Standards können durch all zugeordnet werden (Abb. 29).

### 3.5.2 Derivatisierung von Caulerpeninfolgeprodukten in verwundeten Algen

Mit der Derivatisierung stand eine Methode zum Nachweis von Caulerpeninfolgeprodukten, die eine oder mehrere Aldehydfunktionalitäten besitzen, zur Verfügung. Durch direkte Derivatisierung in verletztem Algengewebe und Vergleich mit den Hydrazonen aus dem semisynthetischen Standard, sollten die reaktiven Intermediate auch hier als Hydrazone nachgewiesen werden können.

Zur Derivatisierung der Folgeprodukte in verwundeten *C. taxifolia* wurden die Algen zermörsert und mit wenig Ethanol extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der ethanolische Überstand abgenommen und mit gesättigter 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) Lösung versetzt. Diese Vorextraktion mit Ethanol war notwendig, um die entstehenden Hydrazone von der Algenmatrix abtrennen zu können. Die Hydrazone fielen aus der Lösung aus, wurden in Ethylacetat gelöst und mit NP-HPLC-MS vermessen. Im HPLC-UV war nicht nur ein dem Hydrazon von **41** entsprechender Analyt zu finden, sondern es waren erneut eine Vielzahl strukturverwandter Hydrazone zu erkennen (Abb. 30). Der Vergleich der Komponenten des semisynthetischen Standards mit den derivatisierten Algenextrakten, zeigte übereinstimmende Produkte für die Hydrazone der Massen 512 und 590.



**Abbildung 30:** NP-HPLC/APCI-MS Detektion von Hydrazonen aus verwundeten *C. taxifolia*. Dargestellt sind die Massenspuren für die einzelnen Molekülonen. Mit \* bezeichnete Signale sind Fragmentationen und keine Molekülonen.

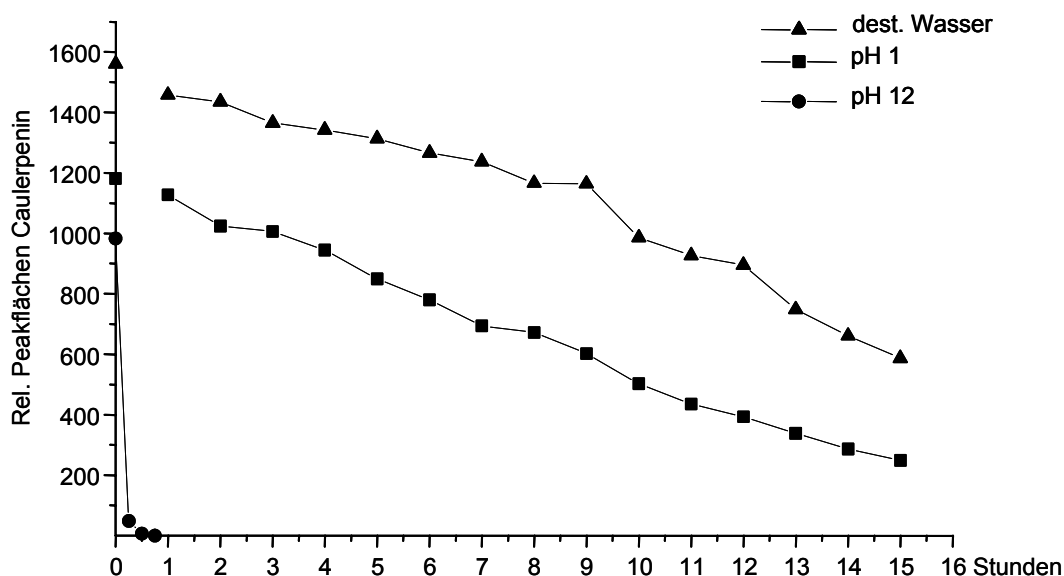
NP-HPLC: 0%, 25 min 100%, 27 min 100%, 27,5 min 0% Ethylacetat.

Darüber hinaus konnten in den verwundeten Algen keine weiteren Hydrazone detektiert werden. Die Tatsache, dass keine Hydrazone der Masse 452 nachgewiesen werden konnten, wird auf die schnelle Umsetzung zum Dialdehyd (**41**) zurückgeführt.

Die Derivatisierung von intaktem Algenmaterial, d.h. Algenmaterial, das vor der Extraktion mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, führte zu keiner Hydrazonbildung. Eine Deacetylierung des Caulerpenins (**7**) zu den Aldehyden findet also nur in verwundeten Algen statt. Daher kann von einer verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung gesprochen werden. Diese beginnt unmittelbar nach der Verwundung und führt, wie der Nachweis der Hydrazone mit der Masse 512 zeigt, über eine schrittweise Deacetylierung des Caulerpenins (**7**) und Tautomerisierung zu Aldehyden. Dabei resultiert als Endprodukt aus der Reaktion der Dialdehyd **41**, dessen Derivate mit der Masse 590 in den Abfangreaktionen mit verwundeten Algen dominant waren. Die Umsetzung von **7** zum Endprodukt **41** läuft in den Verwundungsexperimenten sehr schnell ab. Die schnelle Umsetzung wird auch dadurch bestätigt, dass außer geringen Mengen der Hydrazone mit der Masse 512 keine weiteren Intermediate detektiert werden konnten.

### 3.5.3 Nachweis der enzymatischen Deacetylierung

Betrachtet man die nachgewiesenen Aldehyde, stellt sich die Frage, wie die Acetylgruppen des Caulerpenins (**7**) abgespalten wurden. Chemisch wäre die Deacetylierung unter sauren oder unter basischen Bedingungen möglich. HPLC-Messungen von Caulerpenin (**7**) in destilliertem Wasser dessen pH-Wert mit Salzsäure auf eins eingestellt wurde, zeigten eine langsame Umwandlung mit einer Halbwertszeit von acht Stunden. Messungen in destilliertem Wasser ergaben eine Halbwertszeit von 13,5 Stunden und einen Abbau mit vergleichbarer Kinetik. Im Gegensatz dazu lief die Deacetylierung von Caulerpenin (**7**) in destilliertem Wasser das mit Natronlauge auf pH 12 gebracht wurde sehr schnell ab und war bereits nach 45 min vollständig (Abb. 31). Die Halbwertszeit betrug nur etwa zehn Minuten.



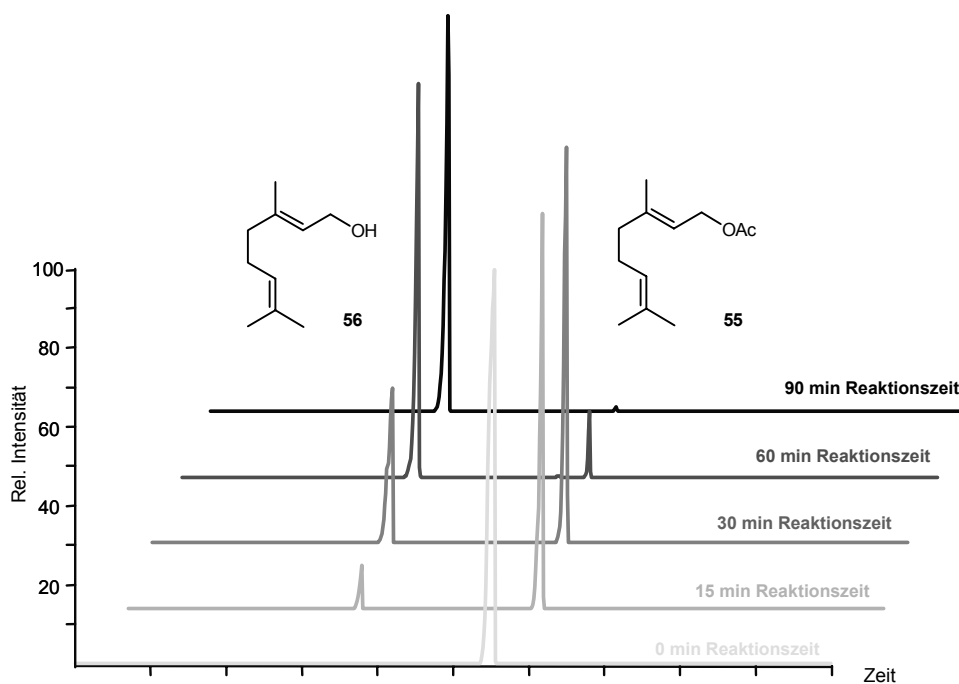
**Abbildung 31:** Stabilität von Caulerpenin (7) in destilliertem Wasser, in verdünnter Salzsäure (pH 1) und in verdünnter Natronlauge (pH 12).

Der pH-Wert im Algenhomogenisat liegt im nahezu neutralen Bereich zwischen sechs und sieben. Damit kann eine spontan ablaufende chemische Deacetylierung des Caulerpenins (7) in den Algen ausgeschlossen werden.

Sowohl die Umsetzungsgeschwindigkeit von 7 durch verwundete Algen von wenigen Minuten, als auch die milden Reaktionsbedingungen machen einen enzymatischen Reaktionsverlauf wahrscheinlich. Dafür spricht auch die Tatsache, dass in Algen, die eine Minute auf 100 °C erhitzt wurden, nach Verwundung keine Caulerpeninumwandlung mehr nachgewiesen werden konnte.

Enzyme, die Bindungsspaltungen durch Reaktion mit Wasser katalysieren, werden Hydrolasen genannt. Zu dieser Gruppe gehören Lipasen und Esterasen, die beide Esterspaltungen katalysieren. Sie unterscheiden sich dadurch, dass die bevorzugten Substrate der Lipasen Triglyceride und andere wasserunlösliche Fettsäureester sind, wohingegen Esterasen wasserlösliche Ester als Substrate bevorzugen.<sup>[78]</sup> Ob es sich um Esterasen handeln kann, die nach Verwundung Caulerpenin (7) aus *C. taxifolia* zu reaktiven Aldehyden umwandeln, soll anhand der Deacetylierung von Modellsubstraten untersucht werden. Dazu wurde zunächst das Sesquiterpen Farnesylacetat als Substrat ausgewählt und zu verwundeten *C. taxifolia* gegeben. Falls eine unselektive Esterase in verletzten *C. taxifolia* aktiv wäre, müsste Farnesylacetat deacetyliert und in den korrespondierenden Alkohol Farnesol überführt werden. Im Gegensatz zu der Vielzahl an reaktiven Deacetylierungsprodukten in der Alge, dürfte hierbei als stabiles Endprodukt der Umsetzung nur Farnesol entstehen. Weil sowohl Farnesylacetat als auch Farnesol gaschromatographisch sehr gut und schnell nachgewiesen werden können, wurde die

Untersuchung der Umwandlung im Algenhomogenisat mit GC/MS durchgeführt. Die in regelmäßigen Zeitabständen durchgeführten Messungen zeigten tatsächlich eine enzymatische Deacetylierung. Um die Substratspezifität der Esterase zu testen, wurde in weiteren Versuchen das Monoterpen Geranylacetat (**55**), unter gleichen Bedingungen dem Algenhomogenisat zugesetzt. Auch hier war die Umwandlung in den korrespondierenden Alkohol Geraniol (**56**) mit ähnlicher Effizienz zu beobachten (Abb. 32). In 90 min wurden so bis zu 4 mg Farnesyl- bzw. Geranylacetat (**55**) pro Gramm verwundeter Alge vollständig zu Farnesol bzw. Geraniol (**56**) umgewandelt (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Verfolgung (GC/MS) der Umwandlung von Geranylacetat (**55**) zu Geraniol (**56**) in verwundeten *C. taxifolia*.

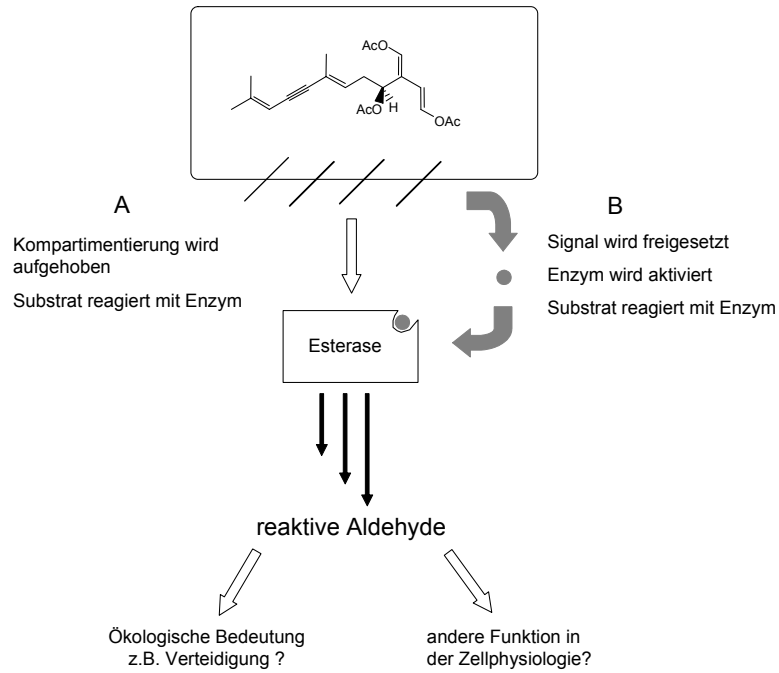
Diese Beobachtungen geben erste Hinweise darauf, dass es sich bei dem Enzym, das Caulerpenin (**7**) nach Verwundung deacetyliert, um eine Esterase handelt. Die hohe Substrattoleranz deutet auf eine unspezifische Esterase hin, die über einen längeren Zeitraum starke Aktivität aufweist. Die Effizienz der Umwandlung zeigt, dass die beteiligten Enzyme hohe Turnover Raten besitzen oder in großen Mengen in der Alge vorliegen müssen. Auch die Beteiligung mehrerer Esterasen kann möglich sein. Durch selektive Inhibierungsversuche mit unterschiedlichen Esteraseinhibitoren sollten weitere Informationen über die Esterase erhalten werden. Die Applikation des Acetylcholinesteraseinhibitors Eserin (Physostigmin), einem Alkaloid aus der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*), führte in Mengen von 100  $\mu\text{M}$  zu keiner nachweisbaren Inhibierung. Da Caulerpenin (**7**) jedoch keine strukturelle Ähnlichkeit zu Acetylcholin aufweist, ist die nicht nachweisbare Inhibierung unter Umständen auf eine Substratspezifität des Inhibitors zurückzuführen. In Inhibierungs-

experimenten, bei denen dem Algenhomogenisat der universelle Esteraseinhibitor Ebelacton B in mikromolaren Mengen zugesetzt wurde, wurde eine deutlich verlangsamte Umsetzung zum korrespondierenden Alkohol beobachtet. Ebelacton B ist ein aus Actinomyceten gewonnener Inhibitor, der Esterasen sowie Lipasen und ausgewählte Peptidasen hemmt (Information Serva). Mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Ebelacton B konnte eine etwa 30%-ige Inhibierung beobachtet werden. Allerdings konnte auch mit höheren Konzentrationen Ebelacton B keine vollständige Inhibierung erreicht werden.

#### 3.5.4 Kompartimentierung von Enzym und Substrat in der Alge

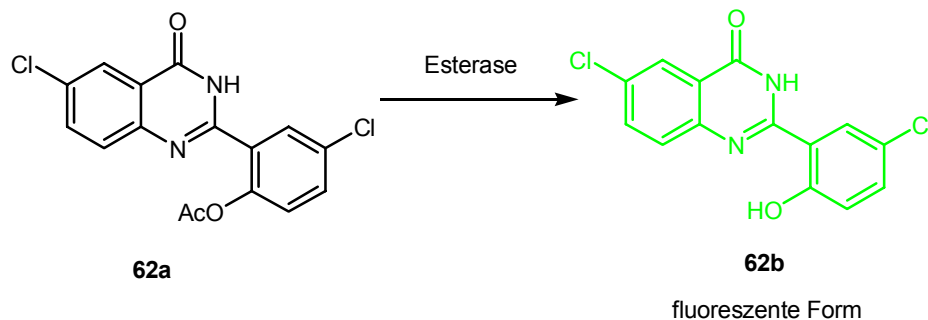
Nachdem die Esterase zur Umwandlung von Caulerpenin (7) nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, wie es die einzellige Alge schafft, Enzyme und Substrat so zu speichern, dass es zu keiner Selbstvergiftung der intakten Alge kommt. Aus terrestrischen Pflanzen ist bekannt, dass sie Vorstufen aktiver Metabolite und die Enzyme, die für eine solche Aktivierung notwendig sind oft räumlich getrennt in unterschiedlichen Kompartimenten ihrer Zellen speichern. Erst wenn die Kompartimentierung z. B. durch Zerstörung des Gewebes aufgehoben wird, kommt das Enzym mit dem Substrat in Kontakt und die Reaktion kann ablaufen. So speichert z.B. Liguster (*Ligustrum obtusifolium*) seinen Verteidigungsmetabolit Oleuropein in den Vakuolen und dem Cytoplasma seiner Zellen und die zur Aktivierung notwendigen Glucosidasen in den Zellorganellen. Wird die Pflanze z.B. durch Raupen befallen, wird die Kompartimentierung zerstört und das Substrat kommt mit den Enzymen in Kontakt, wobei es in die aktive Form überführt wird. <sup>[79]</sup>

Ob die Vermeidung der Deacetylierung in *C. taxifolia* ebenfalls über eine Kompartimentierung erreicht wird (Abb. 33 A), oder ob die Esterase in der intakten Zelle inhibiert wird und erst durch ein Signal bei der Verwundung biochemisch aktiviert werden (Abb. 33 B), soll untersucht werden.



**Abbildung 33:** Schematische Darstellung der möglichen Abläufe der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung. A: Eine bestehende Kompartimentierung von Enzym und Substrat wird aufgehoben. B: Über ein Signal oder einen Co-Faktor kommt es zur Aktivierung des Enzyms.

Erste Informationen zur Lokalisierung der Esterasen bzw. der Esteraseaktivität in *C. taxifolia* könnten durch Epifluoreszenz Mikroskopie unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs ELF 97 (**57**) (Molecular Probes) (Abb. 34) erreicht werden.



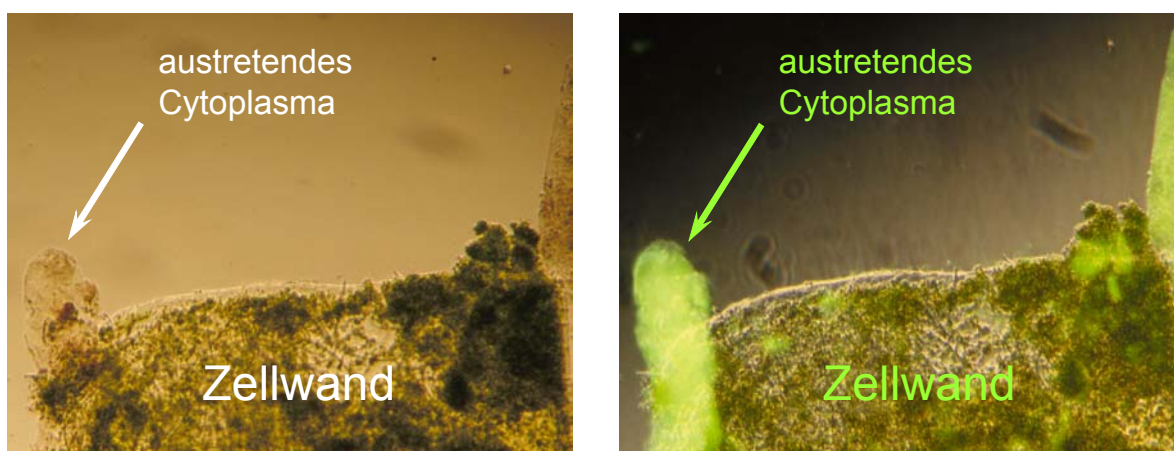
**Abbildung 34:** Umwandlung des Esterasesubstrats ELF 97 (**57 a**) zur deacetylierten fluoreszenten Form (**57 b**)

Bei dem fluorogenen Substrat handelt es sich um ein Acetat (**57 a**), das erst durch Deacetylierung in seine fluoreszente Form (**57 b**) überführt wird (Abb. 35). Die gelbgrüne Fluoreszenz tritt nach der Inkubation im Algengewebe nur in Regionen mit Esteraseaktivität auf. Da es sich bei *C. taxifolia* um einen einzelligen Organismus handelt, sind die Möglichkeiten zur Kompartimentierung von Enzym und Substrat begrenzt. Zur Verfügung



stehen die Zellwand, das Cytoplasma, die Organellen im Cytoplasma und der Vakuoleninhalt (vgl. Abb. 4). Dieser vergleichsweise einfache Aufbau erlaubt eine schnelle Präparation.

Zur Untersuchung der Esteraseaktivität in *C. taxifolia* wurde die Alge auf Eis präpariert, um das Enzym möglichst lange aktiv zu halten. Der Farbstoff wurde an den präparierten Algenbestandteilen appliziert und das Präparat mit Licht der Wellenlänge 300 nm angeregt. Bei der Betrachtung im Epifluoreszenz Mikroskop bei 550 nm war deutlich zu erkennen, dass die Zellwand nicht angefärbt wurde. Eine starke Fluoreszenz und damit auch eine starke Esteraseaktivität konnte nur in der austretenden intrazellulären Flüssigkeit nachgewiesen werden (Abb. 33).



**Abbildung 35:** Nachweis der Esteraseaktivität in *C. taxifolia* durch Applikation von ELF 97 (57). Links: Durchlichtmikroskopie von Zellwand mit austretendem Cytoplasma; Rechts: Gleicher Bildausschnitt in Epifluoreszenzmikroskopie (550 nm). Bereiche mit Esteraseaktivität fluoreszieren grün.

Durch die verhältnismäßig grobe Präparationsmethode konnten der Vakuoleninhalt und das Cytoplasma nicht voneinander getrennt werden. Es kann deswegen nicht unterschieden werden, ob die Esteraseaktivität nur im Cytoplasma oder im Vakuoleninhalt oder in beiden vorhanden ist.

Für eine exakte Lokalisierung wäre es notwendig, die Algen mit genaueren Präparations-techniken vorzubereiten. Um eine höhere Auflösung zu erhalten, könnten diese Untersuchungen auch an einem konfocalen Laserscanning Mikroskop durchgeführt werden.

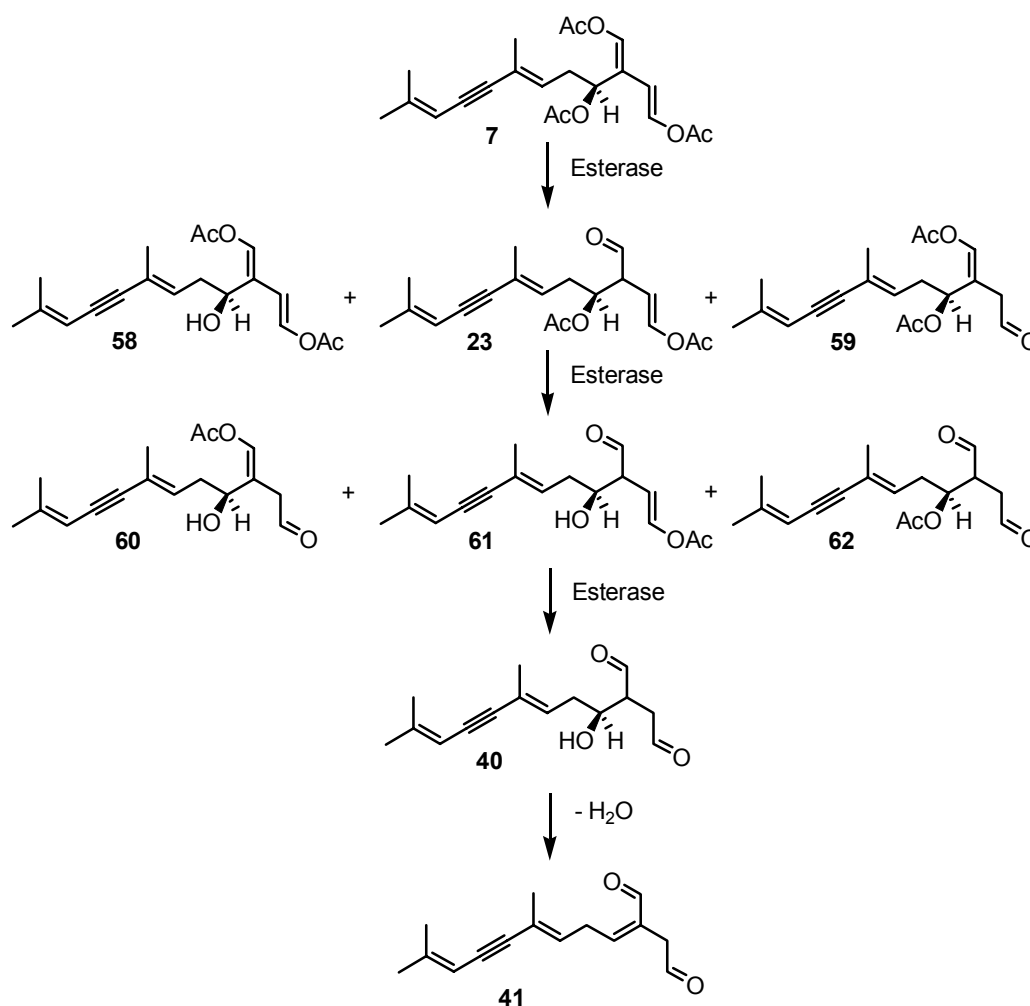
Zur Lokalisierung des Caulerpenins (7) in der Alge wäre es notwendig, diese, ohne die Caulerpeninumwandlung auszulösen, in ihre Bestandteile zu zerlegen und die einzelnen Fraktionen auf ihren Caulerpeningehalt zu untersuchen. Eine solche räumlich aufgelöste Quantifizierung des Caulerpenins (7) könnte möglicherweise nach fraktionierter

Zentrifugation unter Verwendung eines Esteraseinhibitors mit der bereits etablierten Analytik erreicht werden.

Die erhaltenen Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine Kompartimentierung (Abb. 33 A) bei der die Esterase aktiv im Cytoplasma oder dem Vakuoleninhalt der Alge vorliegt. Wo das Caulerpenin (**7**) in der Alge gespeichert wird, konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht untersucht werden. Hinweise auf ein biochemisches Signal, das zu einer Aktivierung der Esterase führt (Abb. 33 B), wurden in den Untersuchungen nicht gefunden.

### **3.5.5 Zusammenfassende Betrachtung der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia***

Durch die erhaltenen Ergebnisse aus chromatographischen, spektroskopischen spektrometrischen und mikroskopischen Untersuchungen an *C. taxifolia* konnte gezeigt werden, dass der Hauptsekundärmetabolit Caulerpenin (**7**) eine wichtige Rolle bei den biochemischen Abläufen nach einer Verwundung spielt. Die Wehrchemie basiert wahrscheinlich nicht, wie bisher angenommen ausschließlich statisch auf Caulerpenin (**7**), sondern es handelt sich dabei um einen dynamischen Prozess in dessen Verlauf Caulerpenin (**7**) enzymatisch in aktive Metabolite umgewandelt wird. Esterasen spalten unmittelbar nach einer Verletzung des Gewebes schrittweise die Acetylgruppen des Caulerpenins (**7**) ab, wobei eine strukturelle Vielzahl tautomerer Aldehyde freigesetzt wird. Als Endprodukt, d.h. nach der Abspaltung aller drei Acetylreste, Tautomerisierung und Wasserabspaltung, resultiert aus dieser Reaktionskaskade der ungesättigte 1,4-Dialdehyd Oxytoxin 2 (**41**) (Abb. 36). Interessant ist dabei die Ähnlichkeit der Reaktion mit der verwundungsaktivierten Verteidigung in *Halimeda* spp.. Die Umwandlung von Halimedatetraacetat (**1**) zu dem frasshemmenden Halimedatrial (**2**) und dem Epimer Epihalimedatrial läuft in Analogie zu der Wundreaktion in *C. taxifolia* ebenfalls über die Abspaltung von Acetatgruppen aus maskierten Aldehyden ab. Die Molekülgeometrie der entschützten Aldehyde ermöglicht allerdings eine intramolekulare Cyclisierung aus der zwei Endprodukte, die Epimere Halimedatrial (**2**) und Epihalimedatrial resultieren, wovon nur Halimedatrial stabil ist.<sup>[7]</sup> Derartige intramolekulare Reaktionen sind in den Caulerpeninfolgeprodukten nicht möglich, was sich in einer komplexen Mischung einer Vielzahl von Reaktionsprodukten zeigt.



**Abbildung 36:** Ablauf der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia*. Durch eine schrittweise Abspaltung der Acetylgruppen entstehen nach Tautomerisierung reaktive Aldehyde.

### 3.6 Rolle der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in der Verteidigung von *C. taxifolia*

Bei *C. taxifolia* aus dem Mittelmeer handelt es sich um eine invasive Spezies, die ein ausgeprägtes Durchsetzungsvermögen gegenüber anderen Arten besitzt. Aus ökologischer Sicht stellt sich die Frage, welche Faktoren die Alge so erfolgreich machen. Ein möglicher Faktor ist dabei die verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung. Ob es sich bei den Aldehyden um Verteidigungsmetabolite handelt, sollte in Versuchen mit Herbivoren evaluiert werden.

Die Alge hat, abgesehen von einigen spezialisierten Schnecken, im Mittelmeer keine Fraßfeinde. In Bioassays mit Seeigeln, wird die Alge in Monaten, in denen ihr Caulerpeningehalt besonders hoch ist überhaupt nicht gefressen und in Monaten in denen

der Caulerpeningehalt niedriger ist wird sie zwar gefressen, stellt aber keine gute Nahrungsquelle für die Tiere dar.<sup>[68]</sup> Lemee *et al.* führten die Meidung der Alge auf ihren Caulerpeningehalt zurück. Die dazu durchgeführten Bioassays konnten allerdings nicht zeigen, ob für diese chemische Verteidigung Caulerpenin (**7**) oder die bei der Verwundung entstehenden Aldehyde verantwortlich sind.

Die Toxizität von Caulerpenin (**7**) wurde in unterschiedlichen weiteren Assays untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Caulerpenin (**7**) fungizid und antibakteriell wirkt und toxisch für Spermien, Eier und Larven der Seeigel *Lytechinus pictus*, *Echinometra mathaei*<sup>[54]</sup> und *Paracentrotus lividus* ist.<sup>[80], [70]</sup> Es ist darüber hinaus cytotoxisch für Ciliaten (Dini, First international workshop on Caulerpa) und Mikroalgen.<sup>[81]</sup> Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Caulerpenin (**7**) die Protein Phosphorylierung inhibiert<sup>[82]</sup> und die DNA Replikation während der mitotischen Zellteilung verhindert.<sup>[83]</sup> Es zeigt antiproliferative Wirkung gegen acht menschliche Krebszelllinien und ist dabei in seinem IC<sub>50</sub> Wert Cisplatin vergleichbar.<sup>[84]</sup> Caulerpenin (**7**) interferiert mit Tubulin<sup>[85]</sup> und ist ein starker Inhibitor der Bienen-Gift Phospholipase A<sub>2</sub>.<sup>[86]</sup> An Blutegel Neuronen induziert es zum einen serotoninartige Reaktionen,<sup>[87]</sup> zum anderen inhibiert es die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase<sup>[88]</sup>, was in diesem Modellorganismus unterschiedliche Verhaltensänderungen hervorruft.

Allgemein bekannt ist, dass terpenoide marine Naturstoffe mit Aldehydfunktion höhere fraßinhibierende und abschreckende Wirkung besitzen als ihre korrespondierenden nicht-aldehydfunktionalisierten Analoga.<sup>[54]</sup> Für ein gesichertes Verständnis über die Rolle der Aldehyde in *C. taxifolia* müssten diese in Bioassays getestet werden, was allerdings aufgrund ihrer Reaktivität und Instabilität nicht ohne weiteres möglich ist. Für Fraßassays müssten die Aldehyde zunächst isoliert werden, um dann in artifizielle Diäten eingebettet oder zur Imprägnierung von Frischfutter verwendet werden zu können. Während diese Versuche mit Caulerpenin (**7**) einfach durchgeführt werden konnten<sup>[54]</sup>, müssten für die Aldehyde andere Applikationsmöglichkeiten gefunden werden.

Erste Bioassays bei denen eine Mischung der Aldehyde Oxytoxin 1 (**23**) und Oxytoxin 2 (**41**) indirekt eingesetzt wurden, führten Gavagnin *et al.* durch. Sie imprägnierten Nahrung mit dem Verteidigungssekret mariner Mollusken (*Oxynoe olivacea*, *Lobiger serradifalci* und *Cylindrobulla fragilis*) und setzten die dotierte Nahrung im Fraßassay mit carnivoren Süß- und Salzwasser Fischen ein.<sup>[89]</sup> Das Verhältnis von Oxytoxin 1 (**23**) zu Oxytoxin 2 (**41**) im Sekret der Schnecken wurde durch NMR Messungen in einer früheren Studie auf 6:4 bestimmt.<sup>[76]</sup> Im Vergleich mit Caulerpenin (**7**) zeigten die Aldehyde höhere Aktivität.

Hierbei handelt es sich um einen Laborversuch in dem Versuchsorganismen, die nicht im natürlichen Umfeld der Algen zu finden sind, verwendet wurden. Das bedeutet, dass die Beobachtungen nicht ohne weiteres auf die natürlichen Bedingungen übertragen werden

können. Ebenfalls fraglich ist, ob und wie lange das Aldehydgemisch im Bioassay stabil war, da die Proben vor, während und nach dem Versuch nicht mehr kontrolliert wurden.

In Stabilitätsversuchen an ausgewählten ungesättigten Dialdehyden zeigte Jonassohn 1996, dass diese in Wasser eine schnelle Autoxidation erfahren, insbesondere bei basischen pH Werten wie sie auch in Meerwasser vorliegen können.<sup>[63]</sup>

Um die Aldehyde dennoch in Fraßassays testen zu können wurde in dieser Arbeit damit begonnen, eine Zweikomponenten-Diät auf Agarbasis zu entwickeln. Ähnlich der Kompartimentierung von Enzymen und ihren Substraten in Pflanzen und Algen, enthielt die Diät Caulerpenin (**7**) und eine caulerpeninumwandelnde Esterase (vgl. 3.8.3) räumlich getrennt in unterschiedlichen Schichten. Durch den Befraß der Diät und während des Fraßvorgangs sollte eine Durchmischung der beiden Schichten stattfinden und so die Bildung der Aldehyde ausgelöst werden. In ersten Laborversuchen wurde die Diät an Seeigeln getestet. Da allerdings zu wenige Versuchstiere zur Verfügung standen und die Haltungsbedingungen für die Tiere nicht optimal waren, mussten die Versuche abgebrochen werden. Die Herstellung und der Einsatz einer Zweikomponentendiät wie sie in dieser Arbeit versucht wurde, könnte Ökologen ein hilfreiches Werkzeug in Bioassays zur Studie der aktivierten Verteidigung werden. Einen indirekten Hinweis auf die größere Verbreitung der verwundungsaktivierten Umwandlung von Sekundärmetaboliten in Algen erbrachten Cetrulo und Hay.<sup>[10]</sup> Sie analysierten mittels Dünnschichtchromatographie Extrakte aus 40 verschiedenen Algen und verglichen die chemische Zusammensetzung der Extrakte vor und nach Verwundung. In den beiden getesteten *Caulerpa*-Arten (*C. mexicana* und *C. prolifera*) beobachteten sie den Abbau eines nicht näher charakterisierten Metabolits 30 s nach Verwundung. Trotzdem fanden sich keine Hinweise auf eine aktivierte Verteidigung in den Bioassays, für die Seegras mit den Extrakten der Algen bestrichen und im Fraßtest an Fischen und Seeigeln getestet wurde. Dies kann auf die Reaktivität und Instabilität der entstehenden Aldehyde zurückzuführen sein, die bereits während der Imprägnierung des Futters abreagieren.

### **3.7 Vergleichende Studie invasiver und nicht-invasiver *Caulerpa*-Arten**

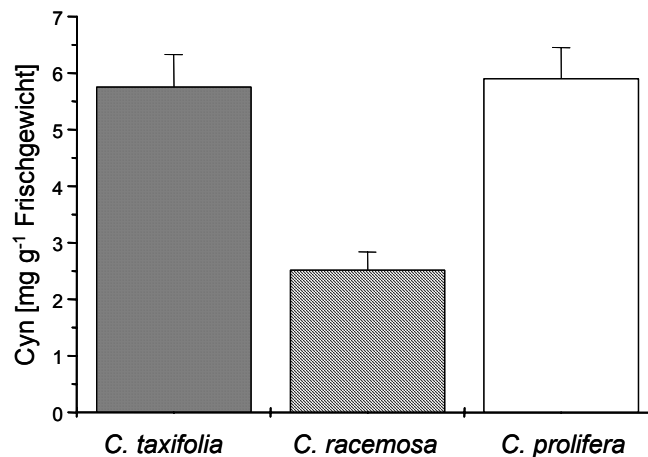
Um auch ohne die Fraßassays eine Einschätzung der Bedeutung der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung für *C. taxifolia* vornehmen zu können, sollte eine vergleichende Studie unterschiedlicher *Caulerpa*-Arten durchgeführt werden. Dazu konnte ausgenutzt werden, dass im Mittelmeer invasive und nicht-invasive *Caulerpa*-Arten koexistieren. Ein direkter biochemischer Vergleich der invasiven *C. taxifolia* und *C. racemosa*

und der nicht-invasiven *C. prolifera* sollte zeigen, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede die Algen aufweisen. Der Studie zugrunde gelegt wurden die an *C. taxifolia* etablierten Methoden. Nachdem zunächst sichergestellt wurde, dass alle drei Mittelmeerarten Caulerpenin (7) enthielten, sollte der Gehalt zunächst in intaktem Algengewebe quantifiziert werden. Danach sollten die Vorgänge nach einer Verwundung des Gewebes untersucht werden. Im direkten Vergleich der invasiven und nicht-invasiven Arten sollte sich zeigen, ob alle *Caulerpa*-Arten Caulerpenin (7) verwundungsaktiviert umwandeln können, oder ob dies eine besondere Eigenschaft der invasiven *Caulerpa*-Arten ist.

Bei allen Untersuchungen wurde darauf geachtet, dass nur intakte, d.h. Algen ohne Beschädigung oder Anzeichen des Ausbleichens, verwendet wurden.

In der vergleichenden Studie sollten alle für die verwundungsaktivierte Verteidigung relevanten Parameter erfasst werden.

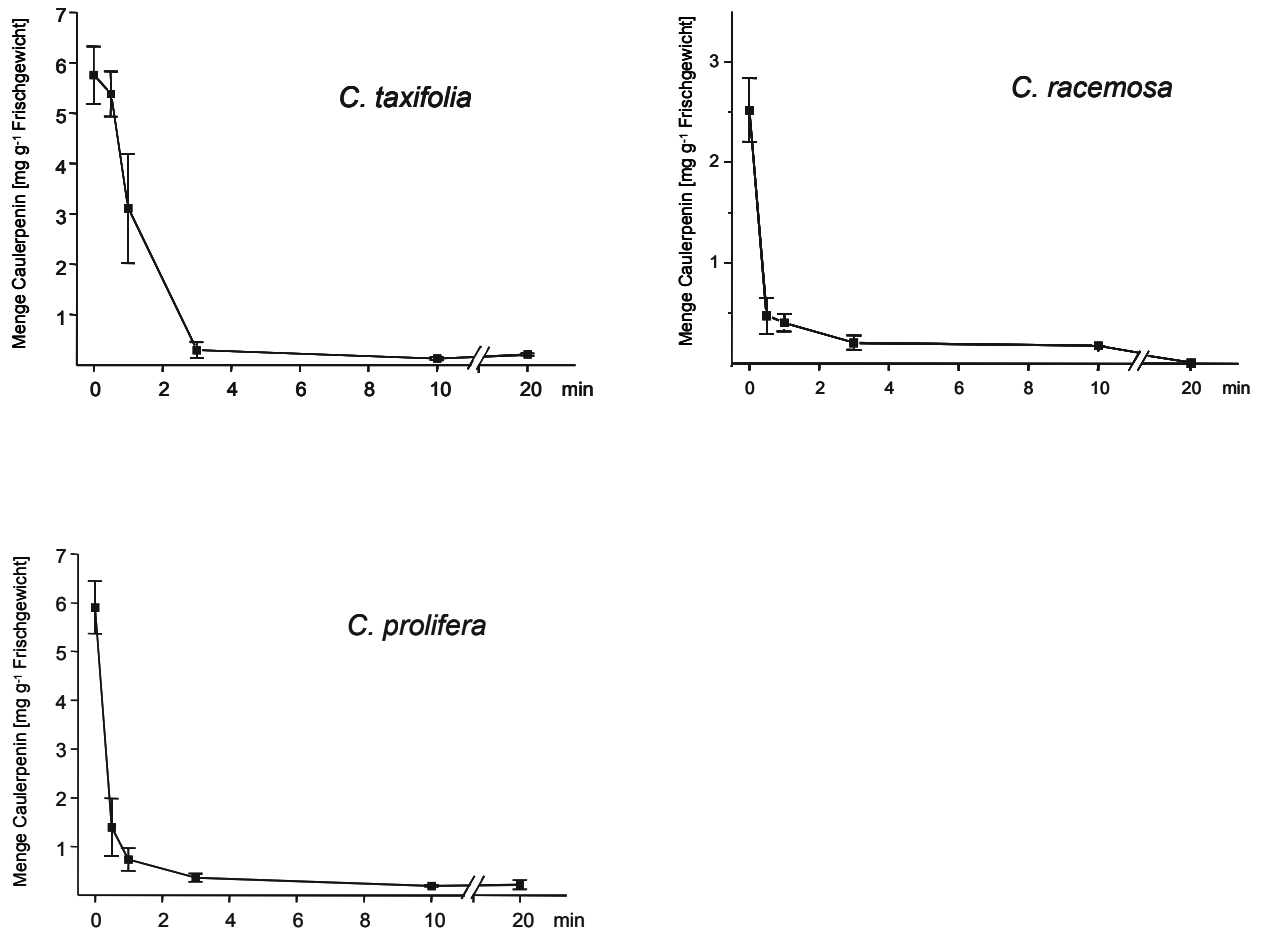
Zunächst wurde die Gesamtmenge Caulerpenin (7) in intaktem Gewebe nach der Ethylacetat-Extraktion quantifiziert (vgl. 3.4.3). Caulerpenin (7) konnte in allen drei Algen als Hauptsekundärmetabolit nachgewiesen werden. Die Caulerpeninmenge variierte jedoch in den einzelnen Arten, wobei überraschenderweise die invasive *C. taxifolia* und die nicht-invasive *C. prolifera* ungefähr die gleiche Menge Caulerpenin (7) enthielten. Im Vergleich zu diesen Arten enthielt die invasive *C. racemosa* nur etwa die Hälfte der Gesamtmenge von 7, um saisonale Schwankungen im Caulerpeningehalt auszugleichen, wurden die Algen zur gleichen Jahreszeit gesammelt. Diese Ergebnisse müssen allerdings dennoch aufgrund der unterschiedlichen Wuchstiefe der drei Arten sehr vorsichtig interpretiert werden, da bekannt ist, dass der Caulerpeningehalt in *C. taxifolia* nicht nur jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, sondern auch von der Wachstumstiefe abhängig ist.<sup>[66]</sup> Weil dies auch für die anderen Arten gelten könnte, wäre es für eine exakte vergleichende Quantifizierung notwendig, alle Algen zur gleichen Zeit an ähnlichen Standorten zu sammeln. Bedingt durch die unterschiedlichen Ansprüche an ihr Habitat wachsen die drei Arten jedoch nicht gemeinsam an einem Standort. Deshalb konnte nur darauf geachtet werden, dass die Algen aus Habitaten mit ähnlichen Bedingungen stammen. Vor den Untersuchungen in Jena wurden die Algen fünf Tage in Aquarien unter identischen Bedingungen equilibriert. *C. taxifolia* wurde in 1 m Tiefe gesammelt, *C. prolifera* wuchs in 5 m Tiefe und *C. racemosa* wurde in 15 m Tiefe gesammelt, was den geringeren Caulerpeningehalt in dieser Alge erklären könnte. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen kann dennoch abgeleitet werden, dass invasive und nicht-invasive *Caulerpa*-Arten sich nicht wesentlich in ihren Caulerpeningehalten unterscheiden (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Vergleich der Caulerpeningehalte intakter *C. taxifolia*, *C. racemosa* und *C. prolifera*.

Um festzustellen, ob in allen drei Arten eine verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung stattfindet, wurden zeitabhängige Untersuchungen des Caulerpeningehalts nach Verwundung durchgeführt. In definierten Zeitabständen nach der Verwundung wurden Algenhomogenisate der verschiedenen Arten mit Ethylacetat extrahiert und der Caulerpeningehalt mit NP-HPLC quantifiziert.

Der Vergleich zeigte, dass alle drei *Caulerpa*-Arten Caulerpenin (**7**) innerhalb weniger Minuten verwundungsaktiviert umwandeln. Dies geschah mit ähnlichen Kinetiken. Innerhalb der ersten Minute nach der Verwundung wurde in allen Arten die größte Menge Caulerpenin (**7**) umgewandelt. Die schnellste Umwandlung auf nur noch 12 % des ursprünglichen Caulerpeningehalts nach einer Minute wurde dabei in der nicht-invasiven *C. prolifera* beobachtet. Im weiteren Verlauf der Reaktion wurden nur noch geringe Mengen **7** umgewandelt. In *C. taxifolia* wurde die ursprüngliche Caulerpeninmenge in der gleichen Zeit um ca. 50 % reduziert, und *C. racemosa* baute innerhalb der ersten Minute etwa 84% ihres Caulerpenins (**7**) ab. Die Quantifizierung wurde in allen drei *Caulerpa*-Arten nach 20 min beendet, da zu diesem Zeitpunkt kein Caulerpenin (**7**) mehr extrahiert und nachgewiesen werden konnte (Abb. 38).



**Abbildung 38:** Kinetische Untersuchungen der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia*, *C. racemosa* und *C. prolifera*.

In direkten NP-HPLC Messungen der Ethylacetatextrakte 30 s nach Verwundung konnte in *C. racemosa* und *C. prolifera* Oxytoxin 2 (**41**) nachgewiesen werden. In *C. racemosa* konnten auch Spuren des Monoaldehyds Oxytoxin 1 (**23**) nachgewiesen werden.

Durch Abfangversuche mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) ließen sich auch in *C. racemosa* und *C. prolifera* die bei der schrittweisen Abspaltung der Acetylgruppen entstehenden Aldehyde als Hydrazone **46-51** nachweisen.

Vervollständigt wurden die Ergebnisse durch den Nachweis der Esteraseaktivität nach Verwundung in den beiden Arten, der durch die Umwandlung der Modellsubstrate Farnesyl- und Geranylacetat (**55**) erfolgte.

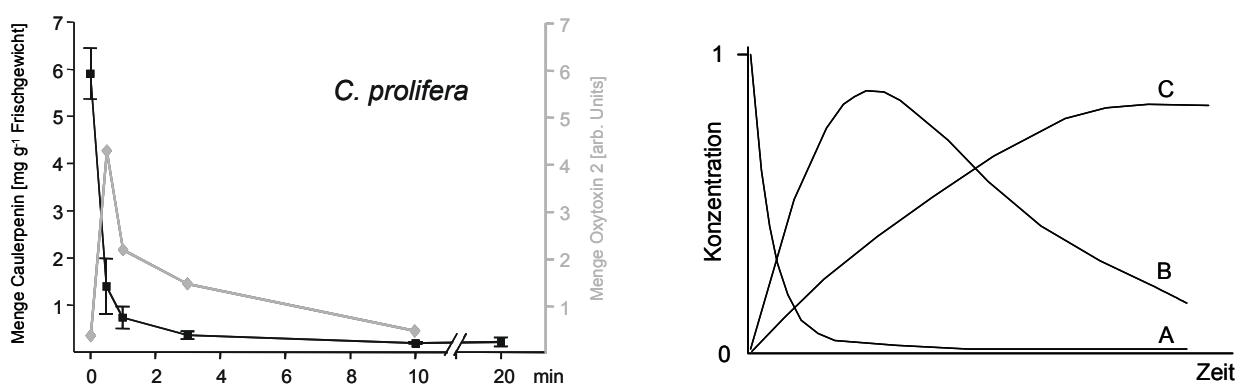
Diese vergleichende Studie zeigt, dass die verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung nicht nur in invasiven, sondern auch in nicht-invasiven *Caulerpa*-Arten vorhanden ist und deshalb als allgemeinere Wundreaktion in der Gattung *Caulerpa* angesehen werden kann. Das bedeutet weiterhin, dass sie nicht der Schlüssel zum Erfolg der invasiven Arten ist.



### 3.8 Wundverschlussreaktion in *C. taxifolia*

Die Rolle, die die verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung bei einer chemischen Verteidigung in *Caulerpa* spielt, konnte wegen der Instabilität und Reaktivität der Folgeprodukte noch nicht bewertet werden. Caulerpenin (**7**) selbst zeigte in Bioassays eine fraßhemmende Wirkung<sup>[54]</sup>, wobei man angesichts der hohen Konzentration von einigen mg Caulerpenin (**7**) pro g Frischgewicht in der Alge die Frage stellen kann, ob dies die einzige Funktion ist, die der Sekundärmetabolit übernimmt. Im marinen Bereich sind einige Beispiele für Verteidigungsstrategien in Organismen bekannt, deren zelluläre Funktionen auch in Abwesenheit von Fraßfeinden für das Überleben des Organismus notwendig sind. So produziert beispielsweise die einzellige Alge *Emiliania huxleyi* hohe Konzentrationen an Dimethylsulfonpropionat (DMSP), das bei Verwundung durch eine Lyase in Dimethylsulfid und Acrylat gespalten wird und die Alge gegen Fraßfeinde verteidigt.<sup>[90]</sup> DMSP dient der Alge jedoch nicht nur als Verteidigungsmetabolit, sondern zusätzlich als Osmoregulator, als „Frostschutzmittel“ und als Methylgruppen Donor in biochemischen Reaktionen.<sup>[90]</sup>

In den kinetischen Untersuchungen zur verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung wurden Beobachtungen gemacht, die gegebenenfalls auf eine weitere Funktion des Caulerpenins (**7**) schließen lassen. Das Algenhomogenisat bildete nach der Verwundung einen gelatinösen Brei, der nach 20 Minuten so weit ausgehärtet war, dass er eine elastische, gummiartige Konsistenz aufwies. Diese physikalische Veränderung geschah in auffälliger Synchronität zur verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung. Der relative Gehalt des Oxytoxins 2 (**41**) stieg (Abb. 39) in den ersten 3 Minuten nach Verwundung an, fiel allerdings, sobald sich die Caulerpeninumwandlung verlangsamte, im weiteren Verlauf der Reaktion stetig ab. Nach 20 min konnte der Dialdehyd (**41**) nicht mehr detektiert werden.



**Abbildung 39:** Links: Quantifizierung des Oxytoxin 2 (**41**)-Gehaltes in verwundeten *C. prolifera* Rechts: Produktbildung nach einer Folgereaktion erster Ordnung<sup>[91]</sup>

Die Kurvenverläufe für die Caulerpeninabnahme und Bildung des Oxytoxins 2 (**41**) (Abb. 39) sind indikativ für eine Folgereaktion erster Ordnung, bei der in ein Stoff A ein Zwischenprodukt B bildet, das dann zu einem Endprodukt C weiterreagiert.

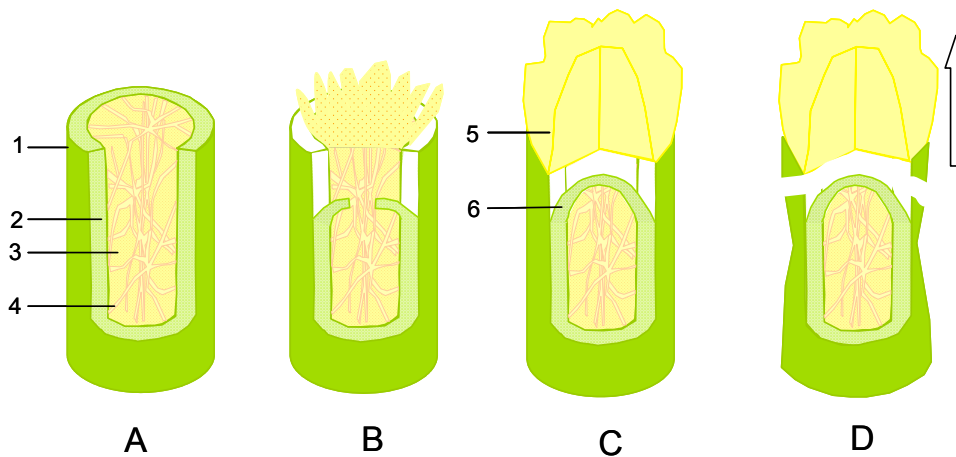
Das bedeutet übertragen auf die Reaktion in der Alge, dass Caulerpenin (**7**) zu Oxytoxin 2 (**41**) umgesetzt wird, das dann Folgereaktionen zu chromatographisch nicht erfassbaren Produkten eingeht. Es könnte z.B. mit der Algenmatrix zu dem beobachteten Polymer reagieren. Die Entstehung eines polymeren Folgeprodukts C würde erklären, dass bis jetzt keine Folgeprodukte des Dialdehyds **41** nachgewiesen werden konnten.

Die Polymerisation des Algenmaterials nach einer Verwundung der Zelle ist für siphonale Grünalgen überlebenswichtig. Der Wundverschluss verhindert zum einen, dass das Cytoplasma nach der Verletzung ausläuft und zum anderen, dass Seewasser von außen in die Zelle eindringt, denn beides könnte den Organismus nachhaltig schädigen.

Bisher ist außer beschreibenden, morphologischen Beobachtungen sehr wenig über den Wundverschluss in *Caulerpa*-Arten bekannt.<sup>[92], [93], [94]</sup> Wie ein Wundverschluss gebildet wird beobachteten Dreher *et al.* in licht- und elektronen-mikroskopischen Untersuchungen an *C. simpliciuscula*. Nach der Verwundung laufen in der Alge eine Reihe von Prozessen ab, die sich vereinfacht in drei Schritten zusammenfassen lassen:

1. Nach der Verwundung wird durch den Turgordruck ein nicht näher definiertes Material aus der Vakuole an die Oberfläche gedrückt, aus dem sich innerhalb von Minuten ein gelatinöser Wundpfropf bildet, der die Wunde von außen verschließt (Abb. 40, B).
2. Im Inneren der Alge zieht sich das Cytoplasma um das verwundete Gewebe herum derart zurück, dass die Wunde von innen verschlossen wird. Durch diesen inneren Wundpfropf wird der intakte Teil der Alge von der verwundeten Stelle abgegrenzt (Abb. 40, C).
3. Unterhalb des inneren Wundverschlusses entsteht eine neue Zellwand, die die Alge verschließt. Der Teil der Alge, der nicht mehr mit dem Cytoplasma in direktem Kontakt steht stirbt ab (Abb. 40, D).

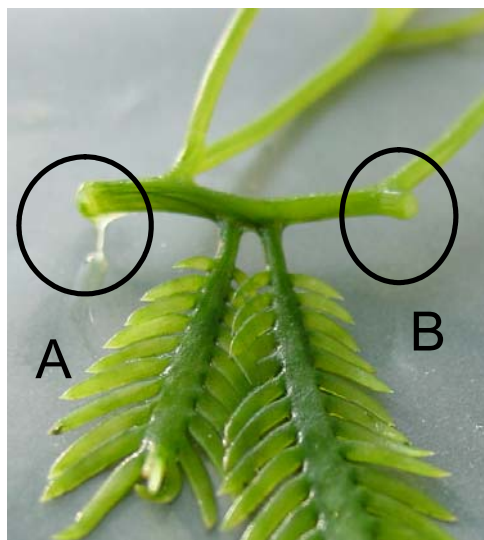
Nach wenigen Tagen ist der Wundverschluss vollständig.<sup>[92] [95]</sup>



**Abbildung 40:** Schematische Darstellung der Entstehung eines Wundpfropfs in *C. taxifolia*. **A:** Alge wird verwundet. **B:** Vakuoleninhalt tritt aus. Das Cytoplasma zieht sich zurück und bildet innerhalb weniger Minuten einen inneren Wundverschluss. **C:** Ausgetretenes Material polymerisiert innerhalb weniger Stunden, und die Bildung des inneren Wundverschlusses ist vollständig. **D:** Nach wenigen Tagen ist die Wundpfropfbildung abgeschlossen und der externe Wundpfropf wird von der Alge abgestoßen.

1 = Zellwand, 2 = Cytoplasma, 3 = Vakuole, 4 = Trabekel, 5 = externer Wundpfropf, 6 = innerer Wundpfropf

Die Entstehung eines äußeren Wundpfropfs in *C. taxifolia* kann auch ohne mikroskopische Vergrößerung sehr gut beobachtet werden (Abb. 41, A). Um die Annahme, dass die Caulerpeninfolgeprodukte am Wundverschluss beteiligt sind, überprüfen zu können, wurde ein Thallus von *C. taxifolia* auf zwei Seiten verletzt. Auf der einen Seite wurde die Caulerpeninumwandlung durch die Applikation des Esteraseinhibitors Ebelacton B (vgl. 3.5.3) herabgesetzt, die andere Seite wurde mit Wasser behandelt. Auf der mit Wasser behandelten Seite wurde die normale Entstehung eines Wundverschlusses beobachtet (Abb. 41, A). Auf der anderen Seite, bei der der Esteraseinhibitor die Deacetylierung des Caulerpenins (7) herabsetzte, entstand kein Wundpfropf (Abb. 41 B).

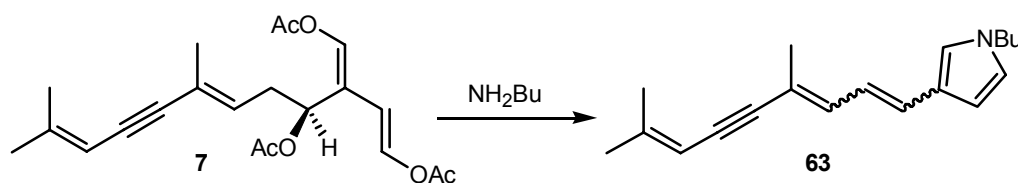


**Abbildung 41:** Wundpfropfbildung in *C. taxifolia*; A: Gelatinöser Wundpfropf verschließt die Wunde. B: Esteraseinhibitor Ebelacton B verhindert Wundverschlussbildung.

Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass die verwundungsinduzierte Caulerpenin-umwandlung und die Wundreaktion der Alge in direktem Zusammenhang stehen. Die zeitabhängige Quantifizierung des caulerpeninabgeleiteten Endprodukts Oxytoxin 2 (**41**) (Abb. 39), zeigt, dass es zu keiner Akkumulierung des von **41** im Algengewebe kommt. Es wäre eine schnelle Reaktion der Aldehyde zu höhermolekularen Produkten, wie sie beispielsweise bei Polykondensationsreaktionen oder Co-Polykondensationsreaktionen entstehen denkbar.

Für eine Co-Polykondensation mit Aldehyden wie **41** stellen nucleophile Reste von Proteinen geeignete Substrate dar.

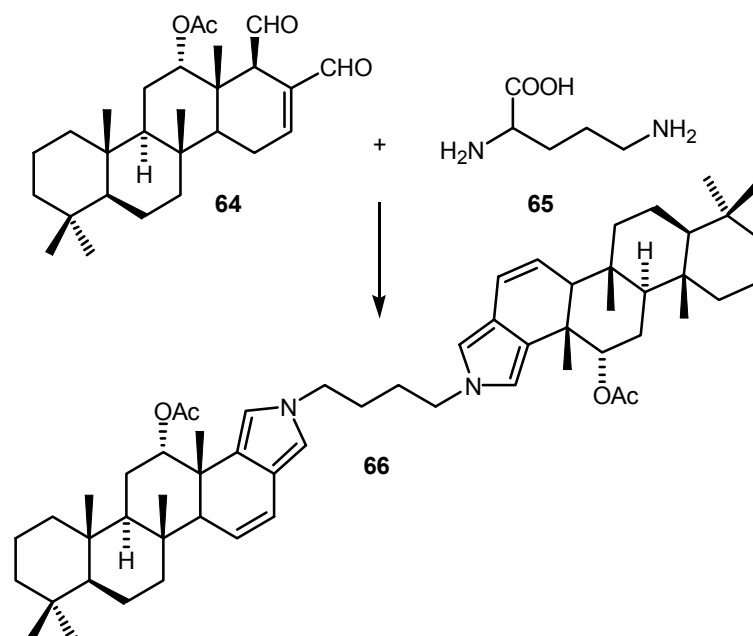
Bei der Umsetzung von Caulerpenin (**7**) mit Butylamin erhalten Guerriero *et al.* ein N-Butylpyrrolderivat (**63**), das vermutlich durch basische Deacetylierung des Caulerpenins (**7**) und anschließende *in situ* Reaktion des Dialdehyds zur Schiffsbasis mit dem Amin entsteht (Abb. 42).<sup>[96]</sup>



**Abbildung 42:** Die Entstehung eines Pyrrols (**63**) wird bei der Umsetzung von Caulerpenin (**7**) mit Butylamin beobachtet.

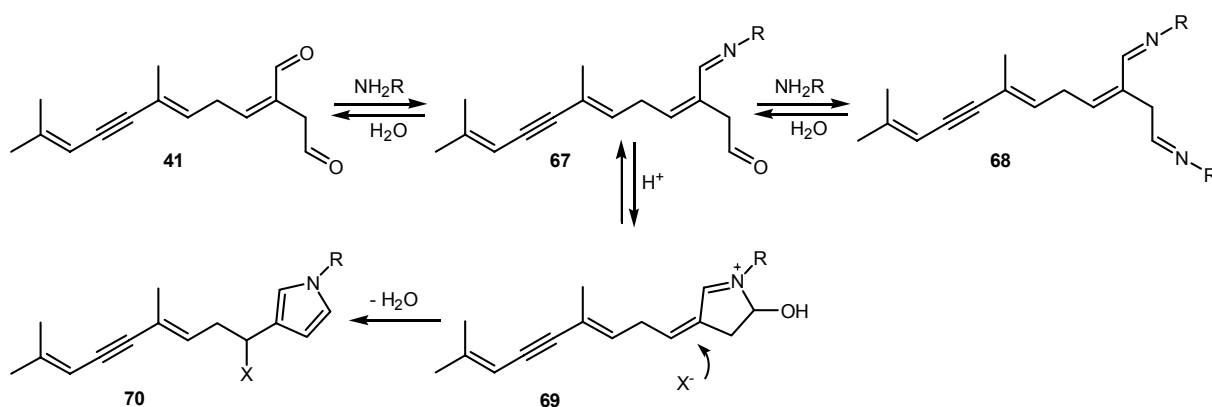
Des Weiteren sind für Naturstoffe, die eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehydstruktur besitzen Beispiele zur Reaktion mit Aminen und Proteinen bekannt. So inhibiert beispielsweise der

ungesättigte 1,4-Dialdehyd Scalarial aus dem Schwamm *Cacospongia mollior* über Schiff'sche Base Bildung mit den freien Aminogruppen des Enzyms die Bienengift Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).<sup>[97]</sup> Die Biosynthese von Molliorin B (**66**) in dem gleichen Schwamm wurde von Sodano *et al.* in Fütterungsversuchen mit markiertem Ornitin (**65**) auf die Reaktion der Aminosäure mit Scalarial (**64**) zurückgeführt (Abb. 43).



**Abbildung 43:** Scalarial (**64**) aus dem Schwamm *Cacospongia mollior* reagiert mit Ornitin (**65**) zu Molliorin B (**66**).

Dass Oxytoxin 2 (**41**) in ähnlicher Weise mit Nucleophilen reagieren kann, wurde in den Derivatisierungsexperimenten gezeigt (vgl. 3.5.1). Auch weniger reaktive Nucleophile könnten in analoger Weise mit den Produkten reagieren. Aus den Derivatisierungsversuchen wurden folgende Reaktionsmöglichkeiten abgeleitet (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Postulierter Mechanismus zur Reaktion von Oxytoxin 2 (**41**) mit Proteinen. R = Protein, X = Nucleophiler Rest proteinogener Aminosäuren.

In Analogie zu den oben gezeigten Reaktionen könnten die bei der Verwundung der Alge freigesetzten Aldehyde mit Aminen reagieren. Freie Aminogruppen, wie sie sich z. B. an Lysinresten der Proteine finden, könnten mit Oxytoxin 2 (**41**) reagieren, was zu unterschiedlichsten Produkten führen würde. Sowohl einfache Additions-Produkte als auch Oligomere und co-polymerisierte Proteine im nieder- und höhermolekularen Bereich sind zu erwarten. Durch diese Reaktionen könnten die Proteine mit Oxytoxin 2 (**41**) quervernetzt werden und als Polymer zur Wundverschlussbildung beitragen. Diese Hypothese stimmt mit colorimetrischen Untersuchungen des Wundverschlusses in *C. simpliciuscula* von Dreher *et al.* überein, in denen Proteine neben Kohlenhydraten als Hauptbestandteile des Wundpfropfens nachgewiesen wurden.<sup>[98]</sup>

### 3.8.1 Massenspektrometrische Untersuchung des Wundverschlusses

Durch massenspektrometrische Untersuchungen des Wundpfropfs soll überprüft werden, ob sich definierte Additionsprodukte der Aldehyde mit Proteinen nachweisen lassen. Dazu wurde zunächst ein externer Wundpfropf aus *C. taxifolia* mit MALDI-ToF untersucht. Das polymerisierte Algenmaterial wurde hierbei direkt in die Matrix eingebettet und vermessen. In der komplexen Mischung höhermolekularer Substanzen konnten jedoch keine definierten Additionsprodukte nachgewiesen werden. Dimere der Proteine sind als Ionisierungsartefakte zu detektieren und höhermolekulare heterogene Polymere werden nicht erfasst.

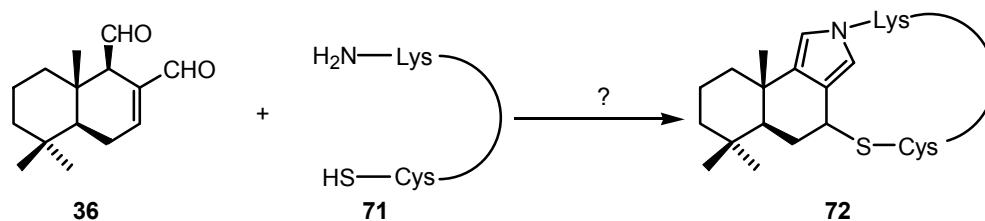
Aus diesem Grund wurde versucht eine ESI-MS Methode zu entwickeln, da mit dieser Technik auch geringere Massenunterschiede nachgewiesen werden können. Hierzu wurde zunächst versucht das Polymer des Wundverschlusses direkt zu vermessen, was misslang, da dieser weder in Phosphatpuffer noch in Wasser mit DMSO gelöst werden konnte und damit keine Messung möglich war.

### 3.8.2 Gelelektrophoretische Untersuchung der Proteine im Wundverschluss

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Dialdehyde komplexere Reaktionen mit den Proteinen eingingen als angenommen. Diese Vermutung wird durch einen Vergleich mit dem bekannten Cross-linker Glutaraldehyd bestätigt. Für Glutaraldehyd werden bei der Umsetzung mit Proteinen zahlreiche unspezifische Reaktionen beobachtet, die von Protein zu Protein so unterschiedlich sind, dass keine Voraussagen für die einzelnen Produkte möglich sind.<sup>[99]</sup>

Weiterhin ist bekannt, dass ungesättigte 1,4-Dialdehyde nicht nur hohe Aktivität gegenüber primären Amino- sondern auch gegenüber Thiolgruppen besitzen.<sup>[62]</sup> So postulieren Fritz *et al.* für die Reaktion von Polygodial mit einem bifunktionalen Modellprotein, das sowohl Lysin-

als auch Cystein-Reste besitzt, ein Reaktionsprodukt, dass über eine Michael-Addition mit der Thiolgruppe reagiert und bei der aus der Reaktion mit dem Dialdehyd ein Pyrrol entsteht (Abb. 45).



**Abbildung 45:** Postuliertes Produkt der Reaktion des ungesättigten 1,4-Dialdehyds Polygodial (**36**) mit einem Lysin- und einem Cystein-Rest eines Proteins (**71**).

Da in der Algenmatrix eine Vielzahl an Proteinen vorhanden sind, die in ungerichteten Polymerisierungsreaktionen teilweise wie oben beschrieben mit dem Dialdehyd **41** reagieren könnten, muss davon ausgegangen werden, dass im Polymerisat auch höhermolekulare unspezifische Proteinaddukte vorliegen. Zur Erfassung dieser Addukte reichen massenspektrometrische Methoden nicht mehr aus, und es werden deshalb zur Untersuchung der Wundreaktion in *C. taxifolia* proteinspezifische Analysemethoden eingesetzt.

Als Methode der Wahl zum Nachweis höhermolekularer Proteinaddukte wurde die Gelelektrophorese gewählt. Stark vereinfacht kann die Elektrophorese als Methode beschrieben werden, bei der auf ein Gel geladene Teilchen (Ionen oder kolloidale Partikel) aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Elektrophoretische Trennverfahren werden in erster Linie zur Trennung, Isolierung und Analyse von Proteinen, Nucleotiden und anderen Biopolymeren eingesetzt.

Die elektrophoretische Beweglichkeit der einzelnen Partikel ist dabei der Ladung eines Teilchens direkt proportional und den Reibungskräften, die durch die Größe und Form des Analyten sowie der Viskosität des Mediums bestimmt werden, umgekehrt proportional. Für die Proteinextrakte aus den Algen wurde die PAGE Technik ausgewählt, bei der die Trennung der Proteine in einem Polyacrylamidgel erfolgt.<sup>[100]</sup> Durch die Acrylamidkonzentration kann die Porengröße im Gel und damit die Größe der aufzutrennenden Analyten reguliert werden. Verwendet wurde die so genannte Disc-Elektrophorese<sup>XV</sup>, bei der die Probe zunächst auf einem Sammelgel fokussiert wird, bevor in einem Trenngel die Auftrennung nach den molaren Massen der Proteine erfolgt.

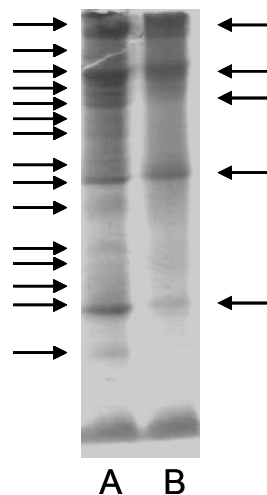
<sup>XV</sup> diskontinuierliche Elektrophorese

Durch eine pH Wert Änderung von pH 6,8 im Sammelgel auf pH 9,1 beim Eintritt der Proteine in das Trenngel werden sie konzentriert, was sich in schärferen Banden und einer höheren Auflösung bemerkbar macht. Für die Elektrophorese werden zunächst alle Proteine denaturiert und dabei die nicht-kovalenten Bindungen und die Schwefelbrücken gespalten. Die kovalenten Bindungen, die bei einer Polymerisation der Proteine mit **41** zu erwarten sind, bleiben erhalten, und somit sollten Aussagen zur qualitativen und quantitativen Veränderung der Proteinzusammensetzung ermöglicht werden. Auf diesem Weg konnte bereits die polymerisierende Wirkung des Oleuropeins in Liguster (*Ligustrum obtusifolium*) nachgewiesen werden.<sup>[79]</sup>

Nach der Auftrennung der Proteine werden die Proteinbanden mit dem Farbstoff Coomassie Blau angefärbt, fixiert und getrocknet.

Durch die Auftrennung von Proteinextrakten der Alge mit Gelelektrophorese sollte untersucht werden, ob Proteinaggregate oder unspezifische höhermolekulare Addukte gebildet wurden. Um das vollständige Proteinmuster einer intakten Alge zu erhalten, wurden die enzymatischen Aktivitäten durch kurzes Aufkochen vor der Aufarbeitung zerstört, was die Erfassung aller in der Alge vorliegenden Proteine vor eventuellen Reaktionen mit Caulerpeninabbauprodukten ermöglichte.

Im Vergleich der Proteinzusammensetzung einer intakten Alge und einer Alge, die nach der Verwundung extrahiert wurde, zeigten sich erste Unterschiede (Abb. 46).



**Abbildung 46:** SDS-PAGE von Proteinextrakten aus *C. taxifolia*; A: *C. taxifolia* gekocht; B: *C. taxifolia* 30s nach Verwundung. Pfeile indizieren diskrete Proteinbanden.

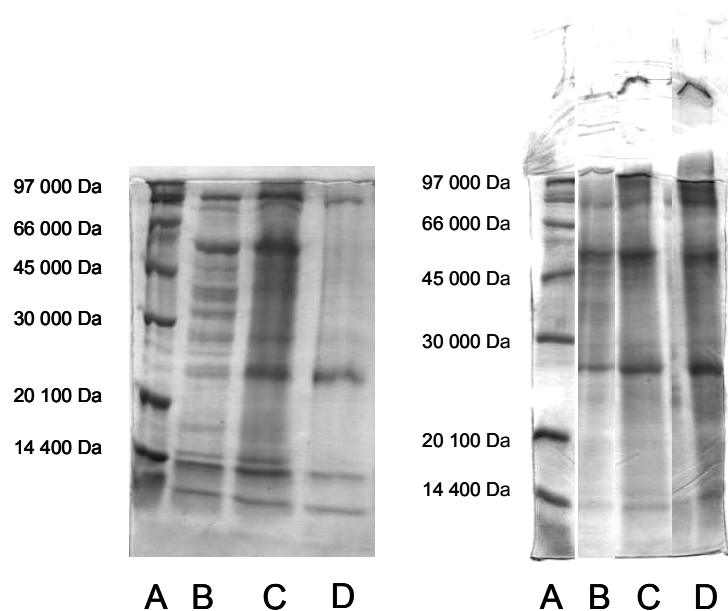
Die intakte Alge, deren Proteine vor der Extraktion durch Kochen denaturiert wurden, ergab ein scharf aufgelöstes vielbandiges Muster (Abb. 46, A). In der Alge, die 30s nach der Verwundung extrahiert wurde, reduzierte sich das Proteinmuster auf wenige diffuse Banden



(Abb. 46, B). Gleichzeitig ist eine Erhöhung der Proteinaddukte im oberen Bereich des Gels, d.h. bei höheren Massen zu beobachten.

Diese ersten Hinweise auf Reaktionen der Proteine nach Verwundung sollten mit den oben erarbeiteten Methoden systematisch validiert werden.

Um Veränderungen im Proteingehalt der Algen im zeitlichen Verlauf einer Verwundungsreaktion besser nachweisen zu können, wurde ein weiterer Kontrollwert zum Zeitpunkt Null eingeführt. Dazu wurden die Algen in Analogie zu den Verwundungsversuchen (vgl. 3.4.2) vor der Extraktion der Proteine mit flüssigem Stickstoff schockgefroren (Abb. 47).



**Abbildung 47:** SDS-PAGE von Proteinextrakten aus *C. taxifolia*

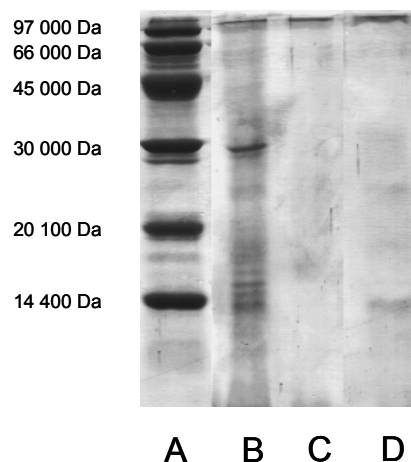
**linkes Gel:** A: Marker; B: *C. taxifolia* schockgefroren, B: *C. taxifolia* 15 min nach Verwundung, D: *C. taxifolia* 30 min nach Verwundung

**rechtes Gel:** A: Marker; B: *C. taxifolia* schockgefroren, B: *C. taxifolia* 15 min nach Verwundung, D: *C. taxifolia* 30 min nach Verwundung

Im linken Gel (Abb. 47) ist zunächst sehr gut die Aufhebung des Bandenmusters im zeitlichen Verlauf zu sehen. Während im Kontrollwert, also zum Zeitpunkt Null noch viele klar aufgelöste Banden erkennbar waren, nahm die Anzahl nach 15 Minuten deutlich ab und nach 30 Minuten waren nur noch wenige diffuse Banden erkennbar. Außerdem ist die Proteinmenge, die auf das Gel geladen wurde, stark zurückgegangen. Dieser Rückgang könnte durch Polymerbildung erklärt werden, bei der die entstehenden Polymere nicht mehr im Ladepuffer gelöst werden, nach der Zentrifugation als Rückstand in den Probengefäßen zurück bleiben, wodurch die Proteinmenge in der Probe herabgesetzt wird. Diese

Beobachtung konnte mit Hilfe des rechten Gels erklärt werden (Abb. 47). Hier wurde nicht nur das Trenn-, sondern auch das Sammelgel entwickelt und es zeigte sich, dass nach 15 Minuten ein Teil der Proteine in der Tasche des Sammelgels zurück gehalten wurde und nicht auf das Trenngel gelangte. Hierbei handelt es sich um polymere Proteinaddukte mit einem sehr hohen Molekulargewicht. Die Menge der polymeren Verbindungen, die nicht in das Sammelgel gelangen konnten, nahm nach 30 Minuten noch zu, was durch weitere Reaktionen im verwundeten Algenmaterial zu erklären war. Diese Polymere können teilweise nicht mehr im Ladepuffer gelöst werden, bleiben nach der Zentrifugation als Rückstand in den Probengefäßen zurück und setzen dadurch die Proteingesamtmenge in der Probe herab. Teilweise können die Polymere noch auf das Sammelgel überführt werden und in den Taschen nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen traten Probleme durch die variierende Proteinmenge in den unterschiedlichen Proben auf. Eine Ursache hierfür ist die individuelle Varianz der Proteinmenge in den Algen. Um diese Varianz zu minimieren, wurde eine Alge so weit es die unterschiedliche Probenvorbereitung zuließ, für mehrere Proben aliquotiert. Auf eine exakte Bestimmung der Proteinmenge vor der Aufarbeitung z.B. nach Bradford musste wegen der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und der Polymerisation verzichtet werden.

Um einen Vergleich zwischen dem Proteingehalt einer verwundeten Alge und einer tatsächlich quervernetzten Algenproteinprobe durchführen zu können, wurde durch den Zusatz des Cross-linkers Glutaraldehyd<sup>[99]</sup> zu schockgefrorenen *C. taxifolia* Thalli eine Vergleichsprobe für mögliche Quervernetzungsprodukte hergestellt (Abb. 48).



**Abbildung 48:** SDS-PAGE von Proteinextrakten aus *C. taxifolia*; A: Marker; B: *C. taxifolia* schockgefroren, C: *C. taxifolia* schockgefroren + Glutaraldehyd, D: *C. taxifolia* 5 min nach Verwundung.

Es zeigte sich (Abb. 48, C), dass nach der Zugabe von Glutaraldehyd in Analogie zu den verwundeten Algen, kein Bandenmuster mehr zu erkennen war und es zu einer Akkumulierung höhermolekularer Produkte kam. Eine deutliche Zunahme dieser Addukte ist ebenfalls in der verwundeten Alge beobachtbar (Abb. 48, D). Dabei sind die Polymere, die nicht in das Laufgel gelangen, sondern auf dem Sammelgel zurückgehalten werden, nicht erfasst worden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es sowohl bei einer Verwundung von *C. taxifolia* als auch in Modellreaktionen mit Algen und etablierten Cross-linkern zu einer Änderung der Proteinzusammensetzung kommt. Es werden dabei verstärkt höhermolekulare Proteinaddukte gebildet, die auf 12 %-igen Polyacrylamid Gelen nicht aufgetrennt werden können und in den Ladetaschen immobilisiert werden. Mit der Bildung dieser Addukte geht ebenfalls eine Verarmung der Gele an Protein einher. Insgesamt wurde beobachtet, dass nach Verwundung in der natürlichen Algenmatrix eine komplexe Mischung von Reaktionsprodukten entsteht, die sich durch diffuse Bandenbildung nicht definierter Proteinaddukte bemerkbar macht. Ursache hierfür ist eine ungerichtete Polymerisation, die durch unspezifische Reaktionen des ungesättigten 1,4-Dialdehyds Oxytoxin 2 (**41**) mit Proteinen erklärt werden kann. Dass eine Mischung unterschiedlicher Polymerisationsprodukte entsteht, ist aus den diffusen Banden abzuleiten und wird durch die MS-Untersuchungen bestätigt, in denen keine definierten Oligomere nachweisbar waren.

Die Proteinquervernetzung durch einen Sekundärmetaboliten wurde von Konno *et al.* bereits ausführlich für Oleuropein in Liguster (*Ligustrum obtusifolium*) beschrieben.<sup>[79]</sup> Bei dieser Quervernetzungsreaktion handelt es sich nicht um eine Reaktion zum Wundverschluss, sondern um eine Verteidigungsreaktion der Pflanze gegen Fraßfeinde. Konno *et al.* konnten in spezialisierten *Lepidoptera* Larven deren Hauptnahrung Liguster ist, einen stark erhöhten Glycin-Gehalt im Darm messen, der sie nachweislich vor der proteindenaturierenden Wirkung des Oleuropins schützt.<sup>[101]</sup> Für Raupen, die kein Glycin in ihrem Darm besaßen, stellte Liguster keine gute Nahrungsquelle dar, da die Nahrungsqualität durch die Proteindenaturierung stark herabgesetzt wurde. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Beobachtungen der Fraßassays an Seeigeln lassen sich Parallelen erkennen. Wie bei den Raupen kommt es auch in den Seeigeln zu Einbußen in der allgemeinen Fitness nach dem Verzehr von *C. taxifolia*. Ein ähnliches Phänomen wurde bei einer vergleichenden Studie zweier Schildkrötenpopulationen auf Hawaii beobachtet. Die Population, deren Diät ausschließlich aus *Caulerpa* bestand, zeigte im Gegensatz zu der Population, die eine caulerpafreie Diät erhielt, stark reduzierte Wachstumsraten.<sup>[102]</sup> Für weiterführende Untersuchungen wäre interessant, ob die marinen Schnecken sich ebenso wie die Raupen, durch die Freisetzung hoher Mengen niedermolekularer nucleophiler Verbindungen in ihrem Verdauungstrakt vor der Proteindenaturierung schützen.

### 3.8.3 Entwicklung eines Modellsystems zur mechanistischen Untersuchung von Dialdehyd-Protein-Wechselwirkungen

Die Durchführung der Umsetzung von Caulerpenin (**7**) außerhalb der Algenmatrix und unter kontrollierbaren Bedingungen, in einem definierten Modellsystem könnte mechanistische Untersuchungen der Protein-Oxytoxin 2 (**41**) Wechselwirkungen ermöglichen. Durch eine esterasemedierte Umsetzung von Caulerpenin (**7**) mit gereinigten Enzymen könnten Beispielreaktionen durchgeführt und die Ergebnisse mit den Reaktionen in *Caulerpa* verglichen werden.

Um eine geeignete Esterase zu finden, die in der Lage ist, Caulerpenin (**7**) zu deacetylieren, wurden Esterasen aus unterschiedlichen Organismen in Puffer bei ihrem pH Optimum mit Caulerpenin (**7**) versetzt und die Caulerpeninumwandlung in LC/MS verfolgt. Nach zwei Stunden war nur bei zwei der getesteten Esterasen eine Caulerpeninumwandlung zu beobachten (Tab. 2). Hierbei handelte es sich um eine Esterase aus *Candida lipolytica* (CLE) und eine Esterase aus Schweineleber (PLE). In Gegenwart der anderen Esterasen blieb die Caulerpeninmenge unverändert.

Esterase aus:	Aktivität in 20 µg	Umwandlung von 1 mg Caulerpenin ( <b>7</b> )	Keine Caulerpenin- umwandlung
<i>Bacillus species</i>	<b>0,002</b>		<b>X</b>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<b>0,008</b>		<b>X</b>
<i>Bacillus thermoglucosidans</i>	<b>0,002</b>		<b>X</b>
<i>Candida lipolytica</i> (CLE)	<b>0,002</b>	<b>X</b>	
<i>Mucor mihei</i>	<b>0,02</b>		<b>X</b>
Pferdeleber	<b>0,014</b>		<b>X</b>
Schweineleber (PLE)	<b>0,44</b>	<b>X</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>0,04</b>		<b>X</b>
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	<b>0,04</b>		<b>X</b>

**Tabelle 2:** Umsetzung von 1 mg Caulerpenin (**7**) mit unterschiedlichen Esterasen.

Bei der Umsetzung von CLE und PLE mit Caulerpenin (**7**) wurde nach einiger Zeit eine Deaktivierung der Enzyme beobachtet, die mit der Entstehung eines polymeren Niederschlags einherging. Aus der Literatur ist bekannt, dass Caulerpenin (**7**) als Lipaseinhibitor wirkt.<sup>[103]</sup> Bei den Lipaseinhibitorstudien sind jedoch keine Untersuchungen

zum Mechanismus der Inhibierung durchgeführt worden. Es wurde nicht untersucht, ob Caulerpenin (**7**) durch die Lipase deacetyliert wird und ob es zu einer Polymerisation während der Reaktion kommt.<sup>[103]</sup>

Die Bildung eines Niederschlags bei der Esteraseinhibierung deutet darauf hin, dass das Enzym direkt, höchstwahrscheinlich durch Reaktionen der deacetylierten Folgeprodukte mit dem Protein, inhibiert wird.

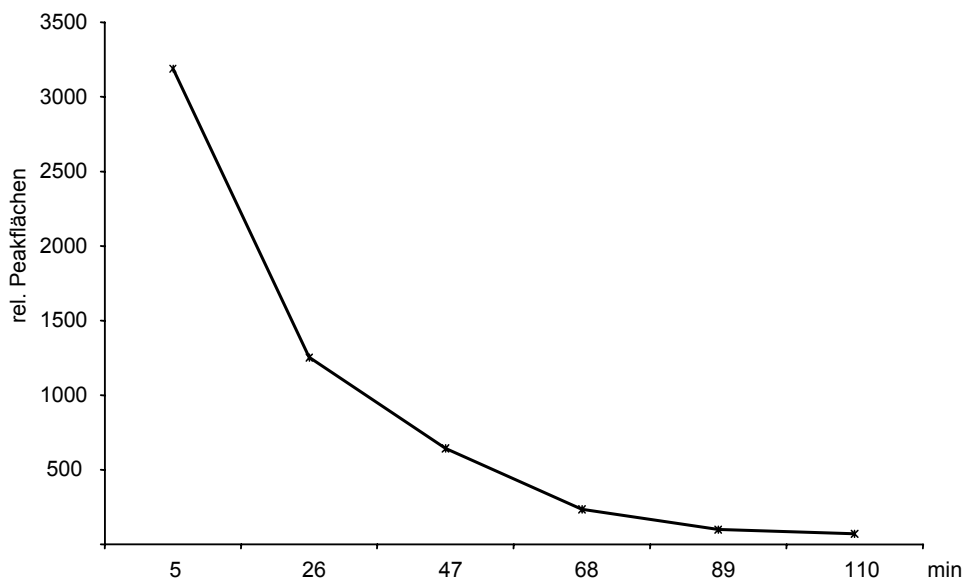
Das erklärte Ziel dieser Versuche sollte die Untersuchung von Wechselwirkungen der Caulerpeninumwandlungsprodukte mit definierten Proteinen sein. Da die Esteraseinhibierung möglicherweise auf solche Reaktionen zurückzuführen ist, wurde zunächst der Mechanismus der Esteraseinhibierung durch Caulerpenin (**7**) näher untersucht.

### 3.8.4 Caulerpenin als Esteraseinhibitor

Durch die Umsetzung der Esterasen CLE und PLE mit geeigneten Substraten in Gegenwart von Caulerpenin (**7**) sollte der Inhibierungserfolg bestimmt werden. Als Substrat wurde, wie auch in den Esteraseversuchen an *C. taxifolia* (vgl. 3.5.3), Geranylacetat verwendet. Beiden Modellesterasen wurde Geranylacetat (**55**) zugesetzt und die Umwandlung zu Geraniol mit GC/MS verfolgt. 1-Bromdecan diente dabei als interner Standard.

Beide Esterasen wandelten Geranylacetat mit unterschiedlichen Umwandlungsgeschwindigkeiten zum korrespondierenden Alkohol Geraniol um. Innerhalb einer Stunde deacetylierten 20 µg (U = 0,44) PLE etwa 15 % von 3,21 mM Geranylacetat, während 20 µg (U = 0,002) CLE in der gleichen Zeit 65% des Substrats umwandelten. Die Umwandlungsgeschwindigkeit ist dabei unabhängig von der Aktivität U, da diese substratabhängig ist und nicht für Geranylacetat, sondern für Ethylvalerat (Fluka) bestimmt wurde. Wegen der höheren Umsetzungsrate wird CLE in weiteren Versuchen bevorzugt als Modell Esterase eingesetzt.

Um ein Verständnis über den zeitlichen Ablauf der Inhibierung durch Caulerpenin (**7**) zu bekommen, wurde CLE mit **7** umgesetzt und die Caulerpeninmenge über einen internen Standard in LC/MS Messungen quantifiziert (Abb. 49).

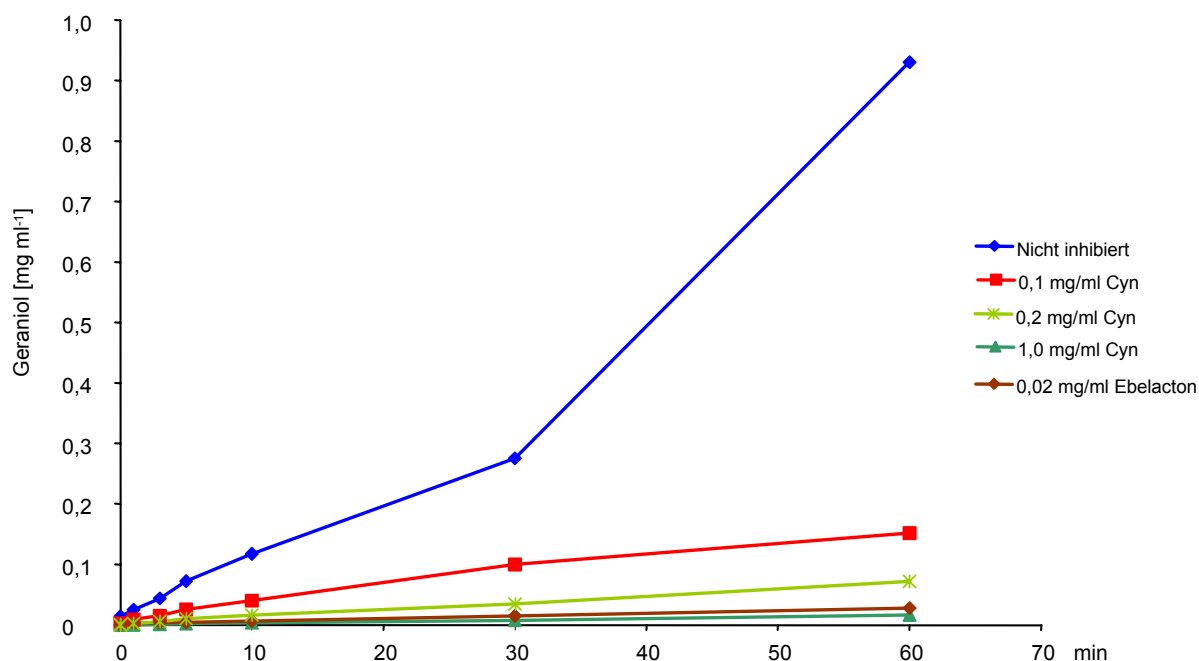


**Abbildung 49:** Zeitlicher Verlauf der Caulerpeninumwandlung durch CLE.

Bis zu einer Stunde wurde dabei Caulerpenin (**7**) kontinuierlich sehr schnell abgebaut. Nach etwa einer Stunde verlangsamte sich der Abbau, bis nach 2 Stunden kein weiterer Caulerpeninumsatz mehr beobachtet werden konnte. Auch konnten keine Caulerpeninumwandlungsprodukte detektiert werden. Diese Beobachtung und der nicht lineare Kurvenverlauf deuten darauf hin, dass es zu einer Veränderung der Esterase während der Reaktion kommt.

Für die weiteren Inhibierungsversuche wurde die Esterase vor der Zugabe des Substrats 1 h mit Caulerpenin (**7**) vorinkubiert, um eventuelle inhibierende Reaktionen der Esterase mit Caulerpeninumwandlungsprodukten zu ermöglichen. Aus Inhibitorstudien an Phospholipase A<sub>2</sub> mit Petraspongiolid M, einem ebenfalls Enzym-denaturierenden Sesterterpen, ist bekannt, dass die Inhibitorwirkung von der Inkubationszeit abhängt. <sup>[104]</sup>

CLE wurde mit unterschiedlichen Caulerpeninkonzentrationen vorinkubiert, die Menge Geraniol mit GC/MS über den internen Standard quantifiziert und die Inhibierung untereinander verglichen. Als weitere Vergleichswerte wurden die gebildete Geraniolmenge ohne Inhibierung und der Wert der Geranylacetatumwandlung nach Applikation des Esteraseinhibitors Ebelacton B gemessen (Abb. 50).

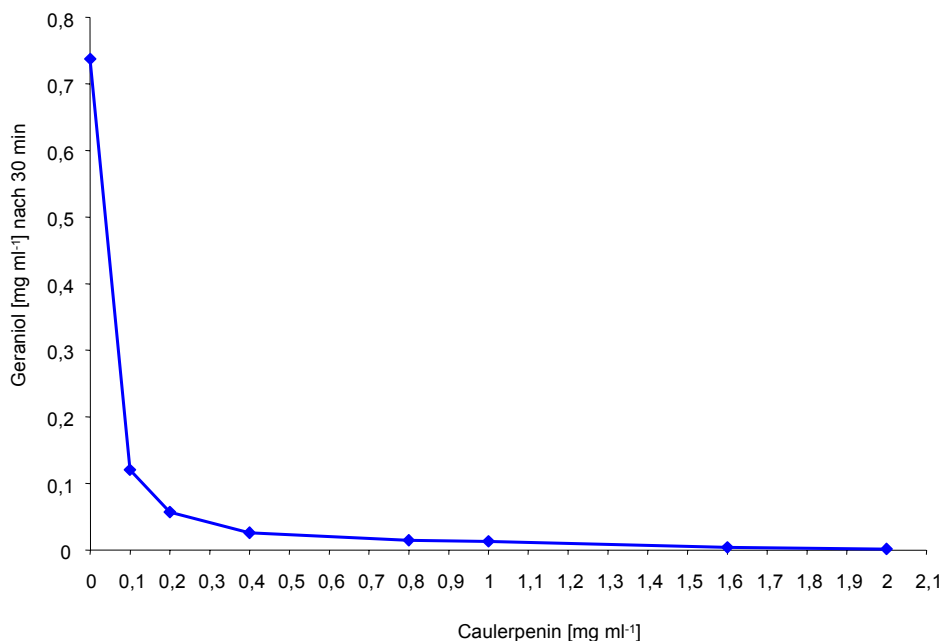


**Abbildung 50:** Esteraseinhibierung durch Caulerpenin (**7**).

Durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen Caulerpenin (**7**) zu CLE wird eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Inhibierung deutlich. Ermittelt man den Inhibierungserfolg für 0,26 mM (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) Caulerpenin (**7**) nach 30 min an 1 mg CLE, erhält man einen Wert von 64%. Das bedeutet, dass nur 36% Geraniol im Vergleich zur nicht-inhibierten Umsetzung entstehen. 0,53 mM **7** reduzierten die Umwandlung von Geranylacetat zu Geraniol auf 13% der nicht-inhibierten Menge. Die nahezu vollständige Inhibierung, die mit 60 µM Ebelacton B erreicht werden konnte, wird auch durch die Zugabe von 2,6 mM Caulerpenin (**7**) erreicht.

Eine Zusammenstellung der Inhibierungswerte nach einer Stunde zeigte, dass eine vollständige Inhibierung der Esterase durch eine Caulerpeninkonzentration von 5,3 mM (2 mg ml<sup>-1</sup>) möglich war (Abb. 51).

Die mittlere Inhibitorkonzentration (IC<sub>50</sub>) von Caulerpenin (**7**) für die Esterase aus *Candida lipolytica* nach 30 Minuten beträgt 0,21 mM (0,08 mg ml<sup>-1</sup>). Die erhaltenen Aktivitäten für die Esteraseinhibierung durch Caulerpenin (**7**) sind damit denen der Lipaseinhibierung vergleichbar. Als Lipaseinhibitor ist Caulerpenin (**7**) je nach Substrat in Konzentrationen von 2 mM bis 13 µM aktiv. <sup>[103]</sup>



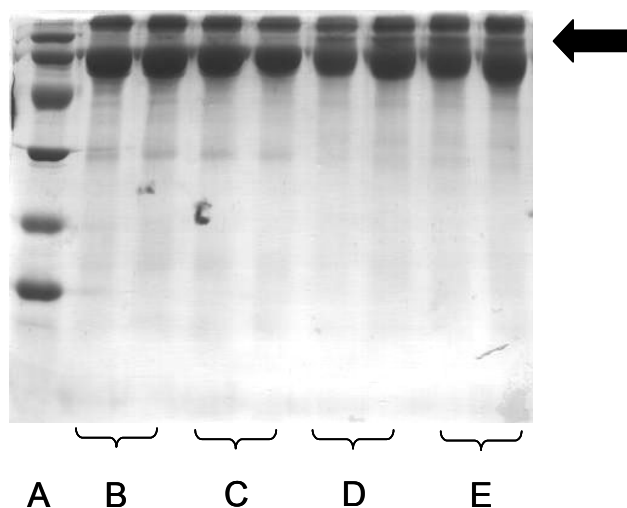
**Abbildung 51:** Konzentrationsabhängige Inhibierung von CLE durch Caulerpenin (**7**) (30 min).

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Esterase aus *Candida lipolytica* durch eine Vorinkubation mit Caulerpenin (**7**) inhibiert wird. Diese Inhibierung wird auch nach einer kompletten Umsetzung des Caulerpenins (**7**) aufrechterhalten, was bedeutet, dass die Caulerpeninfolgeprodukte an der Inhibierung beteiligt sind.

### 3.8.5 Untersuchung zum Inhibierungsmechanismus

Zur Untersuchung der Co-Polymerisation der Deacetylierungsprodukte des Caulerpenins (**7**) mit Proteinen wurde die Inhibierung der Esterasen CLE und PLE mit massenspektrometrischen Methoden näher untersucht. Hierzu wurden sowohl CLE als auch PLE eine Stunde mit Caulerpenin (**7**) vorinkubiert und die Proben danach vermessen. Wie schon in *C. taxifolia* konnten auch in diesem stark vereinfachten System weder mit MALDI-ToF noch mit ESI-MS definierte Additionsprodukte oder Oligomere nachgewiesen werden. Bei Versuchen in denen Cytochrom P450 dem Reaktionsgemisch als Copolymerisierungs Reagenz zugesetzt wurde, konnte eine Polymerbildung beobachtet werden, die jedoch ebenfalls in den massenspektrometrischen Untersuchungen keine weiteren Ergebnisse lieferte. Aus diesem Grund kam auch hier wieder die Gelelektrophorese zum Einsatz. Dazu wurde CLE mit Caulerpenin (**7**) umgesetzt und die Reaktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgebrochen (Abb. 52).





**Abbildung 52:** SDS-PAGE von CLE mit und ohne Caulerpenin (**7**); A: Marker; B: CLE, C: CLE + Cyn, 0 min, D: C: CLE + Cyn, 15 min, E: CLE + Cyn, 30 min.

Die Gelelektrophorese zeigt deutlich, dass es sich bei der Esterase um ein Proteingemisch handelt (Abb. 52). Das Hauptprotein liegt im Bereich von 66 000 Da, ein weiteres bei ungefähr 100 000 Da. Bei der Inkubation mit Caulerpenin (**7**) bildet sich im Verlauf der Reaktion eine weitere Bande im höhermolekularen Bereich aus. Hierbei handelt es sich wiederum um unspezifische Addukte (vgl. 3.8).

Eine bessere Auftrennung der oligomeren Proteine, auch der höhermolekularen Addukte könnte in weiteren Versuchen durch die Verwendung von Gelen, deren Polyacrylamidgehalt geringer ist, erreicht werden.

### 3.8.6. Zusammenfassende Betrachtung der Quervernetzungs- und Wundverschlussreaktionen

Der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**7**) wird in siphonalen Grünalgen der Gattung *Caulerpa* nach einer Verwundung esterasemediiert deacetyliert. Daraus entstehen reaktive Aldehyde, die mit Proteinen aus der Algenmatrix reagieren können. In Modellreaktionen konnte gezeigt werden, dass dabei unspezifische Reaktionen ablaufen, die zu einer Polymerisation des Reaktionsgemisches führen. In der Alge dient dieses Biopolymer zum schnellen Wundverschluss, der nicht nur für das Überleben der einzelligen Grünalge notwendig ist, sondern auch unabdingbar für die ungeschlechtliche Vermehrung ist. Die vegetative Vermehrung, bei der aus Bruchstücken der Algen neue Individuen heranwachsen ist ein Grund für die schnelle Ausbreitung von *C. taxifolia* im Mittelmeer, da sie unter anderem die Ausbreitung über die Anker der Schiffe ermöglicht.

Nähere Untersuchungen zum Mechanismus der Proteinquervernetzung, die Isolierung und Charakterisierung einzelner Produkte, sowohl in Modellsystemen als auch in der Alge werden zum besseren Verständnis dieses für Makroalgen neuartigen enzymatischen Polymerisierungsprozesses beitragen.

### 3.9. Untersuchungen zur Biosynthese von Terpenen in *C. taxifolia*

Da zu Beginn der Arbeit nur sehr wenig über die Entstehung von Terpenen in Algen bekannt war, sollte die Biosynthese des Sesquiterpens Caulerpenin (**7**) untersucht werden. Bei Terpenen handelt es sich um strukturell vielfältige, teilweise funktionalisierte acyclische und cyclische Kohlenwasserstoffe, die in allen Organismen nachgewiesen werden können und zum Teil lebenswichtige Aufgaben übernehmen. Die meisten Terpene finden sich in Pflanzen. Ihre Biosynthese erfolgt über den C<sub>5</sub> Baustein Isopren, so dass Terpene formal als Oligomerisations- und Polymerisationsprodukte des Isoprens angesehen werden können. Sie werden nach der Anzahl ihrer Isoprenbausteine in Hemi- (eine Isopreneinheit), Mono- (2), Sesqui- (3), Di- (4), Tri- (6) und Tetraterpene (8) eingeteilt. Aus den auf diese Weise gebildeten acyclischen Kohlenwasserstoffen können durch Substitutionen, Oxidationen, Cyclisierungen, Umlagerungen usw. eine Vielzahl von Verbindungen gebildet werden. Die vom Isopren ausgehende Terpenbiosynthese beginnt mit der enzymatischen Isomerisierung des Isopentenylpyrophosphats (**73**) (IPP) zu Dimethylallylpyrophosphat (**74**) (DMAPP). Durch die Kondensation des IPP (**73**) an DMAPP (**74**) durch Prenyltransferasen werden Ketten unterschiedlicher Längen aufgebaut (Abb. 53).

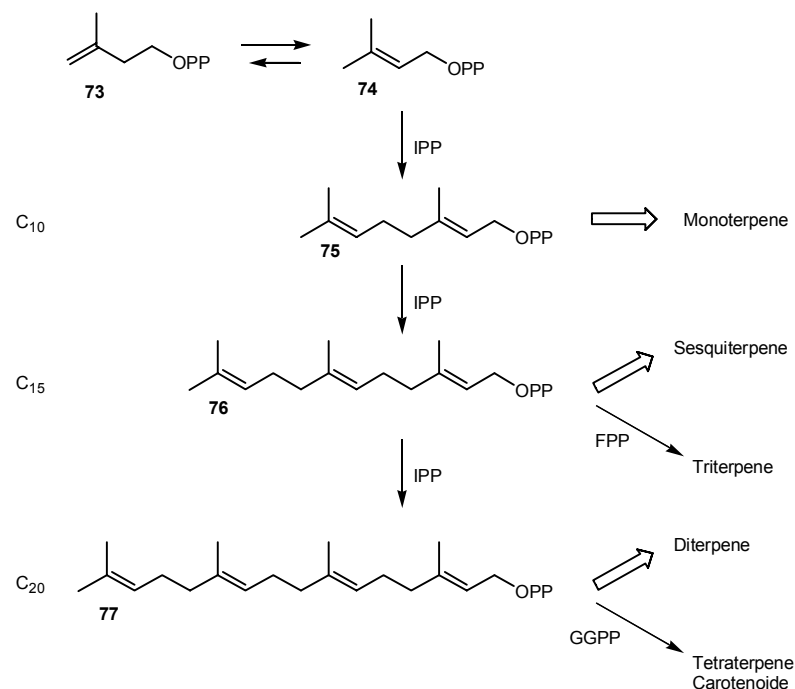


Abbildung 53: Ablauf der Terpenbiosynthese.<sup>[105]</sup>

IPP (**70**) kann über zwei verschiedene Biosyntheserouten, den Mevalonat (MVA)- und den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg, gebildet werden.(LIT)

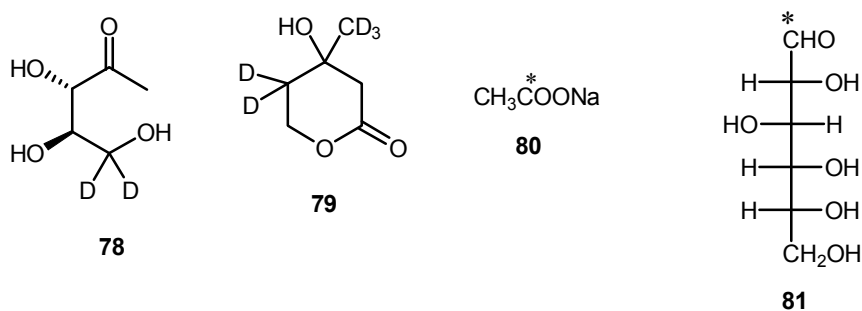
In höheren Pflanzen läuft die Biosynthese der einzelnen Terpenklassen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen ab. Während Mono-, Di- und Tetraterpene in den Plastiden synthetisiert werden, ist die Biosynthese von Sesquiterpenen und Sterolen überwiegend im Cytosol angesiedelt.<sup>[106]</sup> Diese Kompartimentierung ist auf die beiden Biosyntheserouten des Isoprens übertragbar. Während Enzyme des schon lange bekannten Mevalonat-Wegs überwiegend im Cytosol nachgewiesen wurden, konnten Enzyme des erst in den 80er Jahren von Rohmer *et al.*<sup>[105]</sup> aufgeklärten MEP-Wegs in den Plastiden lokalisiert werden.

Die Aufklärung der beiden Biosynthesewege erfolgt gewöhnlich über die Applikation und den Einbau isotopenmarkierter Vorstufen in die Terpene. Die unterschiedlichen Markierungsmuster erlauben dann die Zuordnung des einen oder anderen Wegs.

Während im Rahmen dieser Arbeit mit der Untersuchung der Terpenbiosynthese an *C. taxifolia* begonnen wurde, wiesen Schwender *et al.*<sup>[107]</sup> in neun unterschiedlichen Grünalgen Arten das ausschließliche Vorkommen des MEP-Wegs zur Terpenbiosynthese nach. Sie leiteten über dieses Ergebnis die Vermutung ab, dass dieser Biosynthese Weg in allen Grünalgen exklusiv zur Terpenbiosynthese genutzt wird. Bei dieser Studie wurden allerdings nur Mikroalgen untersucht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Unterschiede zur Terpenbiosynthese in Makroalgen bestehen, und die Untersuchung von *C. taxifolia* weiterhin sinnvoll erschien.

### **3.9.1 Versuche zur Aufklärung der frühen Schritte der Caulerpeninbiosynthese**

Die Aufklärung der frühen Schritte der Caulerpeninbiosynthese sollte auch in *C. taxifolia* durch die Applikation stabilisotopenmarkierter Verbindungen erfolgen. Für die Markierungsversuche standen [1-<sup>13</sup>C]-Acetat, [1-<sup>13</sup>C]-Glucose, deuteriertes Mevalolacton und deuterierte Deoxyxylulose (DOX) zur Verfügung (Abb. 54). Die beiden letzteren wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Jux zur Verfügung gestellt.<sup>[108]</sup>



**Abbildung 54:** Eingesetzte stabilisotopenmarkierte Vorstufen zur Untersuchung der Terpenbiosynthese: deuterierte DOX (**78**) und deuteriertes Mevalolacton (**79**), [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]-Acetat (**80**) und [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]-Glucose (**81**).

Für die Inkorporationsversuche ist es notwendig, die Substanzen in die Algen einzubringen. In terrestrischen Pflanzen erfolgt die Applikation der Vorstufen in erster Linie über die Wurzeln oder die Leitbündel. Hierzu werden die Vorstufen in Wasser gelöst und entweder ganze Pflanzen oder Pflanzenteile in diese Lösungen gestellt. Mit der Wasseraufnahme erfolgt die Aufnahme der Substanzen, und der Einbau in die einzelnen Terpene kann mit MS- und NMR-Techniken nachgewiesen werden.

Anders als in terrestrischen Pflanzen dienen Rhizoide in Algen meist nur als Haftorgane zur Fixierung der Thalli an Substraten, weshalb die Überwindung der Zellwand zur Einbringung von Vorstufen in Makroalgen ein großes Problem darstellt. *C. taxifolia* bildet jedoch eine Ausnahme, da sie in der Lage ist, organischen Kohlen- und Stickstoff und anorganischen Phosphor über die Rhizoide aufzunehmen und in die Assimilatoren an die Orte der Photosynthese zu transportieren. <sup>[109, 110]</sup>

Aus diesem Grund wurden die Vorstufen zunächst direkt dem Kulturmedium zugesetzt. Es konnte jedoch für keine der Vorstufen weder mit GC-MS noch mit NMR ein Einbau in das Sesquiterpen **7** nachgewiesen werden. Ein Problem bei dieser Art der Applikation stellte die konkurrierende Metabolisierung der Vorstufen durch Bakterien aus dem Medium dar. Dieses Problem sollte durch die Verwendung einer Reinkultur, die freundlicherweise von Prof. Müller in Konstanz etabliert wurde, umgangen werden.

Es wurde der Versuch unternommen, die Vorstufen direkt in die Alge zu injizieren. Der hohe Turgordruck im Inneren der Zelle verhinderte jedoch eine Injektion selbst geringster Mengen. Zur Senkung des Turgordrucks wurden die Algen in Medien mit erhöhter NaCl Konzentration vorinkubiert. Das führte allerdings nicht nur zur Senkung des Turgordrucks, sondern auch zum Absterben der Alge. Auch der Zusatz von Sorbitol, was für terrestrische Pflanzen sehr gut verträglich ist, führte zum Absterben der Algen. Durch den Einsatz eines Mikromanipulators, der kleine Probenmengen mit hohem Druck über eine Glaskapillare injizieren kann, gelang zwar eine direkte Injektion, die Polymerisierung des Cytosols in der

Spitze der Injektionskapillare verhinderte jedoch eine kontinuierliche Injektion über einen längeren Zeitraum, so dass nur sehr kleine Volumina in die Alge gespritzt werden konnten. Doch schon diese geringen Mengen hatten entweder das Absterben der gesamten Alge zur Folge oder es bildete sich direkt hinter der Einstichstelle ein Wundpfropf aus, der die Zelle verschloss und eine Verteilung der Substanzen in der Alge verhinderte.

Bei dem Versuch, die Zellwand durch das Bestreichen mit DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen permeabel zu machen, kam es wiederum zum direkten Absterben der Alge.

Die einzige markierte Verbindung die bis zu diesem Zeitpunkt in die Alge eingebracht werden konnte war  $^{13}\text{CO}_2$ . Dieses wurde als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt und in das Medium eingeleitet. Wie erwartet führte das zu einer kompletten  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Caulerpenins (7).

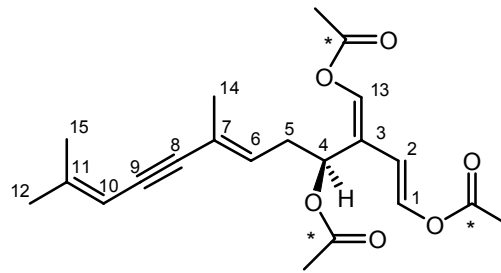
Durch das gezielte Aufbringen hoher Konzentrationen der markierten Substrate im Bereich der Rhizoide wurde versucht, die Alge zur Aufnahme zu bringen. Hierzu wurden die Rhizoide der Algen in Agar, der die markierten Substanzen in hohen Konzentrationen enthielt, fixiert. Doch auch hier konnte keine Markierung des Caulerpenins (7) in den Algen nachgewiesen werden.

Weil die Aufnahme von Nährstoffen über die Rhizoide besonders unter extremen Bedingungen beispielsweise in großer Tiefe zu beobachten ist <sup>[111]</sup>, wurden die Kulturbedingungen geändert und die Vorstufen erneut über die Rhizoide appliziert.

In den Aquarien wurde die Lichtintensität so weit herabgesetzt, dass die Lichtmenge für die Algen nicht mehr ausreichte, um ihren Energiebedarf über die Photosynthese zu decken. Unter diesen heterotrophen Wachstumsbedingungen waren die Algen zur Aufrechterhaltung ihrer Stoffwechselvorgänge darauf angewiesen, Nährstoffe aus ihrer Umgebung, in diesem Fall [1- $^{13}\text{C}$ ]-Acetat, aufzunehmen.

Dieser Versuch wurde mit frisch gesammelten, intakten *C. taxifolia* in Nizza durchgeführt. Die Rhizoide der Algen wurden in kleine Gefäße überführt, die in künstlichem Seewasser gelöstes [1- $^{13}\text{C}$ ]-Acetat in hoher Konzentration ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) enthielten. Nach fünf bis sieben Tagen unter reduzierten Lichtbedingungen wurden die Algen nach Bligh und Dyer extrahiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster in NMR-Messungen bestimmt.

Durch vergleichende NMR-Analyse des gereinigten Caulerpenins (7), das aus markierten und nicht-markierten *C. taxifolia* extrahiert wurde, konnte eine Erhöhung des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes nachgewiesen werden. Es war jedoch kein Einbau des markierten Acetats in das Sesquiterpengerüst nachweisbar. Eine selektive Erhöhung des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes konnte nur in den Acetylgruppen nachgewiesen werden (Abb. 55).



**Abbildung 55:**  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster in Caulerpenin (**7**) aus *C. taxifolia* nach Applikation von  $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat. \* = signifikant erhöhter  $^{13}\text{C}$ -Gehalt.

Während die Markierung an C1 und C13 eindeutig beweist, dass die markierte Verbindung in die Alge aufgenommen wurde, könnte die besonders starke Isotopenanreicherung an C4 auf eine reversible Acetylierung und Deacetylierung des Caulerpenins (**7**) in Anwesenheit von  $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat durch die Esterasen zurückzuführen sein. Die Tatsache, dass die Gerüstatome des Sesquiterpens nicht markiert wurden, lässt den Schluss zu, dass die Acetylierung nicht gleichzeitig mit der Biosynthese des Kohlenstoffgrundgerüsts abläuft. Eine solche Trennung könnte entweder räumlich erfolgen, was bedeuten würde, dass diese Reaktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der Alge ablaufen würden. Zum anderen könnte die Trennung zeitlich erfolgen, d.h. eine Acetylierung ist erst nach dem Aufbau des kompletten Terpengrundgerüsts möglich.

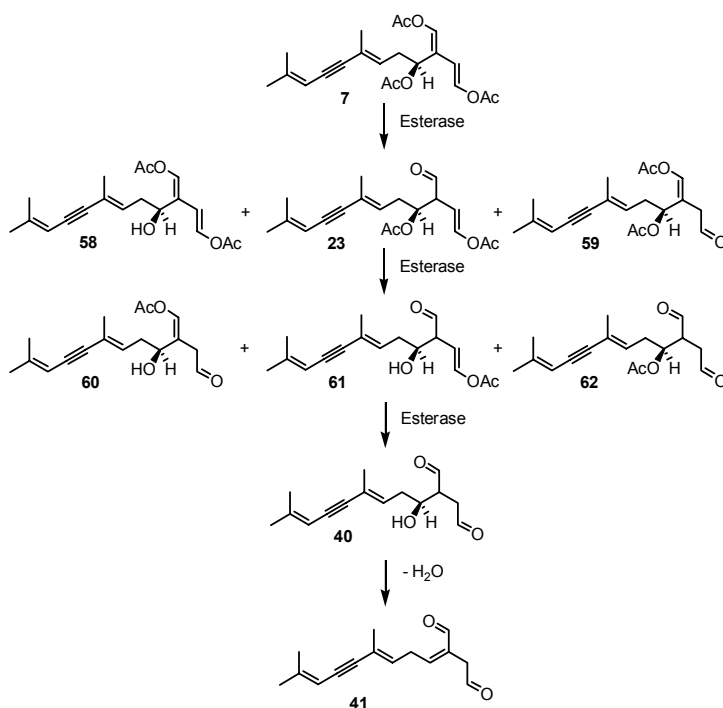
Da in den NMR-Messungen eine Erhöhung des  $^{13}\text{C}$ -Gesamtgehaltes nachgewiesen werden konnte, die sich nicht im Terpengerüst des Caulerpenins (**7**) zeigte, wurde zur Überprüfung der Methode zusätzlich Sitosterol aus den Algen extrahiert. Durch wiederholte  $^{13}\text{C}$ -NMR Analyse wurde auch hier die Isotopenhäufigkeit der einzelnen Gerüstatome des Steroids gemessen. Die integrierbaren Signale ließen allerdings keine Rückschlüsse auf die Biosynthese des Sterols zu.

In *C. taxifolia* ist keine selektive Markierung des Sesquiterpengerüsts von Caulerpenin (**7**) und des Steroidgerüsts von Sitosterol in Fütterungsexperimenten mit unterschiedlichen markierten Vorstufen der Terpenbiosynthese nachweisbar. Die Aufnahme von  $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat in die Grünalge und der Nachweis der Markierung der Acetylreste an C1 und C13 ist das erste Beispiel für die Aufnahme und den Einbau markierter Substanzen in Makroalgen.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die schnelle Ausbreitung des mediterranen Stamms der Grünalge *C. taxifolia* im Mittelmeer und im Nordamerikanischen Pazifik wird durch viele Faktoren begünstigt, als einer wird die effektive chemische Verteidigung diskutiert. Bisher wurde angenommen, dass es sich dabei um eine konstitutive Verteidigung durch den Hauptsekundärmetabolit Caulerpenin (**7**) handelt.

- Dass die Rolle des Caulerpenins (**7**) keinesfalls eine statische ist, konnte durch eine umfangreiche Untersuchung der chemischen und biochemischen Abläufe in der Alge nach einer Verwundung gezeigt werden. Sobald die Zellwand verletzt wird, wird ein dynamischer Prozess in Gang gesetzt, in dessen Verlauf Caulerpenin (**7**) in den Dialdehyd Oxytoxin 2 (**41**) umgewandelt wird.
- In Abfangversuchen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) konnten weitere labile Caulerpeninfolgeprodukte stabilisiert und isoliert werden. Es handelt sich dabei um Aldehyde, die durch eine schrittweise Abspaltung der Acetylgruppen aus Caulerpenin (**7**) entstehen. Sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die nahezu neutralen Bedingungen in der Alge deuteten auf einen enzymatischen Prozess hin (Abb. 56).



**Abbildung 56:** Ablauf der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia*. Durch eine schrittweise Abspaltung der Acetylgruppen entstehen nach Tautomerisierung reaktive Aldehyde.

- In Versuchen, in denen die Umsetzung von Farnesylacetat zu Farnesol durch verwundete *C. taxifolia* beobachtet wurde, konnte eine Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Durch die Applikation des Monoterpens Geranylacetat (**55**) und dem Nachweis von dessen Deacetylierung in verwundeten Algen, konnte gezeigt werden, dass die Esterase eine hohe Substrattoleranz besitzt. Die Esterase konnte durch den Esteraseinhibitor Ebelacton B inhibiert werden. Das Sesquiterpen Caulerpenin (**7**) wird also durch eine Esterase schrittweise deacetyliert und es werden reaktive Aldehyde freigesetzt. Aus der vollständigen Abspaltung aller Acetylgruppen resultiert ein ungesättigter 1,4-Dialdehyd Oxytoxin 2 (**41**) der bisher nur aus spezialisierten Schnecken, deren Nahrung siphonale Grünalgen der Gattung *Caulerpa* darstellen, bekannt war (Abb. 56).
- Damit es zu keiner Caulerpeninumwandlung in der intakten Alge kommt, scheint eine Kompartimentierung von Substrat und Enzym vorzuliegen. In Versuchen mit dem fluorogenen Substrat ELF 97 (**57**) konnte eine Esteraseaktivität ausschließlich im Cytoplasma oder dem Vakuoleninhalt, nachgewiesen werden. Durch die Verletzung der Zellwand wird die Kompartimentierung aufgehoben, die Esterase kommt mit dem Substrat Caulerpenin (**7**) in Kontakt und die Deacetylierung läuft ab. In Modellversuchen mit käuflichen Esterasen konnte Caulerpenin (**7**) deacetyliert werden.
- Die Rolle, die eine enzymatische Caulerpeninumwandlung für die Ausbreitung der Alge spielt konnte in einer vergleichenden Studie invasiver und nicht-invasiver *Caulerpa* Arten aus dem Mittelmeer evaluiert werden. Alle untersuchten Arten enthalten Caulerpenin (**7**) in vergleichbaren Mengen. Auch die Transformation erfolgt mit ähnlichen Kinetiken und folgt dem gleichen Mechanismus. Da die reaktiven Aldehyde in allen untersuchten *Caulerpa*-Arten nachgewiesen werden konnten, stellt weder Caulerpenin (**7**) noch die verwundungsaktivierte Caulerpeninumwandlung den Schlüssel zum Erfolg der invasiven Arten dar.
- Ob es sich bei der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in *C. taxifolia* um eine aktivierte Verteidigung handelt, stellte eine wichtige ökologische Frage dar, die in der Arbeit noch nicht zufrieden stellend untersucht werden konnte. Zur Überprüfung müsste die Wehrchemie in Bioassays, die die dynamische Produktion der reaktiven Aldehyde **58-62** berücksichtigen, sowohl im Labor als auch in der natürlichen Umgebung getestet werden. Für derartige Bioassays wurden in dieser Arbeit grundlegende Methoden erarbeitet, auf denen zukünftige ökologische Untersuchungen aufbauen können.



- Für das Überleben der siphonalen *Caulerpa* ist ein schneller Wundverschluss nach Verletzung notwendig. Bei der Wundreaktion kommt es zu einer Polymerisierung eines Teils des Algeninhalts, was auch bei der Homogenisierung des Algenmaterials im Mörser beobachtet werden kann. Die Analogie im zeitlichen Ablauf der Caulerpeninumwandlung und der Polymerisation des Algenhomogenisats deutete auf einen Zusammenhang dieser beiden Prozesse hin. Die Applikation des Esteraseinhibitors Ebelacton B, der die Caulerpeninumwandlung herabsetzt, verhinderte die Entstehung eines Wundpfropfens in verwundeten Algen. Die zeitabhängige Quantifizierung des caulerpeninabgeleiteten Endprodukts Oxytoxin 2 (**41**) deutet auf Folgereaktionen des Dialdehyds mit dem Algenmaterial hin. Es konnten allerdings keine niedermolekularen Produkte identifiziert werden. In gelelektrophoretischen Untersuchungen konnten Reaktionen der Aldehyde mit Proteinen aus den Algen nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um unspezifische und ungerichtete Polymerisationsreaktionen, die insbesondere zu höhermolekularen Addukten führen. Interessante biochemische Fragestellungen entstehen rund um den Mechanismus der Wundverschlussbildung. Durch den Einsatz markierter Proteine könnten erste Hinweise auf Größe und Eigenschaften der Proteinaddukte erhalten werden. Die Synthese eines fluoreszenz- oder fluormarkierten Caulerpeninanalogs könnte in mikroskopischen bzw. NMR spektroskopischen Untersuchungen weitere Hinweise zu dem Reaktionsmechanismus der Aldehyde mit den Proteinen liefern. Auch Caulerpenin-Addukte an Proteinen sollten charakterisierbar sein und weitere mechanistische Aufschlüsse liefern.
- In Modellreaktionen mit Esterasen zeigte sich, dass Caulerpenin (**7**) bzw. seine reaktiven Umwandlungsprodukte in der Lage sind, diese Enzyme zu inhibieren. Da bei dieser Reaktion ein polymerer Niederschlag entstand, wird vermutet, dass die Inhibierung ähnlich den Reaktionen der Aldehyde mit Proteinen abläuft und es auch hier über Quervernetzungsreaktionen zu einer Inaktivierung der Esterase kommt. Neben seinen bekannten Eigenschaften als Lipase- und Phospholipase A<sub>2</sub>-Hemmer, ist Caulerpenin (**7**) somit auch ein Esteraseinhibitor. Eine sorgfältige Untersuchung zum Mechanismus der Inhibierung von Lipasen und der Phospholipase A<sub>2</sub> durch Caulerpenin (**7**) könnte zeigen, ob die Inhibierung auch bei diesen beiden Enzymen auf eine Reaktion der Caulerpeninumwandlungsprodukte zurückzuführen ist.
- Durch die Applikation von <sup>13</sup>C-Acetat unter heterotrophen Wachstumsbedingungen gelang erstmalig der Nachweis der Aufnahme einer stabilisotopenmarkierten Verbindung in Sekundärmetaboliten von intakten Makroalgen. Diese Methode kann in weiterführenden Untersuchungen der Terpenbiosynthese in *C. taxifolia* mit Isotopen

Verhältnis Massenspektrometrie herangezogen werden, die es erlauben würde geringe Markierungsgrade von Sekundärmetaboliten zu erfassen, und die natürliche Isotopenverteilung zu analysieren.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ac	Acetyl
APS	Ammonium Persulfat
CLE	Esterase aus <i>Candida lipolytica</i>
Cyn	Caulerpenin
DAD	Diodenarray
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Deoxyxylulose
DTT	Dithiothreitol
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalolacton
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAM 40	Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 %
SDS	Natriumdodecylsulfat
sh	Schulter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ToF	Time of Flight
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleic

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien und Geräte

#### 6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance DRX 500 bzw. Bruker AV 400 aufgenommen.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm, die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Lösungsmittel, das als interner Standard dient:

Lösungsmittel	$\delta$ -Werte $^1\text{H-NMR}$	$\delta$ -Werte $^{13}\text{C-NMR}$
$\text{CDCl}_3$	7,24 ppm	77,0 ppm
$[\text{d}_6]\text{-DMSO}$	2,49 ppm	39,7 ppm
$[\text{d}_6]\text{-Benzen}$	7,27 ppm	128,0 ppm

#### 6.1.2 Massenspektrometrie (MS)

##### 6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

EI-Spektren wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV mit folgenden Geräten aufgenommen:

Finnigan Trace MS; GC-Säule: Alltech EC 5 15 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

Finnigan GCQ; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

Finnigan MAT Magnum; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

Hochauflösende Massenspektren wurden entweder mit Direkteinlass oder unter Verwendung einer Kopplung mit einem Gaschromatographen aufgenommen:

Micromass MassSpec 2 verbunden mit einem Hewlett Packard 6890 Gaschromatographen

GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

Perfluorokerosen (Aldrich, Deisenhofen) wurde als Kalibrierungsgas verwendet.

##### 6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Für ESI-MS und APCI-MS Messungen wurde ein Ion-Trap Gerät verwendet:

Finnigan LCQ mit APCI und ESI Ionenquelle

HPLC: Hewlett Packard 1100 System

Die HPLC-Separation erfolgte unter Normalphasenbedingungen auf einer Nucleosil 50-5, CC 125/2 Säule (Macherey-Nagel, Düren) oder einer Nucleosil 50-5, CC 250/4 Säule (Macherey-Nagel, Düren) und unter Umkehrphasenbedingungen auf einer RP-18 LiChrospher 100-5, LichroCART 250/4 Säule (Merck, Darmstadt).

Lösungsmittel Normalphase: n-Hexan, Rotisolv HPLC (Roth, Karlsruhe)

Ethylacetat, Rotisolv HPLC (Roth, Karlsruhe)

Lösungsmittel Umkehrphase: Acetonitril, Lichrosolv für HPLC (Merck, Darmstadt)

Wasser, quartzdestilliert

### 6.1.3 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV (254 nm und 366 nm) und / oder Anfärbung durch Erhitzen nach Behandlung im Tauchbad mit *Seebach*-Reagenz.

*Seebach*-Reagenz Tauchbad: 2.5 g Molybdätophosphorsäure und 1 g Cer(IV)sulfat werden in 65 ml Wasser gelöst und vorsichtig unter Rühren 6 ml konz. Schwefelsäure zugetropft.

### 6.1.4 Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde an Kieselgel (Silica 32-60, 60 Å, ICN, Eschwege) oder an Florisil (aktiviertes Magnesiumsilikat, 100-200 mesh, Act. Temp. 1200°F, Aldrich, Deisenhofen) als Flash-Chromatographie durchgeführt.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Haltung der Algen

#### 6.2.1.1 Künstliches Seewasser

Für 5 l künstliches Seewasser werden 165 g Instant Ocean (Aquarium Systems, Mentor, Ohio, USA) in 5 l quartzdestilliertem Wasser so lange gerührt, bis das Salz vollständig gelöst

ist. Nach Zugabe von 1,1 ml Lösung 3 und 2,45 ml Lösung 4 (siehe unten) kann das Wasser nach Temperaturgleich an die Kulturbedingungen verwendet werden.

### 6.2.1.2 Herstellung von Seewasser nach Maier<sup>[112]</sup>

Für 5 l Seewasser werden:

120 g	NaCl
40 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
3,75 g	KCl
7,5 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
6 g	HEPES (freie Säure)
0,2 g	NaHCO <sub>3</sub>

in ein 5 l Becherglas eingewogen. Dazu werden die folgenden Lösungen gegeben:

<b>Lösung 3</b>	1,1 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,79 g/ 200ml
<b>Lösung 4</b>	2,45 ml	NaNO <sub>3</sub>	17,9 g/ 200ml
<b>Lösung 11</b>	50 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O mit HCl auf pH 3 einstellen	3,5 g/ 500ml
<b>Lösung 16</b>	5 ml	Na <sub>2</sub> -Glycerophosphat x 5 H <sub>2</sub> O	12 g/ 500ml
<b>Lösung 17</b>	5 ml	AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O KI RbCl LiCl SrCl x 6 H <sub>2</sub> O KBr Lösung mit 1 Tropfen 10 M NaOH vor dem Auffüllen alkalisieren (pH 10-12)	60,5 mg/ 500 ml 83 mg/ 500 ml 90 mg/ 500 ml 530 mg/ 500 ml 13,35 mg/ 500 ml 29,76 mg/ 500 ml
<b>Lösung 19</b>	5 ml	Thiamin HCl Biotin (Vitamin H) Cyanocobalmin (Vitamin B12) Nicotinsäureamid	50 mg/ 500 ml 0,5 mg/ 500 ml 0,5 mg/ 500 ml 0,1 mg/ 500 ml

mit quartzdestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt und bis die Salze vollständig gelöst sind gerührt. Danach wird der pH Wert mit 10 N NaOH auf 7,8 eingestellt, das Seewasser in autoklavierbare ein-Liter-Flaschen überführt und 20 Minuten bei 121°C (mit Medienfühler) autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird je 1 ml der separat autoklavierten **Lösung 18** zugegeben.

<b>Lösung 18</b>	1 ml	Na <sub>2</sub> EDTA	18,61 g/ 500 ml
		(NH <sub>4</sub> )Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	4,9 g/ 500 ml
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,09 g/ 500 ml
		MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,99 g/ 500 ml
		ZnCl <sub>2</sub>	0,68 g/ 500 ml
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,24 g/ 500 ml
		CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	25 mg/ 500 ml
		CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	12 mg/ 500 ml
		NaVO <sub>3</sub>	6 mg/ 500 ml
		Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,3 mg/ 500 ml

Alle Lösungen werden mit der in der Tabelle angegebenen Menge quartzdestilliertem Wasser angesetzt.

### 6.2.1.3 Kultivierung von *Caulerpa taxifolia*:

Frische *C. taxifolia* wurden in Villefranche-sur-mer gesammelt und per Express nach Jena geschickt. Hier wurden sie mit Seewasser gewaschen und in belüftete Aquarien überführt, die je nach Größe 10-30 l künstliches Seewasser enthielten. Die Aquarien wurden mit einer Photoperiode 14 h Licht/ 10 h Dunkelheit beleuchtet und bei einer Außentemperatur von 23-25°C gehalten. Ein- bis zweimal im Monat wurden 2/3 des Wassers gewechselt (bei Rotalgenbefall das gesamte Wasser), die Algen mit sauberem Seewasser gewaschen, vorsichtig von äußeren Kontaminationen gesäubert und in ein sauberes Aquarium mit temperiertem Seewasser überführt.

### 6.2.1.4 Haltung von *Caulerpa taxifolia*, *Caulerpa racemosa* und *Caulerpa prolifera*

Je 1 kg Proben der 3 *Caulerpa* Arten wurden im Oktober 2001 an ruhigen Standorten an der Mittelmeerküste in der Gegend von Nizza gesammelt:

*C. taxifolia*, Villefranche-sur-mer, Hafen, 5m Tiefe

*C. prolifera*, Antibes-Juan-les-Pins, Hafen von Crouton, 1m Tiefe

*C. racemosa*, Villefranche-sur-mer, le Lido, 15m Tiefe

In Jena wurden alle Algen zur Equilibrierung in belüftete Aquarien überführt, die je nach Größe 10-30 l künstliches Seewasser (Instant Ocean, Aquarium Systems, Mentor, Ohio, USA) enthielten. Sie wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten wie *C. taxifolia* (s.o.). Für die Versuche wurden nur intakte Individuen ohne Verletzung oder Anzeichen von Ausbleichen verwendet.

#### **6.2.1.5 Kultivierung der unialgalen *C. taxifolia* Kultur**

Eine unialgale *C. taxifolia* Kultur wurde aus Bruchstücken des Mittelmeerisolats in aufwendigen Reinigungsschritten von Prof. Müller in Konstanz hergestellt (D.G. Müller persönliche Mitteilung). Die Algen wurden in stehender Kultur in 250 ml Glasschalen (Weck, Bonn-Duisdorf) bei einer Temperatur von 20°C mit einer Photoperiode 14 h Licht/ 10 h Dunkelheit gehalten. Alle zwei bis drei Wochen, je nach Größe der Algen, wurden die Thalli zur Vermeidung von Kontaminationen unter der Sterilbank, in frisches Seewassermedium nach Maier (s.o.) umgesetzt. Sowohl die Glasschalen als auch die für das Umsetzen benötigten Pasteurpipetten wurden vor Gebrauch hitzesterilisiert (ca. 2h bei 130°C). Skalpell und Pinzette wurden durch Abflammen mit Ethanol sterilisiert.

#### **6.2.2 Extraktion von Caulerpenin aus *C. taxifolia*:**

##### **Mit Ethylacetat:**

50 g Algen werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser zu einem feinen Puder zerrieben. Zu dem kalten Algenhomogenisat werden 50 ml Ethylacetat gegeben und die Mischung ca. eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Über eine Fritte mit Celite werden die Algenrückstände abfiltriert und die klare, dunkelgrüne organische Phase zur Abtrennung der Fettsäuren mit gesättigter  $K_2CO_3$ -Lösung ausgeschüttelt und danach 30 min über  $Na_2SO_4$  getrocknet.

##### **Nach Bligh und Dyer:**

Für die Extraktion nach Bligh und Dyer<sup>[72]</sup> werden 0,8 Teile Wasser, 1 Teil Chloroform und 2 Teile Methanol eingesetzt. 50 g *C. taxifolia* enthalten ungefähr 16 ml extrahierbares Wasser, die Menge Chloroform und Methanol berechnet sich entsprechend.



50 g Algen werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser zu einem feinen Puder zerrieben. Zu dem kalten Algenhomogenisat werden 20 ml Chloroform und 40 ml Methanol gegeben und die Mischung über Nacht bei 4 °C gerührt. Über eine Fritte mit Celite werden die Algenrückstände abfiltriert und das Filtrat in einen Schütteltrichter überführt. Zur Entmischung der Phasen werden 1 Teil Wasser (20 ml) und 1 Teil Chloroform (20 ml) zugegeben. Die Chloroformphase wird zur Abtrennung der Fettsäuren mit gesättigter  $K_2CO_3$ -Lösung ausgeschüttelt und danach 30 min über  $Na_2SO_4$  getrocknet.

### 6.2.3 Aufreinigung von Caulerpenin aus:

#### Der Ethylacetatextraktion:

Nach der Trocknung wird der Extrakt im Vakuum eingeeengt und säulenchromatographisch über Kieselgel mit Petrolether/ Ethylacetat 7:3 gereinigt. Man erhält reines Caulerpenin (7) als zähflüssiges gelbes Öl.

#### Der Bligh und Dyer Extraktion:

Nach der Trocknung wird der Extrakt im Vakuum eingeeengt und säulenchromatographisch über Kieselgel mit Petrolether/ Ethylacetat 7:3 gereinigt. Zur Abtrennung von Sterolen werden die Caulerpenin (7) enthaltenden Fraktionen vereinigt und über Florisil so lange mit Petrolether/ Ether 8:2 gesäult, bis die Sterole eluiert sind (DC Kontrolle). Danach wird mit Petrolether/ Ether 5:5 das Caulerpenin (7) eluiert. Man erhält mehrere mg reines Sitosterol und Caulerpenin (7).

### 6.2.4 Untersuchung verwundeter *C. taxifolia* mit RP-HPLC-UV

3 g *C. taxifolia* werden mit 1 ml reinem Seewasser versetzt, gemörsert und die Flüssigkeit abgenommen. Nach direkter Zentrifugation wird der Überstand an der RP-HPLC vermessen und mit UV detektiert.

Säule: s.o.

Laufmittel A: Wasser

Laufmittel B: Acetonitril

Flussrate: 1 ml/min

Gradient: Wasser mit 0%, 5 min 65%, 15 min 100%, 17,5 min 0% Acetonitril

Detektionswellenlänge DAD-UV Detektor: 254 nm

## 6.2.5 Quantifizierung von Caulerpenin:

### In intaktem Algengewebe:

Für die Quantifizierung des Caulerpeningehalts in intaktem Algengewebe werden 3 g der zu untersuchenden Algen (*C. taxifolia*, *C. racemosa* und *C. prolifera*) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser zu einem feinen Puder zerrieben. Das kalte Algenmaterial wird mit 3 ml Ethylacetat, das 1 mg ml<sup>-1</sup> 4-Methoxyacetophenon als internen Standard enthält, vermischt. Während des Aufwärmvorgangs auf ca. 0°C wurde weiter gemörsert und die kalte Mischung 5 min bei 15000 G zur Phasentrennung zentrifugiert. 20 µl der organischen Phase wurden direkt zur Quantifizierung an der NP-HPLC/MS vermessen.

Säule: Nucleosil 50-5, CC 125/2 Säule

Laufmittel A: Hexan

Laufmittel B: Ethylacetat

Flussrate: 0,5 ml/min

Gradient: Hexan mit 0%, 10 min 20%, 10,5 min 0% Ethylacetat

Detektionswellenlänge DAD-UV Detektor: 252 nm

### APCI-MS Parameter:

vaporizer temperature 450°C

sheath gas 25 arb capillary temperature 150°C

auxilliary gas 6 arb capillary voltage 13 V

discharge current 5 µA tube lens offset 25 V

### APCI-MS:

Caulerpenin (7) (*m/z* (%)): 375 (2), 315 (7), 273 (58), 256 (56), 231 (11), 213 (100), 196 (8), 177 (35)

NMR: siehe Literatur<sup>[43]</sup>

### In verwundetem Algengewebe

Für die Quantifizierung des Caulerpeningehalts in verwundetem Gewebe werden 3 g der zu untersuchenden Algen (*C. taxifolia*, *C. racemosa* und *C. prolifera*) gemörsert und nach definierten Reaktionszeiten mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog der Quantifizierung im intakten Gewebe.

### 6.2.6 Bestimmung des Extraktionserfolges unterschiedlicher Extraktionsmethoden

Zur Bestimmung des Extraktionserfolges von unterschiedlichen Extraktionsmethoden wurden die Algen wie oben beschrieben homogenisiert und dreimal mit dem gewünschten Lösungsmittel extrahiert. Der Caulerpeningehalt wird nach der oben angegebenen Methode mit NP-HPLC-UV bei 252 nm quantifiziert.

#### Ethylacetat:

3g *C. taxifolia* werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und das Homogenisat wird dreimal mit je 3 ml Ethylacetat, das 1 mg ml<sup>-1</sup> 4-Methoxyacetophenon als internen Standard enthält, erschöpfend extrahiert. Jeweils 20 µl der organischen Phase werden direkt mit NP-HPLC-UV analysiert und so der Extraktionserfolg in drei unabhängigen Extraktionen bestimmt. Die Peakfläche von Caulerpenin (7) wird über den internen Standard normiert. Der Extraktionserfolg im ersten Schritt berechnet sich aus der durch dreimalige Extraktion erhaltenen maximal extrahierbaren Caulerpeninmenge.

Extraktion	Peakfläche Cyn normiert	Extraktionserfolg in %
1.	15 775	92,6
2.	632	3,7
3.	623	3,7
1.	18 973	96,8
2.	322	1,6
3.	306	1,6
1.	13872	93,3
2.	606	4
3.	395	2,7

#### Methanol:

3 g *C. taxifolia* werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und das Homogenisat wird dreimal mit je 3 ml Methanol, das 1 mg ml<sup>-1</sup> 4-Methoxyacetophenon als

internen Standard enthält, erschöpfend extrahiert. Jeweils 20 µl der organischen Phase werden direkt mit NP-HPLC-UV analysiert und so der Extraktionserfolg in drei unabhängigen Extraktionen bestimmt.

Extraktion	Peakfläche Cyn normiert	Extraktionserfolg in %
1.	14458	78,8
2.	3159	17,2
3.	753	4
1.	15731	91,7
2.	912	5,3
3.	504	3
1.	10852	78,2
2.	2000	14,4
3.	1021	7,4

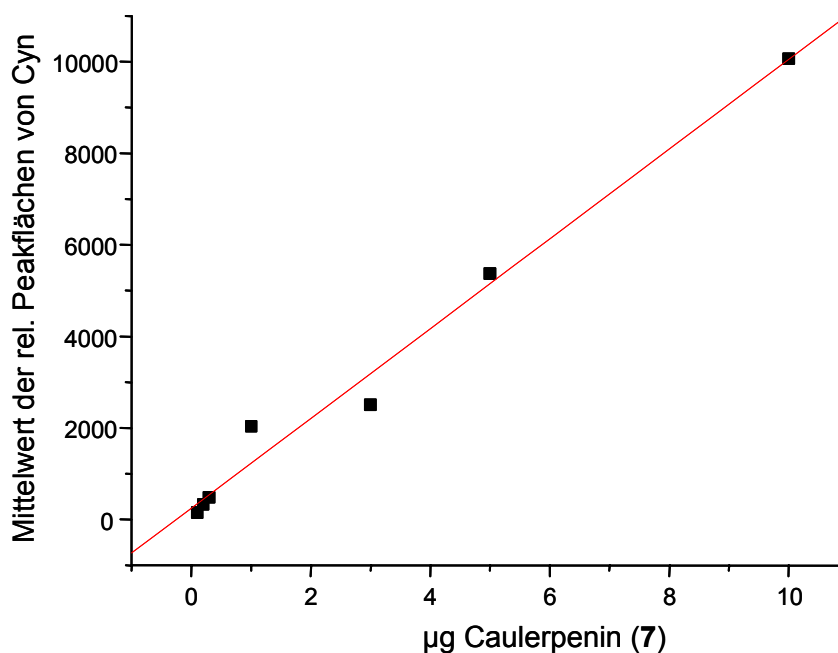
### **Bligh und Dyer:**

Für die Extraktion nach Bligh und Dyer werden 1 Teil Chloroform und 2 Teile Methanol gemischt. Da die Algen einen hohen Wassergehalt haben, wird dem Gemisch kein Wasser zugesetzt, sondern die Menge Chloroform und Methanol auf die extrahierbare Wassermenge in den Algen umgerechnet. 3 g *C. taxifolia* enthalten ungefähr 1 ml extrahierbares Wasser und werden mit 1,25 ml Chloroform und 2,5 ml Methanol, das 3 mg 4-Methoxyacetophenon als internen Standard enthält, extrahiert, nachdem sie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert wurden. Nach Zentrifugation werden dem Überstand 1,25 ml Wasser und 1,25 ml Chloroform zur Phasentrennung zugesetzt. Der Caulerpeningehalt in der organischen Phase wird mit NP-HPLC-UV bestimmt. Für die beiden folgenden Extraktionsschritte wird der Algenrückstand mit 1 ml Wasser versetzt und dann wie oben beschrieben extrahiert. Jeweils 20 µl der organischen Phase werden direkt mit NP-HPLC-UV analysiert und so der Extraktionserfolg bestimmt.

Extraktion	Peakfläche Cyn normiert	Extraktionserfolg in %
1.	20000	95
2.	530	2,5
3.	523	2,5
1.	16021	93
2.	628	3,7
3.	577	3,3
1.	12523	96
2.	320	2,5
3.	201	1,5

Für alle Quantifizierungen wird die Identität des Caulerpenin-Signals mit DAD-UV und MS Detektion bestätigt. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibration mit aufgereinigtem Caulerpenin (7) durchgeführt. Das Signal war linear im Bereich von 0.1 bis 10 µg Caulerpenin ( $P < 0.0001$ ,  $R = 0.99$ ,  $n = 3$ ).

Cyn in µg	rel. Peakfläche Cyn	rel. Peakfläche Cyn	rel. Peakfläche Cyn	Mittelwert rel. Peakfläche Cyn	Standardabweichung	Standardfehler
0,1	143	143	168	151,33	14,434	8,333
0,2	342	319	324	328,33	12,097	6,984
0,3	460	490	498	482,67	20,033	11,566
1	2040	2041	2033	2038	4,359	2,517
3	2505	2500	2512	2505,67	6,028	3,480
5	5504	5248	5358	5370	128,421	74,144
10	10051	10035	10114	10066,67	41,765	24,113



**Abbildung 57:** Regressionsgerade der Caulerpeninquantifizierung

### 6.2.7 Nachweis von Oxytoxin 2 (41) in verwundeten *C. prolifera*

Die Extraktion des Caulerpenins (7) und seiner Folgeprodukte erfolgte in *C. prolifera* nach dem für *C. taxifolia* beschriebenen Protokoll. Für die Quantifizierung des Oxytoxin 2 (41) in verwundetem Algengewebe wurde parallel zur Caulerpeningehaltsbestimmung die Peakfläche des Dialdehyds 41 in der APCI-MS Massenspur bei  $m/z = 231$  bestimmt. Da Oxytoxin 2 (41) wegen seiner Instabilität nicht zu Kalibrationsmessungen genutzt werden kann, konnten keine Absolutmengen bestimmt werden. Aus diesem Grund werden die relativen Peakflächen angegeben.

#### APCI-MS:

APCI-MS Oxytoxin 2 (41) ( $m/z$  (%)): 213 (70), 231 (100), 177 (18)

Die Identität von Oxytoxin 2 (41) wurde in direkten GC/HR-MS Messungen der Ethylacetatextrakte verwundeter *C. prolifera* verifiziert. Dazu wurden die Algen wie bei der Caulerpeninbestimmung in verwundetem Algengewebe vorbereitet. Dem Ethylacetat wurde kein interner Standard zugesetzt. Die Messung ergab: 230.1305; berechnet: 230.1307 [C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>]

EI-MS (70eV;  $m/z$  (%)): 230(100), 215(42), 201(15), 187(59), 159(45), 143(15), 131(17), 115(14).

### 6.2.8 Herstellung des semisynthetischen Hydrazonstandards

5 mg gereinigtes Caulerpenin (**7**) wurden in 1 ml Ethanol gelöst. Unter Rühren und Kühlen wurden 2 ml einer schwefelsauren (pH = 1) ethanolischen 2,4-Dinitrophenylhydrazin(**43**)-Lösung (1 g/ 38 ml) zugegeben. Nach 12 h bei 4°C war die Ausfällung der Hydrazone vollständig und sie konnten mit NP-HPLC/MS aufgetrennt werden.

Säule: Nucleosil 50-5, CC 250/4 Säule

Laufmittel A: Hexan

Laufmittel B: Ethylacetat

Flussrate: 1 ml/min

Gradient: Hexan mit 0%, 25 min 100%, 27 min 100%, 27,5 min 0% Ethylacetat

Detektionswellenlänge DAD-UV Detektor: 380 nm

#### APCI-MS Parameter:

Vaporizer temperature 470°C

sheath gas 25 arb capillary temperature 165°C

auxilliary gas 8 arb capillary voltage 45 V

discharge current 5 µA tube lens offset 55 V

#### APCI-MS:

**42 a/b, 44 a/b** und **45 a/b**: 453 (M+H<sup>+</sup>), 393 (M+H-HOAc), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**46** und **47**: 471 (M+H<sup>+</sup>), 453 (M+H- H<sub>2</sub>O), 393 (M+H-HOAc), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**48** und **49**: 513 (M+H<sup>+</sup>), 495 (M+H- H<sub>2</sub>O), 453 (M+H-HOAc), 393 (M+H-2HOAc), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**50 a/b** und **51 a/b**: 591 (M+H<sup>+</sup>), 573 (M+H-H<sub>2</sub>O), 393 (M+H-2,4-Dinitrophenylhydrazin), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**52**: überlagert mit **43 a/b**

**54**: 651(M+H<sup>+</sup>), 607 (M+H-Ac), 591 (M+H-HOAc), 453 (M+H-2,4-Dinitrophenylhydrazin) 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

NP-HPLC Fraktionierung unter den oben genannten Bedingungen ergab **42 a/b** (150 µg).

**NMR:**

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 0,96 (s, 3H); 0,975 (s, 3H); 0,98 (s, 3H); 1,37 (s, 3H); 2,36 (pseudo t, *J*=7,6, 2H); 4,56 (s, 1H); 4,94 (t, *J*=7,6, 1H); 5,25 (t, *J*=7,65, 1H); 5,55 (d, *J*=12,8, 1H); 7,03 (d, *J*=9,75, 1H); 7,37 (d, *J*=12,8, 1H); 7,44 (dd, *J*=2,22, *J*=8,92, 1H); 7,54 (s, 1H); 8,02 (d, *J*=2,78, 2H)

<sup>13</sup>C-HMQC-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 19,75; 20,1; 20,45; 21,4; 70,5; 105,3; 107,2; 116,8; 123,2; 129,8; 132,5; 141,0; 141,1

**6.2.8.1 Derivatisierung der Algenextrakte mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin**

Jeweils 4 g der Algen (*C. taxifolia*, *C. racemosa* und *C. prolifera*) werden im Mörser 30 s homogenisiert, mit 2 ml Ethanol extrahiert und zentrifugiert. Dem ethanolischen Überstand wird 1 ml gesättigte ethanolische 2,4-Dinitrophenylhydrazin (**43**) Lösung zugesetzt. Dabei fällt ein orangeroter Niederschlag aus. Zur Vervollständigung der Reaktion wird die Lösung über Nacht bei 4°C im Kühlschrank stengelassen. Der entstandene Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt, im Argonstrom getrocknet und in 200 µl Ethylacetat gelöst.

**NP-HPLC/MS:** s.o.

**APCI-MS:**

**48 und 49:** 513 (M+H<sup>+</sup>), 495 (M+H- H<sub>2</sub>O), 453 (M+H-HOAc), 393 (M+H-2HOAc), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**50 a/b und 51 a/b:** 591 (M+H<sup>+</sup>), 573 (M+H-H<sub>2</sub>O), 393 (M+H-2,4-Dinitrophenylhydrazin), 213 (**41**-H<sub>2</sub>O)

**6.2.9 Enzymatische Umwandlung von Farnesyl- und Geranylacetat durch Algen**

Jeweils 10 g der Algen (*C. taxifolia*, *C. racemosa* oder *C. prolifera*) werden in 10 ml reinem Seewasser mit 40,5 mg Geranyl- oder Farnesylacetat gemörsert. Nach definierten Zeitabständen werden 500 µl des Homogenisats mit 100 µl Dichlormethan extrahiert und die organische Phase direkt mit GC/MS analysiert.

**GC/MS:**

Säule: Alltech EC 5 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm

Trägergas: Helium

Split: 15 ml/min



Injektortemperatur: 200°C

Temperaturprogramm: 40°C (2 min) in 10°/ min auf 220°C (2 min)

EI-MS (*m/z* (%)):

Geranylacetat: 137 (50), 123 (33), 109 (12), 93 (27), 81 (100), 67 (67), 53 (18)

Geraniol: 154 (2), 136 (100), 121 (58), 107 (14), 93 (46), 81 (96), 67 (88), 53 (16)

### 6.2.10 Umsetzungen mit Esterasen

Für die Umsetzungen mit der Esterase aus *Candida lipolytica* wird eine Lösung von 1 mg Esterase (0,1 U mg<sup>-1</sup>) in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,5 verwendet. Als interner Standard werden 0,53 mg (2,56 mM) n-Bromdecan pro ml zugesetzt. Die Ausgangsmenge an Geranylacetat beträgt 0,63 mg ml<sup>-1</sup> (3,21 mM). Nach der Zugabe von Geranylacetat wird die Reaktionsmischung geschüttelt und nach definierten Zeitabständen werden je 10 µl der Reaktionsmischung mit 100 µl Dichlormethan extrahiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation wird 1 µl der organischen Phase mit GC/MS vermessen.

**GC/MS:** s.o.

#### Inhibierung der Esterase durch Caulerpenin (7)

Für die Inhibierungsexperimente werden 0,1, 0,2, 1 oder 2 mg Caulerpenin (7) in 1 ml Phosphat Puffer pH 7,5 durch Ultraschall suspendiert. Danach werden 1 mg der Esterase zugegeben und auf dem Schüttler ein Stunde inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit werden dem Reaktionsgemisch wie oben beschrieben Standard und Geranylacetat zugesetzt und die Proben ebenfalls wie oben beschrieben untersucht.

#### Inhibierung der Esterase durch Ebelacton B

Für die Inhibierung durch Ebelacton B werden 0,02 mg Ebelacton B gelöst in 20 µl Ethanol (reines Ethanol in dieser Konzentration ruft keinen Aktivitätsverlust bei der Esterase hervor) zu 1mg Esterase aus *Candida lipolytica* in 1 ml Phosphat Puffer pH 7,5 gegeben und eine Stunde auf dem Schüttler vorinkubiert. Danach wird analog zu den obigen Messungen verfahren.

### 6.2.11 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

#### Herstellung eines 12 % Acrylamidgels:

4xTrenngelbuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 9,1

0,4% SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4% SDS

TEMED

APS 10 %

PAM 40

Für das Trenngel werden 4,5 ml PAM 40 mit 3,75 ml 4xTrenngelpuffer und 6,75 ml dest. Wasser gemischt. Unter rühren werden 15 µl TEMED als Quervernetzer und 150 µl APS als Radikalstarter zugegeben. Etwa 5 ml der Mischung werden in eine Kammer der Gelgießapparatur gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation werden für das Sammelgel 1 ml PAM 40 mit 2,5 ml Sammelgelpuffer und 6,5 ml Wasser gemischt und 10 µl TEMED und 100 µl APS zugegeben. Um die Polymerisationsgeschwindigkeit herabzusetzen, wird die Mischung auf Eis gestellt. Das Wasser wird aus der Apparatur abgossen, der Kamm für die Taschen eingesetzt und das Sammelgel wird in die Kammer gefüllt. Nach vollständiger Polymerisation werden die Gele in ihren Platten aus der Apparatur genommen und in feuchten Tüchern eingeschlagen im Kühlschrank bis zu ihrer Verwendung (jedoch nicht länger als 4 Wochen) aufbewahrt.

#### **Herstellung eines 3x Ladepuffer:**

3 ml Glycerol

0,9 g SDS

3 mg Bromphenolblau

3,75 ml Sammelgelpuffer

mischen und mit dest. H<sub>2</sub>O auf 10 ml auffüllen. Der Ladepuffer wird unverdünnt verwendet.

#### **Herstellung des Proteinstandards**

Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis von Amersham wird nach Vorschrift gelöst und vorbereitet.

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase B	97 000 Da
Albumin	66 000 Da
Ovalbumin	45 000 Da
Carbonanhydrase	30 000 Da
Trypsin Inhibitor	20 100 Da
$\alpha$ -Lactalbumin	14 400 Da

**10x Laufpuffer:**

30,3 g Tris

144 g Glycin

1% SDS

0,1% NaN<sub>3</sub>

auf ein Volumen von 1 l mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen, vor dem Gebrauch 1:10 verdünnen.

**Herstellung der Coomassie Blau Färbelösung**

Hierfür wird eine wässrige Lösung, die 0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 40 % Methanol und 7 % Essigsäure enthält hergestellt und etwa eine Stunde gerührt. Die Lösung ist nach Filtration gebrauchsfertig.

**Herstellung der Coomassie Blau Entfärbelösung:**

Hierfür wird eine wässrige Lösung, die 30 % Methanol und 10 % Essigsäure enthält hergestellt.

**6.2.11.1 Vorbereitung der Proteinproben aus *C. taxifolia***

In 0,5 ml Eppendorfgefäße werden 10  $\mu$ l Ladepuffer mit 3  $\mu$ l 0,2 M DTT vermischt.

Für die Marker Probe werden 7  $\mu$ l der Lösung des Low Molecular Weight Markers und 13  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit dem Inhalt eines Reaktionsgefäßes vermischt und 5 min im Wasserbad gekocht. Danach wird die Probe 8 min bei 13 000 U/min zentrifugiert und geladen.

Für die Algenproben werden intakte Thalli von *C. taxifolia* sorgfältig mit Leitungswasser gereinigt.

Für die Proteinbestimmung in einer intakten Alge wird die Alge 1 min in Wasser gekocht, danach mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zermörsert. 5-10 mg des kalten Homogenisats werden in eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Homogenisat vom Ladepuffer bedeckt wird. Da das optimale Probenvolumen abzüglich des Ladepuffers und der DTT Lösung 20 µl beträgt, wird der Probe die entsprechende Menge dest. Wasser zugesetzt (zwischen 15 und 10 µl). Nach erneuter intensiver Vermischung auf dem Vortexer wird wie bei der Markerprobe weitergearbeitet.

Für den Kontrollwert zum Zeitpunkt null wird ein Thallus der Alge mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, zermörsert und wie für die intakte Algenprobe beschrieben aufgearbeitet.

Für die Proben nach der Verwundung wird ein *C. taxifolia* Thallus zermörsert und nach der gewünschten Zeitspanne ein Aliquot des Homogenisats abgenommen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquotierung der Alge hat den Vorteil, dass ein direkter Vergleich insbesondere im Bezug auf die Proteinmenge möglich wird. Auch mit diesen Proben wird wie oben beschrieben verfahren.

Wenn alle 10 Taschen des Gels mit Probe beladen sind, wird die Kammer mit Trenngelpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese gestartet. Sammelgel: 80 V, Trenngel: 150 V

Nach ca. 1 h erreicht die Bromphenolblau Front das Ende des Gels und zeigt an, dass die Auftrennung abgeschlossen ist. Das Gel wird vorsichtig aus der Apparatur entfernt und in Coomassie Blau Lösung überführt. Unter leichtem Schütteln wird das Gel ca. 2h gefärbt, bis die Banden intensiv blau sind. Danach wird es in die Entfärbelösung überführt und so lange geschüttelt, bis der Hintergrund wieder entfärbt ist. Nach dem Einscannen des Gels wird es zwischen zwei Lagen Zellophan im Gelrockner über Nacht getrocknet.

### **Quervernetzung der Proteinproben aus *C. taxifolia* mit Glutaraldehyd**

Für die Quervernetzungsreaktionen mit Glutaraldehyd wird ein *C. taxifolia* Thallus gekocht und mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Zu Aliquoten des Homogenisats von je ca. 100 mg werden 100 µl einer 0,1, 0,5, 1, 4 oder 10 %igen Lösung von Glutaraldehyd in Wasser gegeben und zwischen 15 oder 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Je 20 µl dieser Lösung werden wie oben beschrieben für die PAGE verwendet.

### **6.2.11.2 Vorbereitung der Proteinproben aus CLE**

In 0,5 ml Eppendorfgläser werden 10 µl Ladepuffer mit 3 µl 0,2 M DTT vermischt.

Für die Esteraseuntersuchung wird eine Lösung von CLE der Konzentration 1 mg ml<sup>-1</sup> in dest. Wasser eingesetzt. Für die direkte Untersuchung werden 20 µl dieser Lösung mit Ladepuffer und DTT vermischt und die Probe wie oben beschrieben weiterbehandelt.



Nr.	ppm unmarkiert	Integral	ppm markiert	Integral	Integral-Differenz
1	136,70	0,975	136,67	1,024	0,049
2	109,51	0,943	109,51	0,989	0,046
3	118,86	0,9581	118,87	0,613	0,032
4	68,46	0,972	68,46	1,017	0,045
5	31,64	0,961	31,64	1,018	0,057
6	130,45	0,911	130,46	0,952	0,041
7	120,93	0,488	120,93	0,499	0,011
8	94,25	0,414	94,25	0,437	- 0,023
9	85,33	0,412	85,33	0,430	0,018
10	105,17	1,013	105,17	1,016	0,003
11	148,22	0,516	148,22	0,531	0,015
12	24,54	1,100	24,54	1,096	0,004
13	20,73	0,975	20,73	n.i.	-
14	17,62	0,924	17,63	0,953	0,029
15	135	0,898	135	0,936	0,038
16	167,95	0,518	167,95	0,643	0,125*
17	20,57	0,992	20,56	1,034	0,042
18	167,14	0,499	167,14	0,590	0,091*
19	20,48	1,000	20,48	1,000	0
20	169,40	0,527	169,40	0,917	0,396*
21	20,86	1,061	20,87	1,092	0,031

n.i. = nicht integrierbar

\* = erhöhter  $^{13}\text{C}$ -Gehalt

### 6.2.13 Herstellung der Zweikomponenten Diät

Für die Herstellung der Zweikomponenten Diät für Fütterungsversuche wurden zunächst 2g gefrorene *Ulva* spp. gemörsert und mit 10 ml Diethylether, der 6 mg Caulerpenin (**7**) enthält, gemischt. Während der Ether im Abzug verdampft, werden 10 ml dest. Wasser mit 0,72 mg Agar vermischt und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Nachdem der Agar so weit abgekühlt ist, dass er gerade noch flüssig ist, wird die pulverisierte, mit Caulerpenin (**7**) beschichtete *Ulva* zugegeben und vermischt. Diese Mischung wird nun zum Aushärten etwa 2 mm dick auf eine feuchte Glasplatte gegossen. Für Blindproben werden die *Ulva* mit 10 ml Diethylether ohne Caulerpenin (**7**) behandelt. Für die Esterase-Schicht wurde dem Agar keine *Ulva* zugesetzt, sondern ca. 2 mg Esterase aus *Candida lipolytica* in wenig Phosphat Puffer pH 7,5 gelöst untergerührt und diese Schicht zum Auskühlen auf die Caulerpenin-Agar-Schicht aufgetragen.

## Literaturverzeichnis

1. Fadden, M. *European Journal of Phycology* **1994**, 29 29-32.
2. Wittstock, U., Gershenzon, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, 5 (4), 300-307.
3. Karban, R., Baldwin, I.T. *Induced responses to herbivory*, Vol. **1997**, Chicago, University of Chicago Press.
4. Anderson, R.J., Velimirov, B. An experimental investigation of the palatability of kelp bed algae to the sea urchin *Parechinus angeluosus* Leske *Marine Ecology* **1982**, 3 (4), 357-373.
5. Potin, P., Bouarab, K., Salaun, J.P., Pohnert, G., Kloareg, B. Biotic interactions of marine algae *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, 5 (4), 308-317.
6. Weinberger, F., Pohnert, G., Kloareg, B., Potin, P. A signal released by an endophytic attacker acts as a substrate for a rapid defensive reaction of the red alga *Chondrus crispus* *Chembiochem* **2002**, 3 (12), 1260-1263.
7. Paul, V.J., Vanalstyne, K.L. Activation of Chemical Defenses in the Tropical Green-Algae *Halimeda* Spp *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1992**, 160 (2), 191-203.
8. Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S.A., Ianora, A., Russo, G.L., Buttino, I., Mazzarella, G., Laabir, M., Cabrini, M., Giacobbe, M.G. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction *Nature* **1999**, 402 (6758), 173-176.
9. Pohnert, G. Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39 (23), 4352-+.
10. Cetrulo, G.L., Hay, M.E. Activated chemical defenses in tropical versus temperate seaweeds *Marine Ecology-Progress Series* **2000**, 207 243-253.
11. Van den Hoek, C. *Algen*, Vol. **1993**, Stuttgart, Thieme Verlag.



12. Wahrlich, J. Untersuchungen des Spitzenwachstums an *Caulerpa mexicana*: in-vivo Bestimmungen des Turgordrucks, de pH-Wertes der Zellwand und des freien cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes **2000**: Kiel.
13. Boudouresque, C.F., Verlaque, M. Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes *Marine Pollution Bulletin* **2002**, 44 (1), 32-38.
14. BellanSantini, D., Arnaud, P.M., Bellan, G., Verlaque, M. The influence of the introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia*, on the biodiversity of the Mediterranean marine biota *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1996**, 76 (1), 235-237.
15. Chisholm, J.R.M., Joubert, J.M., Giaccone, G. *Caulerpa taxifolia* in the northwest Mediterranean: Introduced species or migrant from the Red Sea? *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **1995**, 318 (12), 1219-1226.
16. Meinesz, A., Hesse, B. Introduction of the Tropical Alga *Caulerpa-Taxifolia* and Its Invasion of the Northwestern Mediterranean *Oceanologica Acta* **1991**, 14 (4), 415-426.
17. Jousson, O., Pawlowski, J., Zaninetti, L., Meinesz, A., Boudouresque, C.F. Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea *Marine Ecology-Progress Series* **1998**, 172 275-280.
18. Wiedenmann, J., Baumstark, A., Pillen, T.L., Meinesz, A., Vogel, W. DNA fingerprints of *Caulerpa taxifolia* provide evidence for the introduction of an aquarium strain into the Mediterranean Sea and its close relationship to an Australian population *Marine Biology* **2001**, 138 (2), 229-234.
19. Meusnier, I., Olsen, J.L., Stam, W.T., Destombe, C., Valero, M. Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the Mediterranean introduction *Molecular Ecology* **2001**, 10 (4), 931-946.

20. Komatsu, T., Meinesz, A., Buckles, D. Données préliminaires sur l'influence de la température et de la lumière sur le développement et la croissance de *Caulerpa taxifolia* en culture in *First international workshop on Caulerpa taxifolia*, **1994**, GIS Posidonie.
21. Belsher, T., Meinesz, A. Deep-Water Dispersal of the Tropical Alga *Caulerpa-Taxifolia* Introduced into the Mediterranean *Aquatic Botany* **1995**, 51 (1-2), 163-169.
22. Zuljevic, A., Antolic, B. Synchronous release of male gametes of *Caulerpa taxifolia* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea *Phycologia* **2000**, 39 (2), 157-159.
23. Sant, N., Delgado, O., RodriguezPrieto, C., Ballesteros, E. The spreading of the introduced seaweed *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C Agardh in the Mediterranean Sea: Testing the boat transportation hypothesis *Botanica Marina* **1996**, 39 (5), 427-430.
24. Verlaque, M., Fritayre, P. Mediterranean Algal Communities Are Changing in the Face of the Invasive Alga *Caulerpa-Taxifolia* (Vahl) C Agardh *Oceanologica Acta* **1994**, 17 (6), 659-672.
25. Devillele, X., Verlaque, M. Changes and Degradation in a *Posidonia-Oceanica* Bed Invaded by the Introduced Tropical Alga *Caulerpa-Taxifolia* in the North- Western Mediterranean *Botanica Marina* **1995**, 38 (1), 79-87.
26. Kaiser, J. California algae may be feared European species *Science* **2000**, 289 (5477), 222-223.
27. Jousson, O., Pawlowski, J., Zaninetti, L., Zechman, F.W., Din, F., Di Guiseppe, G., Woodfield, R., Millar, A.Meinesz, A. Invasive alga reaches California - The alga has been identified that threatens to smother Californian coastal ecosystems *Nature* **2000**, 408 (6809), 157-158.
28. Por, F.D. *Lessepsian Migration: The influx of Red Sea biota into the Mediterranean by the Suez Canal*, Vol. 23 **1978**, Berlin, Springer Verlag.

29. Verlaque, M., Boudouresque, C.F., Meinesz, A., Gravez, V. The *Caulerpa racemosa* complex (Caulerpales, Ulvophyceae) in the Mediterranean Sea *Botanica Marina* **2000**, 43 (1), 49-68.
30. Durand, C., Manuel, M., Boudouresque, C.F., Meinesz, A., Verlaque, M., Le Parco, Y. Molecular data suggest a hybrid origin for the invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea *Journal of Evolutionary Biology* **2002**, 15 (1), 122-133.
31. Panayotidis, P., Zuljevic, A. Sexual reproduction of the invasive green alga *Caulerpa racemosa* var. *occidentalis* in the Mediterranean Sea *Oceanologica Acta* **2001**, 24 (2), 199-203.
32. Renoncourt, L., Meinesz, A. Formation of propagules on an invasive strain of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta) in the Mediterranean Sea *Phycologia* **2002**, 41 (5), 533-535.
33. Piazzì, L., Balata, D., Ceccherelli, G., Cinelli, F. Comparative study of the growth of the two co-occurring introduced green algae *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa* along the Tuscan coast (Italy, western Mediterranean) *Cryptogamie Algologie* **2001**, 22 (4), 459-466.
34. Piazzì, L., Ceccherelli, G. Effects of competition between two introduced *Caulerpa* *Marine Ecology-Progress Series* **2002**, 225 189-195.
35. Pillen, T.L. *Die mediterrane "Caulerpa-Wiese" Untersuchungen zur Struktur und Dynamik einer Phytalgemeinschaft und ihrer Bedeutung als mariner Lebensraum*, Vol. **1996** Tectum Verlag Marburg.
36. Meinesz, A. Contribution to the Study of *Caulerpa-Prolifera* (Forsskal) Lamouroux (Chlorophyceae, Caulerpales) .1. Morphogenesis and Growth at a Station Off the French Continental Coast of the Mediterranean Sea *Botanica Marina* **1979**, 22 (1), 27-39.

37. Meinesz, A. Contribution to the Study of *Caulerpa-Prolifera* (Forsskal) Lamouroux (Chlorophyceae, Caulerpales) .2. Sexual Reproduction Along the Western Mediterranean Coast *Botanica Marina* **1979**, 22 (2), 117-121.
38. Meinesz, A. Contribution to the Study of *Caulerpa-Prolifera* (Forsskal) Lamouroux (Chlorophyceae, Caulerpales) .3. Standing Crop and Primary Productivity at a Station Off the French Continental Coast of the Mediterranean Sea *Botanica Marina* **1979**, 22 (2), 123-127.
39. Doty, M.S. Caulerpicin a Toxic Constituent of *Caulerpa* *Nature* **1966**, 211 (5052), 990-&.
40. Nielsen, P.G., Carle, J.S., Christophersen, C. Final Structure of Caulerpicin, a Toxin Mixture from the Green- Alga *Caulerpa-Racemosa* *Phytochemistry* **1982**, 21 (7), 1643-1645.
41. Blackman, A.J., Wells, R.J. Caulerpol, a Diterpene Alcohol, Related to Vitamin-a, from *Caulerpa-Brownii* (Algae) *Tetrahedron Letters* **1976**, (31), 2729-2730.
42. Blackman, A.J., Wells, R.J. Flexilin and Trifarin, Terpene 1,4-Diacetoxybuta-1,3-Dienes from 2 *Caulerpa* Species (Chlorophyta) *Tetrahedron Letters* **1978**, (33), 3063-3064.
43. Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. Caulerpenyne, an Unusual Sesquiterpenoid from Green-Alga *Caulerpa-Prolifera* *Tetrahedron Letters* **1978**, (38), 3593-3596.
44. Paul, V.J. The natural products chemistry and chemical ecology of tropical green algae of the order Caulerpales **1985**, University of California: San Diego 227.
45. Denapoli, L., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. Furocaulerpipin, a New Acetylenic Sesquiterpenoid from the Green- Alga *Caulerpa-Prolifera* *Experientia* **1981**, 37 (11), 1132-1132.
46. Denapoli, L., Magno, S., Mayol, L., Novellino, E. Further Caulerpenyne-Like Esters from the Green-Alga *Caulerpa- Prolifera* *Experientia* **1983**, 39 (2), 141-143.

47. Smyrniotopoulos, V., Abatis, D., Tziveleka, L.A., Tsitsimpikou, C., Roussis, V., Loukis, A., Vagias, C. Acetylene sesquiterpenoid esters from the green alga *Caulerpa prolifera* *Journal of Natural Products* **2003**, *66* (1), 21-24.
48. Guerriero, A., Meinesz, A., Dambrosio, M., Pietra, F. Isolation of Toxic and Potentially Toxic Sesquiterpenes and Monoterpenes from the Tropical Green Seaweed *Caulerpa-Taxifolia* Which Has Invaded the Region of Cap Martin and Monaco *Helvetica Chimica Acta* **1992**, *75* (3), 689-695.
49. Guerriero, A., Marchetti, F., Dambrosio, M., Senesi, S., Dini, F., Pietra, F. New Ecotoxicologically and Biogenetically Relevant Terpenes of the Tropical Green Seaweed *Caulerpa-Taxifolia* Which Is Invading the Mediterranean *Helvetica Chimica Acta* **1993**, *76* (2), 855-864.
50. Paul, V.J., Fenical, W. Toxic Feeding Deterrents from the Tropical Marine Alga *Caulerpa-Bikinensis* (Chlorophyta) *Tetrahedron Letters* **1982**, *23* (48), 5017-5020.
51. Handley, J.T., Blackman, A.J. Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa trifaria* (Chlorophyta) *Australian Journal of Chemistry* **2000**, *53* (1), 67-71.
52. Maiti, B.C., Thomson, R.H., Mahendran, M. Structure of Caulerpin, a Pigment from *Caulerpa* Algae *Journal of Chemical Research-S* **1978**, (4), 126-127.
53. Anjaneyulu, A.S.R., Prakash, C.V.S., Mallavadhani, U.V. 2 Caulerpin Analogs and a Sesquiterpene from *Caulerpa-Racemosa* *Phytochemistry* **1991**, *30* (9), 3041-3042.
54. Paul, V.J., Fenical, W. Chemical Defense in Tropical Green-Algae, Order *Caulerpales* *Marine Ecology-Progress Series* **1986**, *34* (1-2), 157-169.
55. Barnes, C.S., Loder, J.W. Structure of Polygodial - a New Sesquiterpene Dialdehyde from *Polygonum Hydropiper* L *Australian Journal of Chemistry* **1962**, *15* (2), 322-&.
56. Kubo, I., Miura, I., Pettei, M.J., Lee, Y.W., Pilkiewicz, F., Nakanishi, K. Muzigadial and Warburganal, Potent Antifungal Antiyeast, and African Army Worm Anti-Feedant Agents *Tetrahedron Letters* **1977**, (52), 4553-4556.
57. van Beek, T.A., de Groot, A. Terpenoid antifeedants, part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1986**, *105* 513-527.

- 
58. Asakawa, Y., Dawson, G.W., Griffiths, D.C., Lallemand, J.Y., Ley, S.V., Mori, K., Mudd, A., Pezechkle Claire, M., Pickett, J.A., Watanabe, H., Woodcock, C.M., Zhang, Z.N. Activity of Drimane Antifeedants and Related-Compounds against Aphids, and Comparative Biological Effects and Chemical- Reactivity of (-)-Polygodial and (+)-Polygodial *Journal of Chemical Ecology* **1988**, 14 (10), 1845-1855.
59. Cimino, G., Sodano, G., Spinella, A. Occurrence of Olepupane in 2 Mediterranean Nudibranchs - a Protected Form of Polygodial *Journal of Natural Products* **1988**, 51 (5), 1010-1011.
60. Cimino, G., Derosa, S., Destefano, S., Sodano, G. The Chemical Defense of 4 Mediterranean Nudibranchs *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **1982**, 73 (3), 471-474.
61. Dawson, G.W., Hallahan, D.L., Mudd, A., Patel, M.M., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Wallsgrove, R.M. Secondary Plant Metabolites as Targets for Genetic-Modification of Crop Plants for Pest Resistance *Pesticide Science* **1989**, 27 (2), 191-201.
62. Kubo, I., Ganjian, I. Insect Antifeedant Terpenes, Hot-Tasting to Humans *Experientia* **1981**, 37 (10), 1063-1064.
63. Jonassohn, M. Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes, structural properties that affect reactivity and bioactivity **1996**, Lund: Lund.
64. Avila, C., Cimino, G., Crispino, A., Spinella, A. Drimane Sesquiterpenoids in Mediterranean Dendrodores Nudibranchs - Anatomical Distribution and Biological Role *Experientia* **1991**, 47 (3), 306-310.
65. Schulte, G.R., Scheuer, P.J. Defense Allomones of Some Marine Mollusks *Tetrahedron* **1982**, 38 (13), 1857-1863.
66. Amade, P., Lemee, R. Chemical defence of the Mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production *Aquatic Toxicology* **1998**, 43 (4), 287-300.

67. Uchimura, M., Rival, A., Nato, A., Sandeaux, R., Sandeaux, J., Baccou, J.C. Potential use of Cu<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> for the destruction of *Caulerpa taxifolia*: differential effects on photosynthetic parameters *Journal of Applied Phycology* **2000**, 12 (1), 15-23.
68. Lemee, R., Boudouresque, C.F., Gobert, J., Malestroit, P., Mari, X., Meinesz, A., Menager, V., Ruitton, S. Feeding behaviour of *Paracentrotus lividus* in the presence of *Caulerpa taxifolia* introduced in the Mediterranean Sea *Oceanologica Acta* **1996**, 19 (3-4), 245-253.
69. Boudouresque, C.F., Lemee, R., Mari, X., Meinesz, A. The invasive alga *Caulerpa taxifolia* is not a suitable diet for the sea urchin *Paracentrotus lividus* *Aquatic Botany* **1996**, 53 (3-4), 245-250.
70. Pedrotti, M.L., Marchi, B., Lemee, R. Effects of *Caulerpa taxifolia* secondary metabolites on the embryogenesis, larval development and metamorphosis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* *Oceanologica Acta* **1995**, 19 (3-4), 255-262.
71. Schnitzler, I., Pohnert, G., Hay, M., Boland, W. Chemical defense of brown algae (*Dictyopteris* spp.) against the herbivorous amphipod *Ampithoe longimana* *Oecologia* **2001**, 126 (4), 515-521.
72. Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, 37 (8), 911-917.
73. Valls, R., Artaud, J., Amade, P., Vincente, N., Piovetti, L. Determination of Caulerpenyne, a Toxin from the Green-Alga *Caulerpa-Taxifolia* (Caulerpaceae) *Journal of Chromatography A* **1994**, 663 (1), 114-118.
74. Lemiere, F. Interfaces for LC-MS *Guide to LC-MS (Supplement to LC-GC)* **2001**, December 2001 21-27.
75. Hesse, M., Meier, H., Zeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Vol. 1995*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
76. Cimino, G., Crispino, A., Dimarzo, V., Gavagnin, M., Ros, J.D. Oxytoxins, Bioactive Molecules Produced by the Marine Opisthobranch Mollusk *Oxynoe-Olivacea* from a Diet-Derived Precursor *Experientia* **1990**, 46 (7), 767-770.

77. Spiteller, G., Kern, W., Spiteller, P. Investigation of aldehydic lipid peroxidation products by gas chromatography- mass spectrometry *Journal of Chromatography A* **1999**, 843 (1-2), 29-98.
78. Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Vol. **1999**, Weinheim, Wiley-VCH.
79. Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., Nakamura, M. Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96 (16), 9159-9164.
80. Lemee, R., Pesando, D., Durandclement, M., Dubreuil, A., Meinesz, A., Guerriero, A., Pietra, F. Preliminary Survey of Toxicity of the Green-Alga *Caulerpa taxifolia* Introduced into the Mediterranean *Journal of Applied Phycology* **1993**, 5 (5), 485-493.
81. Lemee, R., Pesando, D., Issanchou, C., Amade, P. Microalgae: A model to investigate the ecotoxicity of the green alga *Caulerpa taxifolia* from the Mediterranean Sea *Marine Environmental Research* **1997**, 44 (1), 13-25.
82. Pesando, D., Lemee, R., Ferrua, C., Amade, P., Girard, J.P. Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage *Aquatic Toxicology* **1996**, 35 (3-4), 139-155.
83. Pesando, D., Huitorel, P., Dolcini, V., Amade, P., Girard, J.P. Caulerpenyne interferes with microtubule-dependent events during the first mitotic cycle of sea urchin eggs *European Journal of Cell Biology* **1998**, 77 (1), 19-26.
84. Fischel, J.L., Lemee, R., Formento, P., Caldani, C., Moll, J.L., Pesando, D., Meinesz, A., Grelier, P., Pietra, F., Guerriero, A., Milano, G. Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia* *Anticancer Research* **1995**, 15 (5B), 2155-2160.
85. Barbier, P., Guise, S., Huitorel, P., Amade, P., Pesando, D., Briand, C., Peyrot, V. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell

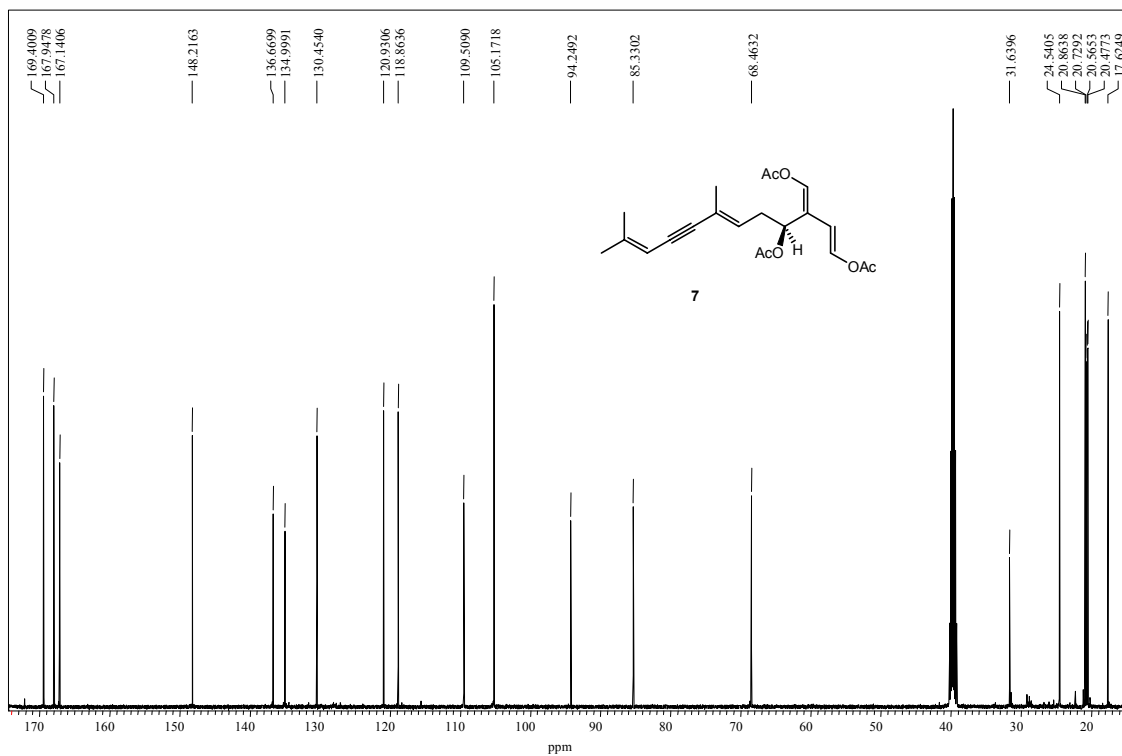
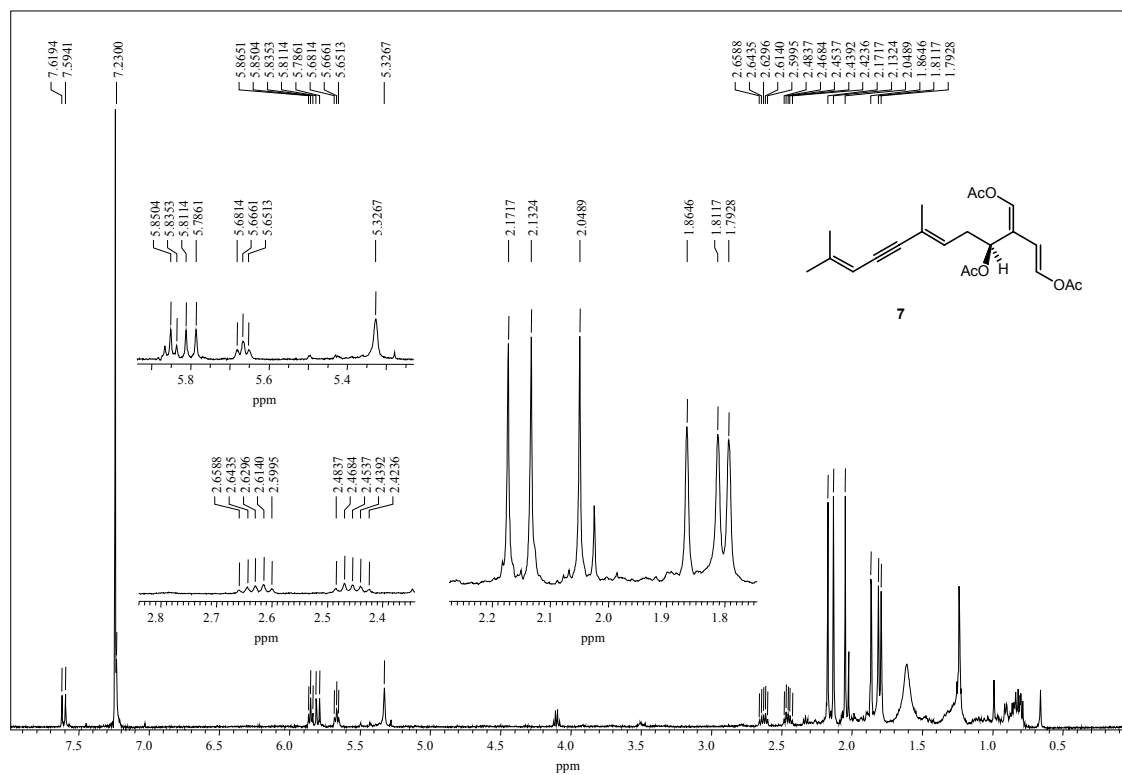


- line SK-N-SH and modifies the microtubule network *Life Sciences* **2001**, *70* (4), 415-429.
86. Mayer, A.M.S., Paul, V.J., Fenical, W., Norris, J.N., Decarvalho, M.S., Jacobs, R.S. Phospholipase a(2) Inhibitors from Marine-Algae *Hydrobiologia* **1993**, *261* 521-529.
87. Brunelli, M., Garcia-Gil, M., Mozzachiodi, R., Roberto, M., Scuri, R., Traina, G., Zaccardi, M.L. Neurotoxic effects of caulerpenyne *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2000**, *24* (6), 939-954.
88. Mozzachiodi, R., Scuri, R., Roberto, M., Brunelli, M. Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses after hyperpolarization in invertebrate neurons *Neuroscience* **2001**, *107* (3), 519-526.
89. Gavagnin, M., Marin, A., Castelluccio, F., Villani, G., Cimino, G. Defensive Relationships between *Caulerpa-Prolifera* and Its Shelled Sacoglossan Predators *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1994**, *175* (2), 197-210.
90. Wolfe, G.V., Steinke, M., Kirst, G.O. Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga *Nature* **1997**, *387* (6636), 894-897.
91. Atkins, P.W. *Physikalische Chemie, Vol. 1990*, Weinheim, Wiley-VCH.
92. Dreher, T.W., Grant, B.R., Wetherbee, R. Wound Response in Siphonous Alga *Caulerpa-Simpliciuscula* C Ag - Fine-Structure and Cytology *Protoplasma* **1978**, *96* (1-2), 189-203.
93. Goddard, R.H., Dawes, C.J. An Ultrastructural and Histochemical-Study of the Wound Response in the Coenocytic Green-Alga *Caulerpa-Ashmeadii* (*Caulerpales*) *Protoplasma* **1983**, *114* (3), 163-172.
94. Laclaire, J.W. Cytomorphological Aspects of Wound-Healing in Selected Siphonocladales (Chlorophyceae) *Journal of Phycology* **1982**, *18* (3), 379-384.
95. Menzel, D. How Do Giant Plant-Cells Cope with Injury - the Wound Response in Siphonous Green-Algae *Protoplasma* **1988**, *144* (2-3), 73-91.
96. Guerriero, A., Depentori, D., Dambrosio, M., Pietra, F. Caulerpenyne-Amine Reacting System as a Model for in-Vivo Interactions of Ecotoxicologically Relevant

- Sesquiterpenoids of the Mediterranean-Adapted Tropical Green Seaweed *Caulerpa Taxifolia* *Helvetica Chimica Acta* **1995**, 78 (7), 1755-1762.
97. Potts, B.C.M., Faulkner, D.J., Decarvalho, M.S., Jacobs, R.S. Chemical Mechanism of Inactivation of Bee Venom Phospholipase- A2 by the Marine Natural-Products Manoalide, Luffariellolide, and Scalaradiol *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114 (13), 5093-5100.
98. Dreher, T.W., Hawthorne, D.B., Grant, B.R. The Wound Response of the Siphonous Green Algal Genus *Caulerpa* .3. Composition and Origin of the Wound Plugs *Protoplasma* **1982**, 110 (2), 129-137.
99. Lubig, R., Kusch, P., Roper, K., Zahn, H. On the Mechanism of Protein Crosslinking with Glutaraldehyde *Monatshefte Fur Chemie* **1981**, 112 (11), 1313-1323.
100. Lottspeich, F., Zorbas, H. *Bioanalytik, Vol. 1998*, Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag.
101. Konno, K., Yasui, H., Hirayama, C., Shinbo, H. Glycine protects against strong protein-denaturing activity of oleuropein. A phenolic compound in privet leaves *Journal of Chemical Ecology* **1998**, 24 (4), 735-751.
102. Balazs, G. *Growth rates of immature green turtles in Hawaiian Archipelago, Vol. 1982*, Washington, D.C., Smithsonian Institutio Press.
103. Bitou, N., Ninomiya, M., Tsujita, T., Okuda, H. Screening of lipase inhibitors from marine algae *Lipids* **1999**, 34 (5), 441-445.
104. Dal Piaz, F., Casapullo, A., Randazzo, A., Riccio, R., Pucci, P., Marino, G., Gomez-Paloma, L. Molecular basis of phospholipase A(2) inhibition by petrosaspongiolide M *Chembiochem* **2002**, 3 (7), 664-671.
105. Rohmer, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants *Natural Product Reports* **1999**, 16 (5), 565-574.
106. McGarvey, D.J., Croteau, R. Terpenoid Metabolism *Plant Cell* **1995**, 7 (7), 1015-1026.

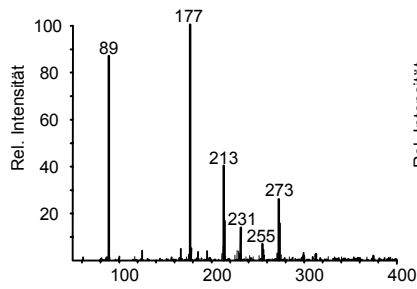
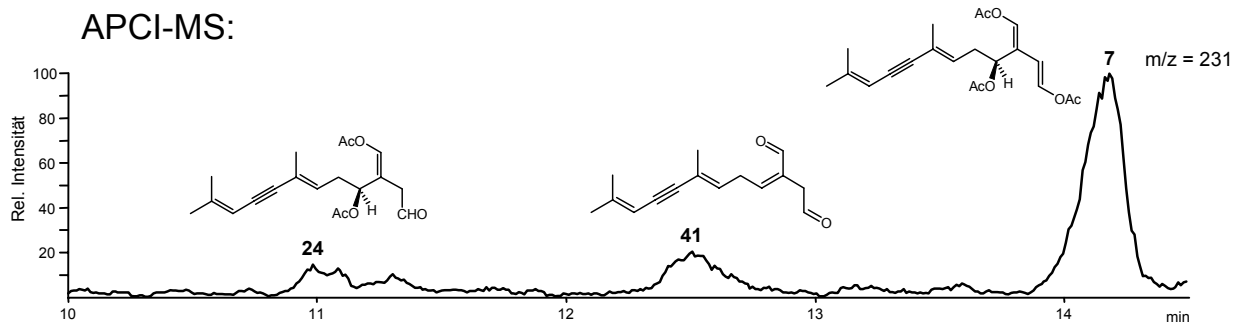
- 
107. Schwender, J., Gemunden, C., Lichtenthaler, H.K. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2- C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids *Planta* **2001**, 212 (3), 416-423.
  108. Jux, A. Frühe Stufen des Terpenstoffwechsels **2001**, Friedrich-Schiller-Universität Jena: Jena 137.
  109. Williams, S.L. Uptake of Sediment Ammonium and Translocation in a Marine Green Macroalga *Caulerpa-Cupressoides* *Limnology and Oceanography* **1984**, 29 (2), 374-379.
  110. Chisholm, J.R.M., Dauga, C., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Jaubert, J.M. 'Roots' in mixotrophic algae *Nature* **1996**, 381 (6581), 382-382.
  111. Chisholm, J.R.M., Jaubert, J.M. Photoautotrophic metabolism of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) in the NW Mediterranean *Marine Ecology-Progress Series* **1997**, 153 113-123.
  112. Maier, I., Calenberg, M. Effect of Extracellular Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-Antagonists on the Movement and Chemoorientation of Male Gametes of *Ectocarpus- Siliculosus* (Phaeophyceae) *Botanica Acta* **1994**, 107 (6), 451-460.

## Spektrenanhang

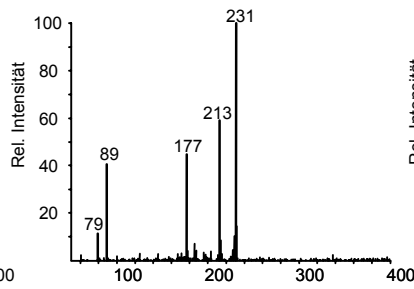


*Caulerpa racemosa* 30s nach Verwundung

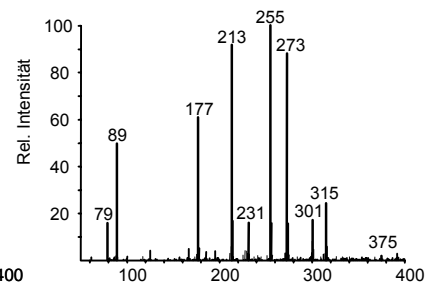
APCI-MS:



Oxytoxin 1 (24)



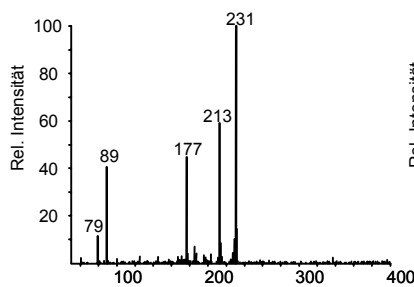
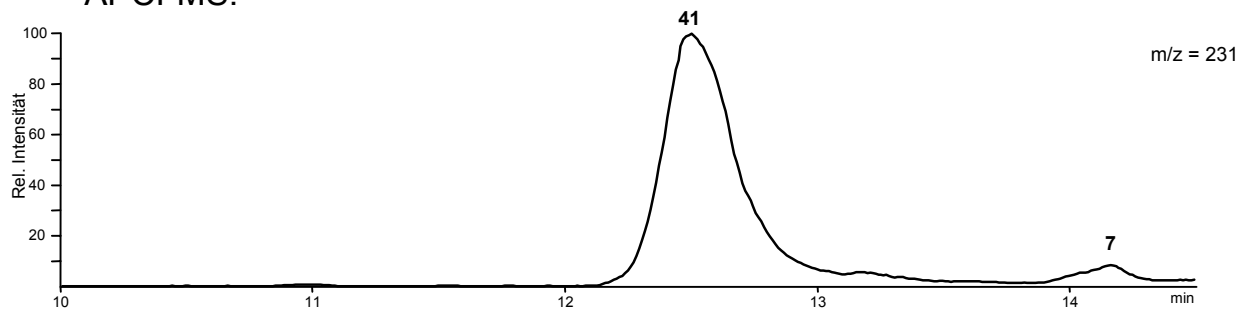
Oxytoxin 2 (41)



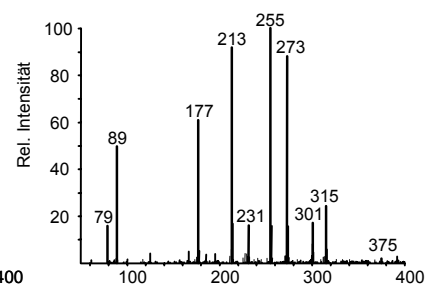
Caulerpenin (7)

*Caulerpa prolifera* 30s nach Verwundung

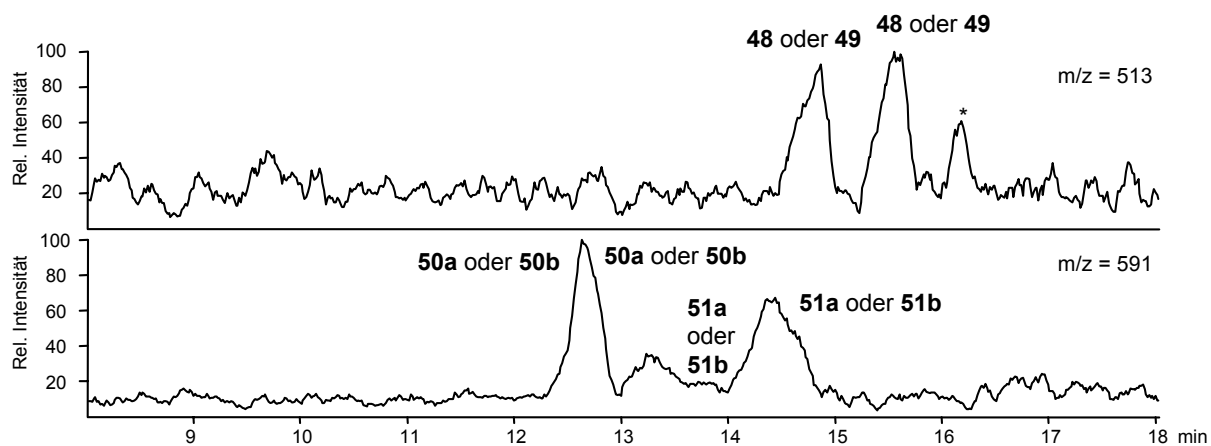
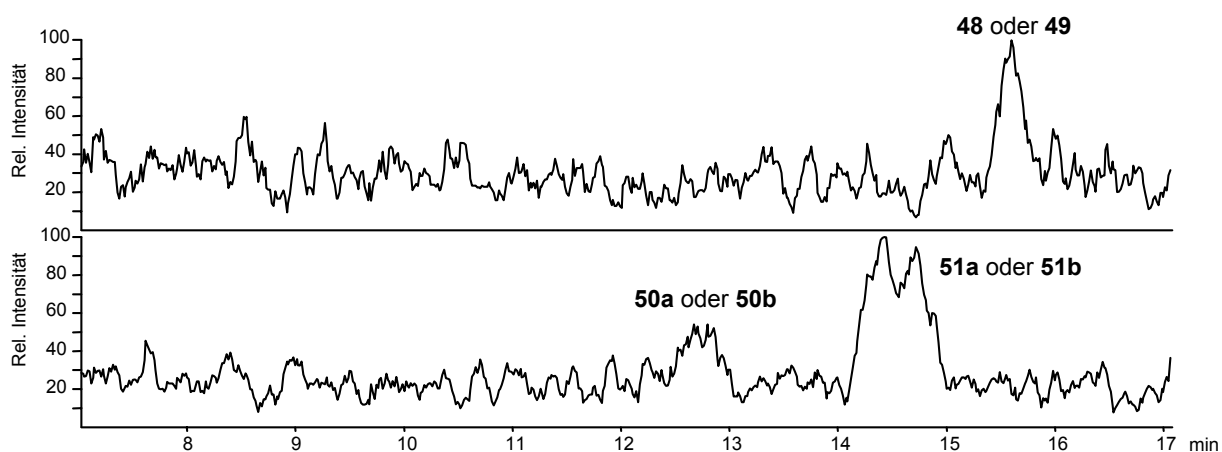
APCI-MS:



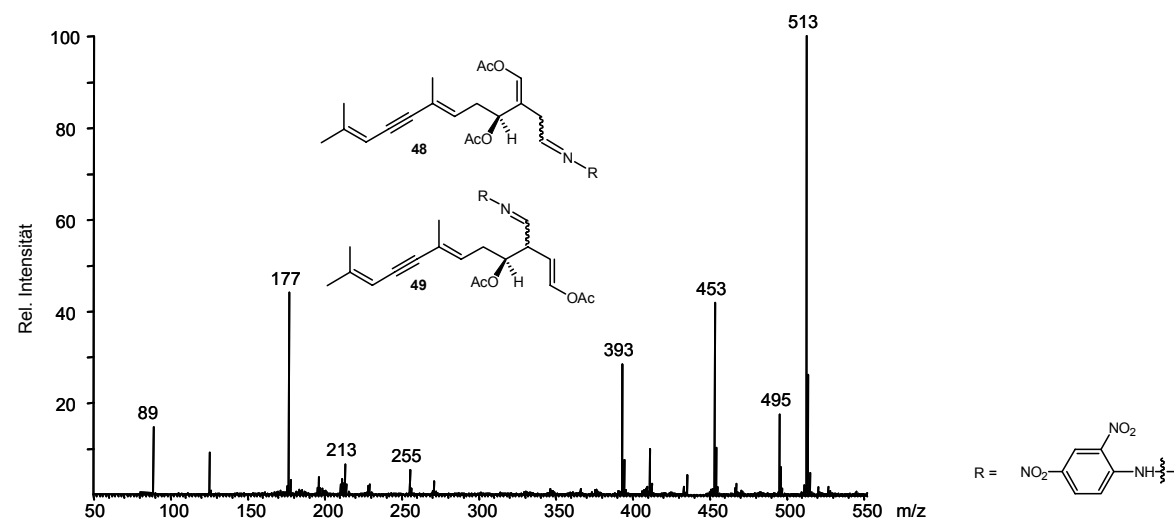
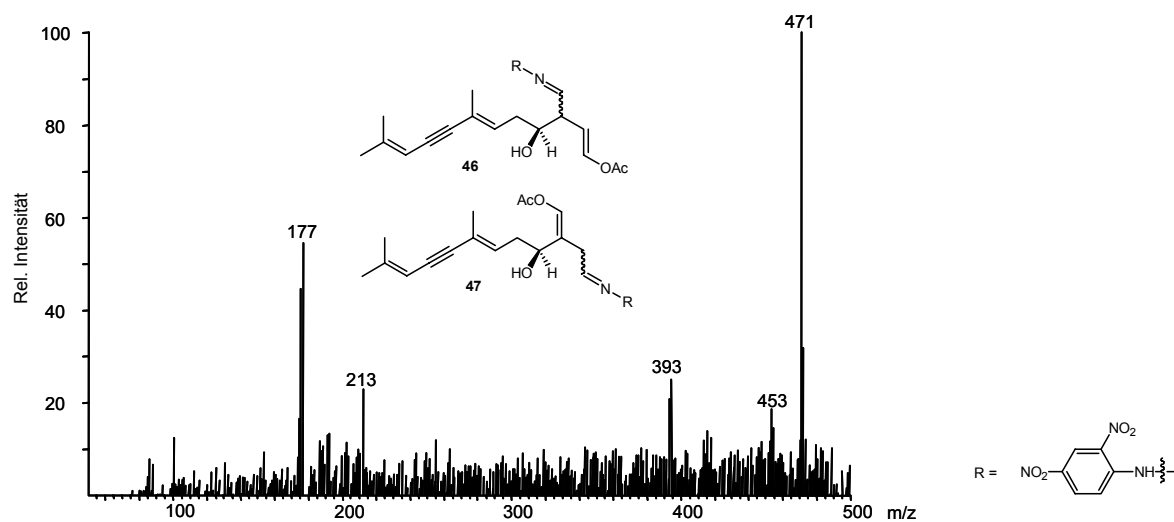
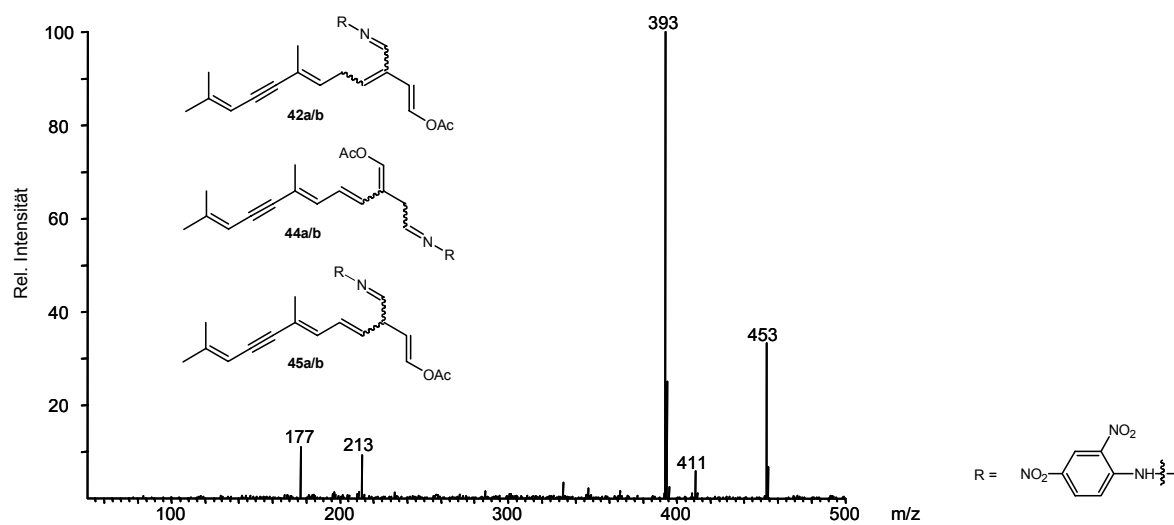
Oxytoxin 2 (41)

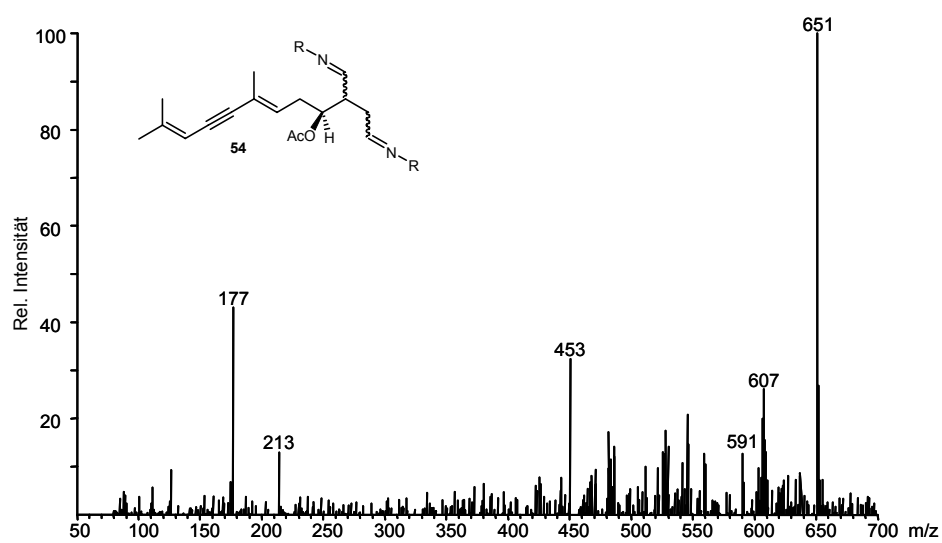
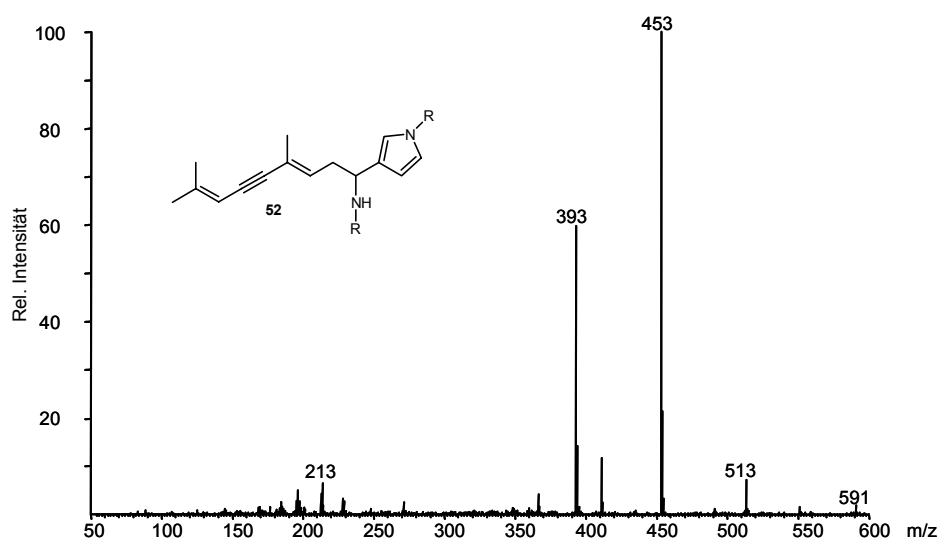
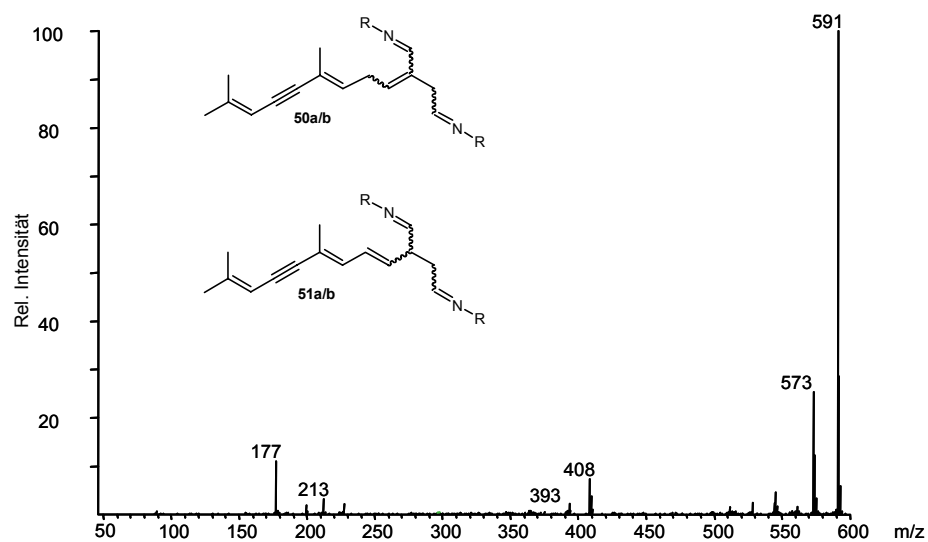


Caulerpenin (7)

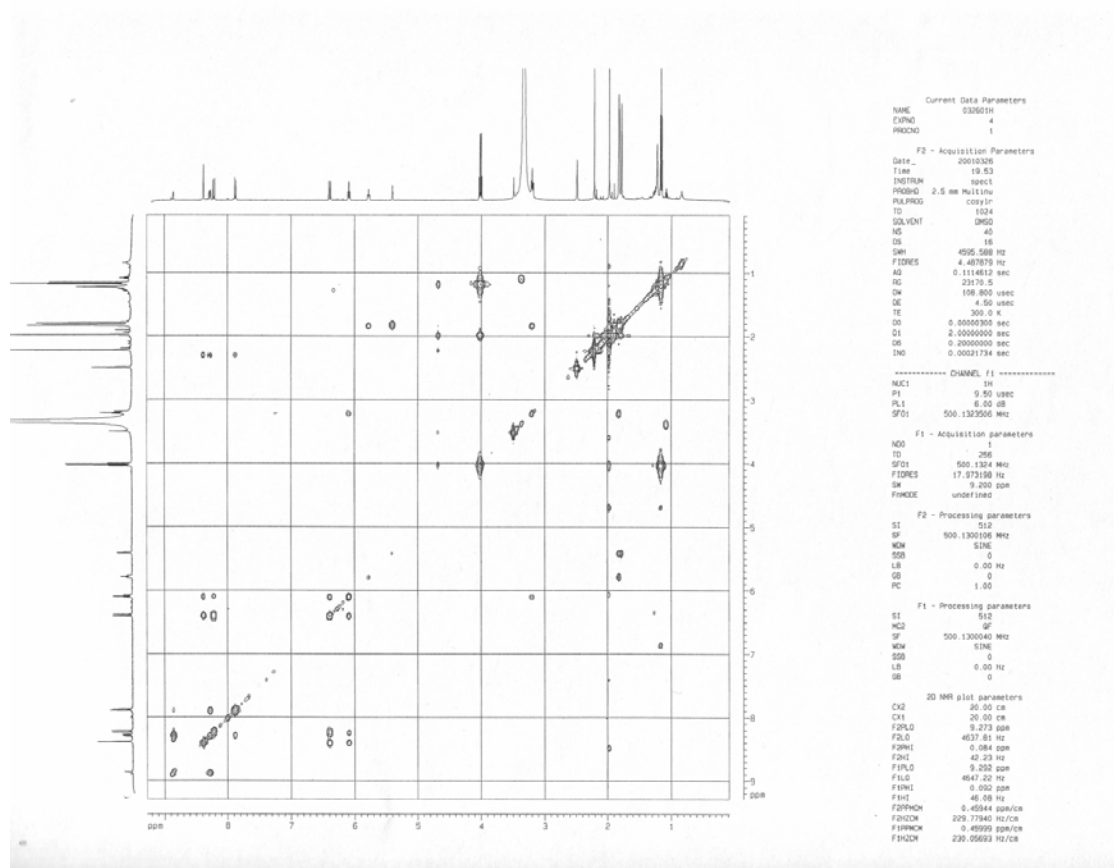
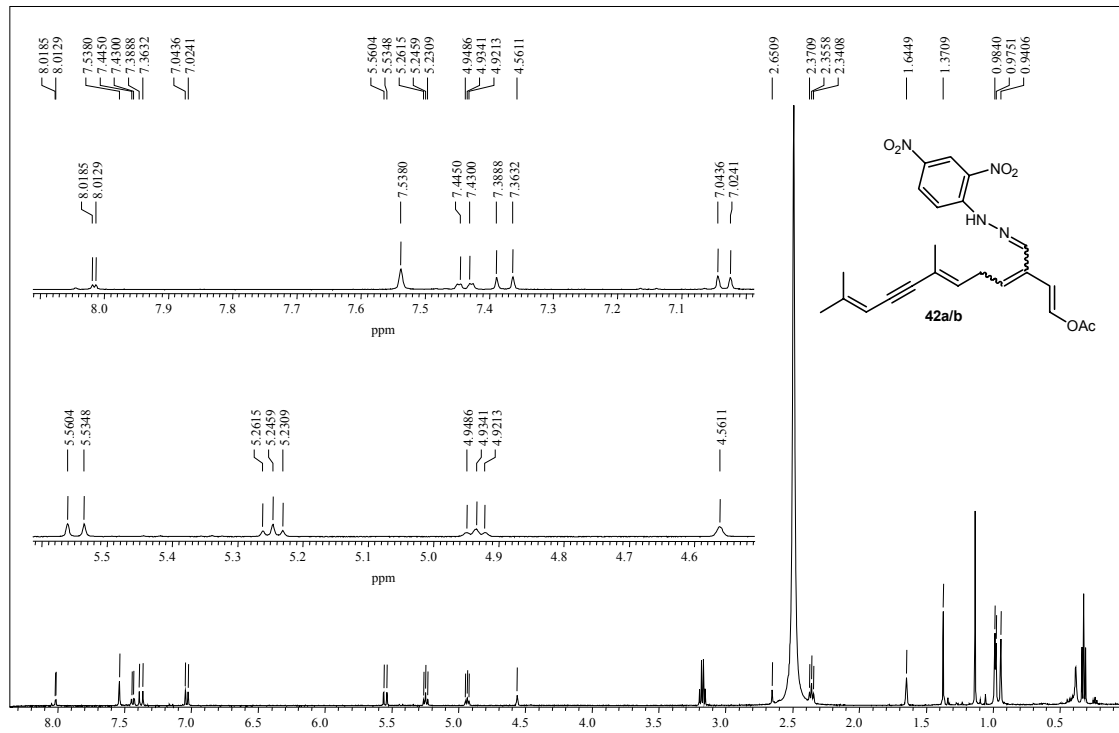
Hydrazone in verwundeten *Caulerpa prolifera*Hydrazone in verwundeten *Caulerpa racemosa*

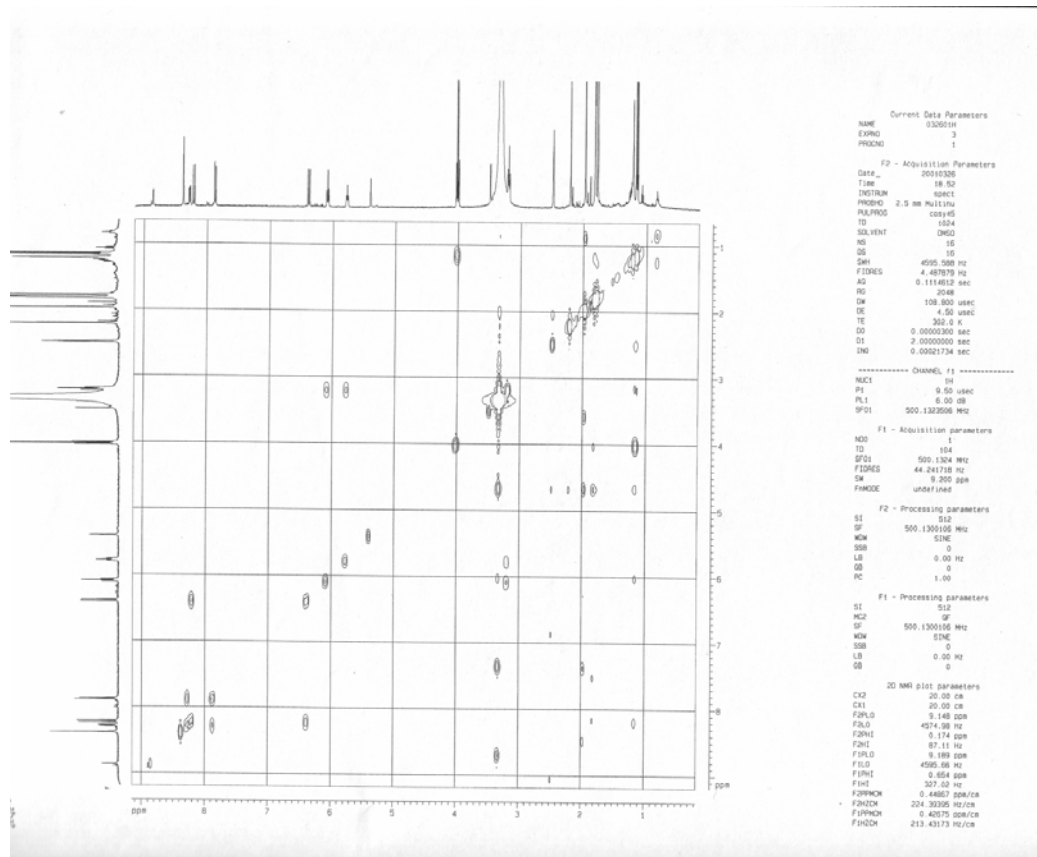
## APCI-Massenspektren der Hydrazone:











## Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei Dr. habil. Georg Pohnert, der mich zu dieser Promotion „überredet“ hat. Danke, für die Zeit, die Geduld, die Hilfestellungen, die Diskussionen und das Vertrauen.

Ich bedanke mich bei Prof. Wilhelm Boland für die Möglichkeit die Arbeit innerhalb seines Arbeitskreises anfertigen zu dürfen. Für die Bereitstellung der Geräte und Verbrauchsmaterialien und die finanzielle Unterstützung vor der Bezahlung durch die DFG.

Ich bedanke mich bei Prof. Dieter Klemm für die freundliche und unkomplizierte Betreuung seitens der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Ich bedanke mich bei Prof. Alexandre Meinesz, Dr. Thierry Thibaut und Jean-Michel Cottalorda für die Versorgung mit Algenmaterial, die Bereitstellung von Laborplatz in Nizza und die nette Betreuung vor Ort.

Ich bedanke mich bei Prof. Müller für die Etablierung der *C. taxifolia* Reinkultur und die „Fernbetreuung“ bei allen anderen Algenfragen.

Ich bedanke mich bei den Serviceabteilungen des Max-Planck-Instituts für Chemische Ökologie:

Bei Dr. Neil Oldham und Janine Rattke für die Aufnahme der Massenspektren, vor allen Dingen für die Geduld und Ausdauer bei den ungewöhnlichen Proben

Bei Dr. Bernd Schneider und Dr. Renate Ellinger für die Messung der NMR-Spektren

Ich bedanke mich bei:

Oliver Brand für die Durchführung der Esteraseversuche.

Dr. Rita Büchler für die Hilfe bei der SDS-PAGE.

Dr. Anne Busch für die Ferndiagnose zur SDS-PAGE, den Bouleevents und den Kochorgien.

Angelika Berg für den unermüdlichen Spüleinsatz.

Dr. Stefan Bartram für die schönen Vorträge und die wunderbaren Crepevariationen.

Bei Dr. Ulrich Lion für die musikalische Untermalung (ob gesungen oder gepfiffen) im Labor.

Grit Winnefeld für die Bereitstellung von Büromaterial und die Nachsicht beim fehlerhaften Ausfüllen von Formularen

Dr. Nathalie Gatto, Andreas Habel, Theresa Wiesemeier, Dr. Christoph Steinbeck, Dr. Martin Heil, Christian Kost, Ivonne Höfer, Dr. Susanna Anderson, Dr. Jörn Piel, Vera Bauke und dem Rest der Arbeitsgruppe Boland.

Ganz besonders bedanke ich mich bei:

Christoph Beckmann für das Korrekturlesen, die Formatierungs- und sonstigen Hilfen bei dieser Arbeit, den Lauftreff, die „Yamserfahrung“ und das regelmäßige Burgeressen.

Sven Adolph für das Korrekturlesen, die Weiterführung der Arbeit und die 3 Sterne Unterbringung mit Shuttleservice bei meinen Aufenthalten in Jena.

Dr. Dieter Spittler und Birgit Schulze für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit und die schöne gemeinsame Zeit.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der „alten“ Gruppe:

Bei Dr. Göde Schüler für die PDA-Analyse und die Hilfe bei all meinen Computerproblemen.

Bei Jana Schubert für die Hilfe bei der Algenversorgung und das unvergessliche Livekonzert im Büro.

Bei Dr. Andrew Jarvis für die Tanzeinlagen im Labor, die Teepausen und die kritischen Blicke bei meinen Syntheseversuchen.

Bei Dr. Andreas Jux für die Bereitstellung von markierter DOX und markiertem Mevalolacton.

Bei Dr. Birte Feld für die Versorgung mit Schokolade, die regelmäßigen Läufe durch Jenas Umgebung und die „Feldversuche“.

Bei Dr. Ulrike Krause und ihrem Team für die umfassende und zuverlässige Versorgung mit Literatur und Kuchen.

Bei Dr. Oliver Fietz für die Einführung in das Magnum und die Trainingsberatung.

Bei Anja Biedermann und Dr. Thomas Koch für die JA- und SA-Analyse.

Bei Dr. Sabine Thiessen für die Einführung in den Gebrauch des Mikromanipulators.

Und zu guter Letzt gilt mein größter Dank:

Meinen Eltern, die mir all das ermöglicht haben.

Roland Seifert, der mich bis hierhin begleitet hat und dies hoffentlich auch in Zukunft tun wird.

Meinem Bruder, der mein Durchsetzungsvermögen in unseren großen und kleinen Kämpfen gestärkt hat.



---

## Tagungsbeiträge und Publikationen

### Publikationen:

Jung V., Thibaut T., Meinesz A., Pohnert G.  
Comparison of the wound-activated transformation of caulerpenyne by invasive and noninvasive *Caulerpa* species of the Mediterranean  
J CHEM ECOL 28 (10): 2091-2105 OCT 2002

Jung V., Pohnert G.  
Rapid wound-activated transformation of the green algal defensive metabolite caulerpenyne  
TETRAHEDRON 57 (33): 7169-7172 AUG 13 2001

Boland W., Engelberth J., Piel J., et al.  
Induced biosynthesis of terpenoid insect semiochemicals in plants  
CHEM LISTY 93: S1-S69 Suppl. S 1999

Koch T., Krumm T., Jung V., et al.  
Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway  
PLANT PHYSIOL 121 (1): 153-162 SEP 1999

Pohnert G., Jung V., Haukioja E., et al.  
New fatty acid amides from regurgitant of lepidopteran (Noctuidae, Geometridae) caterpillars  
TETRAHEDRON 55 (37): 11275-11280 SEP 10 1999

### Tagungsbeiträge:

- Vortrag beim Fränkisch-Mitteldeutschen Naturstofftreffen in Jena 2000, Titel: „Die Wehrchemie der tropischen Grünalge *Caulerpa taxifolia*“
- Vortrag beim International Society of Chemical Ecology (ISCE) meeting in Lake Tahoe, Kalifornien 2001, Titel: „Chemical defense of the invasive green alga *Caulerpa taxifolia*“
- Poster bei der DECHEMA-Naturstofftagung in Irsee 2001, Titel: „Aktivierte chemische Verteidigung der Grünalge *Caulerpa taxifolia*“
- Poster bei der 2nd Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology Penang, Malaysia 2001, Titel: „Rapid wound-activated transformation of the green algal defensivemetabolite caulerpenyne“
- Poster beim ISCE meeting in Hamburg 2002, Titel: „Esterase-mediated caulerpenyne transformation in siphonous green algae of the order Caulerpales“
- Vortrag bei der Kurt-Mothes Tagung 2002, Titel: „Esterase-mediated caulerpenyne transformation in siphonous green algae of the order Caulerpales“
- Poster bei der European Conference on Marine Natural Products in Elmau 2002, Titel: „Esterase-mediated transformation of Caulerpenyne in invasive and noninvasive *Caulerpa* spp.“

**Persönliche Daten:**

Name: Verena Jung  
geboren am 25.04.1974 in Kassel

**Schulbildung:**

08/1980 – 06/1993 Grundschule und Gymnasium in Kassel

**Hochschule:**

10/1993 – 07/1996 Studium der Chemie an der *GHK Gesamthochschule Universität Kassel*

Abschluss: Vordiplom mit Note 2

10/1996 – 10/1999 Studium der Chemie Fachrichtung Umweltchemie an der *Friedrich-Schiller-Universität Jena*

Abschluss: „Diplomchemikerin (Umweltchemie)“ mit Note 1

12/1998 – 09/1999 Diplomarbeit am *Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena*

Thema: „Fettsäure/Aminosäure Konjugate im Regurgitat von Lepidoptera Larven: Identifizierung, Charakterisierung und ökologische Relevanz“ mit Note 1

**Promotion:**

Seit 01/2000 Promotion am *Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena*

Thema: „Mechanismus und Funktion der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung in der invasiven Grünalge *Caulerpa taxifolia*“

**Tätigkeiten:**

10/2001 - 02/2002 Vorlesung „Allgemeine Chemie für Augentoptiker“ an der Fachhochschule Jena

Kapitel: Säuren und Basen, pH-Wert

02/2002 – 03/2002 Betreuung des Biochemie Praktikums an der FSU Jena

10/2002 Betreuung des „Naturstoffchemie“ Praktikums an der FSU Jena





## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

---

Jena, 25. Juli 2003