

BIOMARKER AUS KALTWASSER- UND TIEFSEE-
KIESELSCHWÄMMEN

PHYLOGENIE, CHEMOTAXONOMIE UND CHEMISCHE ÖKOLOGIE DER
DEMOSPONGIAE UND DER HEXACTINELLIDA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Geowissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Martin Blumenberg

Hamburg, 2003

Als Dissertation angenommen vom Fachbereich Geowissenschaften der
Universität Hamburg
auf Grund der Gutachten von

Prof. Dr. W. Michaelis

Prof. Dr. V. Thiel

Prof. Dr. P. Albrecht

Hamburg, den 25. April 2003

Prof. Dr. H. Schleicher
Dekan
des Fachbereiches Geowissenschaften

Danksagung	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung	4
2 Darstellung von Aufbau, Vorkommen, Phylogenie und Erdgeschichte der Kiesel- schwämme (Demospongiae und Hexactinellida)	6
3 Primär- und Sekundärstoffe in Schwämmen – Ziele der Untersuchung	10
4 Kaltwasser- und Tiefseekieselchwämme – Das Probenmaterial	14
4.1 Kaltwasserdemospongiae des Norwegenschelfs	16
4.2 Hexactinellide Schwämme	20
5 Ergebnisse und Diskussion Teil 1 – Lipide als chemotaxonomische Indikatoren von Kieselchwämmen	22
5.1 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Carbonsäuren und Plasmalogene aus Glycerolipiden	22
5.1.1 Langkettige polyungesättigte Fettsäuren (LCFA $\Delta^{5,9}$)	24
5.1.2 Mittkettig und endständig verzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$	32
5.1.3 Bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$	36
5.1.4 Estergebundene Isoprenoidsäuren (Phytansäure und Trimethyltridecansäure)	42
5.1.5 Sonstige ungewöhnliche Fettsäuren	47
5.1.6 Plasmalogene (1- <i>O</i> -alk-1-enyl-2-acyl-Glycerophospholipide)	51
5.2 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Steroide	55
5.2.1 Sterole in Kaltwasserdemospongien	58
5.2.2 Steroide in Vertretern der Hexactinellida	63
5.3 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Niedermolekulare Sekundärstoffe	69
5.3.1 Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanat-Sesquiterpenoide und Diterpenfurane	70
5.4 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Zusammenfassung vorhandener 'Bioindikatoren'	76
5.4.1 Klasse Demospongiae	77
5.4.2 Klasse Hexactinellida	80
5.5 Lipidchemischer Versuch über die phylogenetische Beziehung von Demospongiae und Hexactinellida	81
6 Ergebnisse und Diskussion Teil 2 – Untersuchungen zur Rolle und Biosynthese von Lipidkomponenten in Kaltwasserdemospongien	84
6.1 Lipidadaptationen psychrophiler Organismen	86
6.1.1 Lipidadaptationen in Kaltwasserdemospongien des Norwegenschelfs	88
6.2 Untersuchungen der Biosynthesepfade in <i>Phakellia ventilabrum</i> – Stabile Kohlen- stoffisotope	92
6.3 Untersuchungen zur Verwendung isoprenoidaler Archaealipide durch den axinel- liden Schwamm <i>Phakellia ventilabrum</i> – Ist Phytansäure ein indirekter Bioindikator schwammassoziiierter Archaea?	96
7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	104
8 Literatur	107
 Anhang	
A Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
B Methodik	

C Tabellen

D Massenspektren

E Publikationen mit direktem Bezug zur vorliegenden Arbeit

- E.1 Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., and Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancestral metazoans. *Naturwissenschaften*. **89**, 60-66.
- E.2 Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Pomponi S., and Michaelis W. (2002) Steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 415-419.
- E.3 Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., and Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.
- E.4 Pape T., Blumenberg M., Thiel V., and Michaelis W. (2002) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Boll. Mus. Ist. biol. Univ. Genova* (submitted)

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Michaelis für wichtige Anregungen und die Möglichkeit der Verwirklichung dieser Arbeit. Thomas Pape danke ich für seine Hilfsbereitschaft, wichtige und interessante Diskussionen und für die Schaffung einer freundschaftlichen Atmosphäre auch abseits der Wissenschaft. Ebenso danke ich Sabine Beckmann, Dr. Sabine Brasse, Dr. Oliver Christof, Dr. Nikolaj Delling, Michael Holzwarth, Dr. Richard Seifert, Ariane Seraphin und Gabriele Thal für wichtige Hilfen und vor allem den Spaß, den ich in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit hatte.

Eine wichtige Grundlage dieser Studie stellte das außergewöhnliche Probenmaterial und die taxonomische Klassifizierung der Schwämme dar. Hierfür zeichnen Mitarbeiter der Universität Göttingen (Prof. Dr. J. Reitner und Friederike Hoffmann), der *HARBOR BRANCH Oceanographic Institution* (Dr. S.A. Pomponi und J. Reed), des AWI Bremerhaven (Dr. J. Hefter und Dr. S. Gatti) und Hans-Tore Rapp von der Universität Bergen (Norwegen) verantwortlich. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Susanne Sölter, Christina Roos, Karsten Fehler, Sven Possner und Herrn Prof. Dr. W.A. König (Fachbereich Chemie, Universität Hamburg) für Synthesearbeiten und Analysen, ohne die Teile dieser Arbeit nicht durchgeführt hätten werden können.

Ein ganz besonderer Dank für seine Unterstützung gilt Prof. Dr. Volker Thiel. Sein Wissen, seine Anregungen, die Bereitstellung von Daten und die unermüdlichen und immer spannenden Diskussionen haben es mir ermöglicht, immer neue Aspekte zu entdecken und diese Studie fertigzustellen.

Bei meiner Mutter möchte ich mich für ihr immerwährendes Vertrauen in meinen Lebensweg bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich Marita Sandau für ihre Hilfsbereitschaft und vor allem für ihre Liebe.

Abkürzungen

Abkürzungsverzeichnis

Lipidkomponenten

Fettsäuren

FA	Fettsäure ('fatty acid')
ME	Methylester
FAME	Fettsäuremethylester ('fatty acid methyl ester')
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren ('short chain fatty acids') < 20 C-Atome
MCFA	Mittkettige Fettsäuren ('mid chain fatty acids') 20–22 C-Atome
MCBFA	Mittkettig verzweigte Fettsäuren ('mid chain branched fatty acids') 14–24 C-Atome
LCFA	Langkettige Fettsäuren ('long chain fatty acids') > 24 C-Atome
LCFA $\Delta^{5,9}$	Langkettige Fettsäuren ('long chain fatty acids') > 24 mit <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -9-dien-Muster
MCB	Mittkettig verzweigt ('mid chain branched')
MCBLCFA	Mittkettig verzweigte langkettige Fettsäuren
<i>i</i> -	<i>iso</i> -methylverzweigt (ω 2)
<i>ai</i> -	<i>anteiso</i> -methylverzweigt (ω 3)
MeO	Methoxy-Substitution
OH	Hydroxy-Substitution

Sterole

z.B. 29 $\Delta^{5,22}$	'konventionelles' Sterol mit 29 C-Atomen und Doppelbindungen an C-5 und C-22
-------------------------	--

Phospholipidklassen

PE	Phosphatidylethanolamin
PC	Phosphatidylcholin
PS	Phosphatidylserin
PG	Phosphatidylglycerol
DPG	Diphosphatidylglycerol

Reagenzien und Lösungsmittel

TMCS	Trimethylchlorosilane (C ₃ H ₉ SiCl)
DCM	Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)
BF ₃	Bortrifluorid
MeOH	Methanol (CH ₃ OH)

Methoden

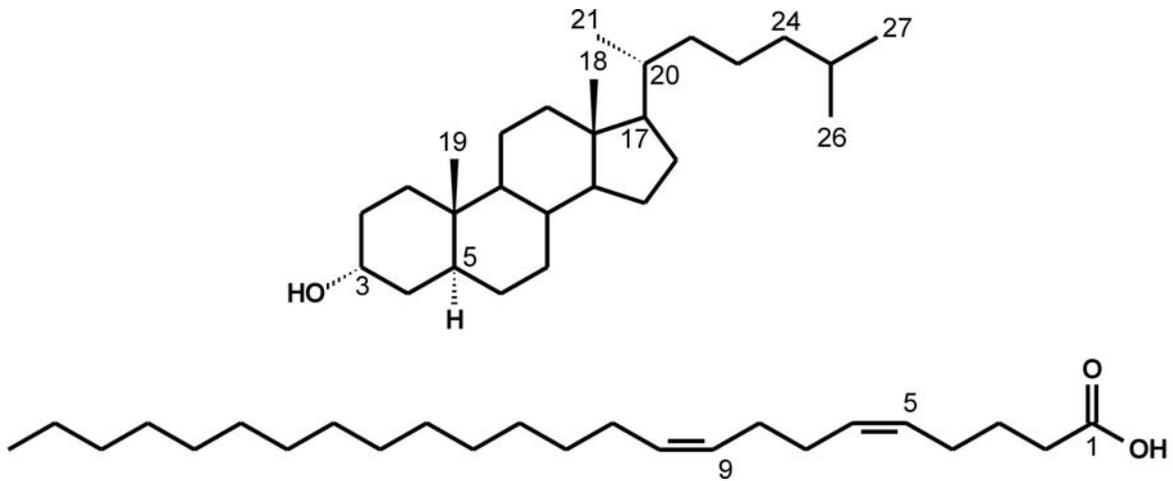
DC	Dünnschichtchromatographie
SPE	'solid phase extraction' (Festphasenextraktion)
SC	Säulenchromatographie
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-C-IRMS	Gekoppelte 'gaschromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry' (Isotopenmassenspektrometrie)
GV	Gelbettvolumina

Sonstiges

SAM	Schwammassoziierte Mikroorganismen
Stabw.	Standardabweichung

Abkürzungen

Nummerierung der Fettsäuren und Steroide



Beispiele $5\alpha(\text{H})\text{-Cholesta-}3\beta\text{-ol}$ ($27\Delta^0$)
 ($5\textit{cis}, 9\textit{cis}$)-5,9-Tetracosadiensäure ($24\Delta^{5,9}$)

1 Einleitung

Das Biomarkerkonzept basiert auf dem Vorkommen spezifischer Moleküle (i.d.R. Lipide), deren Auffinden Aussagen zum Quellorganismus und/oder Ablagerungsmilieu bzw. Reife des Sedimentes zulassen. Das Grundprinzip wurde in den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts (TREIBS, 1934) entdeckt und geht in seinen Anfängen auf die geochemische Charakterisierung fossiler Brennstoffe zurück. Neben der Bearbeitung dieser 'klassischen' Ansätze der Biogeochemie anhand sog. Chemofossilien (fossile Biomarker) wurden in der Folge vielfältige weitere Biomarker beschrieben, die die zu bearbeitenden Fragestellungen laufend erweitern. Zunehmend wichtiger werden diesbezüglich Untersuchungen an rezenten Organismen, da diese Daten einerseits die Grundlage der Interpretation von Chemofossilien darstellen, andererseits aber auch heutig existente Zusammenhänge beleuchten (Taxonomie, Phylogenie, Chemoökologie, etc.).

Die erdgeschichtlich aber auch entwicklungsphysiologische Basis der Metazoenentwicklung stellen Schwämme (Porifera) dar. Die grundsätzliche Lebensweise und Zellorganisation ('Bauplan') von Schwämmen ist seit präkambrischen Zeiten unverändert geblieben; mehr noch, es wird davon ausgegangen, dass Schwämme schon im Proterozoikum verbreitet waren. Sie besitzen weder Organe noch ein Nervensystem und bestehen aus wenigen Zelltypen, die auf zwei Grundtypen basieren (Choanozyten und Archaeocyten). Rezent sind sie im Süßwasser und im marinen Milieu vertreten und müssen aufgrund ihrer weiten Verbreitung und langen Entwicklungslinie als eine ausgesprochen erfolgreiche Lebensform gelten. Somit sind Schwämme Forschungsobjekte, deren Untersuchung einen Einblick in die ursprüngliche Zellorganisation vielzelliger Lebensformen und zudem in die Anfänge des Lebens der Erde erlauben. Schon frühzeitig wurde aus diesem Grund ein Fokus von Biologen und Paläontologen auf das Studium dieser Organismen gerichtet, um taxonomische, phylogenetische und erdgeschichtliche Grundzüge von Schwämmen zu erarbeiten. Allerdings ergaben die dabei eingesetzten Methoden bei spezifischen Problemen keine oder teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb hielten und halten laufend neuentwickelte Analyseverfahren in die Schwammforschung Einzug.

Hierzu zählen auch chemische Methoden, die die Verteilung spezifischer Biomarker in verschiedenen Schwammtaxa nutzen und so unter anderem chemophylogenetische Indikatoren liefern. Wichtige Komponentenklassen, die im Zuge solcher Studien untersucht werden, sind spezifische Fettsäuren und Sterole, deren Vorkommen auf bestimmte taxonomische Arten beschränkt ist. Die dabei erzielten Daten rezenter Organismen bilden allerdings auch die Basis für Einblicke in die Erdgeschichte. So wurde beispielsweise gezeigt, dass 24-Isopropylcholestan aus Sedimenten frühproterozoischen Alters (~1.800 Ma) auf Schwämme oder deren phylogenetische Vorläufer zurückgeht (MCCAFFREY *et al.*, 1994). Der diagenetische Vorläufer dieses Steroids ist für eine Reihe von Schwämmen bekannt, so dass das Chemofossil 24-Isopropylcholestan als ältester Metazoenbiomarker angesehen werden kann. Des Weiteren bietet die Analyse von Biomarkern an rezenten Schwämmen die Möglichkeit – insbesondere im Zusammenhang mit 'klassischen' und molekularbiologischen Klassifizierungsmethoden – Hinweise zu taxonomischen Beziehungen zu erhalten (z.B. BERGQUIST *et al.*, 1980; VAN SOEST *et al.*, 1998). Dennoch sind eine Reihe von diesbezüglichen Fragen bislang ungeklärt. So wird beispielsweise die Phylogenie der drei rezenten Klassen der Schwämme – Hexacti-

nellida, Demospongiae und Calcarea – immer noch kontrovers diskutiert. Dem zugrunde liegt die fehlenden Datendichte außerhalb der Klasse Demospongiae, die mit der geringeren Verbreitung der anderen Schwammklassen und Schwierigkeiten bei der Probengewinnung zusammenhängt. Das 5. Kapitel dieser Arbeit widmet sich der Verteilung spezifischer Biomarker in 32 Kaltwasservertretern der Demospongiae und 23 hexactinelliden Arten. Darauf basierend werden chemotaxonomische Aspekte diskutiert und insbesondere die phylogenetischen Zusammenhänge der Kieselschwämme (Demospongiae und Hexactinellida) im Zusammenhang mit der Klasse Calcarea fokussiert. Diese Betrachtung wird durch die erstmalig in dieser Arbeit durchgeführte umfassende Untersuchung der Lipide hexactinellider Schwämme ermöglicht.

Ferner rücken zunehmend Arbeiten zur Chemoökologie von Schwämmen in den Mittelpunkt. Dieses Interesse basiert auf dem überproportional hohen Vorkommen von Naturstoffen in Schwämmen im Vergleich mit anderen sessilen Organismen (MUNRO and BLUNT, 2000). Offensichtlich nutzen insbesondere Schwämme chemische Abwehrmechanismen, um sich gegen Fraßfeinde, Konkurrenz und Überwuchs zur Wehr zu setzen. Diese Sekundärmetaboliten (Naturstoffe) sind indessen auch von pharmakologischem Interesse, wie die zunehmende Zahl an Publikationen in diesem Forschungsbereich zeigt (z.B. FAULKNER, 2002). Dennoch ist das Verständnis der spezifischen ökologischen Funktion und der Biosynthese von Abwehrsubstanzen vielfach ungeklärt. Entsprechende Untersuchungen sind rar und ausschließlich für einige tropische Schwammarten vorhanden (z.B. PAWLIK, 1993; DUMDEI *et al.*, 1997; SCHUPP *et al.*, 1999b). Chemoökologische Daten zu borealen Vertretern liegen bislang nicht vor. Im 6. Kapitel werden deshalb Ergebnisse vorgestellt, die zum einen Lipidanpassungen von Kaltwasserschwämmen und so mögliche Biomarker psychrophiler Metazoa beschreiben. Zum anderen werden Messungen der Verhältnisse stabiler Kohlenstoffisotope als Methode diskutiert, um Aussagen zu Biosynthesepfaden in Porifera zu gewinnen. Beispielhaft wurden dafür Zusammenhänge pharmakologisch relevanter Naturstoffe in einem axinelliden Schwamm betrachtet und somit Daten zur Edukt-Produkt-Beziehung spezifischer Komponenten erzielt.

Ein zunehmend wichtiger Bestandteil der ökologischen Untersuchung von Schwämmen ist die Erforschung der Assoziation von Schwämmen mit Mikroorganismen. Insbesondere Bakterien liegen intra- und extrazellulär im Gewebe von Poriferen vor und können die Biomasse des Schwammes sogar übersteigen. Jüngere Arbeiten haben gezeigt, dass zusätzlich zu Eubakterien Archaeen in vielen Schwammspezies vertreten sind. Die Grundzüge dieser Assoziation sind dagegen bislang unverstanden. Im 6. Kapitel werden Untersuchungen vorgestellt, die das Ziel hatten, erstmalig Daten zu diesem Zusammenhang zu erhalten. Dort werden isoprenoidale Biomarker als Bindeglied zwischen Archaeen und Schwämmen betrachtet und die Bedeutsamkeit der Assoziation diskutiert.

2 Darstellung von Aufbau, Vorkommen, Phylogenie und Erdgeschichte der Kieselschwämme (Demospongiae und Hexactinellida)

Schwämme (Phylum Porifera) sind sessil-benthische, filtrierende Organismen, die sich phylogenetisch an der Basis der Metazoenentwicklung befinden. Sie gelten in Bezug auf ihre Zellorganisation als einfach, müssen jedoch aufgrund ihrer langen Erdgeschichte und der rezent ubiquitären Verbreitung im marinen Milieu und im Süßwasser als ausgesprochen erfolgreiche Lebensform bezeichnet werden. Rezent sind sie mit drei Klassen, den Calcarea, den Hexactinellida und den Demospongiae, vertreten.

Schwämme besitzen kein echtes Gewebe, keine Organe oder kein Nervensystem. Sie bestehen vielmehr aus einer Vielzahl von Zellen, die auf zwei Typen basieren, Choanocyten und Archaeocyten. Die Erstgenannten sind sog. Kragengeißelzellen, die einen Ein- bzw. Ausstrom von Nahrungspartikeln, Nährstoffen, Sauerstoff und Exkrementen erzeugen. Die Choanocyten sitzen an der Innenwand von Kleinstporen und Kanälen und weisen die größte Dichte in den sog. Choanocytenkammern auf ('Fresskammern'). Archaeocyten sind amoeboiden Zellen, die im Inneren des Schwammes frei beweglich sind. Aus ihnen entwickeln sich zu Beginn der Ontogenese entweder Verdauungszellen (Amoebocyten), Spiculae bildende Zellen (Scleroblasten) oder Geschlechtszellen. All diese Zellen befinden sich in einer Grundsubstanz des Schwammes, die als Mesohyl bezeichnet wird. Dieser 'Bauplan' ist bei allen Schwämmen gleich, allerdings besitzt die Klasse der Hexactinellida eine Sonderstellung. Sie unterscheidet sich von allen anderen Tieren in ihrem Weichkörperaufbau, der als 'syncytial' bezeichnet wird und durch das weitgehende Fehlen diskreter Zellen gekennzeichnet ist (REISWIG, 1979; REISWIG and MACKIE, 1983; MEHL, 1992).

Seit Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass mit den Schwämmen eine Vielzahl von intra- und extrazellulären Prokaryoten assoziiert ist. Diese können die Biomasse des Schwammes deutlich überschreiten und befinden sich vornehmlich im Mesohyl (WILKINSON, 1978; WILLENZ and HARTMANN, 1989). Zusammengesetzt sind die sog. schwammassoziierten Mikroorganismen (SAM) hauptsächlich aus autotrophen und heterotrophen Eubakterien, die großteils schwammspezifisch und nicht mit denen des Umgebungswassers identisch sind (WILKINSON, 1984). Des Weiteren wurde in jüngerer Zeit in einem axinelliden Schwamm der Spezies *Axinella mexicana* ein assoziiertes Archaeum nachgewiesen, das zu den nonthermophilen Crenarchaeota gehört. In der Folge wurde die Existenz von Archaeen auch in weiteren Vertretern der Axinellida beschrieben, in denen sie anscheinend vor allem im Collagen vorliegen (MARGOT *et al.*, 2002).

Basierend auf diesen Daten wurden Biomarkeruntersuchungen an einer Reihe verschiedener Schwammspezies durchgeführt, die auf eine bedeutendere Rolle von Archaeen hindeuten, als gemeinhin angenommen wird (PAPE *et al.*, 2002; THIEL *et al.*, 2002). Für beide assoziierten Mikroorganismengruppen – Archaea und Eubakterien – gilt, dass die Art des Zusammenlebens mit dem Schwamm nahezu ungeklärt ist. Allerdings scheint es, dass Schwämme zur Synthese eigener Lipidsäuren kurzkettige, eventuell bakterienstämmige Fettsäuren verwenden (HAHN *et al.*, 1988). Zudem wurden Hinweise auf mikrobielle Produzenten von cytotoxischen Naturstoffen, beispielsweise in *Halichondria panicea*, gefunden, die darauf hindeuten, dass SAM-produzierte Substanzen ein wichtiger Bestandteil der Abwehrstrategie von Schwämmen sein können (ALTHOFF *et al.*, 1998). Weitere Funktionen assoziierter Prokaryoten in

Schwämmen sind die Nährstoffbereitstellung, die Stabilisierung des Skelettes und die Verarbeitung von Schwammexkrementen (HENTSCHEL *et al.*, 2002 und Zitate darin).

Allgemein ist das Mesohyl der Poriferen von Scleren durchzogen, die eine stützende Funktion haben und teilweise durch einzelne Sponginfasern verbunden sind. Die Scleren können aus Calciumcarbonat (CaCO_3 ; Klasse Calcarea), Kieselsäure (SiO_2 ; Klassen Hexactinellida und Demospongiae) oder Spongin (elastisches Skleroprotein; einige Vertreter der Demospongiae) bestehen. Wegen der chemischen Übereinstimmung des Skelettes werden die Demospongiae und Hexactinellida zu den Kieselschwämmen zusammengefasst. Hexactinellida und Demospongiae sind jedoch morphologisch durch unterschiedliche Formen ihrer Spiculae charakterisiert. So bilden hexactinellide Schwämme sechsstrahlige, Demospongiae dagegen tetractinellide und monoaxone Nadeln. Zudem findet die Sclerenbildung in der Klasse Demospongiae intrazellulär, in den sogenannten Sclerocyten, statt (REITNER and MEHL, 1996). Da der Aufbau der Spiculae taxonomisch spezifiziert ist und sie ein hohes fossiles Erhaltungspotenzial besitzen, sind sie für die Klassifizierung und in der Biostratigraphie von enormer Bedeutung.

Fossile Spuren der Porifera reichen bis in das Mittlere Proterozoikum zurück (REITNER and MEHL, 1996) und ab dem Unteren Kambrium bilden sie die am meisten diverse Metazoen-Gruppe (STEINER *et al.*, 1993). Fossile Funde dieser Zeit und immunologische Untersuchungen zeigen, dass sich der 'Bauplan' und der Aufbau der dort gefundenen Spiculae – aber auch die Assoziation mit internen Prokaryoten – bis heute kaum verändert hat. Auch alle drei heute bekannten Klassen (Hexactinellida, Demospongiae und Calcarea) sind seit dem Unteren Kambrium nachgewiesen (VACELET, 1999). Die ältesten kompletten Schwämme wurden in der Sansha Sektion in Hunan (China) beschrieben und besitzen ein Alter von ~580 Ma (STEINER *et al.*, 1993). Außer einem fraglichen Vertreter, der zu den Demospongiae gestellt wird, gehören alle Porifera der Sansha-Sektion der Klasse Hexactinellida an (MEHL *et al.*, 1998) und auch die ältesten gefundenen Spiculae (Dengying Formation, Hubei Provinz China; Spätes Proterozoikum) stammen wahrscheinlich von Vertretern dieser Gruppe (STEINER *et al.*, 1993).

Die hexactinelliden Porifera erlebten ihre erdgeschichtliche Blütezeit mit einer massiven Ausbreitung in den Epikontinentalmeeren des nördlichen Tethys-Schelfs während des Oberen Jura. Zu dieser Zeit bildeten die Hexactinellida einen Riffgürtel, der eine Ausdehnung von 7.000 km erreichte (KRAUTTER *et al.*, 2001). Tetractinomorpha und einige Homoscleromorpha – rezente Ordnungen der Demospongiae – breiteten sich epochal vor allem seit dem Ordovizium in flach marinen Bereichen aus. Demgegenüber war die Unterklasse Homoscleromorpha während des Silur/Devon und noch einmal in Jura und Kreide vorherrschend. Tetractinomorpha erfuhren dagegen vor allem im Karbon ihre größte Verbreitung (DEBRENNE, 1999).

Jüngere Untersuchungen der Aminosäuresequenzen von Schwämmen deuten darauf hin, dass sich diese schon vor etwa 0.8 Ga von einem phylogenetischen Vorfahren entwickelt haben müssen (MÜLLER, 1997). Ein noch höheres Alter weisen Analysen der Insulin-Rezeptor-Polypeptid-Zusammensetzung den hexactinelliden Schwämmen zu. Ihr hieraus berechnetes Alter wird mit 1.4 Ga angenommen. Das Alter der Abspaltung der Demospongiae wird mit 1.3 Ga, bzw. der Calcarea mit 1.1 Ga beziffert (SCHÜTZE *et al.*, 1999; SKOROKHOD *et al.*, 1999). Interessant ist, dass zyklische Kohlenwasserstoffe wie 24-Isopropylcholesterol, deren Ursprung auf Schwämme zurückgeführt wird, aus Sedimenten mit einem Alter von 1.8 Ga nachgewiesen worden sind (MCCAFFREY *et al.*, 1994). Dieser Nachweis deutet darauf hin, dass Schwämme oder deren Vorläufer ein deutlich höheres Alter aufweisen, als anhand der

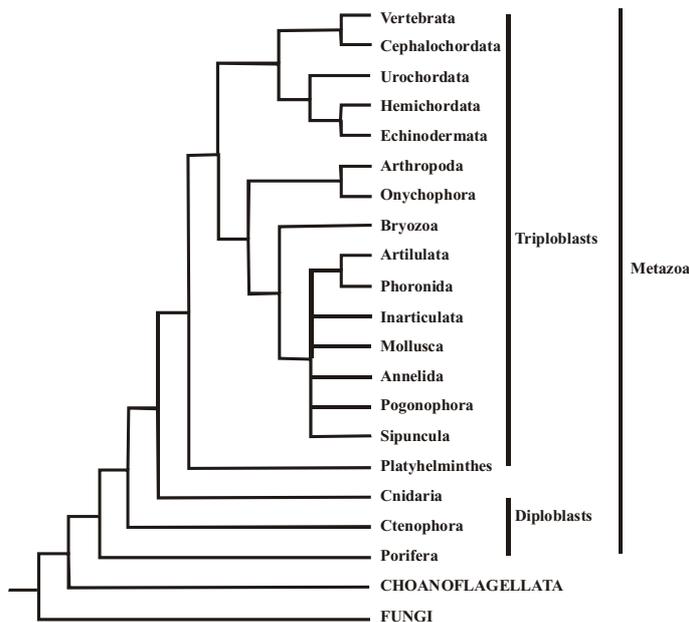


Abbildung 2.1 Abstammungszweig ausgewählter Eukaryoten, basierend auf 18S-rRNA-Daten (leicht verändert nach VALENTINE *et al.*, 1996; KOBAYASHI and SATOH, 1998)

oben genannten Methoden aufgezeigt werden konnte.

Neben dem tatsächlichen Alter des Phylums Porifera ist auch der phylogenetische Vorfahr ein Bestandteil von Studien. Verbreitet ist die Annahme, dass die Entstehung der Porifera auf der Koloniebildung einzelliger Choanoflagellaten beruht (HAECKEL, 1874). Diese These wird gestützt durch Untersuchungen von Nukleotidsequenzen der 18S rRNA, die neben dem monophyletischen Stand von Porifera eine relative Nähe zu Choanoflagellaten aufzeigen (Abb. 2.1; VALENTINE *et al.*, 1996).

Die taxonomische Einteilung der Schwammklassen gilt als noch

nicht hinreichend geklärt. So gliedern einige Autoren Hexactinellida von den Demospongiae und Calcarea ab. Die Klassen Demospongiae und Calcarea werden aufgrund ihrer Pinacoderm-Schicht als 'Pinacophora' (REITNER and MEHL, 1996) oder wegen ihres multizellularen Aufbaus als 'Cellularia' zusammengefasst (Abb. 2.2; MEHL *et al.*, 1998). Diese Einteilung wird gestützt durch Analysen der Proteincodierungen des Gens Hsp 70 (BORCHIellini *et al.*, 1998). BÖGER (1988) dagegen gruppiert Hexactinellida und Demospongiae wegen ihrer Ähnlichkeiten in der Larvalentwicklung bzw. wegen des chemischen Aufbaus der Spiculae zusammen und gliedert die Kalkschwämme aus.

Die drei rezenten Porifera-Klassen – ausgestorben ist die Klasse Archaeocyatha (†510 Ma) – gliedern sich bislang in 21 Ordnungen, 107 Familien und 7.000 Arten. Etwa 90% dieser Spezies gehören den Demospongiae an (HOOPER, 2000).

Schwämme siedeln heute in den unterschiedlichsten Habitaten. Hexactinellida leben exklusiv marin und bevorzugen strömungsarme Bereiche des tieferen Schelfs und des Schelfhanges in Wassertiefen von typischerweise 200–2.000 m (MEHL, 1992). Vertreter der Demospongiae finden sich dagegen vom marinen Milieu bis ins Süßwasser. Sie kommen in allen Wassertiefen vor und sind wichtige Organismen tropischer und auch borealer Riffe. Die vergleichsweise größere habitatunspezifische Ausdehnung der Demospongiae wird auf das gegenüber den Hexactinellida besser entwickelte passive Verteidigungssystem zurückgeführt, das eine effektivere Abwehr von Nahrungs- wie auch Lebensraumkonkurrenten gewährleistet (TABACHNIK, 1991). Vertreter der Klasse Calcarea finden sich vor allem in der

photischen Zone tropischer Meere, da sie häufig symbiotisch mit Cyanobakterien assoziiert leben. Entsprechend siedeln sie vornehmlich in Flachwasserhabitaten, in denen sie Riff bildend sein können. Im Borealen kommen Calcarea untergeordnet mit nur wenigen Zentimeter großen Exemplaren vor (RAPP *et al.*, 2001). In der Fauna des tieferen Schelfs oder in Tiefseebereichen spielen sie keine Rolle.

Derzeit wird davon ausgegangen, dass erst etwa die Hälfte (~7.000) der heute existierenden Schwammarten taxonomisch erfasst ist (HOOPER, 2000). Naturstoff- bzw. lipidchemisch untersucht sind davon bislang erst ~400 Spezies (MUNRO and BLUNT, 2000).

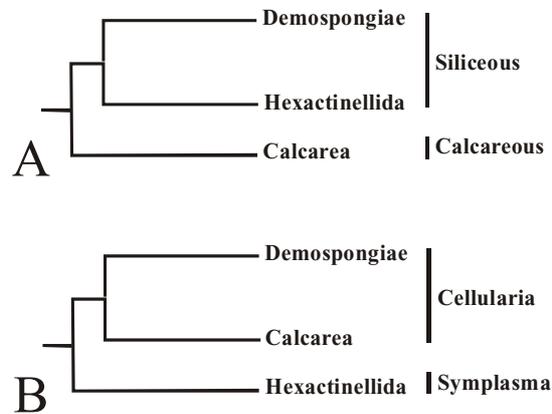


Abbildung 2.2 Hypothesen zur Phylogenie der drei rezenten Porifera-Klassen, basierend u.a. auf der chemischen Zusammensetzung der Spiculae oder der Zellorganisation (aus ADAMS *et al.*, 1999; A nach BÖGER, 1988; B nach REISWIG and MACKIE, 1983)

3 Primär- und Sekundärstoffe in Schwämmen – Ziele der Untersuchung

Schwämme gelten als reichhaltige Quelle verschiedener und teilweise sehr spezifischer Primär- und Sekundärstoffe. Als Primärstoffe werden diejenigen Verbindungen bezeichnet, bei denen – im Gegensatz zu den Sekundärstoffen – ein unmittelbarer Zusammenhang zum Wachstum und zur Entwicklung eines Organismus besteht (PROKSCH, 1991). Hierzu zählen Sterole sowie phospho- und glycolipidgebundene Fettsäuren, die beide in den Membranen von Schwämmen vorliegen. Als Sekundärstoffe (Naturstoffe) gelten Substanzen, die beispielsweise zur Abwehr von Fraßfeinden, Nahrungskonkurrenten und Überwuchs, zur Regulierung von assoziierten Mikroorganismen oder auch zur Färbung dienen.

Wichtige Primärlipide sind zell- oder organellenumschließende Membranbestandteile, deren Hauptgruppen Phospholipide, Glycolipide und Sterole darstellen. Diese Komponenten sind amphiphil und bilden in wässrigen Medien spontan geschlossene bimolekulare Schichten aus. Phospholipide stellen dabei die größte Menge an Membranlipiden dar und leiten sich, wie auch die Glycolipide, vom Glycerin ab. Phosphoglyceride (Glycerinphosphatide) bestehen aus einem Glycerinrückgrat, zwei gleichen oder unterschiedlichen Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol (Abb. 3.1; STRYER, 1995). Amphiphilen Charakter weisen auch die in die Doppelschichten eingelagerten Sterole auf. Deren Strukturen sind sehr variabel, setzen sich aber grundsätzlich aus einem hydrophilen (Hydroxygruppe) und einem lipophilen (Kohlenwasserstoffkette) Teil zusammen. Auch wenn der Aufbau spezifischer Primärstoffe variiert, ist die strukturelle Vielfalt von Sekundärmetaboliten, und damit ihre chemischen Eigenschaften, ungleich vielschichtiger und umfasst ein weites Spektrum von Molekülen (z.B. Terpenoide, Alkaloide und Makrolide).

Generell basiert das Inventar von Primär- und Sekundärstoffen (sog. Biomarker) auf (i) organismusspezifischen enzymatischen Voraussetzungen und (ii) und z.T. variablen Umgebungsbedingungen wie z.B. der Temperatur. Daraus abgeleitet kann die Lipidzusammensetzung unter anderem zu zwei unterschiedlichen Fragestellungen herangezogen werden. So ist das den Lipiden zugrunde liegende Enzymsystem in Organismen phylogenetisch determiniert, und seine Kenntnis erlaubt demnach Aussagen zu den Zusammenhängen verschiedener Taxa. Zusätzlich liefern Lipiddaten Informationen zu den variablen Milieubedingungen (s.o), da gut untersucht ist, in welcher Form strukturelle Modifikationen durch Organismen vorgenommen werden, um deren Zellfunktionen aufrecht zu halten.

Nahezu alle bislang untersuchten Schwämme der Klasse Demospongiae beinhalten ester gebundene, langkettige Fettsäuren ('long chain fatty acids', LCFA) mit Doppelbindungen an den Positionen 5 und 9 ($\Delta^{5,9}$). LCFA $\Delta^{5,9}$ sind spezifische Biomarker für diese Organismen (LITCHFIELD and MORALES, 1976; MORALES and LITCHFIELD, 1976) und werden deshalb von einigen Autoren als 'demospongiac acids' bezeichnet (LITCHFIELD and MORALES, 1976; DJERASSI and LAM, 1991). Schon frühzeitig wurden spezifische Strukturen der LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vergleichsuntersuchungen für chemotaxonomische Aussagen genutzt (BERGQUIST *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1984). Nicht berücksichtigt wurden bei diesen weit gefächerten Untersuchungen Modifikationen der Fettsäuren. Hierzu zählen zusätzliche Doppelbindungen, spezifische Verzweigungen und/ oder Substituenten (z.B. Brom) an der Alkylkette, wie sie in vielen

Schwämme vorkommen (WIJEKON *et al.*, 1984; HAHN *et al.*, 1988; CARBALLEIRA *et al.*, 1989b; BARNATHAN *et al.*, 1994).

Wie alle Metazoen enthalten die Lipide von Schwämmen neben Fettsäuren auch Sterole. Im

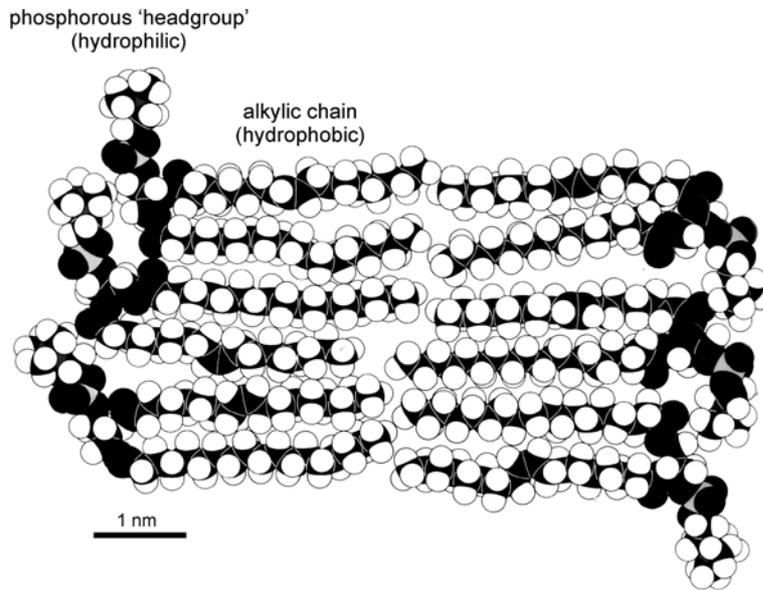


Abbildung 3.1 Kalottenmodell einer Phospholipiddoppelschicht (leicht verändert nach STRYER, 1995)

Gegensatz zur Monotonie von Sterolen terrestrischer Organismen zeigen diese Verbindungen in marinen Invertebraten große strukturelle Abweichungen vom Cholesterol-Grundgerüst. Seit den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde mit zunehmender Intensität diese Strukturdiversität, insbesondere bei schwammproduzierten Sterolen, untersucht, da sich diese als reichhaltigste Quelle solcher Verbindungen erwiesen (z.B. MINALE and SODANO, 1974b; DE ROSA *et al.*, 1975; SICA and ZOLLO, 1978; GUNATILAKA *et al.*, 1981; MARGOT

et al., 1987; DJERASSI and SILVA, 1991; FU *et al.*, 1999). Entsprechende Untersuchungen ergaben, dass Schwammsterole, neben den typischen Gemischen 24-alkylierter Cholesterol-Derivate, Funktionalisierungen und Modifikationen des Ringgerüsts und der Seitenkette aufweisen, die beispiellos im Tierreich sind (AIELLO *et al.*, 1999). Diese Diversität wurde in einer Reihe von chemotaxonomischen Untersuchungen genutzt, um eine Schwammklassifizierung vorzunehmen (BERGQUIST *et al.*, 1980; DJERASSI, 1981; FROMONT *et al.*, 1994).

Die genaue Rolle der unkonventionellen Sterole im Schwammorganismus ist nahezu unbekannt. Allerdings wird davon ausgegangen, dass sie als Zellmembranbestandteile zu deren Stabilität beitragen. Gut untersucht ist die doppelschichtbildende Funktion der Alkylreste von phospho- und glycolipidgebundenen Fettsäuren in Zellmembranen (Abb. 3.1). Diese Funktion wird generell auch für Schwämme angenommen. Berechnungen anhand von Molekularmodellen ergaben jedoch, dass im Schwamm *Aplysina fistularis* enthaltene LCFA $\Delta^{5,9}$, im Gegensatz zu den ebenfalls vorhandenen kurzkettigen Lipidsäuren, zu einer Verminderung der Membranflexibilität führen (WALKUP *et al.*, 1981). Allerdings scheinen möglicherweise ebenso enthaltene unkonventionelle Sterole Interferenzen mit den LCFA $\Delta^{5,9}$ zu ergeben. Diese würden wiederum die Flexibilität der Membran erhöhen. Diese These bietet einen Erklärungsansatz für die Biosynthese unkonventioneller Sterole wie auch von LCFA $\Delta^{5,9}$ durch Schwämme. Andere Arbeiten mit diesem Befund widersprechenden Ergebnissen ergaben ein wahrscheinlich getrenntes Vorkommen von unkonventionellen Sterolen und Fettsäuren in Schwammphospholipiden. So wurde die Inkorporierung von Sterolen eher bei kurzkettigen, und nur untergeordnet bei den schwammspezifischen langkettigen Lipidketten mit dem 5,9-dien Muster festgestellt (LI *et al.*, 1988). Insbesondere die spezifische

Doppelbindungssignatur verhindert offensichtlich die Einlagerung von Sterolen in der Membran und führt dazu, dass beide Verbindungsklassen – einzigartig im Tierreich – nicht gemeinsam in den Zellmembranen von Schwämmen vorkommen (DJERASSI and LAM, 1991). Diese sich widersprechenden Thesen verdeutlichen die unklare Funktion ungewöhnlicher Schwammlipidkomponenten und zeigen, dass ein besseres Verständnis weiter gehender Studien bedarf.

Neben den genannten Primärstoffen synthetisieren einige Organismen zusätzlich Sekundärmetaboliten. Ein Großteil der durch die pharmazeutische Industrie neu eingeführten Wirkstoffe basiert auf diesen Substanzen (Naturstoffe) terrestrischen und marinen Ursprungs. So gingen beispielsweise im Zeitraum von 1983–1994 78% der antibakteriellen und 61% der antikanzerogenen Wirkstoffe auf natürliche Verbindungen zurück (CRAGG *et al.*, 1997). Im marinen Milieu gelten Schwämme als reichhaltige Quelle von Naturstoffen, deren Fülle und Strukturdiversität die anderer mariner Organismen weit übersteigt und deren Wirkweisen u.a. antimikrobiell, antitumoral/cytotoxisch oder enzymhemmend sein können (PAWLIK, 1993; FUSETANI, 1996). Hierbei sind u.a. Terpenoide (Sesquiterpenoide, Diterpene, Sesterpene und Steroide), Makrolide oder Alkaloide wichtige Strukturen, die durch Schwämme und/oder assoziierte Mikroorganismen produziert werden und die offensichtlich einen Teil der Abwehrstrategie darstellen (s. Review von CAPON, 2001). Allerdings konnte in jüngerer Zeit auch für Primärlipide gezeigt werden, dass sie pharmakologische Wirkweisen aufweisen. So beinhaltet beispielsweise eine *Haliclona*-Art hochfunktionalisierte Sulfatsteroidoide, welche als Kinesin-Motor-Protein-Hemmer gelten (SPERRY and CREWS, 1997; BOGENSTÄTTER *et al.*, 1999). Zudem wurde für die in haploscleriden Schwämmen häufig vorkommenden Acetylenalkylkomponenten gezeigt, dass sie antimikrobielle Wirkungen haben und eventuell neben einer membranbildenden auch eine abwehrende Funktion besitzen (FUSETANI *et al.*, 1987; LIM *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 2001).

Das Wirkstoffpotenzial von sessilen Invertebraten, insbesondere von Schwämmen, ist unbestritten. Die bisher erzielten Daten beziehen sich jedoch vornehmlich auf Organismen tropischer und subtropischer Milieus und vernachlässigen damit die weit verbreiteten Kaltwasserareale. Dies ist umso gewichtiger, da ihre hohe Schwammdiversität bekannt ist (HENTSCHEL, 1929; MCCLINTOCK and BAKER, 1997; HANSSON, 1999). Die Fokussierung auf Organismen tropischer und subtropischer Milieus ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass vergleichende Analysen eine Abnahme der Extrakttoxizität mit zunehmender Breite gezeigt haben (BAKUS and GREEN, 1974). Neuere Daten deuten jedoch darauf hin, dass die beobachtete Reduktion der Häufigkeit und Konzentration von Sekundärmetaboliten offensichtlich kein Fehlen dieser Komponenten in marinen Invertebraten borealer Lebensräume bedeutet. Tatsächlich synthetisieren auch sessile Organismen dieser geographischen Breiten Sekundärstoffe (THOMPSON *et al.*, 1985; MCCLINTOCK and BAKER, 1997). Ihre eventuell geringere Breitbandtoxizität kann sogar gezieltere pharmazeutische Wirkweisen ermöglichen und demzufolge ein vergleichsweise höheres pharmakologisches Potenzial aufweisen, als das Verwandter warmer Gewässer.

Problematisch bei der Beurteilung von chemotaxonomischen Zusammenhängen und dem Naturstoffpotenzial von Schwämmen ist die geringe Datenbasis. Die vorliegenden Studien sind, wie beschrieben, fokussiert auf Arten der Klasse Demospongiae tropischer und subtropischer

Gewässer. Zu anderen Schwammklassen und Lebensräumen liegen dagegen nahezu keine Ergebnisse vor. Dies zeigt sich auch in der Naturstoffdatenbank MARINLIT, wo sich unter rund 400 untersuchten Schwammarten nur zwanzig Vertreter der Calcarea und nur vier der Hexactinellida finden (MUNRO and BLUNT, 2000). Damit ist nicht nur das Naturstoffpotenzial schwer abschätzbar; zusätzlich lassen sich offene phylogenetische Fragestellungen, wie die ungeklärte Beziehung der Kieselschwämme, anhand des vorhandenen Datenmaterials nicht bearbeiten.

In der vorliegenden Arbeit wird die vorhandene Datenbasis um bislang fehlende Erkenntnisse der Lipidzusammensetzung hexactinellider Schwämme und borealer Demospongiae erweitert. Diese wurden mit Hilfe geochemischer Methoden erzielt und sind essenziell, um offene phylogenetische und taxonomische Zusammenhänge in Kieselschwämmen – den wahrscheinlich ältesten und einfachsten Metazoen – zu erkennen. Die Untersuchung dieser Organismen soll Parallelen und Unterschiede der Lipidchemie beider Klassen darstellen. Zudem soll anhand der Daten ein Einblick in den Übergang vom einzelligen zum organisiert viellelligen Leben vermittelt werden, da diese basalen Tiere als Bindeglied zu höherem Leben gelten.

Die in dieser Arbeit verfolgten Hauptziele und Fragestellungen sind:

➤ *Die Untersuchung des Lipidinventars von Kieselschwämmen*

- Umfassende Beschreibung lipidchemischer Komponenten (Fettsäuren und Sterole) repräsentativ ausgewählter Hexactinellida
- Erstmalige umfassende Untersuchung des Primär- und Sekundärstoffinventars von Kaltwasserdemospongiae und eine Beschreibung chemotaxonomischer Zusammenhänge innerhalb dieser Schwammklasse
- Durchführung eines Versuches über die phylogenetischen Beziehungen der Schwammklassen Hexactinellida und Demospongiae mit besonderem Fokus auf enthaltene Lipide

➤ *Studien zur chemischen Ökologie von Kaltwasser- und Tiefseeporifera*

- Beschreibung von Lipidadaptationen an den Kaltwasserlebensraum und damit von 'Bioindikatoren' für boreale Milieus
- Untersuchungen zur Biosynthese von Primär- und Sekundärstoffen mit Hilfe stabiler Kohlenstoffisotope (Einsatz ^{13}C -markierter Tracersubstanzen; Vergleich natürlicher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse), um biosynthetische Zusammenhänge innerhalb des Schwammes sowie zwischen Schwamm und assoziierten Mikroorganismen aufzuzeigen

4 Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämme – Das Probenmaterial

Große Teile der Erdoberfläche werden von Schelfen (21%) und der Tiefsee (49%) bedeckt. Damit stellen sie zusammen die weitaus größten Lebensräume unseres Planeten dar. Abgesehen von den vergleichsweise gut untersuchten photischen Gebieten oberhalb von 50 m Wassertiefe ist die Fauna tieferer Schelfe und abyssaler Ebenen, die einer gezielten Probennahme nur schwer zugänglich sind, kaum bekannt. Viele ökologische Studien haben gezeigt, dass Invertebraten und vor allem Schwämme wichtige Bewohner tropischer Schelfe, aber auch borealer Lebensräume und der Tiefsee sind. Die teilweise sehr hohe Besiedlungsdichte kalter Gewässer hängt mit dem Umstand zusammen, dass niedrige Wassertemperaturen *per se* kein limitierender Faktor für benthisches Leben ist. Einzig der saisonale Eintrag von Nährstoffen in viele Kaltwassergebiete stellt eine Einschränkung dar, die zu einem vergleichsweise langsamen Wachstum der borealen Fauna führt (GREBMEIER and BARRY, 1991); dennoch werden hohe Besiedlungsdichten und hohe Diversitäten in diesen Lebensräumen und Schelfbereichen gemäßigter Breiten erreicht. So setzt sich beispielsweise die Schwammfauna in der bathyalen Tiefsee der West Indies aus 250 verschiedenen Arten zusammen (VAN SOEST and STENTOFT, 1988). Hohe Individuenzahlen, mit allerdings geringerer Diversität, finden sich in borealen Gewässern. Für antarktische Tröge wurde eine Fauna beschrieben, die zu 50% aus filtrierenden Organismen wie Schwämmen und Bryozoen und in einigen Bereichen wie der Weddellsee zu 58% aus Porifera besteht (STARMANS *et al.*, 1999). Im arktischen Einflussbereich wurde die höchste Artendiversität in der Norwegischen und der Barent-See aufgefunden, deren Vielfalt auf eine Immigration aus dem Nordatlantik zurückgeführt wird (GREBMEIER and BARRY, 1991). Eine umfassende Aufstellung nordatlantischer Schwämme findet sich in der Arbeit von HANSSON (1999).

Auch wenn Poriferen in allen aquatischen Habitaten auftreten, ist die morphologische und taxonomische Tiefenzonierung von Schwämmen nicht gleichmäßig. Bei der Untersuchung eines Schelfareals über einen Bereich von 90–500 m Wassertiefe wurde festgestellt, dass taxonomische Gruppen unterschiedliche Tiefenbereiche dominieren. Tiefen von 350–500 m werden an dem untersuchten Kontinentalhang von Demospongiae der Ordnung Astrophorida beherrscht, oberhalb von 230 m nimmt die Ordnungs- und Artenvielfalt drastisch zu (MALDONADO and YOUNG, 1996). Die einzig nachgewiesenen Hexactinellida (zwei Arten) kommen in dieser Studie ausschließlich in großen Tiefen des untersuchten Areals vor. Die Dominanz von Hexactinellida in den strömungsärmeren und weniger dicht besiedelten Gebieten der Tiefsee und den Demospongien im Flachwasser wird auf das vergleichsweise gering ausgebildete passive Verteidigungssystem der Hexactinellida zurückgeführt (TABACHNIK, 1991).

Des Weiteren variieren, neben der taxonomischen Verteilung, Form und Farbe der Schwämme mit zunehmender Tiefe. So finden sich gestreckte, aber auch rote Formen vornehmlich in Flachwasserbereichen, wohingegen farblose und kelchförmige Porifera in Bereichen unterhalb von 200 m dominieren (MALDONADO and YOUNG, 1996).

Die meisten Kieselschwämme benötigen Hartsubstrat wie Steine, andere Schwämme oder kalkgerüstbauende Korallen, um darauf zu siedeln. Korallen sind aufgrund ihrer weiten Verbreitung in vielen marinen Bereichen die Hauptsiedlungsgründe. Allgemein werden zwei verschiedene Korallentypen unterschieden. So werden tropische Gewässer von zooxanthella-

ten Korallenarten beherrscht, die zur Fällung von Calciumcarbonat einzellige photoautotrophe Zooxanthellen benötigen und deshalb nur im lichtdurchfluteten Flachwasser vorkommen. Eine deutlich größere Verbreitung weisen azooxanthellate Korallen auf, da ihre Kalkfällung unabhängig von endodermalen, photosynthetisch lebenden Symbionten abläuft. Die Unabhängigkeit azooxanthellater Korallen von photosynthetischen Symbionten ermöglicht die Besiedlung von Wassertiefen zwischen 0–6.200 m und Temperaturen von 1–29°C (STANLEY JR. and CAIRNS, 1988). Dies hat zur Folge, dass sie in allen Weltmeeren stark verbreitet sind und unter bestimmten Voraussetzungen sogar Riff bildend sein können. Als wichtigste Riff bildende Koralle in kalten und tiefen Gewässern des Nordatlantiks gilt die scleractine, azooxanthellate *Lophelia pertusa*, die u.a. entlang des nordeuropäischen Schelfhanges in Tiefen von 200–400 m große Rifffkomplexe und so einen Lebensraum für eine diverse Fauna bildet (MORTENSEN *et al.*, 1995; FREIWALD, 1998). Umfassende Untersuchungen der Standorte von *L. pertusa*-Riffen haben gezeigt, dass das Vorkommen an eine Reihe ozeanographischer und geomorphologischer Voraussetzungen gebunden ist (FREIWALD *et al.*, 2002 und Zitate darin). Entsprechende Standorte verfügen über (i) ein lokal auftretendes Hartsubstrat, (ii) einen Tiefenbereich unterhalb der Sturmwellenbasis, (iii) eine relativ hohe Strömung, die einen hohen Sedimenteintrag in den Organismus verhindert, (iv) die relativ höchste Salinität in einer definierten Wassermasse und (v) eine Unabhängigkeit von jahreszeitlichen Schwankungen in Salinität und Temperatur.

Viele Hexactinellida siedeln dagegen nicht auf Hartgrund. Aufgrund ihres Vorkommens in abyssalen Tiefen sind sie an die Bedingungen des dort vorherrschenden Weichsediments adaptiert. Solche Formen existieren häufig solitär und haben eine eher geringe Individuen- und Artendichte. Dieses Auftreten gilt für Hexactinellida als typisch, obwohl jüngere Studien den Beweis erbracht haben, dass rezent auch hexactinellide Schwämme Riff bildend sein können. Entsprechende Rifffkomplexe liegen beispielsweise am westlichen Kontinentalschelf von Kanada (British Columbia) in 180–250 m Wassertiefe. Dort bedecken sie eine Fläche von 1000 km² und weisen eine maximale Höhe von 15 m auf (CONWAY *et al.*, 1991).

4.1 Kaltwasserdemospongien des Norwegenschelfs

Die in dieser Arbeit untersuchten Schwämme entstammen mehreren Sammelkampagnen aus Norwegischen Gewässern, die im Zuge des naturstofforientierten BOSMAN-Projektes ('Boreale

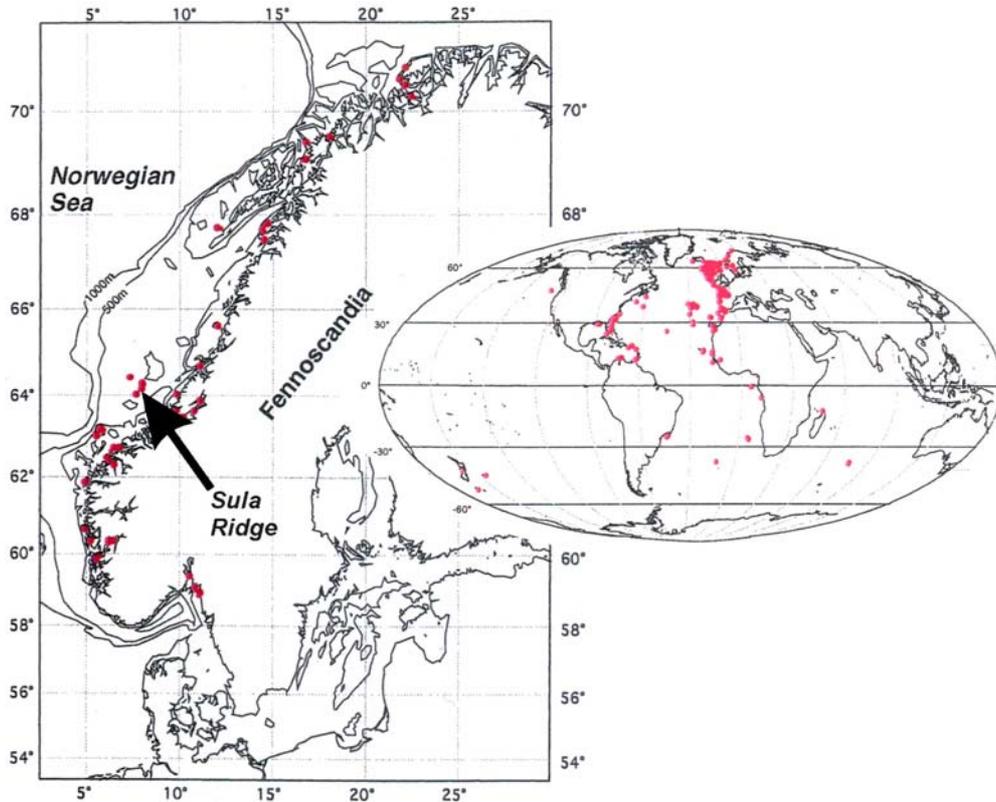


Abbildung 4.1 Vorkommen der Hexakoralle *Lophelia pertusa* (rote Punkte; leicht verändert nach FREIWALD, 1998)

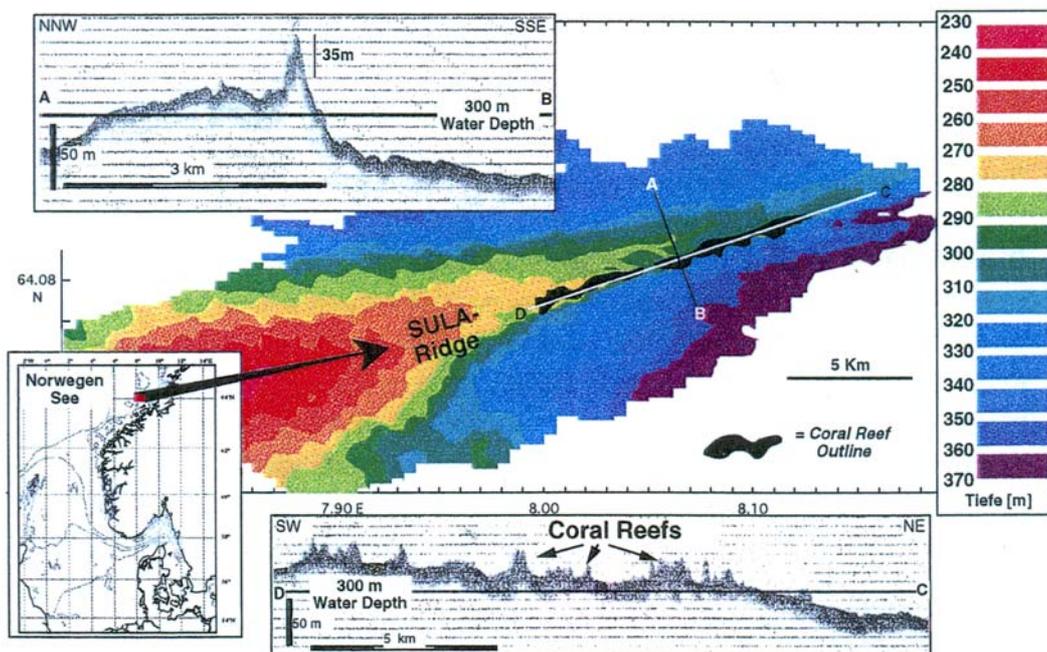


Abbildung 4.2 Bathymetrische Karte des Sula-Rückens mit der Lage des 13 km langen *Lophelia*-Riff Komplexes. Die Echosounder-Aufnahmen zeigen die Riffmorphologie (FREIWALD, 1998)

Schwämme als marine Naturstoffquelle') durchgeführt wurden. Der Hauptteil wurde während einer Forschungsfahrt im Sommer 1999 mit dem FS POSEIDON zum Sula-Rücken gewonnen. Hier konnten mit Hilfe des bemannten Tauchbootes JAGO gezielt Schwämme gesammelt werden. Im Zuge dieser Expedition wurde neben einer Probennahme zudem eine Videodokumentation des spezifischen Lebensraumes, des Substrates und der assoziierten Fauna vorgenommen. Darüber hinaus wurden bei einer Ausfahrt im Frühjahr 1999 mit dem RV JOHAN HJORT zu Tiefwasserkorallenriffen auf dem Norwegenschelf sowie während eines Forschungsaufenthaltes im Herbst 2001 auf der marinen Feldstation der Universität Bergen am Korsfjord



Abbildung 4.3 *Lophelia pertusa* Korallenstock mit Dorschverandtem und mit verschiedenen Poriferen (*Geodia macandrewii*, *Plakortis* sp., *Mycale lingua*), die einen abgestorbenen Korallenblock besiedeln (Sula-Rücken)

Proben gewonnen, die das vorhandene Probenmaterial ergänzten.

In den beprobten Arealen finden sich große Riffkomplexe, die in erster Linie von der Koralle *Lophelia pertusa* aufgebaut werden. Diese scleractine Koralle gilt als der wichtigste Bildner von Tiefwasserriffen. Sie findet sich in allen Weltmeeren und hat ihre größte Verbreitung und Besiedlungsdichte in Wassertiefen von 250–500 m des Nördlichen Atlantiks (Abb. 4.1; WILSON, 1979; MORTENSEN *et al.*, 1995; FREIWALD *et al.*, 2002).

In diesen Tiefen baut *L. pertusa* große Riffkomplexe auf, die eine Ausdehnung von mehreren Kilometern aufweisen können. Der größte bislang bekannte Komplex befindet sich bei 64°N auf dem Mittelnorwegischen Schelf am Sula-Rücken, mit einer Länge von 13 km, einer Breite von 300 m und einer Höhe von etwa 10–35 m (Abb. 4.2; FREIWALD *et al.*, 1999). Das Riff erstreckt sich NE–SW und befindet sich in 240–340 m Wassertiefe. Diese bathymetrischen Strukturen, auf denen sich *L. pertusa* angesiedelt hat, werden als Wälle von Eisbergpflugmarken interpretiert, die gegen Ende des letzten Glazials vor etwa 12.000 Jahren bei der Auflösung des Fennoskandischen Eisschil-

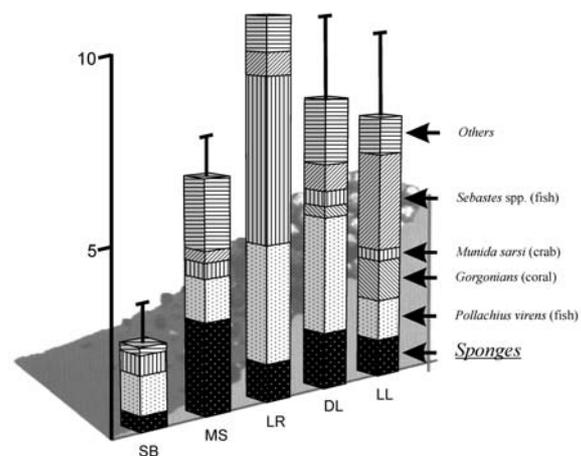


Abbildung 4.4 Zusammensetzung der Fauna in den verschiedenen Arealen eines Riffes der Hexakoralle *Lophelia pertusa*. Angaben in Individuen 10m⁻², SB=Soft bottom, MS=mixed stone bottom, LR=*Lophelia p.* rubble, DL=Dead *Lophelia p.*, LL=Living *Lophelia p.* (leicht verändert nach MORTENSEN *et al.*, 1995)

des aufgetürmt worden sind (LIEN, 1983; FREIWALD *et al.*, 2002). Diese Wälle bestehen aus paläozenen Sand- und Tonsteinen und sind mit herabgefallenen *dropstones* die Siedlungsgründe für eine hochdiverse Fauna. Wie erwähnt, ist das Riff bildende Vorkommen von *L. pertusa* neben dem Vorhandensein von Hartsubstrat an bestimmte Voraussetzungen gekoppelt. So liegt die Tiefenstufe des Sula-Rückens deutlich unter der Sturmwellenbasis, die Strömung beträgt etwa 7–44 cm/s (EIDE, 1979) und führt ausreichend Nährstoffe (PAPE, 2003). Auch die in den Bereichen dominante Nordatlantische Tiefenströmung hat Salinitäten (>35‰), die gegenüber der überlagernden Wassermasse (<35‰) erhöht sind (EIDE, 1979).

L. pertusa-Riffe sind Habitate, die eine vielfältige Megafauna besitzen (Abb. 4.3 und 4.4; MORTENSEN *et al.*, 1995; FREIWALD *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass viele Arten der Stämme Porifera, Cnidaria, Polychaeta, Crustacea, Mollusca, Bryozoa, Echinodermata, aber auch Fische in den Korallenstöcken leben und diese als Siedlungsgrund, Rückzugs- und/oder Jagdgebiet nutzen. Die Rifffkomplexe gliedern sich in unterschiedliche Zonen (MORTENSEN *et al.*, 1995), deren dort lebende Arten in Zusammensetzung und Anzahl variieren. Direkt mit dem Auftreten von *L. pertusa* assoziiert existieren drei distinkte Areale: (i) Lebende *Lophelia*, (ii) abgestorbene *Lophelia* und (iii) *coral rubble* (Korallenbruchstücke). Hinzu kommen Bereiche, die nicht an das Auftreten von *L. pertusa* gekoppelt sind, die aber in den Randbereichen und zwischen den Rifflöcken vorkommen (Weichsubstrat und aus den Eismassen freigegebene *dropstones*). In allen fünf Habitaten siedeln Schwammarten, die teilweise spezifisch für den jeweiligen Bereich sein können. So kommen *Thenea muricata* oder *Oceanapia robusta* ausschließlich im Weichsubstrat vor, der verbreitete Schwamm *Plakortis* sp. ist dagegen charakteristisch für den *coral rubble*. Porifera nehmen in diesen Bereichen, aber auch auf Steinen einen großen Anteil der dort siedelnden Fauna ein (Abb. 4.4). Insbesondere dort sind Schwämme die Erstbesiedler und führen durch ihren teilweise inkrustierenden Habitus zu einer Verfestigung des Korallenschutts.

Insgesamt wurden 40 unterschiedliche Kaltwasserarten der Klasse Demospongiae beprobt; bei 32 war die Menge des Probenmaterials für chemische Untersuchungen ausreichend (Tab. 4.1).

Unterklasse	Ordnung	Familie	Gattung
Homoscleromorpha	Homosclerophorida	Plakinidae SCHULZE 1880	<i>Plakortis</i> sp.
Tetractinomorpha	Astrophorida	Ancorinidae SCHMIDT 1870	<i>Stryphnus ponderosus</i> <i>Dragmastra normanii</i>
		Geodiidae GRAY 1867	<i>Geodia barretti</i> <i>Geodia macandrewii</i> <i>Isops phlegraei</i> <i>Pachymatisma johnstonii</i>
		Theneidae SOLLAS 1886	<i>Thenea muricata</i>

4 Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämme – Das Probenmaterial

Ceractinomorpha	Hadromerida	Polymastidae GRAY 1867	<i>Tentorium semisuberites</i>	
	Poecilosclerida	Microcionidae CARTER 1875	<i>Antho dichotoma</i> <i>Clathria barleii</i>	
		Hymedesmidae TOPSENT 1928	<i>Hymedesmium</i> sp.	
		Myxillidae TOPSENT 1928	Unknown sp. 1 Unknown sp. 2	
		Coelosphaeridae HENTSCHEL 1928	<i>Forcepia forcipis</i>	
		Mycalidae LUNDBECK 1905	<i>Mycale lingua</i>	
		Haplosclerida	Phloeodictyidae CARTER 1882	<i>Oceanapia robusta</i>
			Chalinidae GRAY 1867	<i>Haliclona</i> sp. 1 <i>Haliclona</i> sp. 2 <i>Haliclona urceolus</i>
	Petrosidae VAN SOEST 1980		<i>Petrosia crassa</i>	
	Niphatidae VAN SOEST 1980		<i>Hemigellius pumiceus</i>	
	Halichondrida	Axinellidae CARTER 1875	<i>Phakellia ventilabrum</i> <i>Phakellia robusta</i> <i>Axinella rugosa</i> <i>Axinella infundibuliformis</i>	
		Halichondridae VOSMAER 1887	<i>Spongosorites genitrix</i> <i>Hymeniacion aff. fallax</i>	
		Dendroceratida	Darwinellidae MEREJKOWSKY 1879	<i>Dendrilla cirsioides</i> Unknown sp. 3
	Dysideidae GRAY 1867		Unknown sp. 4	
?	Unknown sp. 5			

Tabelle 4.1 Untersuchte Demospongiae des Mittelnorwegischen Schelfs (Taxonomische Klassifizierung durch F. Hoffmann, Prof. Dr. J. Reitner (Universität Göttingen) und Dr. R.W.M. van Soest (Amsterdam))

4.2 Hexactinellide Schwämme

Die größte Verbreitung rezenter Arten der Schwammklasse Hexactinellida findet sich in den Tiefseebereichen aller Ozeane. Hier siedeln sie vorrangig im Weichsubstrat. Die Taxa, die die abyssalen Tiefenebenen bewohnen, sind an ein Leben im Weichsubstrat angepasst (TABACHNIK, 1991). So haben sie Verfahren entwickelt, um eine Verankerung in feinkörnigen Sedimenten, die große Teile der Tiefsee bedecken, zu gewährleisten. Hierzu haben sie die aus dem Schwamm herausragenden basalen Prostalia evolutionär modifiziert. Die proximalen Nadeln ihrer Hexactinen oder Pentactinen sind verlängert und fungieren als Anker, die übrigen sind reduziert. Ferner muss der Habitus den Eintrag leicht zu mobilisierender Ton- und Siltpartikel verhindern. Deshalb siedeln viele Hexactinellida mit ihrem Filterapparat nicht direkt auf dem Sediment, sondern haben einen langen Stiel entwickelt, der das Eindringen bodennaher Sedimentationsfracht in den fragilen Organismus verhindert. Eine diesbezügliche Extremform ist *Monorhaphis chuni*, welcher ein axiales Spiculum mit einer Länge von bis zu 3 m aufweisen kann (KOLTUN, 1967).

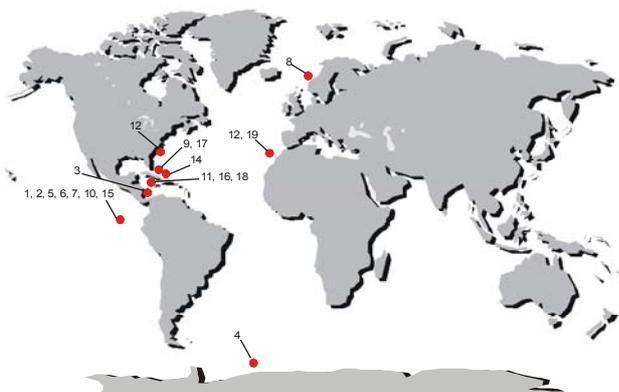


Abbildung 4.5 Lokalitäten der Probenkampagnen (Zahlen s. Legende von Tabelle 4.2)

Hexactinellida kommen vornehmlich in geringer Artzahl und Diversität an einem Standort vor. Um dennoch eine möglichst hohe Repräsentativität zu gewährleisten, stammen die meisten in dieser Arbeit untersuchten hexactinelliden Schwämme von verschiedenen Sammelkampagnen. Diese wurde an unterschiedlichen Regionen der Erde und in verschiedenen Wassertiefen durchgeführt (Abb. 4.5; Tab. 4.2).

Unterklasse	Ordnung	Familie	Gattung	Wassertiefe (m)
Hexasterophora	'Lyssakinosa'	Rossellidae GRAY 1872	<i>Staurocalyptus</i> sp.	445 ¹
			<i>Acanthascus</i> sp.	440 ²
			Unknown sp. 6	490 ³
			<i>Rossella</i> sp. 1	265 ⁴
			<i>Rossella</i> sp. 2	265 ⁴
			<i>Rossella</i> sp. 3	265 ⁴
		Euplectellidae GRAY 1867	<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>	440 ⁵
			Unknown sp. 7	320 ⁶
			<i>Sympagella</i> <i>nux</i>	380 ⁷
			<i>Sympagella</i> nov. sp.	285 ⁸
			<i>Euplectella</i> sp.	580 ⁷

4 Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämme – Das Probenmaterial

		Unknown sp. 8	860 ⁹
		Unknown sp. 9	430 ¹⁰
	?		
		Unknown sp. 10	480 ¹¹
		Unknown sp. 11	335 ¹²
	Hexactinosida		
	Farreidae GRAY 1872		
		<i>Farrea</i> (?) sp.	215 ¹³
	Aphrocallistidae GRAY 1867		
		<i>Ipheton panicea</i>	480 ¹⁴
		<i>Heterochone</i> sp.	475 ⁷
		Unknown sp. 12	365 ¹⁵
Amphidiscophora			
	Amphidiscosida		
	Hyalonematidae GRAY 1857		
		<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	375 ¹⁶
		<i>Hyalonema</i> sp. 2	800 ¹⁷
		Unknown sp. 13	825 ¹⁸
	?		
	?		
		Unknown sp. 14	675 ¹⁸

Tabelle 4.2 Untersuchte Hexactinellida mit Angabe zur Wassertiefe (Taxa bestimmt durch Dr. S.A. Pomponi und J. Reed (HBOI, Ft. Pierce Florida), F. Hoffmann und J. Reitner (Universität Göttingen) und S. Gatti (AWI, Bremerhaven). Lokationen: ¹ Punta Mangle (Galapagos), ² Punta Vincente (Galapagos), ³ Golf von Chiriqui (Panama), ⁴ Kapp Norvegia (Östliche Weddellsee), ⁵ Isla Bartholome (Galapagos), ⁶ Santa Cruz Island (Galapagos), ⁷ Isla Marchena (Galapagos), ⁸ Sula-Rücken (Norwegen), ⁹ Plana Cay (Bahamas), ¹⁰ Rocas Gordon (Galapagos), ¹¹ Lucea (Jamaika), ¹² Teneriffa (Canarische Inseln), ¹³ Charleston Lumps (Süd Carolina), ¹⁴ Turks & Caicos Islands (Karibik), ¹⁵ Wolf Island (Galapagos), ¹⁶ Negril (Jamaika), ¹⁷ Long Island (Bahamas), ¹⁸ Negril (Jamaika), ¹⁹ Hierro (Canarische Inseln)

5 Ergebnisse und Diskussion Teil 1 – Lipide als chemotaxonomische Indikatoren von Kiesel Schwämmen

Umfangreiche Lipiduntersuchungen einer Reihe von Schwammarten haben gezeigt, dass diese Produzenten vielfältiger chemischer Substanzen sind, die teilweise chemotaxonomische Relevanz besitzen. Der Fokus entsprechender Studien liegt auf membranaufbauenden Verbindungen wie Fettsäuren und Steroiden, da diese eine hohe Spezifität aufweisen, einer strukturbestimmenden Analytik gut zugänglich sind und in hohen Konzentrationen in den meisten Porifera vorliegen. Allerdings bilden, wie in Kapitel 3 bereits erwähnt, bislang vornehmlich Untersuchungen an tropischen und subtropischen Schwämmen der Klasse Demospongiae und Calcarea die Grundlage dieser Daten. Umfassende Untersuchungen von Schwämmen der Klasse Hexactinellida und von Kaltwasserdemospongiae fehlen bislang.

Im Folgenden werden erstmalig chemotaxonomisch relevante Lipidkomponenten aus 32 repräsentativen Kaltwasserdemospongiae und 23 Vertretern der Hexactinellida dargestellt und ihre taxonomische, phylogenetische und habitatbezogene Aussagekraft diskutiert. Dabei steht die phylogenetische Beziehung zwischen den beiden Klassen Hexactinellida und Demospongiae im Mittelpunkt der Studie. Die in dieser Arbeit erzielten lipidchemischen Daten werden in die bestehenden kontrovers diskutierten Hypothesen integriert und darauf basierend Vorschläge zu den verwandtschaftlichen Beziehungen unterbreitet.

Darüber hinaus werden Fragestellungen innerhalb der Schwammklassen Demospongiae und Hexactinellida chemotaxonomisch beleuchtet. Da die taxonomischen Klassifizierungen – je nach Autor – deutlich variieren, für die vorliegende Arbeit jedoch eine möglichst anerkannte Einteilung benötigt wird, bezieht sich diese auf die verwandtschaftliche Einordnung der Schwammtaxonomen um Dr. R.W.M VAN SOEST (Zoological Museum, University of Amsterdam, April 1999).

5.1 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Carbonsäuren und Plasmalogene aus Glycerolipiden

Schon in den frühen 50er Jahren des letzten Jahrhunderts rückten Schwammfettsäuren in den Mittelpunkt von Studien. Diese Arbeiten waren Bestandteil der Untersuchungen zum Verständnis mariner Invertebraten und wiesen ungewöhnlich lange, ungesättigte Fettsäuren (C₂₄, C₂₆ und C₂₈) als Bestandteil der Demospongiae *Sphaciospongia vesparia* und *Suberites compacta* nach (BERGMANN and SWIFT, 1951). Solche Kettenlängen weichen deutlich von denen gewöhnlicher Fettsäuren (C₁₄–C₂₂) höherer Animalia ab (BERGMANN and SWIFT, 1951; HAHN *et al.*, 1988). In der folgenden Zeit fokussierten deshalb Studien zusätzlich die Aufklärung struktureller Besonderheiten dieser Komponenten und ihrer Rolle im Organismus. So zeigten JEFFERTS *et al.* (1974) die Dominanz von *cis*-5,*cis*-9-Säuren als Merkmal von *Microciona prolifera* und wiesen zudem die Phospho- und Glycolipide (Membranen) und nicht ihre Speicherlipide (Triglyceride oder Wachsester) als Quelle dieser Verbindungen nach. Zudem konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Phospholipide Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin mehr als 41% der vorhandenen 26 $\Delta^{5,9}$ -Säure enthalten, Phosphatidylcholin dagegen nur etwa 4%. Eine weitere Besonderheit weist die Lipidstruktur der Schwämme auf. Im Unterschied zu den generell variabel aufgebauten, glycerolestergebundenen Säuren höherer Tiere

konnte für Schwämme (*Parasperella spira* und *Microciona prolifera*) belegt werden, dass beide Glycerolpositionen mit strukturell gleichen Alkylketten besetzt sind (DASGUPTA *et al.*, 1986).

Weitere Arbeiten der Gruppe um LITCHFIELD und MORALES erweiterten die Untersuchungen um zusätzliche Arten der Demospongiae und wiesen auch in diesen LCFA $\Delta^{5,9}$ als Phospholipidbestandteil nach. Aus diesem Grund führten sie für diese charakteristischen Fettsäuren den Begriff der 'demospongiac acids' ein (LITCHFIELD *et al.*, 1976).

Nachfolgend wurden in einer Vielzahl von Schwämmen der Klasse Demospongiae strukturell sehr unterschiedliche 'demospongiac acids' nachgewiesen. So synthetisieren diese Organismen beispielsweise langkettige Lipidsäuren mit Variationen in den Kettenlängen (BERGQUIST *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1984), mit endständigen und mittkettigen Verzweigungen, Cyclopropyleinheiten in der Kette (WALKUP *et al.*, 1981; LANKELMA *et al.*, 1983; CARBALLEIRA *et al.*, 1986), mit Bromsubstitution (WIJEKON *et al.*, 1984; LAM *et al.*, 1989) oder mit zusätzlichen Doppelbindungen (LITCHFIELD and MARCANTONIO, 1978; LITCHFIELD *et al.*, 1980). Alle Verbindungen haben jedoch die typische *cis*-5,*cis*-9-Doppelbindungssignatur und wurden ausnahmslos als estergebundene Bestandteile der Membranlipide identifiziert. Einige Schwämme verfügen zusätzlich über Fettsäuren mit strukturellen Besonderheiten. So konnten in vielen Porifera Isoprenoidsäuren, wie 4,8,12-Trimethyltridecan- (TMTD) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure), in teilweise hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (AYANOGLU *et al.*, 1982; CARBALLEIRA *et al.*, 1987; CARBALLEIRA *et al.*, 1989a). Trotz ihrer vergleichsweise geringen Kettenlängen stammen diese Verbindungen offensichtlich aus den Schwammzellmembranen und nicht, wie für andere kurzkettige Fettsäuren angenommen, von schwammassoziierten Mikroorganismen (SAM; GARSON *et al.*, 1994). Beispielhaft ist in Abbildung 5.1 das Fettsäureinventar eines Vertreters der Demospongiae vom Norwegenschelf dargestellt. Das Chromatogramm zeigt zwei deutlich voneinander unterscheidbare Bereiche, die zum einen von kurzkettigen Fettsäuren schwammassoziiertter Mikroorganismen (SAM) und zum anderen von charakteristisch ungesättigten langkettigen Fettsäuren (LCFA $\Delta^{5,9}$) des Schwammes dominiert werden. Zu sehen ist weiterhin, dass eine hohe Variabilität in den LCFA $\Delta^{5,9}$ von *Haliclona* sp. 1 vorliegt. So synthetisiert dieser Schwamm, neben unverzweigten und endständig verzweigten, insbesondere mittkettig methylverzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$.

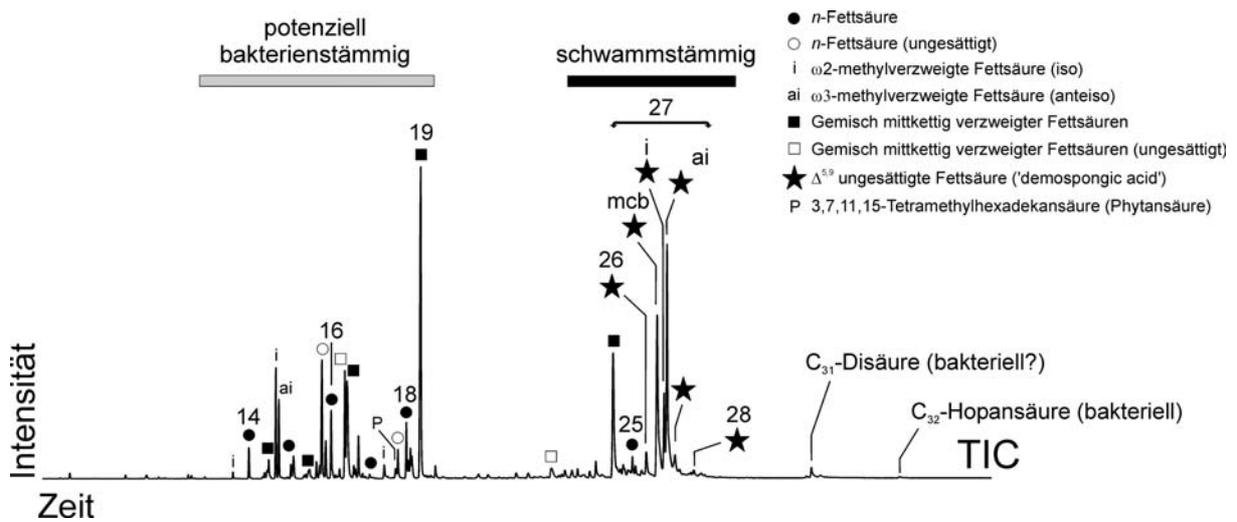


Abbildung 5.1 SPE 2-Fraktion (s. Methodik im Anhang B) der vormals estergebundenen Fettsäuren (als Methyl ester) von *Haliclona* sp. 1 (Klasse Demospongiae, Unterklasse Ceractinomorpha, Ordnung Haploclerida)

Wie oben erwähnt basiert die strukturelle Vielfalt von Schwammfettsäuren nahezu ausschließlich auf Daten von Vertretern der Demospongiae; diesbezüglich existieren etwa 250 Studien. Hingegen behandeln nur fünf Arbeiten die Fettsäuren von *Calcarea* bzw. *Hexactinellida* (MUNRO and BLUNT, 2000), so dass die hier dargestellten Daten eine erhebliche Erweiterung des vorhandenen Datensatzes darstellen und weitergehende taxonomische Diskussionen ermöglichen.

5.1.1 Langkettige polyungesättigte Fettsäuren (LCFA $\Delta^{5,9}$)

Allgemein

Schwämme der Klasse Demospongiae haben, im Gegensatz zu den $\Delta^{6,9}$ -dien-Systemen höherer Tiere, Fettsäuren mit $\Delta^{5,9}$ -Muster (HAHN *et al.*, 1988; Abb. 5.2). Diese seltenen Verbindungen wurden untergeordnet aus terrestrischen Organismen wie einer Coniferen- (MADRIGAL and SMITH JR, 1975) und der Blüte einer Malvaceaart (CARBALLEIRA *et al.*, 1999) beschrieben. Sie gelten jedoch im marinen Milieu als ausgezeichnete Biomarker für Porifera, insbesondere für die Klasse Demospongiae.

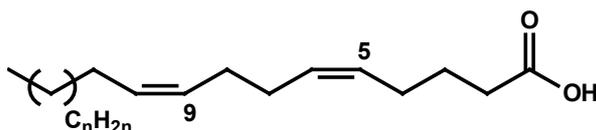


Abbildung 5.2 Allgemeine Struktur einer *cis*-5,*cis*-9-'long chain fatty acid' (LCFA $\Delta^{5,9}$; $n > 12$)

Neben den strukturellen Variationen dieser Komponenten sind die Langkettigkeit ($>C_{24}$) und die Doppelbindungssignatur konstituierende Merkmale solcher Säuren. Insbesondere die Verteilung von poly-ungesättigten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge bildete daher die Grundlage für eine

Reihe chemotaxonomisch orientierter Studien (LITCHFIELD *et al.*, 1976; BERGQUIST *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1984). Varianzen der Doppelbindungspositionen wurden bei diesen

synthese endständig verzweigter *iso*- und *anteiso*- (CARBALLEIRA *et al.*, 1986), mittkettig verzweigter (RAEDERSTORFF *et al.*, 1987), bromierter (LAM *et al.*, 1989) und polyungesättigter LCFA $\Delta^{5,9,x}$ (HAHN *et al.*, 1988) vor. Abbildung 5.3 zeigt die Haupttrouten des Aufbaus der Schwammsäuren in *Microciona prolifera*, die über Zwischenschritte zu den Hauptmembrankomponenten $26\Delta^{5,9}$ und $26\Delta^{5,9,19}$ führen.

Demnach verwendet der Schwamm kurzkettige Fettsäuren, um seine LCFA aufzubauen. Dies gilt neben gesättigten Verbindungen (z.B. 16-) für ungesättigte (z.B. $16\Delta^9$ -) sowie endständig (z.B. *i*- und *ai*-C₁₅-) und mittkettig verzweigte (z.B. 10Me-C₁₆-) Säuren (bakterielle Biomarker; (TAYLOR and PARKES, 1983; KANEDA, 1991; ZELLES, 1997). Demnach bilden wahrscheinlich Vorläuferkomponenten aus SAM oder exogenen Bakterien die Grundlage der LCFA $\Delta^{5,9}$. Dieser Prozess deutet auf eine syntrophische Beziehung von SAM und Schwamm hin. Eine Reihe von Schwämmen haben neben langkettigen auch kurzkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren ($16\Delta^{5,9}$ und $18\Delta^{5,9}$). So wurden beispielsweise in *Higginsia tethyoides* (AYANOGLU *et al.*, 1983), *Pseudoaxynissa* sp. (GILLAN *et al.*, 1988) und *Chondrilla nucula* (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1986) $16\Delta^{5,9}$ bzw. $18\Delta^{5,9}$ nachgewiesen. Ihr Auftreten wird mit der Befähigung einiger Schwämme gedeutet, neben LCFA $\Delta^{5,9}$ auch kurzkettige Homologe mit Hilfe der $\Delta^{5,9}$ -Dehydrogenasen zu synthetisieren, ohne vorher eine Kettenverlängerung durchzuführen (GILLAN *et al.*, 1988). Eine weitere Besonderheit von Schwammlipiden bildet der Anbau von Brom an C-6 der LCFA $\Delta^{5,9}$. Die Substitution durch Brom schließt sich der üblichen Kettenverlängerung und der $\Delta^{5,9}$ -Dehydrierung an und wird durch Bromperoxidasen katalysiert (LAM *et al.*, 1989). Das Vorkommen und die möglichen Funktionen von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ werden in den Kapiteln 5.1.3 und 6.1.1 diskutiert.

Der grundsätzliche Pfad der Fettsäuresynthese ist in allen für die ¹⁴C-Markierungsversuche verwendeten Spezies (*Microciona prolifera*, *Jaspis prolifera*, *Aplysina fistularis*, *Xestospongia* sp. und *Hymeniacidon* sp.) gleich, resultiert allerdings, trotz Vorhandenseins ähnlicher kurzkettiger Vorläufermoleküle, in unterschiedlichen Mustern der $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren. Offensichtlich wird die Biosynthese durch weitere spezifische Enzyme reguliert, die nicht ausschließlich durch äußere Bedingungen wie die Temperatur kontrolliert werden. Dies lässt auf chemotaxonomisch bedingte Anteile der Lipidbiosynthese schließen, die daher Rückschlüsse auf phylogenetische Beziehungen zulassen.

Analytik

Die Strukturen der $\Delta^{5,9}$ -Lipidsäuren wurden anhand massenspektrometrischer Fragmentierungen (EI) charakterisiert. Basis der Untersuchungen sind Massenspektren der zu Methylestern transveresterten $\Delta^{5,9}$ -Lipidsäuren, die ein ausgeprägtes Fragment m/z 81 (100%) und einen gegenüber der gesättigten Säure um vier Massen verringerten Molekularpeak aufweisen. Die GC/MS-Analyse der Methylester ermöglicht die Bestimmung der Molekularmasse und der Verzweigungen. Die Positionscharakterisierung der Doppelbindungen dagegen wird durch damit einhergehende McLafferty-Umlagerungen verhindert. Eine Methode zur Bestimmung von Doppelbindungspositionen ist die Addition von Methylsulfiden mit Hilfe von Dimethyldisulfid (DMDS; BUSER *et al.*, 1983; DUNKELBLUM *et al.*, 1985; s. Methodik im Anhang B). Diese Methode eignet sich vornehmlich zur Analyse einfach ungesättigter Verbindungen, da mit jeder Doppelbindung eine Massenzunahme von 94 *amu* und zudem eine Polaritätserhöhung einhergehen, die eine gaschromatographische Analyse erschweren. Einen Sonderfall stellen Doppelbindungen dar,

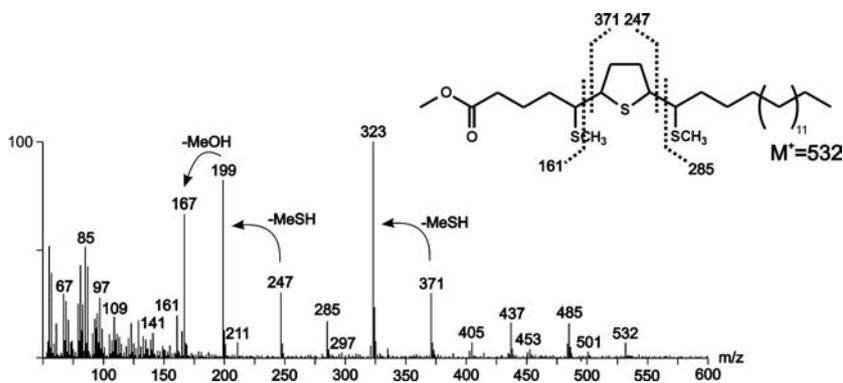


Abbildung 5.4 Struktur und Fragmentierung von 2-(4-methoxycarbonyl-1-methylthiobutan-1-yl)-5-(1-ethylthioheptadecan-1-yl)tetrahydrothiophene. DMDS-Derivat des $26\Delta^{5,9}$ -Fettsäuremethylesters aus *Haliclona urceolus*

die durch nicht mehr als drei Alkylgruppen getrennt sind. Entsprechende Verbindungen reagieren mit DMDS zu einem zyklischen Thioether und der Addition zweier weiterer Methylsulfide (VINCENTI *et al.*, 1987). Das Resultat der Umsetzung von $\Delta^{5,9}$ -Säuremethylestern ist die Bildung eines eindeutig fragmentierenden Fünfringthioethers

(CARBALLEIRA and SHALABI, 1993) mit acht möglichen Diastereoisomeren (Thioetherbildung aus vier asymmetrischen C-Atomen; Abb. 5.4). Unter den eingesetzten gaschromatographischen Bedingungen war die Detektion von zu $\Delta^{5,9}$ zusätzlich ungesättigten DMDS-Derivaten aus den beschriebenen Gründen nicht möglich.

Deshalb wurden Pyrrolidinderivate hergestellt (s. Methodik im Anhang B), deren Fragmentierungen die Doppelbindungsposition auch mehrfach ungesättigter Verbindungen anzeigt (WALKUP *et al.*, 1981).

Pyrrolidide mit ungesättigter Seitenkette fragmentieren verstärkt zwischen C_2 und C_3 . Als diagnostische Peaks für $\Delta^{5,9}$ -Pyrrolidide gelten, neben der Abspaltung des Pyrrolidinrests (m/z 113), m/z 180 und untergeordnet m/z 234. Die Evaluierung

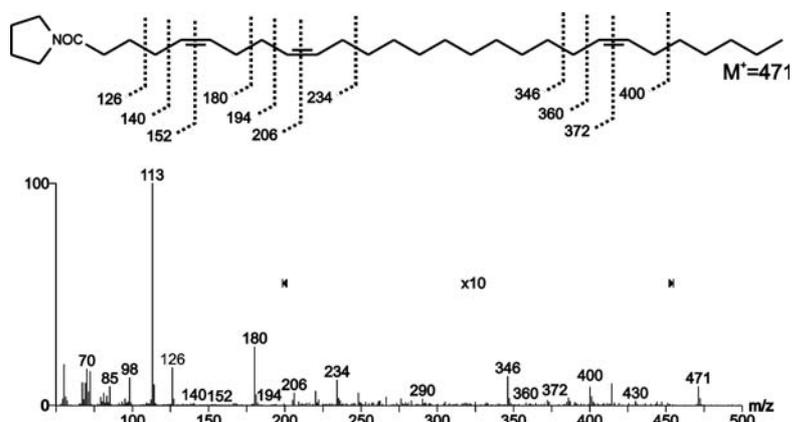


Abbildung 5.5 Struktur und Fragmentierung von N-Octacos-5,9,21-trienoyl-pyrrolidid aus *Thenea muricata*

weiterer Doppelbindungen ist durch diese Methode ebenfalls möglich, wie am Beispiel des N-Octacos-5,9,21-trienoyl-pyrrolidides zu sehen ist (Abb. 5.5).

Alle untersuchten Schwämme enthalten in unterschiedlichen Konzentrationen und Verteilungen Lipidsäuren mit einer $\Delta^{5,9}$ -Doppelbindungssignatur (eine detaillierte Darstellung der Lipidsäuren findet sich in einer Tabelle im Anhang C). Insbesondere LCFA $\Delta^{5,9}$ kommen nahezu in jedem Schwamm vor und machen 2–64% der Gesamtfettsäuren aus. Dem einzig untersuchten Schwamm der Ordnung Homoscleromorpha – *Plakortis* sp. – fehlen dagegen LCFA $\Delta^{5,9}$ völlig. Allerdings besitzt *Plakortis* sp. stattdessen eine $21\Delta^{5,9}$ -Säure als Hauptbestandteil der Fettsäuren.

Alle Kaltwasservertreter der Tetractinomorpha und der Ceractinomorpha sind Produzenten von LCFA $\Delta^{5,9}$ mit Kettenlängen, die von 23 bis 30 C-Atomen variieren. Die größte Verbreitung haben dabei Verbindungen mit 26 C-Atomen. Allerdings variieren die Kettenlängen offensichtlich unabhängig von der taxonomischen Position der Schwämme. Eine Ausnahme bilden Vertreter der Ordnung Haplosclerida, deren LCFA durch ungeradkettige, verzweigte Verbindungen mit 27 C-Atomen dominiert werden. Auffällig ist zudem der axinellide Schwamm *Phakellia robusta*, der als einziger Säuren mit 23 C-Atomen enthält. Diese Fettsäuren wurden im Rahmen dieser Studie erstmalig in einem Organismus beobachtet. Ferner fällt diese Art durch einen geringen Anteil von LCFA $\Delta^{5,9}$ an den Gesamtfettsäuren auf (2%).

Tabelle 5.1 zeigt, dass einige Schwämme zusätzlich über kurzkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen verfügen. Nahezu alle tetractinomorphen Schwämme der Ordnung Astrophorida weisen dieses Merkmal auf (einzige Ausnahme *Thenaea muricata*), aber auch der ceractinomorphe Vertreter *Oceanapia robusta* enthält eine $18\Delta^{5,9}$ -Lipidsäure.

LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Hexactinellida

Alle 23 Vertreter der Hexactinellida synthetisieren, unabhängig von der unterschiedlichen Probenherkunft oder Wassertiefe, LCFA $\Delta^{5,9}$ (s. Kap. 4.1). Diese Verbindungen machen etwa 30–60% der Gesamtlipide aus (Sterole und Fettsäuren). Kurzkettigere Fettsäuren als C_{26} kommen in keinem hexactinelliden Schwamm vor.

Species	Taxonomy	LCFA $\Delta^{5,9}$	[%]	chain-length (incl. methyl branching)						
				>24	26	27	28	29	30	31
<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	50				□	■	■	□
<i>Acanthascus</i> sp.	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	55				□	■	■	□
Unknown sp. 6	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	55				□	■	■	□
<i>Rossella</i> sp. 1	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	53				■	■	■	
<i>Rossella</i> sp. 2	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	43				■	■	■	
<i>Rossella</i> sp. 3	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	59				■	■	■	
<i>Aulosaccus cf. mitsukuri</i>	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	47				■	■	■	□
Unknown sp. 7	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	47				□	■	■	□
<i>Sympagella nux</i>	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	46				□	■	■	□
<i>Sympagella</i> nov. sp.	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	32				□	■	■	□
<i>Euplectella</i> sp.	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	30				□	■	■	
Unknown sp. 8	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	52				□	■	■	□
Unknown sp. 9	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	44				□	■	■	□
Unknown sp. 10	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	37						■	□
Unknown sp. 11	Hexasterophora - 'Lyssakinosa'	●	32						■	■
<i>Farrea</i> (?) sp.	Hexasterophora - Hexactinosida	●	39				□			
<i>Ipheton panicea</i>	Hexasterophora - Hexactinosida	●	41						■	□
<i>Heterochone</i> sp.	Hexasterophora - Hexactinosida	●	43		□	□	■	■	■	□
Unknown sp. 12	Hexasterophora - Hexactinosida	●	40		□	□	■	■	■	□
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidiscophora - Amphidiscosida	●	27				■	■	■	□

<i>Hyalonema</i> sp. 2	Amphidiscophora - Amphidiscosida	●	51	□ ■ □
Unknown sp. 13	Amphidiscophora - Amphidiscosida	●	26	□ □ ■ □
Unknown sp. 14	Amphidiscophora - ?	●	37	□ □ ■ □ □

Tabelle 5.2 Vorkommen von LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Hexactinellida; % LCFA der Gesamtlipide (Sterole und Fettsäuren; quantifiziert anhand des TIC); ● = hochkonzentriert, ○ = gering konzentriert

Tabelle 5.2 verdeutlicht, dass innerhalb der Hexactinellida nur geringe Variationen der Kettenlängen auftreten. So scheinen die sog. 'Glasschwämme' langkettigere Homologe zu synthetisieren als die Demospongiae, mit einem deutlichen Maximum bei 30 C-Atomen. Diese Verbindungen sind in jeder untersuchten Art enthalten und stellen nahezu überall die Hauptkomponenten (THIEL *et al.*, 2002). Ein weiteres bemerkenswertes Merkmal ist das Fehlen kurzkettiger $\Delta^{5,9}$ -Äquivalente, wie sie bei einer Reihe von Demospongiae auftreten.

Diskussion

Kurzkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren sind in der Natur rar und bislang nur in einzelnen terrestrischen Pflanzen (MADRIGAL and SMITH JR, 1975; CARBALLEIRA *et al.*, 1999) und in einer neueren Arbeit aus der Gorgonie *Eunicea succinea* (CARBALLEIRA *et al.*, 1997) nachgewiesen. LCFA $\Delta^{5,9}$ gelten dagegen als spezifische Biomarker für Schwämme der Klasse Demospongiae (DJERASSI and LAM, 1991).

In nahezu allen untersuchten Kaltwasserdemospongiae und Hexactinellida treten LCFA $\Delta^{5,9}$ auf. Insbesondere für Hexactinellida ist dies bislang unbekannt und ist demnach auch für diese Klasse der Porifera ein konstituierendes Merkmal (s. THIEL *et al.*, 2002 im Anhang E.1). Die Biosynthese dieser Verbindungen ist bei den Demospongiae gut untersucht und führt durch die Verlängerung wahrscheinlich bakterienstämmiger Fettsäuren und einer nachfolgenden Dehydrierung zu den LCFA $\Delta^{5,9}$ (RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; HAHN *et al.*, 1988). Die hohen Konzentrationen von LCFA $\Delta^{5,9}$ und das Vorhandensein potenzieller Edukte (THIEL *et al.*, 2002) deuten darauf hin, dass innerhalb der Hexactinellida Elongations- und Untersättigungsprozesse ablaufen, die ein den Demospongiae ähnliches Enzymsystem zur Synthese der Membranlipide voraussetzen. In den Kalkschwämmen fehlen LCFA $\Delta^{5,9}$ dagegen völlig (THIEL *et al.*, 2002). Somit deuten diese lipidchemischen Daten auf eine phylogenetisch enge Verknüpfung von Demospongiae und Hexactinellida, unter Ausschluss der Calcarea, hin (THIEL *et al.*, 2002). In Kapitel 5.5 werden die Lipidinventare beider Klassen unter phylogenetischen Gesichtspunkten eingehend diskutiert.

Dennoch weisen Demospongiae und Hexactinellida Unterschiede in der Synthese von Lipidsäuren auf. Hexactinellida zeigen ein eindeutiges Maximum bei Kettenlängen um 30 C-Atomen, wohingegen Demospongiae tendenziell kurzkettigere Verbindungen produzieren. Zudem ist die Verteilung der Kettenlängen in den Demospongien variabler und weist nicht wie bei den Hexactinellida einen distinkten Verbindungstyp als konservatives Merkmal auf ($30\Delta^{5,9,x(x)}$; THIEL *et al.*, 2002). Auftreten und Verteilung von $\Delta^{5,9}$ -Säuren innerhalb von Vertretern der Hexactinellida lassen aufgrund der oben genannten geringen Merkmalsunterschiede keine chemotaxonomischen Aussagen zu.

Demgegenüber weisen einige Demospongiae chemotaxonomisch relevante Merkmale bezüglich der Synthese von $\Delta^{5,9}$ -Lipidverbindungen auf. So bilden Schwämme der Ordnung Homoscleromorpha offensichtlich eine Ausnahme bei dem Aufbau langkettiger Lipidsäuren. Der untersuchte Schwamm der Homoscleromorpha *Plakortis* sp. enthält ausschließlich eine $21\Delta^{5,9}$ -Säure und keine höheren Homologe dieser Verbindung. Das Fehlen von LCFA $\Delta^{5,9}$ in den Homoscleromorpha wurde auch in anderen Vertretern dieser Ordnung beobachtet (BERGQUIST *et al.*, 1984; CARBALLEIRA and SHALABI, 1990). Zudem wurde durch einige Autoren für einen homoscleromorphen Schwamm der Nachweis einer *trans, trans*-Konfiguration für die $\Delta^{5,9}$ -Doppelbindungen erbracht, ein Merkmal, das bislang nicht aus Porifera beschrieben wurde (CARBALLEIRA and SHALABI, 1990). Der am Sula-Rücken beprobte *Plakortis* sp. besitzt dagegen – begründet durch das Ergebnis IR-spektroskopischer Untersuchungen (pers. Mitt. M. Holzwarth) – die verbreitete *cis, cis*-Struktur. Die dargestellten Besonderheiten der Lipidchemie von *Plakortis* sp. unterstreichen die kontrovers diskutierte phylogenetische Sonderstellung der Homoscleromorpha. Einige Autoren gliedern die Homoscleromorpha von den Demospongiae ab und stellen diese wegen ihrer andersartigen Larvalentwicklung näher zu den Calcarea (REITNER and MEHL, 1996). Lipidchemisch spricht zwar das Fehlen von LCFA für diese Einordnung. Dem widerspricht aber das Auftreten mittellangkettiger $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren in *Plakortis* sp., Produkte eines sehr spezifischen Enzymsystems, welches in der Klasse Calcarea noch nicht nachgewiesen werden konnte. Zumindest scheinen Homoscleromorpha phylogenetisch abgegliedert von den anderen Ordnungen der Demospongiae (Tetractinomorpha und Ceractinomorpha) zu sein. Schlüsse auf eine engere Beziehung der Homoscleromorpha zu den Calcarea lassen die lipidchemischen Befunde nicht zu.

Neben den wahrscheinlich mikroorganismenstämmigen Fettsäuren besitzen einige der untersuchten Demospongiae auch kurzkettige Fettsäuren mit der typischen $\Delta^{5,9}$ -Dehydrierung, die bislang von keinem Mikroorganismus bekannt sind. So zeigen alle Vertreter der Astrophorida (Tetractinomorpha), mit Ausnahme von *Thenea muricata*, $16\Delta^{5,9}$ und untergeordnet $18\Delta^{5,9}$ als Bestandteil ihrer Lipide auf. Die Erstgenannte wurde bislang nur in einem weiteren Schwamm nachgewiesen, dem Tetractinomorpha *Chondrilla nucula* (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1986). Das Auftreten dieser Verbindung scheint demnach ein auf diese Unterklasse beschränktes Merkmal zu sein (Tab. 5.1). Höhere Konzentrationen von $18\Delta^{5,9}$ zeigt der in dieser Studie erstmalig analysierte haploscleride Schwamm *Oceanapia robusta* (Ceractinomorpha), eine Verbindung, die beispielsweise von GILLAN *et al.* (1988) anhand von Schwämmen der Ceractinomorpha dokumentiert wurde. Bekannt ist, dass geringe Wassertemperaturen, neben einem höheren Untersättigungsgrad bei Lipidsäuren, zu einer relativen Bevorzugung von Verbindungen kürzerer Kettenlänge führen können (RUSSELL, 1990; HARWOOD *et al.*, 1994). Somit deutet die Häufung kurzkettiger $\Delta^{5,9}$ -Verbindungen in Kaltwasserdemospongiae, verglichen mit dem untergeordneten Auftreten in bisher untersuchten Arten aus tropischen und subtropische Habitaten (MUNRO and BLUNT, 2000), auf eine Kaltwasserlipidadaptation von dazu enzymatisch befähigten Schwämmen hin (vornehmlich Tetractinomorpha).

5.1.2 Mittkettig und endständig verzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$

Allgemein

Porifera besitzen eine Reihe verzweigter, kurzkettiger und langkettiger Carbonsäuren. Hierzu zählen kurzkettige, endständig (*i*-, *ai*-) und mittkettig verzweigte Fettsäuren (MCBFA), die als Membrankomponenten assoziierter Mikroorganismen gelten (GILLAN *et al.*, 1988; DJERASSI and LAM, 1991; THIEL *et al.*, 1999). So sind *i*- und *ai*-Membransäuren aus einer Fülle anaerober Eubakterien beschrieben, die ubiquitär in vielen Kompartimenten der Umwelt vorkommen (KANEDA, 1991; WAKEHAM and BEIER, 1991; ZELLES, 1997). MCBFA sind dagegen seltener in Bakterien verbreitet. Als Quelle konnten bislang einige Sulfat reduzierende Bakterien (TAYLOR and PARKES, 1983; DOWLING *et al.*, 1988), ein Mycobakterium und proactinomycete Nocardien (ZELLES, 1997) nachgewiesen werden. Diese Organismen synthetisieren die 10Me-C₁₆-Einheit als einen wichtigen Bestandteil ihrer Membranphospholipide. Eine auffällige Komponentenklasse innerhalb der Schwämme bilden Gemische unterschiedlich methylverzweigter MCBFA-Isomere (ω 5- ω 9), die bislang ausschließlich aus marinen Vertretern der Porifera beschrieben sind und offensichtlich Marker schwammspezifischer Mikroorganismen darstellen (THIEL *et al.*, 1999). Die Produzenten dieser Isomerengemische sind bislang unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass sie aus den Membranphospholipiden (vornehmlich aus der Phospholipidklasse Phosphatidylethanolamin) Sulfat reduzierender SAM resultieren (PAPE, 2003).

Schwämme sind befähigt, neben unverzweigten kurzkettigen, auch endständig und mittkettig verzweigte Fettsäuren zu elongieren, um eigene Phospholipide aufzubauen. So konnte beispielsweise für *Aplysina fistularis* gezeigt werden, dass dieser Schwamm eine ihm eigene 10Me-C₁₆-Fettsäure (ω 7-Verzweigung) durch C₂-Elongation zu 20Me-C₂₆ bzw. 22Me-C₂₈-Ketten modifiziert und nachfolgend an $\Delta^{5,9}$ dehydriert (WALKUP *et al.*, 1981). Ein ähnlich operierender Mechanismus wurde mit Hilfe von ¹⁴C-Inkorporierungsversuchen für endständig verzweigte Carbonsäuren in *Jaspis stellifera* nachgewiesen. Dieser modifiziert *i*- und *ai*-15-Säuren (ω 2 bzw. ω 3) zu einer *i*- und *ai*-27 $\Delta^{5,9}$ (CARBALLEIRA *et al.*, 1986). Demnach scheinen Verzweigungen in Schwammlipidsäuren ausschließlich ein Resultat verzweigter kurzkettiger Eduktmoleküle zu sein und Schwämme keine Verzweigungen eigenständig synthetisieren zu können (DJERASSI and LAM, 1991).

Analytik

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand massenspektrometrischer Analysen und bei den kurzkettigen C₁₄-C₁₈-SäureME mit Hilfe von Koelutionen mit authentischen GC-Standardsubstanzen. Generell führt die MS-Analyse von endständig verzweigten, gesättigten Methylestern zu charakteristischen Fragmenten, die aus der bevorzugten Bindungsspaltung Δ -seitig an der Verzweigung resultieren. Dies führt bei *i*-verzweigten-SäureME zu einer Erhöhung des Fragmentes M⁺-43 und für *ai*-Verbindungen zur Erhöhung des Fragmentes M⁺-57 (Abb. 5.6).

Ferner wurden sog. 'equivalent chain length'-Werte (ECL) zugrunde gelegt, die eine Identifizierung der Komponente anhand ihres gaschromatographischen Elutionsverhaltens ermöglichen. So besitzt beispielsweise *i*-15 einen ECL-Wert von 14.62 und *ai*-15 von 14.70 (CARBALLEIRA *et al.*, 1986). Das Vorhandensein von Isomergemischen mittkettig verzweigter SäureME wurde anhand von spezifischen Fragmenten massenspektrometrisch bestimmt, die in THIEL *et al.* (1999) detailliert beschrieben wurden. Die Charakterisierung von Verzweigungen in langkettigen

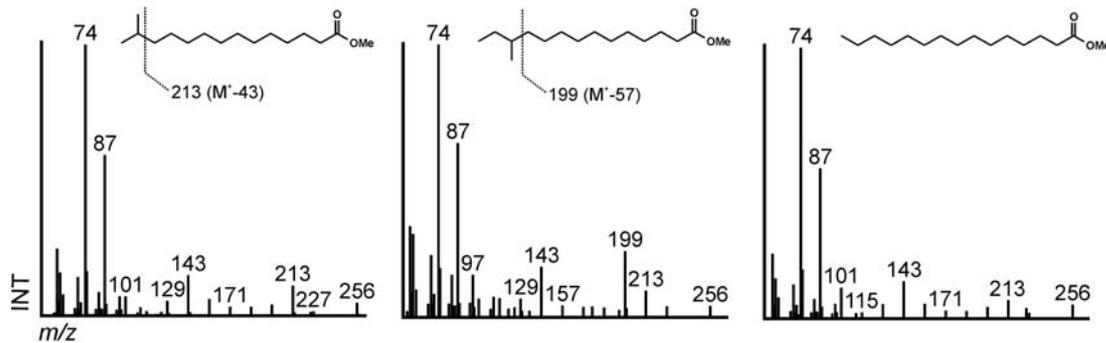


Abbildung 5.6 MS-Spektren (EI) endständig verzweigter, gesättigter CarbonsäureME (*i*-, *ai* und unverzweigte 15ME)

gen $\Delta^{5,9}$ -SäureME ist aufgrund uneindeutiger massenspektrometrischer Fragmentierungen schwierig. Daher wurden ECL-Werte genutzt. Generell eluieren verzweigte $\Delta^{5,9}$ -Verbindungen in der Reihenfolge mittkettig ($\omega > 3$ -methyl), *i*- und abschließend *ai*-verzweigt. So liegen beispielsweise die ECL der mittkettig verzweigten 22-Me-29 $\Delta^{5,9}$ bei 28.12 (RAEDERSTORFF *et al.*, 1987) und die der endständig verzweigten 27 $\Delta^{5,9}$ -SäureME bei 26.15 für *i*-, bei 26.37 für die *ai*-Äquivalente (CARBALLEIRA *et al.*, 1986). Isomergemische von MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ konnten ausschließlich anhand der Peakform (Peakbreite, 'Peakschultern') bestimmt werden; eine Positionierung der Methylverzweigungen war aufgrund obengenannter MS-Charakteristika nicht durchführbar.

Im Folgenden wird die Verteilung verzweigter Carbonsäuren in Demospongiae und Hexactinellida dargestellt und diskutiert.

Ergebnisse

Endständig und mittkettig verzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$ in Kaltwasserdemospongien

In Tabelle 5.3 ist das qualitative Auftreten von endständig und mittkettig verzweigten, langkettigen $\Delta^{5,9}$ -Carbonsäuren dargestellt. Zusätzlich umfasst die Auflistung das Vorkommen kurzkettiger, gesättigter Äquivalente.

Demnach enthalten alle analysierten Kaltwasserdemospongien verzweigte Lipidsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen und Verteilungen (Tab. 5.3 und Tab. im Anhang C). Die weiteste Verbreitung haben kurzkettige *i*-Carbonsäuren, die meist gemeinsam mit den *ai*-Isomeren auftreten.

Species	Taxonomy	<i>i</i> -SCFA	<i>ai</i> -SCFA	MCBFA	<i>i</i> -LCFA $\Delta^{5,9}$	<i>ai</i> -LCFA $\Delta^{5,9}$	MCBLCFA $\Delta^{5,9}$
<i>Plakortis</i> sp.	Homoscleromorpha-Homoscl.	●	●	●			
<i>Stryphnus ponderosus</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●			
<i>Dragmastra normanii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●	●	●	●
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●	●	●	●
<i>Geodia macandrewii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●	○	○	○
<i>Isops phlegraei</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●	●	●	●
<i>Pachymatisma johnstonii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	●	●	●	●	●	
<i>Thenea muricata</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	○	○				
<i>Tentorium semisuberites</i>	Tetractinomorpha-Hadromerida	○	○				
<i>Antho dichotoma</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○		○			
<i>Clathria barleii</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	●	○				
<i>Hymedesmium</i> sp.	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○	○	○		●	
Unknown sp. 1	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○	○	○			
Unknown sp. 2	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	●	○	○			
<i>Forcepia forcipis</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○	○	○			
<i>Mycale lingua</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○					
<i>Oceanapia robusta</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	●	●			
<i>Haliclona</i> sp. 1	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	●	●	●	●	●
<i>Haliclona</i> sp. 2	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	●	○	●	●	○
<i>Haliclona urceolus</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	●				
<i>Petrosia crassa</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	●	●	●	●	●
<i>Hemigellius pumiceus</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●	○	○			
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●	●	○			
<i>Phakellia robusta</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●	●		○	○	
<i>Axinella rugosa</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida		●				
<i>Axinella infundibul.</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	○					
<i>Spongosorites genitrix</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●	●	●	●	●	
<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●	○	○			
<i>Dendrilla cirsioides</i>	Ceractinomorpha-Dendroceratida	●	○				
Unknown sp. 3	Ceractinomorpha-Dendroceratida	●	○				
Unknown sp. 4	Ceractinomorpha-Dendroceratida	●	○				
Unknown sp. 5	Ceractinomorpha-Dendroceratida	●	○				

Tabelle 5.3 Vorkommen verzweigter Fettsäuren in Kaltwasserdemospongien (● = vorhanden, ○ = untergeordnet enthalten)

Weniger häufig sind MCBFA in den untersuchten Demospongiae enthalten; dennoch stellen sie in elf Vertretern die Hauptkomponenten der Fettsäurefraktion (v.a. MCBFA18; Tab. im Anhang C). Eine Häufung kurzkettiger, *ai*- und mittkettig verzweigter Lipidsäuren ist bei Schwämmen der Unterklasse Tetractinomorpha vorhanden (sechs von acht Arten), aber auch die Biomasse der Ceractinomorpha (vier von 23 Arten) *Oceanapia robusta*, *Haliclona* sp. 1, *Petrosia crassa* und *Spongosorites genitrix* besitzen offensichtlich eine große Menge eubakterieller Produzenten dieser Lipidklassen.

Zusätzlich zu den kurzkettigen weisen neun der untersuchten Arten *ai*- und fünf Spezies MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ in signifikanten Konzentrationen auf, wobei die letztgenannten Verbindungen ausschließlich in Vertretern der Astrophorida und Haplosclerida vorkommen.

Endständig und mittkettig verzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Hexactinellida

Das Vorkommen verzweigter Fettsäuren ist in der umfassenden Studie von (s. THIEL *et al.*, 2002 im Anhang E.1) zusammengefasst. Endständig und mittkettig verzweigte Fettsäuren sind ebenfalls ein Bestandteil der estergebundenen Säuren in Schwämmen der Klasse Hexac-

tinellida, auch wenn sie gegenüber den Demospongiae seltener und in geringeren Konzentrationen auftreten (THIEL *et al.*, 2002). Allerdings finden sich die charakteristischen Gemische von MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ nur in Vertretern der Amphidiscophora (drei von vier Arten) und fehlen in der Unterklasse Hexasterophora gänzlich.

Diskussion

Verzweigte Carbonsäuren sind in Demospongiae und Hexactinellida enthalten. Ihr Auftreten variiert allerdings deutlich. So ist das Vorkommen von MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ innerhalb der Kaltwasserdemospongiae auf drei Arten der Astrophorida und zwei Arten der Haplosclerida beschränkt, in denen sie teilweise die Hauptkomponenten der Schwammsäuren darstellen (Tab. im Anhang C). Der einzige publizierte Nachweis einer mittkettig verzweigten LCFA $\Delta^{5,9}$ (22Me-28 $\Delta^{5,9}$) ist für den Schwamm *Aplysina fistularis* erbracht worden (WALKUP *et al.*, 1981; RAEDERSTORFF *et al.*, 1987). Diese Art gehört der auf dem Norwegenschelf nicht vorgefundenen Ordnung Verongida an.

Innerhalb der untersuchten Hexactinellida sind diese Isomerengemische ebenfalls vorhanden, allerdings den Demospongiae klar untergeordnet. Sie deuten darauf hin, dass diese Komponenten keine klassenspezifischen Marker darstellen. Bei hexactinelliden Schwämmen scheint jedoch dieses Merkmal ausschließlich auf Vertreter der Amphidiscophora (spez. Hyalonematidae) begrenzt zu sein (THIEL *et al.*, 2002), die eine stark divergente Gruppe innerhalb der Hexactinellida bilden (TABACHNIK and MENSHENINA, 1999).

Für alle MCBLCFA enthaltenden Spezies der Hexactinellida und Demospongiae gilt, dass diese ebenso kurzkettige, gesättigte Isomerengemische enthalten, deren Ursprung auf aphotrophe assoziierte Mikroorganismen zurückgeführt wird (TAYLOR and PARKES, 1983; GILLAN and HOGG, 1984; DJERASSI and LAM, 1991). Wie oben dargestellt wurde für *Aplysina fistularis* ein enzymatisch induzierter Verlängerungsprozess eines Diastereomerengemisches einer 10Me-C₁₆-Säure (10*R* und 10*S*) nachgewiesen, der stereounspezifisch abläuft (RAEDERSTORFF *et al.*, 1987). Das gekoppelte Auftreten von MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ mit kurzkettigen MCBFA deutet auf ähnliche in den untersuchten Schwämmen ablaufende Prozesse hin. Trotz dieser nicht direkt durch den Schwamm durchgeführten Synthese von MCBLCFA $\Delta^{5,9}$, besitzen diese Markercharakter. Dem zugrunde liegt einerseits die taxonomisch relevante Spezifität der Assoziation von SAM und Schwämmen, deren Bestand schon für diese Organismen aus präkambrischen Zeiten angenommen wird (WILKINSON, 1978). Andererseits nutzen offensichtlich nicht alle Porifera das Prinzip der Kettenverlängerung mittkettig verzweigter bakterieller Säuren (Tab. 5.3). Dieses Merkmal ist bei den untersuchten Demospongien auf die Familien Astrophorida, Haplosclerida und Verongida und innerhalb der Hexactinellida auf Vertreter der Astrophorida (Hyalonematidae) beschränkt.

5.1.3 Bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ **Allgemein**

Halogenierte Naturstoffe (Sekundärmetaboliten) sind in marinen Invertebraten, insbesondere in Demospongien, weit verbreitet und bilden einen wichtigen Bestandteil des Verteidigungssystems in sessilen Organismen (z.B. FAULKNER, 2002). Trotz der im Seewasser gegenüber

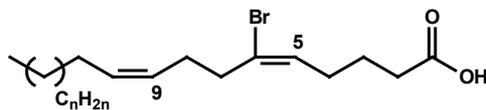


Abbildung 5.7 Allgemeine Struktur von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ aus Schwämmen (LCFA; $n > 12$)

Chlor untergeordneten Konzentrationen ist Brom der häufigste Halogensubstituent. Obwohl halogenierte Sekundärmetaboliten in marinen Invertebraten vielfach vorkommen, sind Phospholipide mit bromierten, langkettigen Fettsäuren in der Natur vergleichsweise selten (LAM *et al.*, 1989). Dennoch wiesen einige Studien diese

Membrankomponenten in wenigen Schwammarten nach (WIJEKON *et al.*, 1984; LAM *et al.*, 1989; CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993; CARBALLEIRA and SHALABI, 1993; BARNATHAN *et al.*, 1994; GARSON *et al.*, 1994). Aber auch einzelne Seeanemonenarten synthetisieren kurzkettige Varianten dieser Verbindungen (CARBALLEIRA and REYES, 1995). Das Vorkommen bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ scheint dagegen praktisch ausschließlich auf Demospongiae der Ordnungen Haplosclerida und Halichondrida beschränkt zu sein. Die einzige bekannte Ausnahme ist der Schwamm *Cinachyrella* aff. *schulzei* (Ordnung Spirophorida), der geringe Konzentrationen einer 6-Br-27 $\Delta^{5,9}$ -Fettsäure enthält (0.5% der Lipidsäuren; BARNATHAN *et al.*, 1994).

Neben der charakteristischen LCFA $\Delta^{5,9}$ -Struktur dieser Fettsäuren stellt die Substitutionsposition des Broms ein weiteres Charakteristikum dieser spezifischen Verbindungen dar. So konnte Brom bisher ausschließlich an C-6 der Alkylkette nachgewiesen werden (Abb. 5.7).

Zellseparationsexperimente mit *Amphimedon terpenensis* zeigten eindeutig, dass Schwammzellen, und nicht SAM, 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ produzieren (GARSON *et al.*, 1994). In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die schwammtypische Phospholipidklasse Phosphatidylethanolamin (PE), und untergeordnet Phosphatidylinositol (PI), neben den unbromierten LCFA $\Delta^{5,9}$ auch die bromierten Äquivalente enthält. Der Zusammenhang zwischen beiden Verbindungstypen wurde schon frühzeitig anhand von ^{14}C -Inkorporierungsversuchen mit *Hymeniacidon* sp. untersucht (LAM *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Schwamm zunächst den beschriebenen Verlängerungsprozess kurzkettiger Vorläufersäuren durchführt (HAHN *et al.*, 1988) und abschließend Brom an der Position C-6 substituiert.

Die Rolle bromierter Carbonsäuren in Organismen ist bislang unklar, es wird jedoch von einigen Autoren angenommen, dass sie als Teil des Verteidigungssystems mariner Schwämme fungieren. So konnte in pharmakologischen Untersuchungen eines Vertreters der Halichondrida eine toxische Wirkung bromierter Fettsäuren nachgewiesen werden (LI *et al.*, 1995), wie sie auch für viele halogenierte Sekundärmetaboliten bekannt ist (z.B. THOMPSON *et al.*, 1985; PAWLIK, 1993; FUSETANI, 1996). Andere Autoren gehen dagegen von einer wichtigen membranphysiologischen Funktion des Broms in Fettsäuren aus (LAM *et al.*, 1989), denn die Einführung von Verzweigungen und Substituenten in die Phospholipidalkylketten führt vermutlich zu einer gesteigerten Membranfluidität und -permeabilität. Die bevorzugte

Synthese von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ als mögliche Kaltwasseradaption wird in Kapitel 6.1.1 diskutiert. Unbestritten ist, dass sog. Bromperoxidasen in Eukaryoten den Einbau von Brom in Primär- wie Sekundärmetaboliten ermöglichen (LAM *et al.*, 1989; CARBALLEIRA and SHALABI, 1993), und so das Auftreten von bromierten Lipidsäuren auf die Potenz eines Organismus hindeutet, pharmakologisch relevante Sekundärmetaboliten zu synthetisieren.

Analytik

Zunächst wurde die eingesetzte Transveresterungsmethode (TMCS/MeOH) auf ihre Eignung zur destruktionsfreien Analyse von bromierten Lipidsäuren überprüft, da einige Autoren selektive Diskriminierungen spezifischer Methoden gegenüber halogenierten SäureME gezeigt haben (GARSON *et al.*, 1994; s. Methodik B). In der in dieser Studie verwendeten Methode wurde keine relevante Diskriminierung oder Bevorzugung bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ festgestellt.

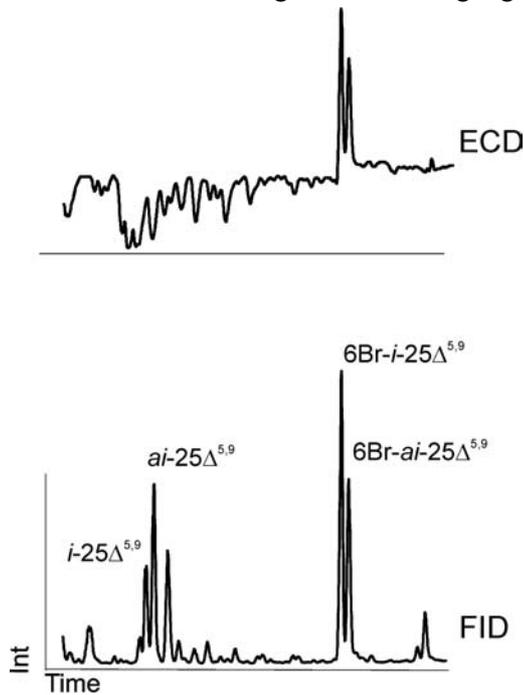


Abbildung 5.8 Gaschromatographische Analysen endständig verzweigter LCFA in *Spongosorites genitrix* mit EC/FI-Detektoren

Generell wurden das Auftreten und die Strukturen der bromierten $\Delta^{5,9}$ -Lipidsäuren anhand von ECD-Analysen und massenspektrometrischen Fragmentierungen (EI) bestimmt. Zunächst wurden gaschromatographische Untersuchungen durchgeführt, die mit parallel laufenden EC/FI-Detektoren Hinweise auf enthaltene Halogenierungen geben (Abb. 5.8).

Zusätzlich wurden GC-IR-Analysen an der SäureME-Fraktion von *Phakellia ventilabrum* vorgenommen, die bei den halogenierten $\Delta^{5,9}$ -Verbindungen, neben den für *cis*, *cis*- $\Delta^{5,9}$ -SäureME charakteristischen Adsorptionen, kleine Peaks bei $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ aufweisen. Dies deutet auf einen Substituenten in der Alkylkette hin (WIJEKON *et al.*, 1984;

CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993).

Darüber hinaus bildeten die Massenspektren der 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ -FettsäureME eine Basis der Untersuchungen. Sie weisen ein ausgeprägtes Fragment m/z 81 (100%) und einen bezüglich des

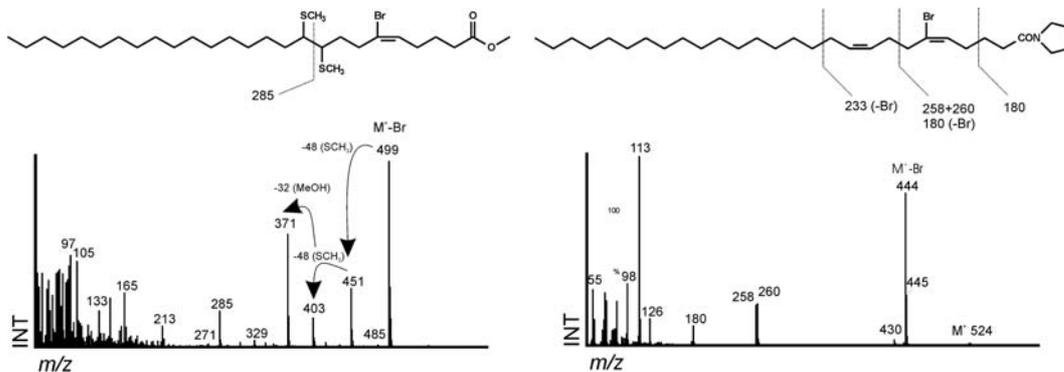


Abbildung 5.9 Massenspektren der DMDS- und Pyrrolidin-Derivate von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ aus *Phakellia ventilabrum*

Molekularpeaks der unbromierten LCFA $\Delta^{5,9}$ -ME um 1 *amu* verringerten Peak auf, der aus der Abspaltung des Broms resultiert (Massenspektrum s. Anhang D). Die bromierten SäureME zeigen eine sehr kleine M^+ -Duplette, die aus der gleichmäßigen Verteilung der zwei Brom-Isomere mit den Massen 79 und 81 resultiert. Zusätzlich wurden Derivatisierungen (mit Hilfe von Pyrrolidin und DMDS) durchgeführt, die die Charakterisierung der Präsenz und die Position der Bromierung massenspektrometrisch ermöglichen. So ergeben bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ -Pyrrolidide Fragmente, die die Position des Broms auf C_1 – C_7 limitieren (LAM *et al.*, 1989; CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993; BARNATHAN *et al.*, 1994). Die Addition von DMDS wird unter den gewählten Bedingungen an der Doppelbindung Δ^5 durch das Brom sterisch gehindert, und verhindert so auch die Bildung eines Thioethers wie bei unbromierte $\Delta^{5,9}$ -Pyrrolididen. Somit deuten die Massenspektren der DMDS-Derivate auf eine Position des Broms zwischen C_5 und C_8 hin (Abb. 5.9). Demnach kann die Position des Broms anhand der eigenen Daten auf C_5 – C_7 eingeschränkt werden.

Eine eindeutige Positionierung ermöglicht die Hydrierung mit Deuterium (D_2), die zu einer Abspaltung des Broms und einer zweifachen Deuterierung am substituierten Kohlenstoff führt. Zu den anderen Kohlenstoffe wird nur jeweils ein Deuterium addiert, da diese schon an ein Wasserstoff gekoppelt vorliegen. Die Massenspektren der so hydrierten Verbindung führen zu charakteristischen MS-Fragmenten, die die Position des Broms eindeutig festlegen (WIJEKON *et al.*, 1984). In allen entsprechenden Studien wurde an C_6 die Bromsubstitution nachgewiesen, so dass, obwohl diese Methode im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden konnte, von der gleichen Position in den untersuchten Porifera ausgegangen werden kann.

Ergebnisse

Bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ in Kaltwasserdemospongien

Die gaschromatographischen Untersuchungen der estergebundenen Säuren mit ECD/FID ergaben, dass eine Reihe von Schwämmen halogenierte Verbindungen enthalten, die im Weiteren mit Hilfe der oben angeführten Methoden strukturell untersucht wurden. In Tabelle 5.4 sind die Arten zusammengefasst, in denen 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ nachgewiesen werden konnten.

Species	Taxonomy	6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$
<i>Plakortis</i> sp.	Homoscleromorpha-Homosclerophorida	
<i>Stryphnus ponderosus</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Dragmastra normanii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Geodia macandrewii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Isops phlegraei</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Pachymatisma johnstonii</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Thenea muricata</i>	Tetractinomorpha-Astrophorida	
<i>Tentorium semisuberites</i>	Tetractinomorpha-Hadromerida	
<i>Antho dichotoma</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	
<i>Clathria barleii</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	
<i>Hymedesmium</i> sp.	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○
Unknown sp. 1	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	○
Unknown sp. 2	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	
<i>Forcepia forcipis</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	
<i>Mycale lingua</i>	Ceractinomorpha-Poecilosclerida	
<i>Oceanapia robusta</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●
<i>Haliclona</i> sp. 1	Ceractinomorpha-Haplosclerida	
<i>Haliclona</i> sp. 2	Ceractinomorpha-Haplosclerida	
<i>Haliclona urceolus</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	
<i>Petrosia crassa</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●
<i>Hemigellius pumiceus</i>	Ceractinomorpha-Haplosclerida	●

<i>Phakellia ventilabrum</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●
<i>Phakellia robusta</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●
<i>Axinella rugosa</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●
<i>Axinella infundibuliformis</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●
<i>Spongosorites genitrix</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	●
<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	Ceractinomorpha-Halichondrida	
<i>Dendrilla cirsioides</i>	Ceractinomorpha-Dendroceratida	
Unknown sp. 3	Ceractinomorpha-Dendroceratida	
Unknown sp. 4	Ceractinomorpha-Dendroceratida	
Unknown sp. 5	Ceractinomorpha-Dendroceratida	

Tabelle 5.4 Vorkommen von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ in den untersuchten Kaltwasserdemospongien, (● = vorhanden, ○ = untergeordnet enthalten)

Wie dargestellt, enthalten sieben Arten hohe Konzentrationen bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$, die beispielsweise bei *Phakellia ventilabrum* bis zu 75% der Fettsäuren ausmachen (Tab. 5.5). Drei weitere Spezies weisen diese Verbindungen gering konzentriert auf, so dass insgesamt zehn der 32 untersuchten Kaltwasserdemospongiae 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ synthetisieren.

Neben dem Auftreten halogener Carbonsäuren in den haploscleriden Schwämmen *Oceanapia robusta*, *Petrosia crassa* und *Hemigellius pumiceus* finden sich die höchsten Konzentrationen in Vertretern der Halichondrida (Tab. 5.5).

Fatty acids		<i>Axinella infundibuliformis</i>	<i>Spongosorites genitrix</i>	<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Phakellia robusta</i>	<i>Phakellia rugosa</i>
11-Methyldodecanoic	<i>i-13</i>	-	0.1	-	0.2	-
10-Methyldodecanoic	<i>ai-13</i>	-	0.1	-	0.2	-
Tridecanoic	13	-	0.1	-	0.2	-
12-Methyltridecanoic	<i>i-14</i>	-	0.3	-	0.9	-
Tetradecanoic	14	0.6	1.5	0.3	7.3	2.2
Methyltetra-4en-oic	m-14Δ^4	-	-	-	0.2	-
Methyltetradecanoic (MCBFA)	m-14	-	1 (m 11, 12)	-	0.7	-
13-Methyltetradecanoic	<i>i-15</i>	0.2	4.3	-	2.3	1
12-Methyltetradecanoic	<i>ai-15</i>	0.2	3.1	-	1.1	0.2
Pentadecanoic	15	0.2	0.8	-	0.8	0.1
Methylpentadecanoic (MCBFA)	m-15	-	0.8 (m 10)	-	-	-
14-Methylpentadecanoic	<i>i-16</i>	0.5	0.5	-	-	1.1
13-Methylpentadecanoic	<i>ai-16</i>	0.7	-	-	-	-
Hexadec-7en-oic	16Δ^7	-	0.7	-	-	0.2
Hexadec-9en-oic	16Δ^9	1.7	6	1.1	23.3	9.9
Hexadec-11en-oic	16Δ^{11}	0.1	1.4	-	0.5	0.2
Hexadecanoic	16	3.7	3.9	0.6	13.3	5
Methylhexadec-5en-oic	m-16Δ^5	1.2	-	-	-	-
Methylhexadec-7en-oic	m-16Δ^7	2.3	-	-	-	-
Methylhexadec-9en-oic	m-16Δ^9	-	4.3	-	-	-
Methylhexadecanoic (MCBFA)	m-16	-	6.5 (m 9, 10, 11)	-	1.3 (m11)	-
Cyclonheptadecanoic?	cy-16	-	-	-	4	0.8
15-Methylhexadecanoic	<i>i-17</i>	0.6	0.4	-	0.3	0.4
14-Methylhexadecanoic	<i>ai-17</i>	0.8	0.8	-	1.3	1.3
Heptadecanoic	17	0.2	0.3	-	0.4	0.6
Methylheptadecanoic (MCBFA)	m-17	-	-	-	-	-
16-Methylheptadecanoic	<i>i-18</i>	0.8	-	-	-	-
15-Methylheptadecanoic	<i>ai-18</i>	2.1	-	-	-	-
Octadec-?,?dien-oic	18$\Delta^{2,2}$	-	2.2	-	-	-
Octadec-9en-oic	18Δ^9	-	0.9	-	0.3	0.2
Octadec-11en-oic	18Δ^{11}	1.9	2.1	0.5	5.8	2.8
3,7,11,15-Tetramethylhexadecanoic (phytanic)	Phy	0.2	-	1	9.4	6.7
Octadecanoic	18	1.1	2.7	0.2	2.5	0.8
Methyloctadec-4+5-en-oic	m-18Δ^{4+5}	-	5.4	-	-	-
Methyloctadecanoic (MCBFA)	m-18	1.9 (m 11)	12.7 (m 9, 10, 11)	-	-	0.6
Cyclononadecanoic?	cy-18	-	0.6	-	-	-
17-Methyloctadecanoic	<i>i-19</i>	0.9	-	-	-	0.4

5 Ergebnisse und Diskussion Teil 1 – Chemotaxonomie anhand von Biomarkern

16-Methyloctadecanoic	<i>ai-19</i>	0.1	-	-	-	0.1
Nonadecanoic	19	-	-	-	0.3	0.2
Methylnonadecanoic (MCBFA)	m-19	-	-	0.2 (m?)	-	-
18-Methylnonadecanoic	<i>i-20</i>	-	-	0.1	2	0.7
17-Methylnonadecanoic	<i>ai-20</i>	-	-	0.2	-	0.5
Eicosa-11en-oic	20Δ^{11}	0.6	-	-	-	-
Eicosa-13en-oic	20Δ^{13}	0.7	-	0.1	-	0.5
Eicosa-15en-oic	20Δ^{15}	0.7	-	0.1	-	0.6
Eicosanoic	20	2.3	-	0.2	1.6	1
Methyleicosanoic (MCBFA)	m-20	-	0.9 (m 13)	-	-	1.4
19-Methyleicosanoic	<i>i-21</i>	-	-	0.2	0.6	-
18-Methyleicosanoic	<i>ai-21</i>	-	-	0.3	4.8	1
Methyldocosanoic (MCBFA)	m-22	-	2.5 (m 15, 16)	-	-	1
Docosa-15en-oic	22Δ^{15}	-	-	1	-	2.7
Methyltricosanoic (MCBFA)	m-23	-	1.1 (m 18)	-	0.3	0.4
22-Methyltricoso-5,9dien-oic	<i>i-24$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.8	-	-	-
21-Methyltricoso-5,9dien-oic	<i>ai-24$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.5	-	-	-
Tetracosa-5,9dien-oic	24$\Delta^{5,9}$	-	-	2.8	-	2.5
23-Methyltricosanoic	<i>i-24</i>	-	1.7	-	-	-
Tetracosa-15en-oic	24Δ^{15}	0.8	-	0.1	-	0.9
Tetracosa-17en-oic	24Δ^{17}	2	-	0.9	0.4	-
Tetracosanoic	24	-	-	-	0.3	-
23-Methyltetracosa-5,9dien-oic	<i>i-25$\Delta^{5,9}$</i>	-	2.8	-	-	-
22-Methyltetracosa-5,9dien-oic	<i>ai-25$\Delta^{5,9}$</i>	-	5.1	-	-	-
Pentacosa-5,9dien-oic	25$\Delta^{5,9}$	-	-	1	-	4.3
6-Br-21-Methyldocosa-5,9dien-oic	6Br <i>i-23$\Delta^{5,9}$</i>	-	-	-	1.8	-
6-Br-20-Methyldocosa-5,9dien-oic	6Br <i>ai-23$\Delta^{5,9}$</i>	-	-	-	2	-
Methyltetracosanoic (MCBLCFA)	m-25	-	3.6 (m 17, 18)	-	-	-
23-Methylpentacosa-5,9dien-oic	<i>ai-26$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.4	-	-	-
6-Br-22-Methyltricoso-5,9dien-oic	6Br <i>i-24$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.2	-	-	-
6-Br-21-Methyltricoso-5,9dien-oic	6Br <i>ai-24$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.1	-	-	-
Hexacosa-17en-oic	26Δ^{17}	0.5	-	-	-	-
Hexacosa-5,9dien-oic	26$\Delta^{5,9}$	2.7	-	0.9	-	1
6-Br-Tetracosa-5,9dien-oic	6Br 24$\Delta^{5,9}$	-	0.4	5.8	0.5	1.9
6-Br-Tetracosa-5,9,?trien-oic	6Br 24$\Delta^{5,9,?}$	-	-	-	0.7	-
6-Br-23-Methyltetracosa-5,9dien-oic	6Br <i>i-25$\Delta^{5,9}$</i>	-	7.1	-	-	-
6-Br-22-Methyltetracosa-5,9dien-oic	6Br <i>ai-25$\Delta^{5,9}$</i>	-	5.5	-	-	-
Heptacosa-15en-oic	27Δ^{15}	1	-	-	-	-
Heptacosa-17en-oic	27Δ^{17}	1.4	-	-	-	-
Heptacosa-5,9dien-oic	27$\Delta^{5,9}$	1.3	-	-	-	-
6-Br-Pentacosa-5,9dien-oic	6Br 25$\Delta^{5,9}$	-	-	22.8	-	11.2
Octacosa-5,9,21trien-oic	28$\Delta^{5,9,21}$	5	-	-	-	-
6-Br-24-Methylpentacosa-5,9dien-oic	6Br <i>i-26$\Delta^{5,9}$</i>	-	0.4	-	-	-
6-Br-23-Methylpentacosa-5,9dien-oic	6Br <i>ai-26$\Delta^{5,9}$</i>	-	1.7	-	-	-
6-Br-Hexacosa-5,9dien-oic	6Br 26$\Delta^{5,9}$	1.1	-	45.5	-	25.4
Nonacosa-5,9,22trien-oic	29$\Delta^{5,9,22}$	30.2	-	-	-	-
6-Br-Heptacosa-5,9dien-oic	6Br 27$\Delta^{5,9}$	2	-	-	-	-
6-Br-Octacosa-5,9,?trien-oic	6Br 28$\Delta^{5,9,?}$	0.7	-	-	-	-
6-Br-Nonacosa-5,9,?trien-oic	6Br 29 $\Delta^{5,9,?}$	2.2	-	-	-	-
Di (?) -Br-Hexacosa-5,9dien-oic	Di Br(?) 26$\Delta^{5,9}$	-	-	1.8	-	1
6-Br-Hexacosa-5,9,?trien-oic	6Br 26 $\Delta^{5,9,?}$	-	-	-	1.2	1.2
Polyenoic acids	Poly	17.5	-	14.8	6.5	5.3
Dicarboxylic acids	Dicarboxy	-	0.9	-	-	-
Dimethylacetale (resulting from plasmalogens)		4.3	-	-	-	-
Totals (wt% of the total fatty acids)						
Linear sat. fatty acids		8.1	9.3	1.3	26.7	9.9
<i>Iso-anteiso</i> fatty acids		6.9	35.9	0.8	3.8	6.7
Mid-chain branched fatty acids (MCBFA)		5.4	38.8	0.2	2.5	2.4
LCFA $\Delta^{5,9}$		45.2	25	80.6	6.2	48.5
Brominated LCFA $\Delta^{5,9}$		6	15.4	75.9	6.2	38.5

Tabelle 5.5 Inventar der estergebundenen Fettsäuren ausgewählter Kaltwasservertreter der Halichondrida, die bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ enthalten

Alle vier Arten der Familie Axinellidae synthetisieren große Mengen bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$, die teilweise die Hauptverbindungen der estergebundenen Fettsäuren sind. Insbesondere die auf dem Norwegenschelf sehr verbreitete Art *P. ventilabrum* und die etwas seltener vertretene *Phakellia rugosa* synthetisieren diese Verbindungsklasse in hohen Mengen.

Trotz der vergleichsweise geringen relativen Konzentration an 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ in der Art *Phakellia robusta* ist diese ein Produzent einer bisher nicht beschriebenen Verbindungsklasse. In *P. robusta* konnten erstmals zwei endständig verzweigte (*i*- und *ai*-) 6-Br-23 $\Delta^{5,9}$ -Verbindungen als Bestandteil der estergebundenen Fettsäuren beobachtet werden. LCFA dieser Kettenlänge wurden noch nicht aus Schwämmen beschrieben und stimmen auch nicht mit der Definition von LCFA überein (>24).

Bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Hexactinellida

Keiner der untersuchten Hexactinellida besitzt halogenierte Fettsäuren als Bestandteil seiner estergebundenen Säuren (THIEL *et al.*, 2002).

Diskussion

Innerhalb der untersuchten Demospongiae treten bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ sehr verbreitet auf und wurden in dieser Studie erstmals in dieser Fülle und auch in diesen hohen Konzentrationen beobachtet. So verfügen nahezu ein Drittel der Arten vom Norwegenschelf über diese Verbindungen, die teilweise sogar die Hauptkomponenten ihrer Fettsäuren bilden. Speziell Kaltwasserarten der Halichondrida synthetisieren offensichtlich große Mengen dieser seltenen Verbindungsklasse, wie der Vergleich mit Lipiddaten tropischer und subtropischer Halichondrida, die aus anderen Studien stammen, zeigt. Diese Diskrepanz wird als mögliche lipidchemische Adaption borealer Arten im Kapitel 6.1.1 diskutiert.

Trotz der beobachteten Häufung bromierter Carbonsäuren in den untersuchten Kaltwasserdemospongien scheinen diese Komponenten auch hier auf einige taxonomische Gruppen beschränkt zu sein. Neben den Haplosclerida sind insbesondere Halichondrida wichtige Produzenten bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ (Tab. 5.5). Einzig in zwei inkrustierenden Arten (*Hymedesmia* sp., Unknown sp. 1) wurden halogenierte Fettsäuren in geringen Konzentrationen gefunden. Dies und der Nachweis in *Cynachyrella* aff. *schulzei* (BARNATHAN *et al.*, 1994) zeigen, dass sich 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ nicht als spezifische Markerverbindungen für die Ordnungen Haplosclerida und Halichondrida eignen. Dennoch ist die Fähigkeit zur Synthese halogener Säuren in diesen Gruppen am stärksten ausgeprägt.

Entsprechend ihrer als konservativ geltenden Lipidbiosynthese sind hexactinellide Schwämme offensichtlich nicht in der Lage eine Bromsubstitution bei der Lipidsynthese durchzuführen (THIEL *et al.*, 2002). Dies könnte am Fehlen der dazu benötigten Haloperoxidasen liegen, deren Entstehung eventuell eine evolutionäre Weiterentwicklung spezifischer Gruppen der Demospongiae darstellt.

Möglicherweise gibt der indirekte Nachweis von Haloperoxidasen über bromierte Fettsäuren – zusätzlich zur Klärung chemotaxonomischer Fragestellungen – Hinweise über die Potenz

eines Schwammes zur Synthese halogener Sekundärstoffe. So gilt für beide Komponentenklassen, dass zur Addition von Halogenen ähnliche Enzyme vorhanden sein müssen. Dieser mögliche Zusammenhang sollte in weiter gehenden Studien untersucht werden, um gegebenenfalls einen leicht nachzuweisenden Biomarker für höhermolekulare, halogenierte Sekundärmetaboliten zu finden.

5.1.4 Estergebundene Isoprenoidsäuren (Phytansäure und Trimethyltridecansäure)

Allgemein

Azyklische Isoprenoide mit 20 oder weniger Kohlenstoffatomen sind weit verbreitet in marinen Sedimenten (BROOKS *et al.*, 1978) und gelten als Abkömmlinge der degradierten Phytylkette des Chlorophyll *a* (DIDYK *et al.*, 1978). Zudem wurde diese Verbindungsklasse untergeordnet auch als Bestandteil von Moosen (BUCHANAN *et al.*, 1996) oder als Abbauprodukt des Chlorophyll *b*, Bacteriochlorophyll *a* (GILLAN and JOHNS, 1980) und der Lipide von Archaeen (ANDERSON *et al.*, 1977) nachgewiesen. Neben den häufig beschriebenen defunktionalisierten Isoprenoidkohlenwasserstoffen Pristan und Phytan und ihrem diagenetischen Vorläufer Phytol (PETERS and MOLDOWAN, 1993) bilden auch Carboxykomponenten, wie 4,8,12-Trimethyltridecansäure (TMTD) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure), Zwischenprodukte des Chlorophyllabbaus (DIDYK *et al.*, 1978). Diese Isoprenoidsäuren stellen wichtige Biomarker für Prozesse in terrestrischen und marinen Milieus dar. Daneben sind auch direkte Produzenten dieser Verbindungen beschrieben. So wurde Phytansäure aus den Lipiden von Fischen und marinen Mammalia (ACKMAN and HOOPER, 1968), aus Schafen und Ochsen (MACLEAN *et al.*, 1968) und dem Archaeum *Halobacterium cutirubrum* (KATES *et al.*, 1967) beschrieben. Die niedermolekulare TMTD wurde u.a. in marinen Fischen nachgewiesen und gilt als Abbauprodukt der Phytansäure in diesen Organismen (REZANKA and DEMBITSKY, 1993).

Zusätzlich zu den genannten Quellen wurden schon frühzeitig Phytansäure und TMTD als Bestandteile der Lipide mariner Schwämme entdeckt. Der erste Nachweis für Phytansäure konnte aus dem Schwamm *Aplysina fistularis* erbracht werden, bei dem sich diese Verbindung vornehmlich im Phosphatidylethanolamin (PE) bzw. Diphosphatidylglycerol (DPG) seiner Phospholipide befindet (WALKUP *et al.*, 1981). TMTD wurde erstmals in *Petrosia ficiformis* nachgewiesen (AYANOGLU *et al.*, 1982). In der Folge wurden in einer Reihe von Lipiduntersuchungen mariner Demospongien beide Komponenten jeweils einzeln beschrieben, und letztlich im Ergebnis eine Selektivität der Synthese von Phytansäuren oder TMTD in Schwämmen vorgeschlagen (CARBALLEIRA *et al.*, 1987). Allerdings scheint diese Selektivität nicht durchgängig vorhanden zu sein. So enthält *Dysidea fragilis* beide Komponenten (CHRISTIE *et al.*, 1992). Eine Koexistenz wurde zudem für zwei axinellide Arten senegalesischer Gewässer beschrieben (BARNATHAN *et al.*, 1996). Dennoch scheint eine chemotaxonomische Selektivität in manchen Taxa vorhanden zu sein. So wurde beispielsweise die TMTD-Synthese als Merkmal der Hadromerida vorgeschlagen, da diese Komponente in mehreren Arten dieser Ordnung exklusiv vorkommt (CARBALLEIRA *et al.*, 1989a; BARNATHAN *et al.*, 1992).

Für beide Isoprenoidsäuren gilt der Schwamm und es gelten nicht die SAM als Quelle. Neben der vorhandenen chemotaxonomisch relevanten Dominanz einer der beiden Carbonsäuren, die auf eine Unabhängigkeit des Vorhandenseins von Phytansäure und TMTD von den SAM schließen lässt, basiert die Aussagen von Schwämmen als Produzenten isoprenoidaler Säuren auf Analysen an *Amphimedon compressa*. Dieser Schwamm weist ein Vorherrschen der Phytansäure in dessen Aminophospholipiden (PE und PS) auf (GARSON *et al.*, 1994). Diese Phospholipidklassen gelten als charakteristische 'Schwammphospholipide' im Gegensatz zu dem eher von Eubakterien synthetisierten Phosphatidylcholin (PC; DJERASSI and LAM, 1991). Obwohl die zelluläre Herkunft von Isoprenoidsäuren in Schwämmen geklärt erscheint, ist die Verwendung von Isoprenoidvorläufern wahrscheinlich (z.B. aus der Nahrung).

Verglichen mit den verbreiteten C₁₆- und C₂₀-Säuren sind langkettige Isoprenoidsäuren in Schwämmen sehr rar und aus anderen Milieus unbekannt. Vor diesem Hintergrund ist der Nachweis einer Vielzahl von langkettigen tri- sowie und tetramethyl polyungesättigten Lipidsäuren aus mehreren endemischen Süßwasserdemospongien des Baikalsees einzigartig (REZANKA and DEMBITSKY, 1993). Der strukturelle Aufbau dieser bis zu 30 Kohlenstoffatome beinhaltenden Fettsäuren, inklusive der $\Delta^{5,9}$ -Doppelbindungssignatur, deutet auf eine Elongation von Isoprenoidsäuren durch den Schwamm, wie sie auch für nichtisoprenoidale Vorläuferfettsäuren nachgewiesen ist (HAHN *et al.*, 1988).

Analytik

Die transesterierten ME von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure) und 4,8,12-Trimethyltridecansäure (TMTD) wurden aufgrund ihrer charakteristischen massenspektrometri-

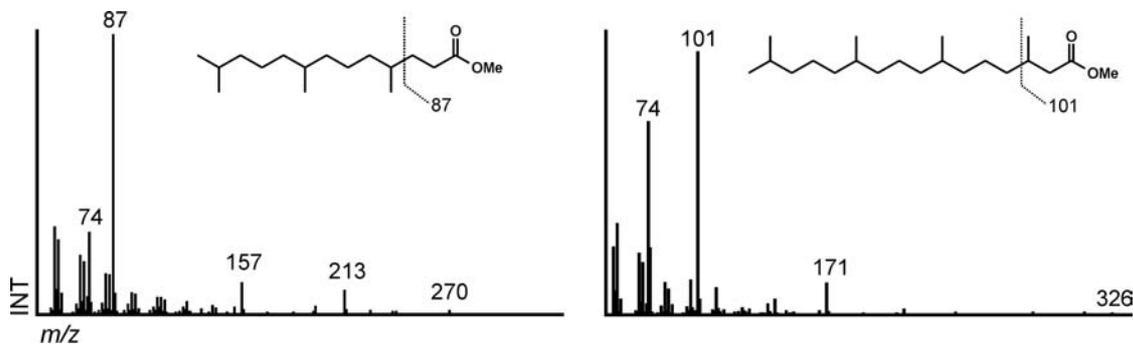


Abbildung 5.10 Massenspektren von 4,8,12-TrimethyltridecansäureME und 3,7,11,15-TetramethylhexadecansäureME

sehen Fragmentierung und ihrer gegenüber den unverzweigten Verbindungen geringeren ECL-Werte charakterisiert. PhytansäureME wurde zudem mittels gaschromatographischer Koelutionen mit einem authentischen Standard identifiziert.

Massenspektrometrisch weist PhytansäureME ein dominantes Fragment m/z 101 auf und hat einen Molekülionenpeak von m/z 326 (Abb. 5.10). Des Weiteren deutet die gaschromatographische Elution im Bereich der ungesättigten OctadecansäureME mit einem ECL von 17.58 auf eine Reihe von Verzweigungen in der Struktur hin (CARBALLEIRA *et al.*, 1987).

Die Methylester der TMTD-Säure zeigen ein dominantes Fragment bei m/z 87, das aus der McLafferty-Umlagerung der funktionellen Gruppe im Zusammenhang mit der Spaltung vor der Methylverzweigung an Position C₄ resultiert. TMTD hat einen M⁺ bei m/z 270 (AYANOGLU *et al.*, 1983; Abb. 5.10).

Ergebnisse

Isoprenoidsäuren in Kaltwasserdemospongien

Beide nachfolgend beschriebenen Verbindungen resultieren aus der Transveresterung und wurden als nicht frei vorliegend in den untersuchten Spezies nachgewiesen.

Nahezu alle der untersuchten Kaltwasserdemospongiae enthalten Isoprenoidsäuren in unterschiedlichen Gehalten. Tabelle 5.6 fasst das Vorkommen zusammen.

Species	Taxonomy	TMTD	Phytan-säure	Species	Taxonomy	TMTD	Phytan-säure
<u>Demospongiae</u>				<u>Hexactinellida</u>			
<i>Plakortis</i> sp.	Homoscl. -			<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora		●
<i>Stryphnus ponderosus</i>	Tetract.-Astrophorida		○	<i>Acanthascus</i> sp.	Hexasterophora		○
<i>Dragmastra normanii</i>	Tetract.-Astrophorida		Tr	Unknown sp. 6	Hexasterophora		○
<i>Geodia barretti</i>	Tetract.-Astrophorida			<i>Rossella</i> sp. 1	Hexasterophora	n.a.	n.a.
<i>Geodia macandrewii</i>	Tetract.-Astrophorida			<i>Rossella</i> sp. 2	Hexasterophora	n.a.	n.a.
<i>Isops phlegraei</i>	Tetract.-Astrophorida		Tr	<i>Rossella</i> sp. 3	Hexasterophora	n.a.	n.a.
<i>Pachymatisma johnstonii</i>	Tetract.-Astrophorida			<i>Aulosaccus cf. mitsukui</i>	Hexasterophora		●
<i>Thenea muricata</i>	Tetract.-Astrophorida	●	Tr	Unknown sp. 7	Hexasterophora		●
<i>Tentorium semisuberites</i>	Tetract.-Hadromerida	●	Tr	<i>Sympagella nux</i>	Hexasterophora		Tr
<i>Antho dichotoma</i>	Ceract.-Poecilosclerida		○	<i>Sympagella</i> nov. sp.	Hexasterophora		○
<i>Clathria barleii</i>	Ceract.-Poecilosclerida		Tr	<i>Euplectella</i> sp.	Hexasterophora		Tr
<i>Hymedesmium</i> sp.	Ceract.-Poecilosclerida		Tr	Unknown sp. 8	Hexasterophora		●
Unknown sp. 1	Ceract.-Poecilosclerida		Tr	Unknown sp. 9	Hexasterophora		○
Unknown sp. 2	Ceract.-Poecilosclerida	●		Unknown sp. 10	Hexasterophora		Tr
<i>Forcepia forcipis</i>	Ceract.-Poecilosclerida		Tr	Unknown sp. 11	Hexasterophora		○
<i>Mycale lingua</i>	Ceract.-Poecilosclerida		Tr	<i>Farrea</i> (?) sp.	Hexasterophora		●
<i>Oceanapia robusta</i>	Ceract.-Haplosclerida		Tr	<i>Ipheton panicea</i>	Hexasterophora		Tr
<i>Haliclona</i> sp. 1	Ceract.-Haplosclerida		Tr	<i>Heterochone</i> sp.	Hexasterophora		○
<i>Haliclona</i> sp. 2	Ceract.-Haplosclerida		Tr	Unknown sp. 12	Hexasterophora		●
<i>Haliclona urceolus</i>	Ceract.-Haplosclerida		Tr	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidiscophora	●	
<i>Petrosia crassa</i>	Ceract.-Haplosclerida	○	Tr	<i>Hyalonema</i> sp. 2	Amphidiscophora	●	
<i>Hemigellius pumiceus</i>	Ceract.-Haplosclerida	Tr	○	Unknown sp. 13	Amphidiscophora	●	
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Ceract.-Halichondrida		●	Unknown sp. 14	Amphidiscophora	●	
<i>Phakellia robusta</i>	Ceract.-Halichondrida		●				
<i>Axinella rugosa</i>	Ceract.-Halichondrida		●				
<i>Axinella infundibul.</i>	Ceract.-Halichondrida		●				
<i>Spongosorites genitrix</i>	Ceract.-Halichondrida						
<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	Ceract.-Halichondrida	Tr	●				
<i>Dendrilla cirsioides</i>	Ceract.-Dendroceratida		Tr				
Unknown sp. 3	Ceract.-Dendroceratida		Tr				
Unknown sp. 4	Ceract.-Dendroceratida		Tr				
Unknown sp. 5	Ceract.-Dendroceratida		Tr				

Tabelle 5.6 Verteilung estergebundener TMTD (4,8,12-Trimethyltridecansäure) und Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) in Kaltwasserdemospongiae und Hexactinellida

Hohe Konzentrationen an TMTD zeigen die Phospholipidsäuren von *Thenea muricata* und des Hadromerida *Tentorium semisuberites*. Zudem enthält *Petrosia crassa* diese Isoprenoidsäure. Häufiger vertreten ist, wenn auch bei vielen Arten sehr untergeordnet, die Phytansäure. Diese findet sich in signifikanten Konzentrationen insbesondere in fünf der sechs Schwammpezies der Halichondrida und bildet eine der Hauptkomponenten der Fettsäuren von *Phakellia ventilabrum* und *Axinella rugosa*.

Isoprenoidsäuren in Vertretern der Hexactinellida

Tabelle 5.6 zeigt, dass alle analysierten Hexactinellida Phytansäure oder TMTD enthalten. So scheinen Hexactinellida der Unterklasse Hexasterophora ausschließlich Phytansäure, Vertreter der Amphidiscophora dagegen TMTD zu synthetisieren.

Diskussion

Tabelle 5.6 veranschaulicht die selektive Bevorzugung der Synthese einer Isoprenoidsäure (Phytansäure oder TMTD) in allen untersuchten Arten, wenn auch eine Exklusivität, wie von einigen Autoren vorgeschlagen (CARBALLEIRA *et al.*, 1987), nicht beobachtet werden konnte. So zeigen beispielsweise *Thenea muricata* und *Tentorium semisuberites* neben der dominanten TMTD auch geringe Konzentrationen an Phytansäure. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine mögliche Koexistenz beider Verbindungen (vgl. CHRISTIE *et al.*, 1992; BARNATHAN *et al.*, 1996).

Die Lipiddaten aller analysierten Arten verdeutlichen, dass Isoprenoidsäuren eine chemotaxonomische Relevanz besitzen. Vertreter der Demospongiae zeigen diesbezüglich die größten Varianzen. So scheinen einige Spezies keine oder nur untergeordnet Isoprenoidsäuren zu synthetisieren, andere Arten bestimmter Familien besitzen dagegen TMTD oder Phytansäure als Hauptbestandteil ihrer Lipidsäurefraktion. Schwämme der Familien Spirastrellidae und Clionidae (Ordnung Hadromerida) enthalten TMTD in hohen Konzentrationen, wie eine vergleichende Untersuchung an mehreren Arten dieser Taxa gezeigt hat (CARBALLEIRA *et al.*, 1989a). *Tentorium semisuberites*, ein Schwamm vom Sula-Rücken, der zur Ordnung Hadromerida gehört, enthält ebenfalls TMTD in hohen Konzentrationen, die darauf hindeutet, dass TMTD ein konstituierender Marker von Porifera dieser Ordnung in tropischen wie auch borealen Habitaten ist. Ein weiterer Produzent von TMTD ist *Petrosia crassa*, der zur Familie Petrosiidae gehört. Das Lipidsäureinventar von anderen Porifera der Gattung Petrosiidae ist bekannt und diesbezügliche Arbeiten zeigen, dass alle Arten dieser Gattung TMTD synthetisieren (AYANOGLU *et al.*, 1982; CARBALLEIRA and SHALABI, 1993). Die hohen Konzentrationen der Isoprenoidsäure in *Petrosia crassa* vom Sula-Rücken unterstreicht weiterhin, dass das Merkmal offensichtlich ubiquitär für Petrosiidae gilt und nicht auf tropische bzw. subtropische Organismen beschränkt ist. Zusätzlich wurden in einigen weiteren Schwämmen hohe Gehalte an TMTD nachgewiesen (z.B. in dem Astrophorida *Thenea muricata*). Allerdings fehlen publizierte Vergleichsdaten, um die chemotaxonomische Relevanz zu überprüfen. Im Gegensatz zur TMTD scheint das Vorkommen von Phytansäure bei Vertretern der Demospongiae dagegen weniger spezifisch. So ist Phytansäure aus einer Reihe von Demospongiaearten unterschiedlicher taxonomischer Position beschrieben (WALKUP *et al.*, 1981; CARBALLEIRA *et al.*, 1987; CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993; GARSON *et al.*, 1994; BARNATHAN *et al.*, 1996). Dennoch sind einige Taxa der Demospongiae für eine gruppenspezifische Häufung des Auftretens dieser Verbindung bekannt. Hierzu zählt die Ordnung Halichondrida, die in tropischen und subtropischen Vertretern eine Dominanz von Phytansäure in den Fettsäuren aufweist (z.B. CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993). Die Ergebnisse werden von den Daten dieser Studie unterstützt, denn in den in dieser Arbeit untersuchten Halichondrida wurden die höchsten Konzentrationen an Phytansäure beobachtet. Allerdings scheint dieses Merkmal nicht für alle

Halichondrida zu gelten, wie der Befund des Fehlens in *Spongosorites genitrix* dieser Studie und anderen Arten anderer Arbeiten zeigt (CARBALLEIRA *et al.*, 1987; GILLAN *et al.*, 1988; CHRISTIE *et al.*, 1994; BARNATHAN *et al.*, 1996).

Langkettige Isoprenoidsäuren, wie sie für drei endemische Süßwasserarten des Baikalsees beschrieben sind (REZANKA and DEMBITSKY, 1993), konnten in keinem Schwamm nachgewiesen werden.

In den Hexactinellida zeigt sich eine taxonomisch ausgeprägte Differenzierung von Isoprenoidsäuren auf einer niedrigen taxonomischen Ebene. So dominiert in der Unterklasse Hexasterophora Phytansäure, innerhalb der Amphidiscophora dagegen ist TMTD in hohen Konzentrationen und obligat enthalten. Die nachgewiesene Exklusivität der jeweiligen Verbindung verdeutlicht, dass Isoprenoidsäuren chemotaxonomische Aussagen für die Klasse der Hexactinellida ermöglichen, und unterstreicht zudem chemotaxonomisch die phylogenetische Abtrennung der Hexasterophora von den Amphidiscophora. Die Konsistenz der Verteilung von Isoprenoidsäuren bei den Hexactinellida gegenüber der größeren Varianz bei Vertretern der Demospongiae hebt die ancestrale phylogenetische Position der Hexactinellida hervor (s. Kap. 5.5 und THIEL *et al.*, 2002).

Wie oben beschrieben, wird als Herkunft der Isoprenoidsäuren der Schwammorganismus angenommen, da diese Verbindungen in seinen charakteristischen Phospholipidklassen angereichert sind (GARSON *et al.*, 1994). Der Ursprung der isoprenoidalen Vorläufer ist dagegen ungeklärt und geht möglicherweise auf assoziierte Mikroorganismen oder die Nahrung (marine Nahrungskette, Chlorophylldegradation) zurück. In Kapitel 6.3 werden diesbezügliche Zusammenhänge und schwammassoziierte Archaea als mögliche Quelle diskutiert.

5.1.5 Sonstige ungewöhnliche Fettsäuren

Allgemein

Neben den beschriebenen Carbonsäuren sind eine Reihe weiterer Verbindungen aus Schwämmen beschrieben, die teilweise hochkonzentriert in den Organismen vorkommen und durch ihre strukturellen Besonderheiten chemotaxonomische Relevanz besitzen.

So wurden von einigen Autoren α -substituierte Säuren beschrieben, die ansonsten in der Natur sehr selten vorkommen. Hierzu zählen strukturell variable, phospholipidgebundene α -Methoxy (MeO) und α -Hydroxy (OH) -LCFA, deren Hauptquelle marine Demospongiae sind. Der erste Nachweis für MeO-substituierte Varianten wurde für den axinelliden Schwamm *Higginsia tethyoides* erbracht, der eine Reihe entsprechender langkettiger, gesättigter und ungesättigter Verbindungen enthält (AYANOGLU *et al.*, 1983). In der folgenden Zeit sind weitere Schwämme, aber auch Rotalgen (*Schizymenia dubyi*) sowie Cyanobakterien (*Lyngba majuscula*) als Produzenten dieser Verbindungsklasse entdeckt worden, obwohl die α -Substitution auf Vertreter der Porifera beschränkt zu sein scheint (GERWICK *et al.*, 1987; CARBALLEIRA *et al.*, 1990; CARBALLEIRA *et al.*, 1992b; CARBALLEIRA and SEPULVEDA, 1992; BARNATHAN *et al.*, 1998; CARBALLEIRA *et al.*, 1998a; CARBALLEIRA *et al.*, 1998b; CARBALLEIRA and PAGÁN, 2001). Innerhalb dieser Komponentenklasse variieren die Kettenlängen deutlich. So wurden in den Halichondrida *Higginsia tethyoides* und *Topsentia roquensis* langkettige Säuren mit bis zu 28 C-Atomen nachgewiesen (AYANOGLU *et al.*, 1983; CARBALLEIRA *et al.*, 1992b). Deutlich häufiger sind kurzkettige Varianten aus Schwämmen publiziert, deren Vorkommen jedoch nicht auf bestimmte Ordnungen der Demospongiae begrenzt zu sein scheint (nachgewiesen in Spezies der Hadromerida, Poecilosclerida und Haplosclerida). Dieses vergleichsweise unspezifische Auftreten wird von einigen Autoren damit interpretiert, dass diese Verbindungen nicht vom Schwamm synthetisiert, sondern von SAM produziert werden (CARBALLEIRA and PAGÁN, 2001). Eine Funktion von α -MeO-Fettsäuren wurde bisher noch nicht nachgewiesen, wenn auch für kurzkettige glycerolgebundene Varianten eine antibiotische und antitumorale Wirkung beschrieben worden ist (CARBALLEIRA and PAGÁN, 2001 und Zitate darin).

Im Gegensatz zu α -MeO-Säuren, die in bakteriellen Lipiden bislang unbekannt sind, konnten strukturell verwandte α -OH-Äquivalente in einigen Eubakterien, wie z.B. Myxobakterien, nachgewiesen werden. Diese Verbindungen bilden jedoch auch eine weitere ungewöhnliche Klasse funktionalisierter Verbindungen in Schwämmen. Neben den weit verbreiteten kurzkettigen α - und β -OH-Carbonsäuren bakterieller Herkunft (z.B. ZELLES, 1997) sind langkettige α -OH-Lipidsäuren bislang ausschließlich von einigen Demospongiae bekannt (CARBALLEIRA and LOPEZ, 1989; CARBALLEIRA *et al.*, 1989b; CARBALLEIRA *et al.*, 1992a; CARBALLEIRA and SEPULVEDA, 1992). Entsprechende Arten gehören den Ordnungen Haplosclerida, Verongida und den Dendroceratida an. Vornehmlich handelt es sich bei den Verbindungen um gesättigte Säuren mit Kettenlängen bis zu 26 C-Atomen, wobei α -Hydroxydocosansäure (C₂₂) häufig vorherrschend ist (z.B. 42% der Lipidsäuren von *Amphimedon compressa*; CARBALLEIRA and LOPEZ, 1989). Die Rolle der α -OH-Funktionalisierung in Schwämmen ist unklar, wenn auch bekannt ist, dass sie aus dem Phosphatidylethanolamin stammen und somit offensichtlich Zellmembranbestandteile darstellen (CARBALLEIRA *et al.*, 1992a).

Neben den beschriebenen zusätzlich funktionalisierten Lipidsäuren besitzen einige zweifach ungesättigte Verbindungen mit spezifischen Doppelbindungspositionen Markercharakter innerhalb mariner Porifera. Hierzu zählen die in der Natur sehr seltenen $\Delta^{6,14}$ - und $\Delta^{6,11}$ -Lipidsäuren, die bislang aus je einem Schwamm nachgewiesen wurden (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989; CARBALLEIRA and SHALABI, 1990). Die erstgenannte Verbindung wurde bislang ausschließlich in dem homoscleromorphen Schwamm *Plakortis halichondroides* entdeckt. Hingegen sind für $\Delta^{6,11}$ -Lipidsäuren, neben dem beschriebenen dictyoceratiden Schwamm *Euryspongia rosea*, auch wenige nicht marine Quellen bekannt. So wurde $18\Delta^{6,11}$ als Bestandteil eines gram-negativen Bakteriums (*Alcaligenes* sp., β -Proteobacteria) und eines Ciliaten (*Tetrahymena rostrata*) gezeigt (KOROLY and CONNER, 1976). Auch für diese Verbindung sind Funktion und biosynthetischer Ursprung bisher unklar, wenngleich sie ausschließlich als Bestandteil der Phospholipide gefunden wurden. Die Quellorganismen besitzen offensichtlich sehr aktive und in der Natur seltene Δ^6 -Desaturasen, um diese Lipide zu bilden (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989).

Analytik

- α -MeO-Fettsäuren

Das charakteristische Fragment m/z 104 zur Identifizierung von α -MeO-Säuren resultiert aus Bruchstücken einer McLafferty-Umlagerung. Diese umfasst die Abspaltung der Methylester-inklusive der Methoxy-Gruppe und weicht deshalb um 30 *amu* von dem McLafferty-Fragment m/z 74 eines unsubstituierten Methylesters ab. Neben einem ECL-Wert, der ~ 0.22 über einem unsubstituierten Methylester liegt (CARBALLEIRA *et al.*, 1998a), ergeben zusätzliche Hinweise die massenspektrometrischen Daten der entsprechenden Pyrrolidide. Diese zeigen für α -MeO-substituierte Verbindungen als Hauptfragment m/z 143 (Massenspektrum s. Anhang D und in AYANOGLU *et al.*, 1983).

- α -OH-Fettsäuren.

Gegenüber α -MeO-substituierten Methylestern fehlt bei den α -OH-Äquivalenten m/z 104, sie weisen aber aus einer McLafferty-Umlagerung resultierende Fragmente bei m/z 103 und m/z 90 auf (CARBALLEIRA and LOPEZ, 1989). Charakteristika der massenspektrometrischen Fragmentierung von α -OH-Fettsäuremethylestern sind, neben einem relativ hohen Molekülion, hohe Fragmente bei $M^+ - 59$. Zudem ergeben die Pyrrolidide starke Fragmentationen von m/z 129, die aus der Abspaltung der α -OH- C_2 HOH-Pyrrolidingruppe herrühren (Massenspektrum s. Anhang D).

- $\Delta^{6,14}$ - und $\Delta^{6,11}$ -Carbonsäuren

Beide Verbindungen wurden anhand massenspektrometrischer Daten der Methylester bzw. ihrer Pyrrolidin-Derivate charakterisiert. Die zweifach ungesättigten ME zeigen bezüglich der gesättigten Äquivalente einen um 4 *amu* verringerten Molekülpeak. Die Doppelbindungspositionen wurden durch Pyrrolidin-Umsetzungen bestimmt. Diese ergeben für Derivate der $\Delta^{6,14}$ -ME und $\Delta^{6,11}$ -Carbonsäuremethylester typische Fragmentationen. So zeigen die entsprechenden Spektren für die erstgenannte Verbindung Erhöhungen der Fragmente m/z 304, 250, 194 und 140 (CARBALLEIRA and SHALABI, 1990), wohingegen $\Delta^{6,11}$ -Pyrrolidide hohe Fragmentationen bei m/z 262, 208, 194 und 140 aufweisen (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989) (Massenspektren s. Anhang D). Die massenspektrometrische Fragmentierung der als 6,14-Eicosadiensäure angesehenen Verbindung ist nicht so eindeutig, so dass die Positionen der Doppelbindungen auch anders festgelegt sein könnten (insbesondere bei dem entsprechenden Pyrrolidinderivat). Dennoch stimmt die Fragmentierung mit der von (CARBALLEIRA and SHALABI, 1990) überein, die die Komponente mit der obengenannten Struktur beschrieben haben.

Ergebnisse

Vorkommen weiterer ungewöhnlicher Fettsäuren in Kaltwasserdemospongien

Lipidgebundene α -MeO-Säuren wurden in fünf der untersuchten Schwämme gefunden. Diese gehören nahezu allen Ordnungen an (Astrophorida, Poecilosclerida, Haplosclerida und Halichondrida). Relativ verbreitet sind kurzkettenige Verbindungen wie α -MeO-16 Δ^5 in *Mycale lingua*, *Haliclona urceolus* und *Hymeniacidon aff. fallax*. Ferner konnte α -MeO-18 $\Delta^{2,2}$ nachgewiesen werden, die hochkonzentriert in *Haliclona* sp. 1 vorkommt.

In *Stryphnus ponderosus* konnte im Rahmen dieser Studie erstmals eine spezifische estergebundene α -MeO-Fettsäure beobachtet werden. Es handelt sich dabei um eine zweifach ungesättigte α -MeO-Säure mit der C-Anzahl 29. Das nicht eindeutig fragmentierende Pyrrolidin-derivat deutet auf Doppelbindungen an den Positionen 5 und 11 hin (Massenspektrum s. Anhang D). Diese Verbindung ist in hohen Konzentrationen in diesem Schwamm enthalten (s. Tab. im Anhang C) und spielt offensichtlich eine wichtige, aber bislang unbekannt Rolle in seiner Membranphysiologie.

In einigen Demospongien sind α -OH substituierte Carbonsäuren hochkonzentriert vorhanden (s. Tab. Anhang C). So ist in den Dendroceratida *Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 4 α -OH-C₂₂- und in Unknown sp. 3 α -OH-C₂₆-Fettsäure stark vertreten. Zudem ist in *Phakellia ventilabrum* und *Hemigellius pumiceus* jeweils eine α -OH-Säure mit 24 C-Atomen enthalten, deren genaue Struktur nicht charakterisiert werden konnte.

Carbonsäuren mit ungewöhnlichen Doppelbindungsmustern wurden in drei Schwämmen gefunden. So ist eine der Hauptverbindungen in *Plakortis* sp. die estergebundene Fettsäure 20 $\Delta^{6,14}$. Weiterhin kommen $\Delta^{6,11}$ -Carbonsäuren in dem Hadromerida *Tentorium semisuberites* (18 $\Delta^{6,11}$) und in dem Dendroceratida *Dendrilla cirsioides* (20 $\Delta^{6,11}$) vor.

Weitere ungewöhnliche Fettsäuren in Vertretern der Hexactinellida

Keiner der analysierten Hexactinellida verfügt über α -MeO-Carbonsäuren oder Verbindungen mit Doppelbindungsmustern, welche von denen 'konventioneller' Fettsäuren und LCFA $\Delta^{5,9}$ abweichen. Dagegen sind in den Hexactinellida α -OH-Verbindungen weit verbreitet. Sie sind in zwölf der 23 analysierten Arten enthalten. Vorherrschend ist α -OH-C₂₂, die in allen zwölf Spezies beobachtet wurde.

Diskussion

Der Vergleich des Vorkommens ungewöhnlicher Doppelbindungssignaturen, die von dem $\Delta^{5,9}$ -Grundmuster abweichen oder α -MeO bzw. α -OH-Substitutionen haben, zeigt, dass diese vermehrt in Schwämmen der Demospongiae vorkommen. So sind in den untersuchten Demospongiae strukturell unterschiedliche α -substituierte Fettsäuren und Verbindungen mit ungewöhnlichen Doppelbindungspositionen enthalten. Dagegen konnte in den Hexactinellida nur die Fettsäure α -OH-C₂₂ beobachtet werden, die jedoch in dieser Schwammklasse weit verbreitet ist.

Die in einigen Demospongiae vorgefundenen α -MeO-Fettsäuren sind in der Natur selten; ihr Produzent – Schwamm oder SAM – ist bislang ungeklärt (s.o). Das taxonomisch unspezifische Vorkommen in den untersuchten Arten und die Kurzkettigkeit der Hauptverbindung α -MeO-16 Δ^5 deutet jedoch für diese Komponenten auf einen Produzenten hin, der Bestandteil der SAM ist. Dies wird unterstrichen durch die Nachweise β -substituierter MeO-Fettsäuren aus Rotalgen (BARNATHAN *et al.*, 1998) und Cyanobakterien (GERWICK *et al.*, 1987), Organismengruppen, die als Bestandteile der SAM gelten (GILLAN *et al.*, 1988; HAACK *et al.*, 1994; FRIEDRICH *et al.*, 1999). Hingegen ist in *Stryphnus ponderosus* mit α -MeO-29 $\Delta^{5,11}$ eine Verbindung enthalten, deren Kettenlänge auf den Schwamm als Produzenten deutet. Entsprechend langkettige Lipidsäuren sind für Mikroorganismen bisher nicht beschrieben, weshalb Prokaryoten als Quelle dieser Verbindungen eher ausscheiden. Nachweise solcher langkettigen α -MeO-Verbindungen aus Schwämmen sind bislang rar, so dass zur Beurteilung ihrer chemotaxonomischen Relevanz ausreichende Daten fehlen. Nur in *Higginsia tethyoides* (Ordnung Halichondrida; AYANOGLU *et al.*, 1983) wurden ähnliche Verbindungen wie in *Stryphnus ponderosus* (Ordnung Astrophorida) entdeckt.

Dagegen sind α -OH-Carbonsäuren in der Natur relativ häufig vertreten und kommen u.a. in einer Reihe von Mikroorganismen vor. Unterschieden werden können kurzkettige Verbindungen aus Eubakterien (ZELLES, 1997) und langkettige Säuren, die ausschließlich von Schwämmen bekannt sind. Diese sind in einigen Ordnungen der Demospongiae vertreten, bilden jedoch innerhalb der Hexactinellida eine verbreitete Komponentenklasse. Die Säure mit der Struktur α -OH-C₂₂ scheint hier besonders verbreitet zu sein (CARBALLEIRA and LOPEZ, 1989) und bildet innerhalb der untersuchten Arten die am höchsten konzentrierte α -OH-Carbonsäure. Eine Häufung von Hydroxysäuren innerhalb der analysierten Demospongiae tritt bei den Dendroceratida auf; für drei von vier ihrer Vertreter sind diese Verbindungen belegt. Allerdings enthalten auch andere Schwämme α -OH-Carbonsäuren. Möglicherweise ist das Auftreten von α -OH-Fettsäuren nicht auf bestimmte taxonomische Gruppen beschränkt, sondern hat bislang ungeklärte membranphysiologische Ursachen.

Sehr außergewöhnlich ist eine von CARBALLEIRA and SHALABI (1990) entdeckte Fettsäure, deren Doppelbindungen ein $\Delta^{6,14}$ -Muster aufweisen. Der Schwamm, für den diese einzigartige Verbindung beschrieben wurde, ist der Homosclerophorida *Plakortis halichondroides*. Auch der in dieser Untersuchung analysierte verwandte Schwamm *Plakortis* sp. synthetisiert in hohen Konzentrationen eine 20 $\Delta^{6,14}$ -Carbonsäure. Somit scheint diese Fettsäure ein 'Bioindikator' innerhalb der Homosclerophorida (Familie Plakinidae) zu sein und unterstreicht damit zusätzlich die vorgeschlagene phylogenetische Sonderposition der Homoscleromorpha innerhalb der Kieselschwämme (REITNER and KEUPP, 1989).

Wie oben beschrieben, synthetisieren zwei Spezies der Kaltwasserdemospongiae sehr ungewöhnliche $\Delta^{6,11}$ -Fettsäuren, die bisher u.a. in einem gram-negativen Bakterium und einem Ciliaten nachgewiesen wurden. Innerhalb von Invertebraten wurde bisher ausschließlich der Schwamm *Euryspongia rosea* als Quelle dieser Verbindung beschrieben (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei weitere Arten der Demospongiae als Quelle dieser Verbindungsklasse identifiziert werden. Es handelt sich dabei um *Dendrilla cirsioides* und *Tentorium semisuberites*. Wenngleich der Produzent dieser Verbindung unklar ist, könnte sie ein lipidchemisches Relikt der frühphylogenetischen Entwicklung

der Stammlinie Porifera sein. Darauf deutet das oben beschriebene Vorkommen von $\Delta^{6,11}$ -Säuren in Protozoa (begeißelte Einzeller), die von einige Autoren als evolutionäre Vorläufer von Schwämmen gelten (KANESHIRO, 1987; DEMBITSKY *et al.*, 1989). Denkbar ist allerdings auch die Anwesenheit spezifischer, eubakterieller SAM, die in einigen Schwammspezies exklusiv vertreten sind.

5.1.6 Plasmalogene (1-O-alk-1-enyl-2-acyl-Glycerophospholipide)

Allgemein

Vertreter der Demospongiae weisen neben esterbasierten Phospholipiden eine Reihe von Mono- und Dialkylethern auf, die beispielsweise in *Tethya aurantia* bis zu 40% der Phospholipidfraktion ausmachen können (SMITH and DJERASSI, 1987). Den Hauptanteil der Etherlipide in Porifera bilden 1-O-alk-1-enyl-2-acyl-Glycerophospholipide, die sog. Plasmalogene (Abb. 5.11). Plasmalogene sind aus einer Reihe natürlicher Quellen beschrieben. So sind sie wichtige Bestandteile des zentralen Nervensystems, des Herzens und der Skelett-Muskulatur höherer Tieren und sind auch in anaeroben Eubakterien verbreitet (GOLDFINE and LANGWORTHY, 1988; DEMBITSKY *et al.*, 1989). Ferner wurden hohe Gehalte an alkylacyl-Glycerophospholipiden in den Ciliophora (Protozoa) *Tetrahymena* und *Paramecium* nachgewiesen (KANESHIRO, 1987; DEMBITSKY *et al.*, 1989), und auch in Schwämmen sind diese Etherlipide wichtige Bestandteile der Phospholipide. Eine detaillierte Studie zur Zusammensetzung der Phospholipide von 19 Arten mariner Demospongiae hat gezeigt, dass Plasmalogene auch in Schwämmen in allen enthaltenen Phospholipidklassen (PE, PC, PS) vorkommen (DEMBITSKY *et al.*, 1989). Auch in Süßwasservertretern dieser Klasse und in Calcarea sind Alkenylether verbreitet (DEMBITSKY *et al.*, 1991; CARBALLEIRA and SHALABI, 1995). Ein direkter Nachweis von Plasmalogenen in Schwämmen wurde in einer Reihe von Untersuchungen der Gruppe um Dembitsky erbracht, die mit Hilfe von Mikro-Dünnschichtchromatographie eine Auftrennung von Plasmalogenen (vinylische alkylacyl-Glycerolephospholipide), nicht vinylischen alkylacyl- und diacyl-Phospholipiden erzielte (DEMBITSKY, 1988). Häufiger werden dagegen – nach acidisch-methanolischer Präparation – Plasmalogenderivate, die Dimethylacetale, detektiert. Diese können massenspektrometrisch charakterisiert werden und geben so Informationen zu Konzentrationen und Struktur von Vinylketten, die Plasmalogenen entstammen (CARBALLEIRA *et al.*, 1992a).

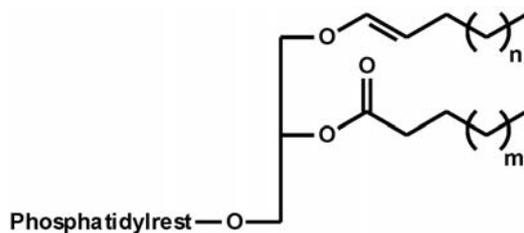


Abbildung 5.11 1-O-alk-1-enyl-2-acyl-Glycerophospholipid (Plasmalogen)

breitet (GOLDFINE and LANGWORTHY, 1988; DEMBITSKY *et al.*, 1989). Ferner wurden hohe Gehalte an alkylacyl-Glycerophospholipiden in den Ciliophora (Protozoa) *Tetrahymena* und *Paramecium* nachgewiesen (KANESHIRO, 1987; DEMBITSKY *et al.*, 1989), und auch in Schwämmen sind diese Etherlipide wichtige Bestandteile der Phospholipide. Eine detaillierte Studie zur Zusammensetzung der Phospholipide von 19 Arten mariner Demospongiae hat gezeigt, dass Plasmalogene auch in Schwämmen in allen enthaltenen Phospholipidklassen (PE, PC, PS) vorkommen (DEMBITSKY *et al.*, 1989). Auch in Süßwasservertretern dieser Klasse und in Calcarea sind Alkenylether verbreitet (DEMBITSKY *et al.*, 1991; CARBALLEIRA and SHALABI, 1995). Ein direkter Nachweis von Plasmalogenen in Schwämmen wurde in einer Reihe von Untersuchungen der Gruppe um Dembitsky erbracht, die mit Hilfe von Mikro-Dünnschichtchromatographie eine Auftrennung von Plasmalogenen (vinylische alkylacyl-Glycerolephospholipide), nicht vinylischen alkylacyl- und diacyl-Phospholipiden erzielte (DEMBITSKY, 1988). Häufiger werden dagegen – nach acidisch-methanolischer Präparation – Plasmalogenderivate, die Dimethylacetale, detektiert. Diese können massenspektrometrisch charakterisiert werden und geben so Informationen zu Konzentrationen und Struktur von Vinylketten, die Plasmalogenen entstammen (CARBALLEIRA *et al.*, 1992a).

Analytik

Die Charakterisierung von vinylethergebundenen Alkylketten (aus Plasmalogenen) wurde mit Hilfe der methanolischen Transveresterung durchgeführt. Plasmalogene reagieren unter sauer

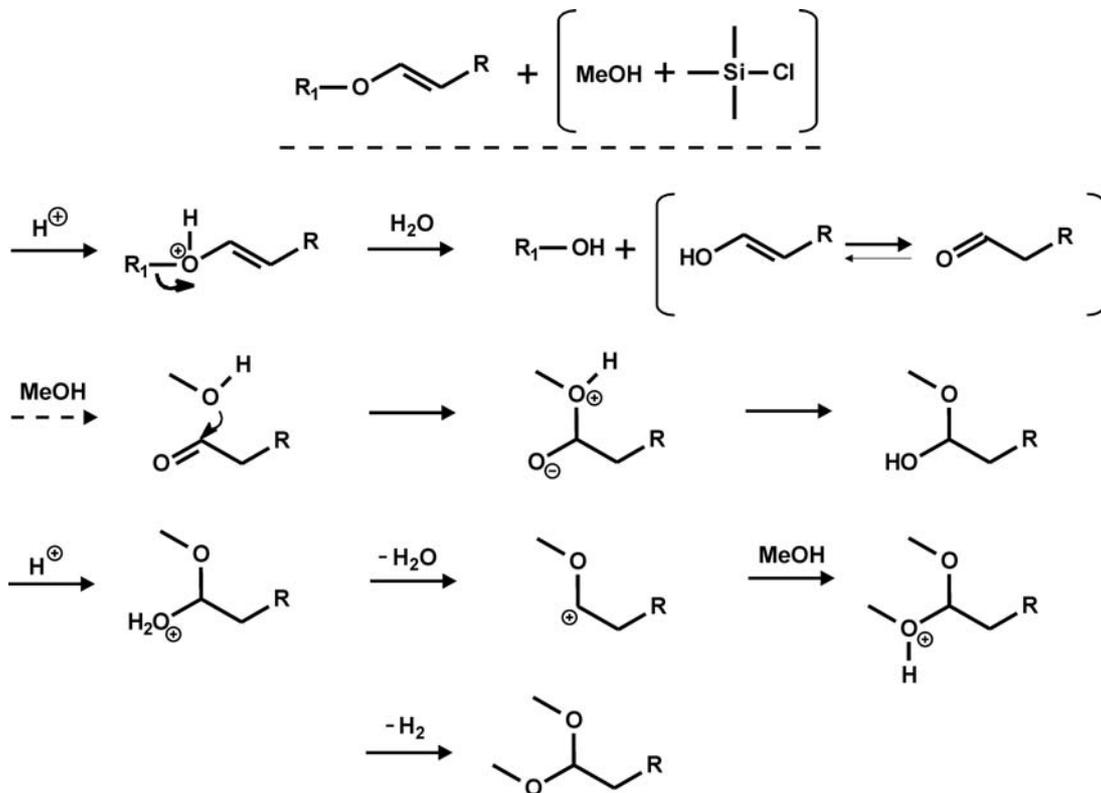


Abbildung 5.12 Schematischer Ablauf der Vinyletherspaltung (Plasmalogene) mit Hilfe von TMCS/MeOH über Aldehyde zu Dimethylacetalen

hydrolytischen Bedingungen (TMCS-Transveresterung) über Aldehyde zu den entsprechenden Dimethylacetalen und sind so massenspektrometrisch detektierbar (Schema in Abb. 5.12 und in CARBALLEIRA *et al.*, 1992a; MACPHERSON *et al.*, 1998).

Diese Methode wurde im Rahmen dieser Studie modifiziert und anhand eines authentischen Plasmalogenstandards (Fa. BIOTREND, Plasmalogen Phosphatidylethanolamine, lyso-, Alkenyl-LPE) auf ihre Eignung überprüft. Ähnlich der sauer hydrolytischen Umsetzung mit methanolischer HCl führt dieses sehr rasche Verfahren zu GC/MS-detektierbaren Dimethylacetalen. Solche Dimethylacetale zeigen einen schwachen Molekülionenpeak und deutliche Fragmente bei $M^+ - 32$ und $M^+ - 64$. Die Hauptfragmente m/z 75 bzw. m/z 71 resultieren aus der McLafferty-Umlagerung der funktionellen Gruppe ($C_3H_7O_2^+$, $C_4H_7O^+$). Dimethylacetale eluieren gaschromatographisch etwa 0.5 ECL-Einheiten nach dem entsprechenden Säuremethylester gleicher Kettenlänge und geben so zusätzliche strukturelle Informationen (CARBALLEIRA and SHALABI, 1993).

Die Effektivität der Umsetzung von Plasmalogenen zu Dimethylacetalen wurde nicht überprüft, daher wird auf Angaben zur genauen Konzentration einzelner Verbindungen verzichtet.

Ergebnisse*Plasmalogene in den Kaltwasserdemospongien*

Nahezu alle untersuchten Demospongiae weisen Gehalte an Dimethylacetalen, die aus der Plasmalogenerspaltung stammen, auf. In Tabelle 5.7 ist das qualitative Vorkommen gerad- und

ungeradkettiger Dimethylacetale zusammengefasst, die enthaltenen Hauptverbindungen und Schwämme mit hohen Gehalten sind hervorgehoben.

Dimethylacetale (aus Plasmalogenen)	Porifera (Demospongiae)
ungerade Alkylketten (vornehmlich 23, 25, 25 Δ^3)	<i>Stryphnus ponderosus</i> <i>Dragmastra normanii</i> <i>Geodia barretti</i> <i>Isops phlegraei</i> <i>Pachymatisma johnstoni</i> <i>Haliclona</i> sp. 1 <i>Petrosia crassa</i> <i>Spongosorites genitrix</i> <i>Thenea muricata</i>
gerade Alkylketten (vornehmlich 22 Δ^2 , 22, 24 Δ^2)	<i>Tentorium semisuberites</i> <i>Antho dichotoma</i> <i>Clathria barleii</i> <i>Hymedesmium</i> sp. <i>Forcepia forcipis</i> <i>Mycale lingua</i> <i>Haliclona urceolus</i> <i>Hemigellius pumiceus</i> <i>Phakellia ventilabrum</i> <i>Hymeniacion aff. fallax</i> <i>Dendrilla cirsioides</i> Unknown sp. 3 Unknown sp. 4 Unknown sp. 5

Tabelle 5.7 Dimethylacetale (aus Plasmalogenen) in Kaltwasserdemospongien (fett=sehr hohe Gehalte)

Die Kettenlängen der am häufigsten vorkommenden Alkylketten, die aus den vinyllischen Alkenylethern freigesetzt wurden, variieren zwischen 22 und 25 Kohlenstoffatomen. Die häufigsten Verbindungen sind gesättigte mit 23 C-Atomen und einfach ungesättigte Komponenten mit der C-Anzahl 22. Kurzkettige Homologe wurden nur untergeordnet beobachtet.

Plasmalogene in Vertretern der Hexactinellida

Alkenylketten aus der Plasmalogen-spaltung konnten in den Hexactinellida nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Vorherrschend sind kurzkettige Äquivalente mit Kettenlängen von 12 bis 18 C-Atomen, die in Unknown sp. 5 und Unknown sp. 10 mit den höchsten Gehalten auftreten. Entsprechende länger-kettige Varianten zeigen ausschließlich die Lipide von *Sympagella* nov. sp., deren Plasmalogene insbesondere durch das Vorkommen von 24 Δ^2 gekennzeichnet sind.

Diskussion

Anhand der eingesetzten Transveresterungsmethode (TMCS/MeOH) ist der Nachweis vinyl-ethergebundener Alkylketten (Plasmalogene) möglich. Es zeigte sich, dass das Verfahren – bei deutlich geringerem analytischen Aufwand – ähnliche Ergebnisse wie die von anderen Autoren durchgeführte HCl/MeOH-Derivatisierung liefert (CARBALLEIRA and RODRIGUEZ, 1991; CARBALLEIRA *et al.*, 1992a).

Wie oben dargestellt sind Demospongiae und auch Calcarea als Quelle von Plasmalogenen bekannt. Entsprechende Daten zu den Hexactinellida fehlen bislang. Die in dieser Studie untersuchten Demospongiae scheinen Vinyl ether als wichtige Membranbestandteile der Phospholipide zu enthalten. Die Ergebnisse bestätigen die hohen Plasmalogengehalte, die aus Kaltwasserdemospongiae der Barent- und der Weißen See festgestellt worden sind (DEMBITSKY *et al.*, 1989). Ähnliche relative Gehalte an Plasmalogenen, Alkylacyl- und Acylacylkomponenten in den Phospholipiden, wie sie durch (DEMBITSKY *et al.*, 1989) beobachtet wurden, konnten auch in Ciliophora festgestellt werden (KANESHIRO, 1987). Diese gelten als phylogenetische Vorfahren der Porifera. Demzufolge wurde vorgeschlagen, dass Plasmalogene Relikte ancestralen Lipidaufbaus sind und sukzessive durch steigende Sauerstoffkonzentrationen in den Ozeanen aus Etherlipiden (Archaea), über alkylacyl- zu den heute vorherrschenden diacyl-Phospholipiden oxidiert wurden (DEMBITSKY *et al.*, 1989). Schwämme und Ciliophora repräsentieren demnach urzeitliche Strategien der Lipidsynthese (vgl. Nachweis der Ciliophora-Biomarker $\Delta^{6,11}$ -Carbonsäure in *D. cirsioides* und *T. semisuberites*, Kap. 5.1.5). Das nur untergeordnete Auftreten von Plasmalogenen in Vertretern der wahrscheinlich ursprünglichsten Porifera – den Hexactinellida – und die hohen Gehalte in den phylogenetisch progressiveren Demospongiae ist beim Zugrundelegen der wahrscheinlichen phylogenetischen Zusammenhänge verwunderlich. Denkbar ist jedoch, dass das Fehlen von Plasmalogenen in den Hexactinellida mit ihrer syncytialen Zellstruktur zusammenhängt.

Plasmalogene sind auch aus anaeroben Eubakterien beschrieben, in denen sie neben acylacyl-Glycerophospholipiden vorkommen. Allerdings deuten die hohen Kettenlängen der beschriebenen Alkenylether (22–25 C-Atome) in den Demospongiae eher darauf hin, dass es sich um von Schwammzellen produzierte Verbindungen handelt. Denkbar ist jedoch, analog den LCFA $\Delta^{5,9}$, eine Verwendung kurzkettiger Fettsäuren aus SAM. Dafür spricht das Vorherrschen ungeradkettiger Plasmalogenderivate in Schwämmen, deren SAM von anaeroben SAM dominiert werden. Diese Bakterien synthetisieren bevorzugt endständig und mittkettig verzweigte Fettsäuren und erhalten dadurch Verbindungen mit ungerader Kohlenstoffanzahl in der Kette. Möglicherweise stellen diese Verbindungen den Ursprung der Schwammplasmalogene dar. Allerdings bedarf die Klärung dieses biosynthetischen Zusammenhangs weiter gehender Studien.

5.2 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Steroide

Allgemein

Marine Invertebraten gelten als reichhaltige Quelle strukturell vielfältiger Steroide, und innerhalb dieser Organismengruppe weisen Schwämme die größte Diversität dieser Verbindungsklasse auf (DJERASSI and SILVA, 1991; AIELLO *et al.*, 1999). Die dabei auftretenden Variationen des 'konventionellen' Cholest-5en-3 β -ol-Grundkörpers (Cholesterin) umfassen Modifikationen des Ringgerüsts, der Seitenkette bzw. der Funktionalität und sind aus einer Vielzahl mariner Porifera beschrieben (z.B. BERGMANN and SWIFT, 1951; DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE and SODANO, 1974b; a; FATTORUSSO *et al.*, 1975; KHALIL *et al.*, 1980; PATIL *et al.*, 1996a; s. Reviews von KERR and BAKER, 1991 und AIELLO *et al.*, 1999).

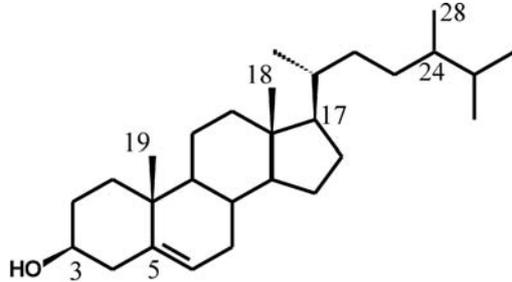


Abbildung 5.13 Grundgerüst eines 'konventionellen' Sterols (Ergosterol; Ergost-5en-3 β -ol; 28 $\Delta^{5,24(28)}$)

Als Quelle von Steroiden in Porifera werden vier Möglichkeiten angenommen, die (i) *de novo*-Biosynthese, (ii) die Nahrung, (iii) die Modifikation von Sterolen der Nahrung und (iv) die *de novo*-Biosynthese durch assoziierte Mikroorganismen (GOAD, 1981). Diese Unterscheidung basiert auf Studien mit radiomarkierten Substanzen (^{14}C -Acetat und ^{14}C -Mevalonat), anhand derer für einige Schwammspezies eine *de novo*-Biosynthese nachgewiesen und für andere widerlegt werden konnte. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Taxon und der Fähigkeit zur *de novo*-Sterolsynthese aufgezeigt werden. Offensichtlich zeigen selbst Arten der gleichen Gattung diesbezüglich Unterschiede (DJERASSI and SILVA, 1991). In der Folge wurden deshalb detailliertere Untersuchungen durchgeführt. So zeigte sich, dass einige Schwämme, deren Fähigkeit zur *de novo*-Steroidsynthese in früheren Studien widerlegt wurde, bei Einsatz des Edukts Squalen sehr wohl zur *de novo*-Sterolsynthese in der Lage waren (SILVA *et al.*, 1991). Die Autoren führten diese Unterschiede auf die Untauglichkeit von Acetat und Mevalonat als Vorläufer zur Steroidbildung zurück. Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass die *de novo*-Sterolsynthese – ausgehend von unterschiedlichen Vorläufermolekülen – der dominante Prozess in Schwämmen ist (KERR and BAKER, 1991).

Generell verläuft die *de novo*-Sterolsynthese höherer Eukaryoten ausgehend vom Squalen zum Lanosterol (4,4,14-Trimethylcholesta-8,24-dien-3 β -ol), das nachfolgend enzymatisch über etwa 20 Zwischenschritte (u.a. Squalen-2,3-oxid) zum Δ^5 -ungesättigten Cholesterin modifiziert wird (Abb. 5.14; NES and MCKEAN, 1977). Diese Konversion des Lanosterols zu einem Δ^5 -4-Desmethylsterol in höheren Tieren (und Pilzen) benötigt unter anderem die Eliminierung der Methylgruppen an Position C₄ und C₁₄. Der Verlust der Methylgruppen an C₄ erfolgt sequenziell durch die Oxidation mit Hilfe eines mikrosomalen Oxygenase-Systems (unter Beteiligung von Cytochrome b₅). Der dabei ablaufende Prozess führt zur Bildung eines Alkohols, eines Aldehyds und einer Carboxygruppe, welche abschließend als CO₂ abgespalten wird. Dies wird erleichtert durch die zwischenzeitliche Generierung einer 3-oxo-Gruppe, deren Wiederholung auch zur Abspaltung der zweiten 4-Methylgruppe führt (GOAD and AKI-

HISA, 1997). Die Einführung der Δ^5 -Doppelbindung erfolgt dann enzymatisch durch eine Umlagerung von Δ^8 an die Position Δ^7 , um über die Zwischenprodukte $\Delta^{5,7}$ und Δ^7 zur ubiquitären Δ^5 -Struktur abzuschließen (NES and MCKEAN, 1977).

Eine weitere Möglichkeit der Synthese von Δ^7 -Sterolen als die oben dargestellte ist aus einigen marinen Asteroidea (Echinodermata) beschrieben (*Asterias rubens* und *Porania pulvillus*). Diese nutzen offensichtlich Cholesterin aus der Nahrung, um über mehrere Zwischenprodukte – Δ^4 -Steroid-3-on \rightarrow Δ^0 -Steroid-3-on \rightarrow 5 α (H)-Cholestan-3 β -ol – zu dem in diesen Organismen vorherrschenden 5 α (H)-Cholesta-7-en-3 β -ol zu gelangen.

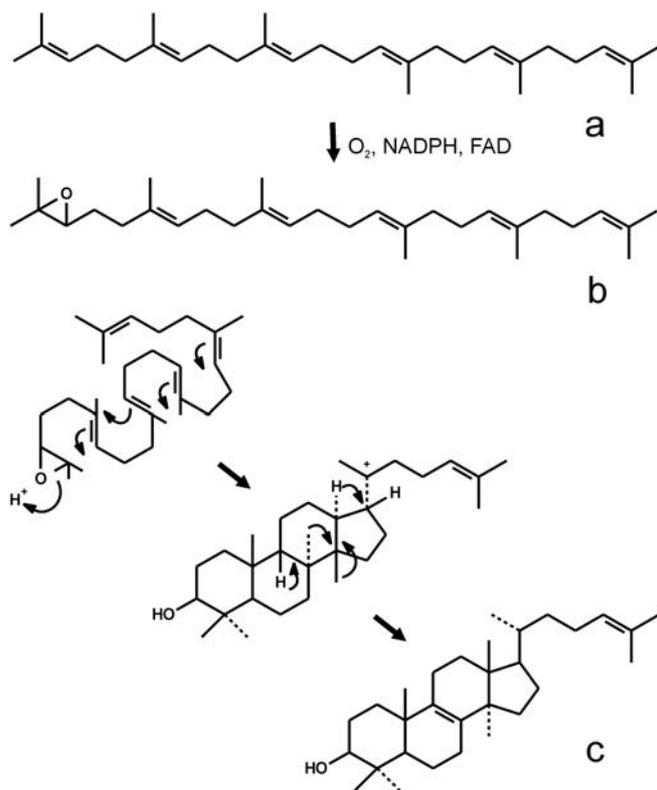


Abbildung 5.14 Cyclisierung von Squalen (a) über Squalen-2,3-oxid (b) zum Lanosterol (c) in eukaryotischen Organismen (leicht verändert nach GOAD and AKIHISA, 1997)

Als Funktion von Sterolen in Organismen gilt generell ihre membranstabilisierende Eigenschaft. Während Prokaryoten die Zellmembraneigenschaften durch Variation der Doppelbindungszahl und der Länge der Fettsäureketten regulieren, ist es bei Eukaryoten das Cholesterin, das in die Lipiddoppelschichten eingelagert wird (STRYER, 1995). In den Membranen reduzieren die zwischengeschalteten Cholesterinmoleküle den effektiven Bereich (sog. 'condensing effect') der Phospholipide und justieren dadurch neben der Fluidität auch deren Permeabilität. Generell benötigen Sterole zur Gewährleistung der oben genannten Eigenschaften in Membranen strukturelle Voraussetzungen, und zwar eine 3 β -Hydroxy-Gruppe, eine C₁₈- und eine C₁₉-Methylgruppe, eine 17 β - und 20R-

Konfiguration und eine Seitenkette mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen (Abb. 5.13; s. DJERASSI and LAM, 1991 und Zitate darin). Jedoch scheinen einige Schwämme Sterole zu synthetisieren, die von diesen Kriterien deutlich abweichen und damit ein Einlagern in eine konventionelle Lipiddoppelschicht erschweren. Weil Schwämme neben ungewöhnlichen Sterolen zudem einzigartige LCFA $\Delta^{5,9}$ synthetisieren, wurde angenommen, dass diese beiden Substanzklassen in den Membranen nebeneinander vorliegen. Dem entgegen steht jedoch, dass auch eine Reihe von Schwämmen beschrieben sind, die zwar ungewöhnliche Membransäuren, aber ausschließlich 'konventionelle' 24-alkylierte Sterole enthalten (z.B. BERGQUIST *et al.*, 1984; BERGQUIST *et al.*, 1986). Dieses Fehlen ungewöhnlicher Sterole bei gleichzeitigem Vorkommen von LCFA $\Delta^{5,9}$ und eine Reihe von modellbasierten Studien ergaben sogar, dass beide nicht gemeinsam in Schwammzellmembranen vorliegen können. Dies widerspricht der ur-

sprünglichen Annahme (s. DJERASSI and LAM, 1991 und Zitate darin). Mehr noch scheinen, langkettige Lipidsäuren mit der (*cis,cis*)- $\Delta^{5,9}$ -Doppelbindungssignatur in einer Lipiddoppelschicht zu einem Ausschluss von Sterolen ('unkonventionelle' Sterole und Cholesterin) zu führen, so dass eher von einer Koexistenz von Sterolen mit kurzkettigen Lipidsäuren in den Membranen der Schwämme auszugehen ist (DAI *et al.*, 1991).

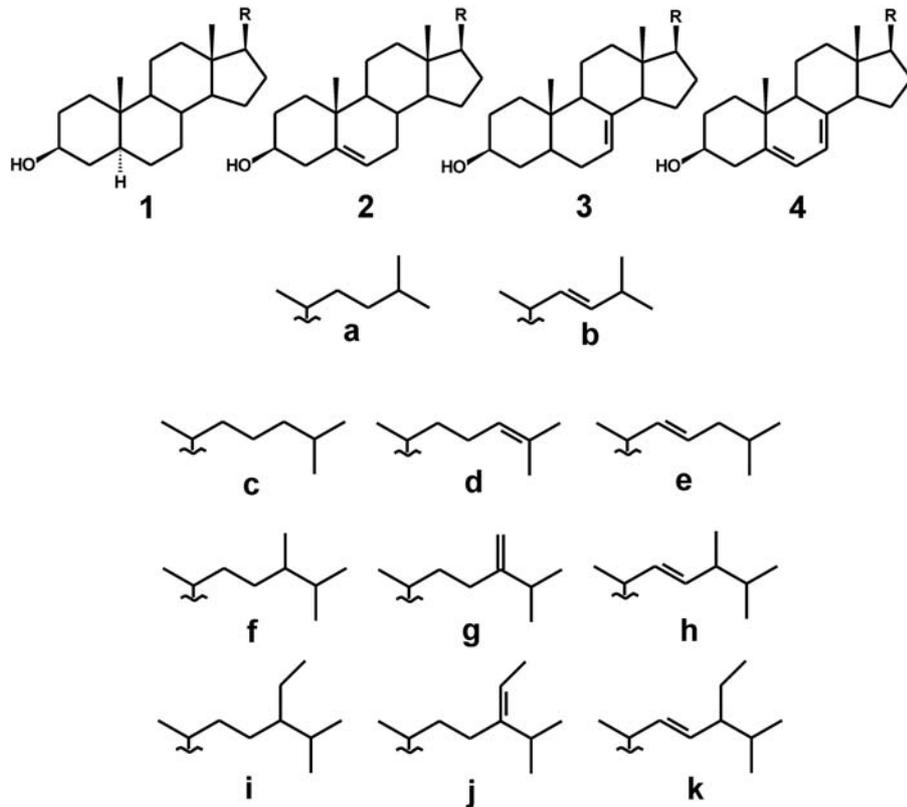


Abbildung 5.15 Übersicht über die Steroidstrukturen aus Kaltwasserdemospongien (nur 'konventionelle' Steroide); Legende der Abkürzungen und Auftreten in den untersuchten Arten in Tab. 5.8

Neben den Studien zur Biosynthese und zur Funktion von Sterolen in Eukaryoten wurde schon frühzeitig die Komplexität der Sterolzusammensetzung in einigen Schwammtaxa zur chemotaxonomischen Klassifizierung genutzt. So wurden in den letzten dreißig Jahren umfassende Studien durchgeführt, die die taxonomische Relevanz von Steroiden in der Klasse Demospongiae zum Gegenstand hatten (DE ROSA *et al.*, 1973; BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1986). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass Unterschiede in der Seitenkette und im Ringgerüst auftreten, die in ihrer Spezifität zum Teil auf einige taxonomische Gruppen beschränkt sind. In weiter gehenden Studien zeigte sich jedoch, dass in einigen Arten verschiedener Taxonomie die Varianzen nicht signifikant und Gemeinsamkeiten innerhalb spezifischer Taxa nicht ausgeprägt sind. Dies führte dazu, dass einige Autoren Sterolen nur bedingte Eignung zur chemotaxonomischen Klassifizierung zuschrieben (DUMDEI *et al.*, 1998) bzw. insgesamt für ungeeignet befanden (VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999). Als anerkannt gelten jedoch sog. '*fingerprintings*' auf einer hohen taxonomischen Ebene (Spezies) sowie das Auftreten charakteristischer unkonventioneller Steroide, die ausschließlich distinkte Taxa synthetisieren. Hierzu zählen beispielsweise Sterole mit cyclopropylsubstituierter Seitenkette, die vornehmlich aus der Ordnung Haplosclerida beschrieben

sind, und die seltenen, bislang ausschließlich in einigen Axinellidae nachgewiesenen 19-Norstanole (DE ROSA *et al.*, 1975; SICA and ZOLLO, 1978).

Wie erwähnt, gelten Porifera als reichhaltige Quelle komplexer Steroide. Entsprechende Studien basieren allerdings nahezu ausschließlich auf Daten zu Schwämmen der Klassen Demospongiae und Calcarea. Hingegen beschäftigt sich nur eine Arbeit mit den Steroiden zweier Hexactinellida (*Symplectella rowi* und *Rossella ijimae*), in denen u.a. seltene Steroidketone nachgewiesen werden konnten (GUELLA *et al.*, 1988). Umfassende Steroiduntersuchungen innerhalb dieser ancestralen Poriferaklasse und eine Abschätzung der chemotaxonomischen Aussagekraft fehlen bislang.

Im Folgenden wird erstmalig die Verteilung ‚konventioneller‘ und ‚unkonventioneller‘ Steroide in Kaltwasserdemospongiae und Hexactinellida beschrieben. Die strukturelle Charakterisierung der Steroide erfolgte anhand von Massenspektren und durch den Vergleich des Elutionsverhaltens mit synthetischen Standards (s. Methodik im Anhang B).

5.2.1 Sterole in Kaltwasserdemospongien

Alle 32 untersuchten Kaltwasserdemospongiae enthalten Sterole in hohen Konzentrationen (Tab. 5.8). Insgesamt fasst die Tabelle das Auftreten von 45 Verbindungen zusammen, von denen 37 massenspektrometrisch identifiziert wurden (z.T. als ihre Trimethylsilylether; BSTFA) und für die restlichen eine vorläufige Struktur bestimmt worden ist. Nicht aufgeführt wurden Sterole, deren Struktur nicht weiter eingegrenzt werden konnte und/oder die nur in sehr geringen Konzentration in den Schwämmen vorlagen. Die Differenzierung der durch asymmetrische Kohlenstoffzentren bedingten unterschiedlichen Konfigurationen in der Seitenkette war nicht möglich, da diese identische Eigenschaften bei der GC/MS-Analyse aufweisen (BERGQUIST *et al.*, 1980).

'Konventionelle' Sterole

In Tabelle 5.8 ist das Vorkommen der 'konventionellen' Sterole der Schwämme des Norwegenschelfs dargestellt. Abbildung 5.15 zeigt ergänzend die Strukturen mit strukturellen Variationen des Cholesterolgrundgerüsts (Seitenkette, Alkylierung im Ringsystem und Anzahl und Positionen der Doppelbindungen).

Die Kohlenstoffgerüste variieren in der Kohlenstoffanzahl von C_{25} bis C_{30} , weisen allerdings ein deutliches Maximum zwischen C_{27} und C_{29} auf (Tab. 5.8). Innerhalb der Tetractinomorpha liegt nur in *Thenea muricata* ein Sterol in signifikanten Konzentrationen mit einer Kohlenstoffanzahl $<C_{27}$ vor. Hingegen weisen mehrere ceractinomorphe Schwämme erhöhte Konzentrationen an 24-Norcholesta-5,22-dien-3 β -ol auf (Abb. 5.15; Struktur **2b**). Die massenspektrometrische Charakterisierung mit Hilfe von Trimethylsilylderivatisierungen zeigt, dass alle Sterole eine Hydroxygruppe an Position C_3 enthalten und die größte Verbreitung in den untersuchten Spezies Δ^5 -ringungesättigte Sterole ausmachen (Fragmente $M^+ - 85$; $M^+ - 111$). Weiterhin finden sich hohe Konzentrationen an seitenkettenungesättigten Δ^{22} - und $\Delta^{24(28)}$ -Steroiden, die in einigen Spezies deutlich dominieren (*Stryphnus ponderosus*, *Geodia barretti*, *Geodia macandrewii*, *Isops phlegraei*, *Thenea muricata*, *Mycale lingua* und *Oceanapia robusta*). Zweifach ringungesättigte Sterole ($\Delta^{5,7}$) wurden nur in wenigen Arten der Ceractinomorpha nachgewiesen (*Phakellia ventilabrum*, *Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 4) und fehlen in den untersuchten Tetractinomorpha gänzlich. Die massenspektrometrische Identifizierung dieser Verbindungen ist anhand der charakteristischen Ringfragmente m/z 128, 143 und 158 möglich (GOAD and AKIHISA, 1997).

Gesättigte Sterole (v.a. 5 α (H)-Cholestan-3 β -ol, Abb. 5.15, Struktur **1c**) sind in den analysierten Kaltwasserdemospongiae selten. Wenn sie auftreten, sind ihre Konzentrationen allerdings gegenüber ringungesättigten Sterolen deutlich erhöht (v.a. in dem Hadromerida *Tentorium semisuberites* und den Microcionida *Clathria barleii* und *Antho dichotoma*).

4-Methylsterole sind nur in *Spongosorites genitrix* vorhanden.

C_{30} -Sterole wurden nur in wenigen Schwämmen nachgewiesen. Vor allem *Mycale lingua* weist hohe Konzentrationen eines C_{30} -Sterols mit zweifacher Untersättigung auf ($M^+ = 426$ und Fragmente m/z 341, 314, 229).

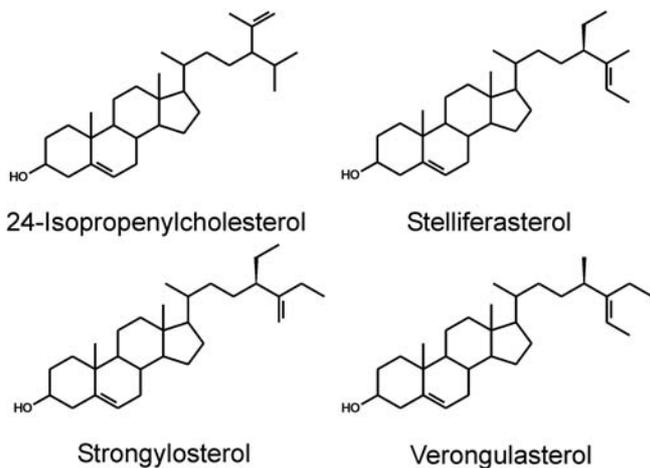


Abbildung 5.16 Mögliche Strukturen des C_{30} -Steroids in *Mycale lingua* (Strukturen nach KOKKE *et al.*, 1979)

Möglicherweise handelt es sich bei der beschriebenen Verbindung um 24-Isopropenylcholesterin, das bislang nur aus wenigen Schwämmen beschrieben ist. Aufgrund der ähnlichen massenspektrometrischen Fragmentierung von Strukturäquivalenten und dem Fehlen von Standardsubstanzen zur Durchführung von Koelutionen könnte es sich auch um Stelliferasterol, Strongylosterol oder Verongulasterol handeln (Abb. 5.16; KOKKE *et al.*, 1979). Ein zweifach ungesättigtes Sterol mit einem Molekulargewicht von 426 *amu*, dessen Massenspektren einer der vier in Abbildung 5.16 dargestellten Strukturen entspricht, ist ebenfalls in dem Schwamm Unknown sp. 5 enthalten.

19-Norstanole in *Axinella infundibuliformis*

Die Steroide des ceractinomorphen Schwammes *Axinella infundibuliformis* setzen sich ausschließlich aus ringgesättigten 19-Norstanolen zusammen. In Tabelle 5.9 sind ihre relative Konzentrationen zusammengefasst. Es zeigt sich, dass eine homologe Folge ringgesättigter 19-Norstanole mit entsprechenden seitenkettengesättigten Δ^{22} -Stanolen in dieser Spezies dominieren. Das Gaschromatogramm in Abbildung 5.17 illustriert die relative Verteilung dieser ungewöhnlichen Steroide und stellt zudem die charakteristische massenspektrometrische Fragmentierung am Beispiel von 19-Norcholestan-3 β -ol dar. Gegenüber 'konventionellen' Stanolen weisen die aufgezeigten Verbindungen deutliche Fragmente auf, die auf eine fehlende Methylgruppe innerhalb der Ringe A–C hindeuten. So fehlen die für Stanole typischen Fragmente m/z 233/234 (D-Ring-Spaltung) und m/z 215 (M^+ - Seitenkette (113) - 42 - H₂O; GOAD and AKIHISA, 1997) und werden in der untersuchten *Axinella*-Art durch m/z 220 bzw. m/z 201 ersetzt (Abb. 5.17). Entsprechende Fragmentierungen wurden auch für 19-Norstanole für die mediterrane *Axinella polypoides* nachgewiesen (DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE and SODANO, 1974a; DE ROSA *et al.*, 1975). Die Massenspektren der ge-

Komponente	Abk.	rel. Konz. [%]
24-Nor-19-norcholesta-22-en-3 β -ol	19-nor-26 Δ^{22}	1.0
24-Nor-19-norcholestan-3 β -ol	19-nor-26 Δ^0	4.0
19-Norcholesta-22-en-3 β -ol	19-nor-27 Δ^{22}	9.6
19-Norcholestan-3 β -ol	19-nor-27 Δ^0	18.3
24-Methyl-19-norcholesta-22-3 β -ol	19-nor-28 Δ^{22}	17.2
24-Methyl-19-norcholestan-3 β -ol	19-nor-28 Δ^0	12.9
24-Ethyl-19-norcholesta-22-en-3 β -ol	19-nor-29 Δ^{22}	4.6
24-Ethyl-19-norcholestan-3 β -ol	19-nor-29 Δ^0	30.5
24-Isopropyl-19-norcholestan-3 β -ol	19-nor-30 Δ^0	2.0

Tabelle 5.9 Relative Verteilung der Sterole (ausschl. 19-Norsterole) in *Axinella infundibuliformis*

Das Gaschromatogramm in Abbildung 5.17 illustriert die relative Verteilung dieser ungewöhnlichen Steroide und stellt zudem die charakteristische massenspektrometrische Fragmentierung am Beispiel von 19-Norcholestan-3 β -ol dar. Gegenüber 'konventionellen' Stanolen weisen die aufgezeigten Verbindungen deutliche Fragmente auf, die auf eine fehlende Methylgruppe innerhalb der Ringe A–C hindeuten. So fehlen die für Stanole typischen Fragmente m/z 233/234 (D-Ring-Spaltung) und m/z 215 (M^+ - Seitenkette (113) - 42 - H₂O; GOAD and AKIHISA, 1997) und werden in der untersuchten *Axinella*-Art durch m/z 220 bzw. m/z 201 ersetzt (Abb. 5.17). Entsprechende Fragmentierungen wurden auch für 19-Norstanole für die mediterrane *Axinella polypoides* nachgewiesen (DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE and SODANO, 1974a; DE ROSA *et al.*, 1975). Die Massenspektren der ge-

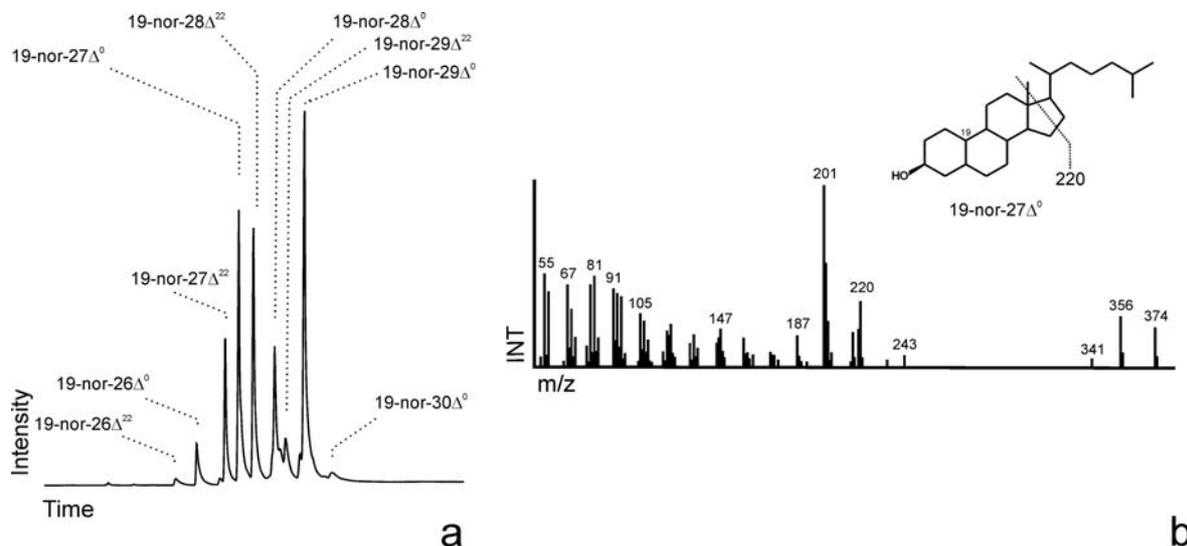


Abbildung 5.17 a) Totalionenchromatogramm (TIC) der Sterole in *Axinella infundibuliformis*. **b)** Massenspektrum und Struktur von 19-Norcholestan-3 β -ol; Abk. s. Tab. 5.8

genüber den Stanolen um zwei *amu* verringerten Äquivalente deuten auf eine Untersättigung an Position C₂₂ der Seitenkette hin. Hierfür spricht das Auftreten von Fragmenten bei m/z 288 (vinylische Abspaltung im Bereich der Seitenkette; GOAD and AKIHISA, 1997) und m/z 243 (M^+ - Seitenkette (111) - H₂O) bei gleichzeitigem Fehlen der für Δ^{22} -Stanole typischen Fragmente m/z 302 und m/z 288 (GOAD and AKIHISA, 1997).

Sterole mit Cyclopropylseitenkette in Vertretern der Haplosclerida

Zwei Arten der Haploscleriden enthalten Steroide, deren massenspektrometrische Fragmentierung auf Cyclopropylseitenketten hindeuten. Hierzu zählt *Petrosia crassa*, welche ein dominantes Sterol aufweist (Tab. 5.10). Die dargestellte Fragmentierung enthält Fragmente bei

Komponente	rel. Konz. [%]
Cholesta-5,22-dien-3 β -ol	Tr
5a(H)-Cholesta-22-en-3 β -ol	0.8
Cholesta-5-en-3 β -ol	0.3
24-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol	Tr
24-Methylcholesta-22-en-3 β -ol	1.2
24-Methylcholesta-5-en-3 β -ol	2.5
22,23-Dihydrocalysterol	8.1
Petrosterol	75.5
Petrostanol	6.5
24-Ethylcholestan-3 β -ol (evtl. Clionasterol)	5.1

Tabelle 5.10 Relative Verteilung der Sterole in *Petrosia crassa*; Tr=Trace (Spur)

356, 328 und 314 und verweist damit auf 23,24-Dihydrocalysterol, ein ebenfalls aus der Familie Petrosiidae beschriebenes Steroid (GAUVIN *et al.*, 1998). Insbesondere Petrosterol ist aus drei *Petrosia*-Arten bekannt, die von verschiedenen Standorten stammen (*Petrosia ficiformis*, SICA and ZOLLO, 1978; KHALIL *et al.*, 1980; *Petrosia hebes*, CHO and DJERASSI, 1987 und *Petrosia spheroida*, GAUVIN *et al.*, 1998). Auch aus einem anderen haploscleriden (*Cribrochalina vasculum*) und einem halichondriden (*Halichondria* sp.) Schwamm ist diese Verbindung beschrieben (RAVI *et al.*, 1978; DOSS *et al.*, 1990).

Weniger eindeutig sind die Steroidfragmentogramme von

Haliclona sp. 1. Dieser Schwamm enthält zwei dominierende Steroidalkohole, die neben den charakteristischen Bruchstücken von Δ^5 -Sterolen (M^+ - 85 und M^+ - 111) ebenfalls Diagnostika einer Cyclopropyleinheit zeigen. Beide Verbindungen weisen einen Molekülionenpeak bei 410 auf und stellen 24.6 bzw. 39.3% der Gesamtsterole. Bei den möglicherweise cyclopropenstämmigen Fragmenten handelt es sich um m/z 110 und m/z 300 für die früher eluierende Verbindung und m/z 96 und m/z 314 für die Hauptkomponente. Nach LI *et al.* (1982) und GOAD and AKIHISA (1997) deuten diese Fragmente auf Calysterol bzw. 23*H*-Isocalysterol hin und resultieren aus McLafferty-Umlagerungsprozessen der Cyclopropenseitenkette. Zusätzlich konnte eine Verbindung aufgezeigt werden, deren Fragmentierung auf das ebenfalls cyclopropenhaltige 24*H*-Isocalysterol hindeutet (Abb. 5.19). Diese und weitere cyclopropylhalti-

M^+ - 42 (m/z 370), M^+ - 42 - Me (m/z 355), M^+ - 42 - H₂O (m/z 352) und M^+ - 42 - Me - H₂O (m/z 337), die aus der Spaltung im Bereich des Cyclopropylringes resultieren und diagnostisch für das sog. Petrosterol sind (GOAD and AKIHISA, 1997). Mit Petrosterol koeluiert das ringgesättigte Petrostanol, das jeweils die um 2 *amu* erhöhten Ringfragmente zeigt. Zudem ist mit 8.1% der Gesamtsterole ein Steroid enthalten, für das ebenfalls ein Zyklus in der Seitenkette wahrscheinlich ist. Diese Verbindung zeigt, neben einem M^+ von 412, Bruchstücke mit m/z

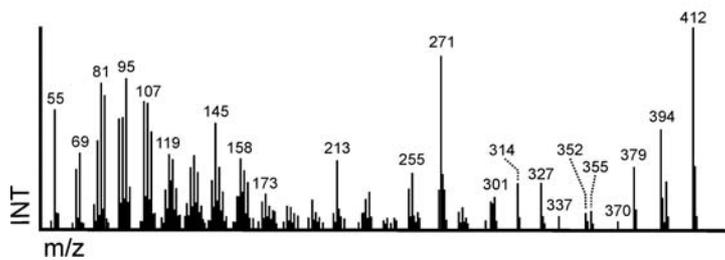
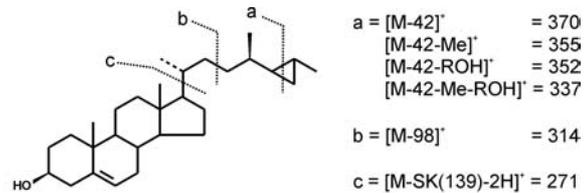


Abbildung 5.18 Massenspektrometrische Fragmentierung des dominanten Sterols (Petrosterol) in *Petrosia crassa*

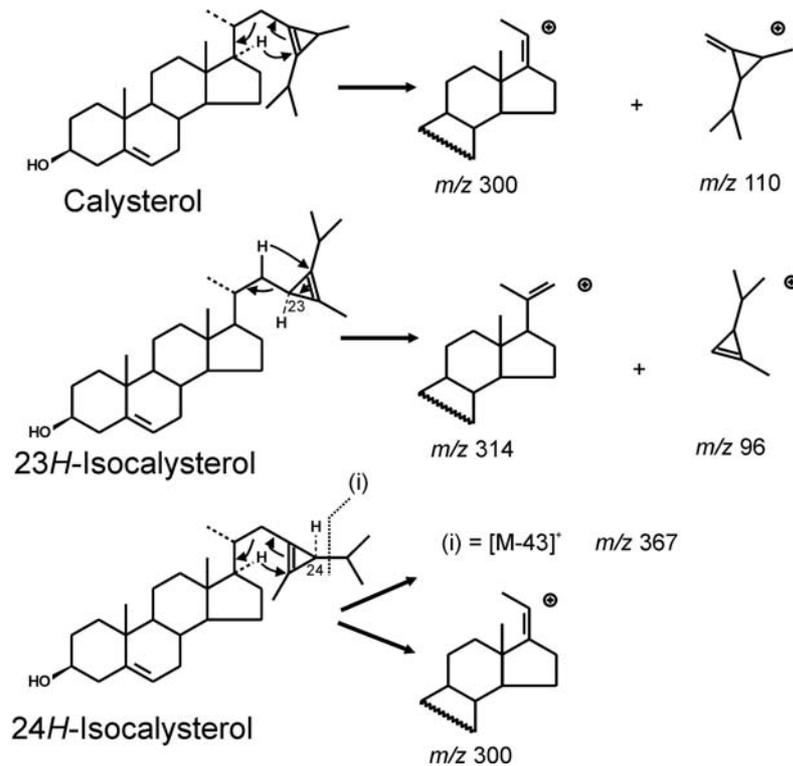


Abbildung 5.19 Charakteristische massenspektrometrische Fragmente von Cyclopropensterolen (Calysterol, 23H-Isocalysterol, 24H-Isocalysterol), die möglicherweise in *Haliclona* sp. 1 enthalten sind (leicht verändert nach DOSS and DJERASSI, 1988 und GOAD and AKIHISA, 1997)

ge Sterole (z.T. Cyclopropen) sind aus den Schwämmen *Calyx nicaensis* und *Calyx podatypa* beschrieben (LI *et al.*, 1982; DOSS and DJERASSI, 1988), die wie *Petrosia crassa* und *Haliclona* sp. 1 der Ordnung Haplosclerida angehören. Die restlichen 36.1% der Sterole in *Haliclona* sp. 1 konnten nicht näher charakterisiert werden, ihre Massenspektren weisen jedoch Fragmente auf, die für Strukturanaloga der Calysterole sprechen (s. Anhang D).

5.2.2 Steroide in Vertretern der Hexactinellida

Alle 20 analysierten Hexactinellida enthalten Steroide als signifikante Bestandteile ihrer Lipide (Hauptsterol: $0.29\text{--}4.32\text{mg g}^{-1}$ Trockengewicht). Die drei *Rossella*-Arten der Weddell See konnten aufgrund des Fehlens ausreichenden Materials nicht auf ihr Steroidinventar untersucht werden. Unabhängig von untergeordneten Unterschieden zwischen den untersuchten Spezies haben alle Vertreter der Hexactinellida Komponentengemische, die das konventionelle C_{27} -Cholestan-Grundgerüst, eine unsubstituierte oder C-24-alkylierte (methyl- oder ethyl-) Seitenkette und eine sauerstofftragende funktionelle Gruppe an C_3 beinhalten (BLUMENBERG *et al.*, 2002). Generell nehmen die Steroidkonzentrationen mit zunehmender Kohlenstoffanzahl ($C_{27}\text{--}C_{29}$) ab. Dies ist in Abbildung 5.20 anhand von *Sympagella* nov. sp. beispielhaft dargestellt. Als zusätzliches Merkmal findet sich in einigen Vertretern 24-Norcholesterin; vier Spezies enthalten C-4-monomethylierte Steroide in geringen Konzentrationen. 'Unkonventionelle' Kohlenstoffgerüste sind, im Gegensatz zu den untersuchten Demospongiae, in den Hexactinelliden nicht vorhanden.

Nahezu alle Spezies weisen C_{27} - C_{29} Δ^5 -Sterole mit Cholesterin als Hauptkomponente auf. Bekannte Intermediate der *de novo*-Sterolsynthese von Squalen, wie die 'primitiven' 4,4-Dimethylsterole (GOAD, 1981), konnten nicht nachgewiesen werden. Dagegen sind $5\alpha(H)$ -Stanole in den meisten Arten vertreten und dominieren das Steroidinventar in einigen Spezies. Ein weiteres ungewöhnliches Charakteristikum ist das Vorkommen von $5\alpha(H)$ -Cholestan-3-on und entsprechender C-24-alkylierter Derivate, die wie die ebenfalls enthaltenen Stanole in einer Vielzahl von Organismen in ähnlichen Größenordnungen vorliegen. In vier Proben konnten weiterhin geringe Konzentrationen an Cholest-4-en-3-on nachgewiesen werden (*Acanthascus* sp., Unknown sp. 7, *Heterochone* sp., *Hyalonema* (?) sp. 1).

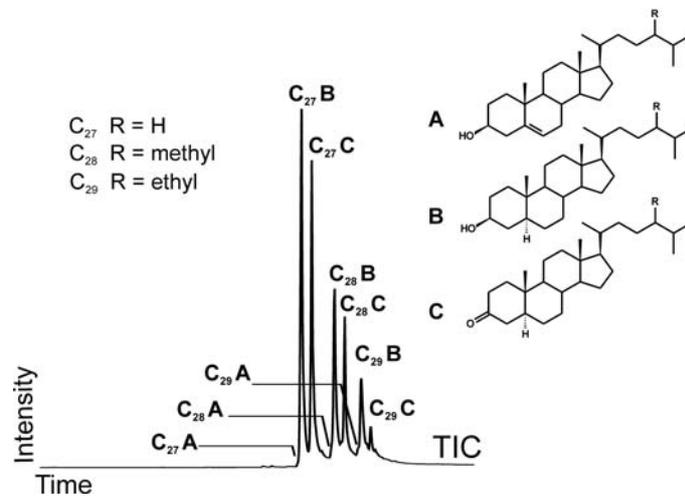


Abbildung 5.20 Chromatogramm (FID) der Steroidfraktion von *Sympagella nov. sp.* (A = ...-5en-3 β -ol, B = $5\alpha(H)$ -...-3 β -ol, C = $5\alpha(H)$ -...-3-on)

Eine detaillierte Beschreibung der Strukturen, Konzentrationen und Biosynthesewege von Steroiden in den Hexactinellida findet sich in einer Publikation, die im Rahmen dieser Studie erstellt wurde (BLUMENBERG *et al.*, 2002 im Anhang E.1).

Diskussion

Im Zuge dieser Studie wurde das Steroidinventar von 32 Kaltwasserarten der Demospongiae und von 20 Vertretern der Hexactinellida untersucht, um Aussagen zu chemotaxonomischen Zusammenhängen zu gewinnen. Die Basis dieser umfassenden Arbeiten bildeten massenspektrometrische Analysen der Alkohole und gegebenenfalls erzeugter Trimethylsilylderivate. Zudem wurden Koinjektionen mit Vergleichsstandards bekannter Struktur durchgeführt (s. Methodik im Anhang B).

Der Großteil der untersuchten Demospongiae enthält 'konventionelle' Sterole als Hauptbestandteile der Steroide mit einem Maximum von 27–29 Kohlenstoffatomen. Generell weist jede Schwammart einen qualitativen und tendenziell quantitativen sog. 'fingerprint' des Steroidinventars auf, unabhängig von Fundortlokalität und saisonalen Varianzen der Probennahme (FROMONT *et al.*, 1994). Neben diesen Artcharakteristika konnte gezeigt werden, dass distinkte taxonomische Gruppen Ähnlichkeiten in der Sterolzusammensetzung aufweisen. So scheinen tetractinomorphe Demospongiae weniger variabel in ihrer Sterolsynthese zu sein. Weder deutliche Varianzen in der Kohlenstoffanzahl (nahezu keine Sterole mit C_{26} und C_{30} , Ausnahme: *Thenia muricata*) noch 'unkonventionelle' Sterole konnten in dieser Arbeit oder in früheren Studien nachgewiesen werden (BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1986). Dagegen wurden in der Unterklasse Ceractinomorpha unterschiedliche Sterole identifiziert,

die von dem Cholesteringrundgerüst abweichen ($\Delta^{5,7}$ -ringungesättigte Sterole, 19-Norstanole, Sterole mit Cyclopropylseitenkette). Sie deuten dadurch auf eine stärker divergierende Sterolsynthese gegenüber den Tetractinomorpha hin (Tab. 5.8).

Die artspezifische Konsistenz 'konventioneller' Steroide zeigt – neben in dieser Studie wiederholt durchgeführten Analysen an verschiedenen Exemplaren derselben Art (nicht dargestellt) – eine Studie verschiedener Geodiidae der Faroer Inseln. In der genannten Arbeit wurden u.a. die Steroidzusammensetzungen von *Geodia barretti*, *Geodia macandrewii* und *Isops phlegraei* veröffentlicht (HOUGAARD *et al.*, 1991), Arten, die weit verbreitet im Nordostatlantik vorkommen und auch in dieser Untersuchung bearbeitet wurden. In Tabelle 5.11 sind die

relativen Konzentrationen der Steroide oben genannter Geodiidae dieser Arbeit mit denen einer Vergleichsstudie zusammengefasst. Für *G. barretti* und *G. macandrewii* zeigt sich eine signifikante

	<i>Geodia barretti</i>	<i>Geodia macandrewii</i>	<i>Isops phlegraei</i>
Cholesta-5,22-dien-3 β -ol	1 (3.3)	2 (2.7)	3 (0.9)
Cholesterol	3 (5.5)	5 (5.8)	7 (2.3)
Ergosta-5,22-dien-3 β -ol	2 (5.5)	3 (4.6)	4 (1.4)
Ergosta-5,24(28)-3 β -ol	88 (77.4)	78 (76.2)	55 (-)
Stigmasta-5-en-3 β -ol	3 (1.0)	7 (0.6)	Tr (-)
Stigmasta-5,24(28)-3 β -ol	3 (3.8)	5 (5.0)	27 (9.9)
Stigmasta-4,24(28)-dien-3-on	- (-)	1 (-)	3 (-)
24,28-Dehydroaplysterol	- (2.7)	- (2.2)	- (95.5)

Tabelle 5.11 Relative Konzentrationen der Sterole in den Geodiidae *Geodia barretti*, *G. macandrewii* und *Isops phlegraei*; in Klammern Daten aus HOUGAARD *et al.* 1991)

Übereinstimmung beider Untersuchungen. Große Unterschiede weist jedoch das Steroidinventar von *I. phlegraei* auf. So konnte in dem Exemplar der Faroer Inseln dominierend 24(28)-Dehydroaplysterol nachgewiesen werden, eine Verbindung, die die Spezies vom Sularücken nicht enthält. Dieses Sterol mit dem unkonventionellen Aplystangrundgerüst wurde in einigen Spezies der Verongida beschrieben (DE ROSA *et al.*, 1973; BERGQUIST *et al.*, 1980), ist jedoch nicht auf diese Taxa beschränkt. So konnte sie auch in einer *Haliclona*-Art in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (BERGQUIST *et al.*, 1980). Dagegen gleicht die in dieser Arbeit aufgezeigte Zusammensetzung der beiden anderen Geodiidae, mit den höchsten Konzentrationen der Verbindung 24-Methylencholesterin (Ergosta-5,24(28)-dien-3 β -ol). Diese Differenz ist durch die geographische Verschiedenartigkeit des Probenstandorts nicht zu erklären (vgl. FROMONT *et al.*, 1994). Möglich ist eine fehlerhafte taxonomische Klassifizierung dieser Probe oder der des Exemplars der Vergleichsstudie von HOUGAARD *et al.* (1991). Allerdings weist die Ähnlichkeit der Sterolzusammensetzung des hier untersuchten *I. phlegraei* zu *G. barretti* und *G. macandrewii* auf einen Schwamm der Geodiidae hin. Die Dominanz von $\Delta^{5,24(28)}$ -Sterolen lässt vermuten, dass dies ein konstituierendes Merkmal von Porifera der Geodiidae ist. Hierfür spricht, dass neben den gezeigten drei *Geodia*-Arten *Pachymatisma johnstonii* C₂₉ $\Delta^{5,24(28)}$ (Fucosterol) als Hauptkomponente enthält (Tab. 5.8). Neben den untersuchten Geodiidae erweist sich dieses Attribut in der übergeordneten Klasse der Astrophorida als bestimmendes, wenn auch durch die weite Verbreitung von $\Delta^{5,24(28)}$ -Sterolen wenig spezifisches Merkmal (Tab. 5.8).

Wie oben erwähnt, zeigen Schwämme, die den Ceractinomorpha angehören, größere Variationen in ihrem Steroidmuster. Neben strukturellen Unterschieden enthalten deutlich mehr ceractinomorphe als tetractinomorphe Schwämme C₂₆- bzw. C₃₀-Steroide. Ein weiteres Merkmal ist die Fähigkeit zur Synthese von $\Delta^{5,7}$ -ringungesättigten Verbindungen, die in *Phakellia ven-*

tilabrum und den dendroceratiden Schwämmen *Dendrilla cirsiodes* und Unknown sp. 4 den Großteil der Steroide ausmachen. Diese Komponenten und die seitenkettenungesättigten $\Delta^{5,7,22}$ - und Δ^7 -Strukturanaloga sind in Schwämmen der Dendroceratida und der Halichondrida sehr verbreitet und neben den hier dargestellten Spezies in vielen untersuchten verwandten Arten in hohen Konzentrationen enthalten (DE ROSA *et al.*, 1973; BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1991). Das Auftreten von $\Delta^{5,7}$ -Sterolen ist neben Schwämmen auch von Pilzen, einigen einzelligen Algen und Protozoa wie *Tetrahymena pyriformis* bekannt, die offensichtlich Δ^5 - bzw. Δ^7 -Steroide der Nahrung nutzen und entsprechend modifizieren (GOAD, 1981 und Zitate darin). Möglicherweise stellt das Vorkommen dieser Komponenten, analog dem Auftreten von Plasmalogenen und speziellen Fettsäuren, ein Relikt der evolutionären Vorläufer von Porifera dar (DEMBITSKY *et al.*, 1989; vgl. Kap. 5.5).

Das Vorherrschen ringgesättigter Steroide ist ein Charakteristikum, das auf einige untersuchte Arten der Demospongiae beschränkt ist. So enthalten zwar eine Reihe von Spezies Stanole, jedoch ausschließlich die Steroidinventare von *Tentorium semisuberites* (Hadromerida) und der Microcionidae *Antho dichotoma* und *Clathria barleii* werden durch entsprechende Steroide dominiert (Tab. 5.8). Dieses Merkmal wurde in unterschiedlichen Studien an Porifera der Suberitidae (Familie Hadromerida; DELSETH *et al.*, 1979; BERGQUIST *et al.*, 1980) und der Microcionidae beobachtet (BERGQUIST *et al.*, 1986) und ist demnach ein Charakteristikum dieser Familie. Studien zur Biosynthese von 5α (H)-Stanolen an Mammalia und Seesternen (*Asterias rubens* und *Porania pulvillus*) haben gezeigt, dass diese aus der Konversion von nahrungsstämmigen Δ^5 -Sterolen resultieren und über Ketozwischenprodukte zu den ringgesättigten Äquivalenten modifiziert werden (SMITH *et al.*, 1972; GOAD, 1981). Vergleichbar ablaufende Prozesse wurden als verantwortlich für die Steroidsynthese in Schwämmen der Klasse Hexactinellida vorgeschlagen, da in diesen alle drei Komponentenklassen vorherrschend sind (BLUMENBERG *et al.*, 2002). Möglicherweise existieren in den untersuchten Spezies der Demospongiae ähnliche Biosynthesewege, denn in *T. semisuberites* und *A. dichotoma* sind neben Stanolen die potenziellen Vorläufer (Δ^5 -Sterole) ebenfalls enthalten. Dagegen fehlt das ringungesättigte Edukt des 5α (H)-Cholestanols in *Clathria barleii*, und auch Steroidketo- ne konnten in keiner der genannten Arten nachgewiesen werden. Gründe hierfür sind möglicherweise Prozesse, die entweder keine Zwischen- und Ausgangsprodukte zurücklassen oder aus bislang unbekanntem Biosynthesewegen resultieren.

Axinella infundibuliformis des Sula-Rückens verfügt ausschließlich über Stanole mit dem seltenen 19-Nor-Grundgerüst. Neben den komplett gesättigten Stanolen konnten weiterhin

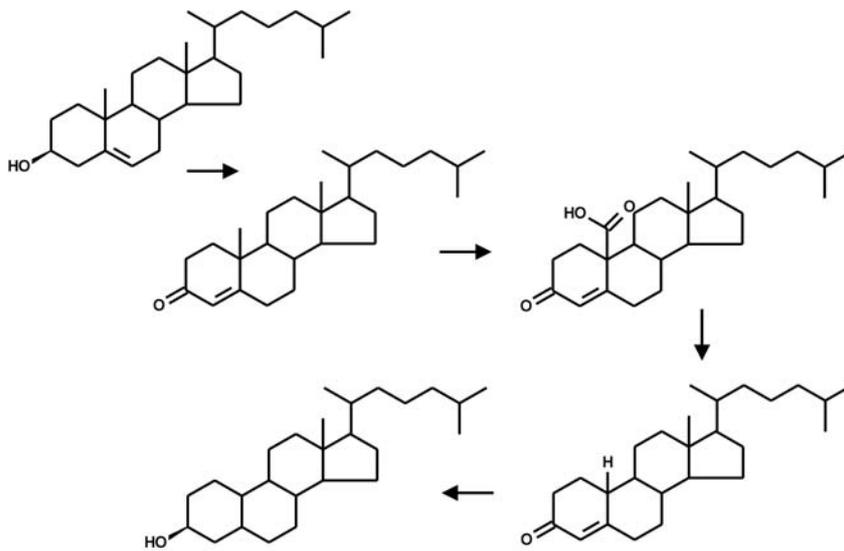


Abbildung 5.21 Biosynthese des 19-Norstanol Grundgerüsts in *Axinella polypoides* am Beispiel des Eduktes Cholesterol (Cholest-5-en-3-β-ol; DE ROSA *et al.*, 1975)

Δ^{22} -seitenkettenunge-sättigte Steroide in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Neben ihrer taxonomischen Relevanz gelten die 'unkonventionellen' 19-Norstanole als interessante pharmakologische Substanzen, da diese eine strukturelle Ähnlichkeit zu vergleichbaren empfängnisverhütenden Steroidhormonen aufweisen (CRIST and DJERASSI, 1983). Ferner sind Steroide mit einem 19-Nor-Grundkörper Be-

standteile von Muskelaufbaupräparaten, da nachgewiesen werden konnte, dass diese Verbindungen zu einer vermehrten Produktion von Testosteron führen. Als Naturstoff ist diese Substanzklasse bisher einzig aus dem mediterranen Schwamm *Axinella polypoides* beschrieben worden (DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE and SODANO, 1974a). Der im Rahmen dieser Studie erzielte Zweitnachweis von 19-Norsterolen in *A. infundibuliformis* deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Komponenten um ein spezifisches Merkmal bestimmter Axinellida handelt. Allerdings sind 19-Norstanole selbst in Schwämmen der Axinellidae sehr rar, denn zu einer Vielzahl von *Axinella*-Arten liegen Steroiddaten vor, die außer zu *A. polypoides* keinen weiteren Beleg dieser Steroide erbracht haben. Zusätzlich zum Nachweis dieser Verbindungen wurden Studien zur Biosynthese in *A. polypoides* durchgeführt. Diesbzüglich zeigte sich, dass offensichtlich Cholesterin (möglicherweise aus der Nahrung) vom Schwamm verwendet wird und nachfolgend über Cholest-4-en-3-on und eine Carboxylierung der 19-Methylgruppe eine Abspaltung dieses Kohlenstoffs durchgeführt wird (Abb. 5.21; DE ROSA *et al.*, 1975). In *A. infundibuliformis* sind dagegen weder Cholesterin noch Steroidketone enthalten, so dass der für *A. polypoides* beschriebene Prozess für die vom Sula-Rücken stammende Spezies nicht näher zu charakterisieren ist. Die ungewöhnliche Struktur der Sterole in *A. infundibuliformis* wirft interessante Fragen auf, da das Fehlen der Methylgruppe an Position 19 gegen eine Funktion in der Membran spricht (s. Kap. 5.2). Ob diese Verbindungen im untersuchten Schwamm eine hormonelle Aufgabe haben, etwa unterschiedliche Verhaltensweisen des Schwammes zu modifizieren oder zu induzieren (Botenstoff, Fortpflanzung, etc.), bleibt unklar. Daher müssen weiter gehende Studien durchgeführt werden, um die Wirkweise im Organismus und das mögliche Potenzial als pharmakologischer Naturstoff zu überprüfen.

Aus Schwämmen der Familie Haplosclerida sind eine Reihe von spezifischen Sterolen beschrieben, deren Seitenkette eine Cyclopropyleinheit beinhaltet (DJERASSI and SILVA, 1991). So setzt sich beispielsweise das Sterolinventar von *Calyx nicaensis* zu 52% aus dem cyclopropenhaltigen Calysterol zusammen (FATTORUSSO *et al.*, 1975) und auch drei *Petrosia*-Arten (*P. ficiformis*, *P. hebes* und *P. spheroida*) synthetisieren als Hauptkomponente das sog. Petrosterol. In den genannten Spezies dominiert diese Verbindung mit bis zu 60% die Steroidfraktion (SICA and ZOLLO, 1978; CHO and DJERASSI, 1987; GAUVIN *et al.*, 1998). Das Vorkommen von Cyclopropylseitenketten ist jedoch kein verbreitetes und somit obligates Merkmal der Petrosiidae, denn bei der Untersuchung weiterer Spezies dieser Familie konnten keine entsprechenden Verbindungen nachgewiesen werden (FROMONT *et al.*, 1994). Dennoch wurde in *Petrosia crassa* des Norwegenschelfs – die in dieser Arbeit erstmalig untersucht wurde – Petrosterol massenspektrometrisch identifiziert und liegt mit einer Konzentration von 75.5% an den Gesamtsterolen vor (Tab. 5.10). Zusätzlich weist *P. crassa* weitere cyclopropylhaltige Steroide auf (22,23-Dihydrocalysterol und Petrostanol), so dass insgesamt etwa 90% der Gesamtsterole von dieser 'unkonventionellen' Verbindungsklasse gebildet werden. Die Biosynthese von Petrosterol und 22,23-Dihydrocalysterol ist für *Petrosia ficiformis* gut untersucht. So zeigte sich, dass ausgehend vom Clionasterol (mit 5.1% ebenfalls in *P. crassa* enthalten) über Clerosterol Petrosterol bzw. 22,23-Dihydrocalysterol synthetisiert werden (SILVA *et al.*, 1992 und Zitate darin). Möglicherweise handelt es sich nicht um Clionasterol, sondern um Sitosterol, da beide Stereoisomere massenspektrometrisch nicht unterscheidbar sind. Eine direkte Verbindung beider Cyclopropylsterole konnte diesbezüglich nicht nachgewiesen werden (DOSS *et al.*, 1990), so dass offensichtlich entweder das C₂₉-Steroid Clionasterol oder 24-Methylencholesterin mit Hilfe sog. Cyclopropanasen parallel zu den entsprechenden Verbindungen transformiert werden (SILVA *et al.*, 1992). Offensichtlich verläuft dieser Schritt über enzymgebundene carbokationische Intermediate, wenn auch Details dieser Reaktion bislang unklar sind (SILVA *et al.*, 1992; GINER, 1993). Neben *P. crassa* konnten in einem weiteren Schwamm der Haplosclerida des Sula-Rückens Cyclopropylsteroide entdeckt werden. So deuten die massenspektrometrischen Daten darauf hin, dass *Haliclona* sp. 1 die C₂₉-Sterole Calysterol, Calystanol und die Isomere 23*H*- und 24*H*-Isocalysterol enthält. Diese Verbindungen wurden beispielsweise aus *Calyx nicaensis* beschrieben, in dem eine Konversion von Fucosterol zu Calysterol mit einer Effizienz von 2.7% gezeigt werden konnte (MINALE *et al.*, 1977; SILVA *et al.*, 1992). In einer weiteren Untersuchung erwies sich, dass *C. nicaensis* und *C. podatypa* Dihydrocalysterol durch Isomerisierung der Cyclopropeneinheit zu 24*H*-Isocalysterol modifizieren. Detaillierte Beschreibungen der Biosynthese von Cyclopropylseitenketten in Schwämmen finden sich in DJERASSI and SILVA von (1991) und GINER von (1993).

Die Zusammensetzung der Steroide in der Klasse Hexactinellida ist gegenüber den Demospongiae weniger, so dass chemotaxonomische Aussagen innerhalb der Hexactinellida nicht möglich sind (BLUMENBERG *et al.*, 2002). Generell dominieren Δ^5 -Sterole mit 27–29 Kohlenstoffatomen. Hingegen fehlen Verbindungen mit 'unkonventionellem' Ringgerüst. Der Trend in den Steroidkonzentrationen (C₂₆<C₂₇>C₂₈>C₂₉), seine Ähnlichkeit zum Steroidmuster partikulären marinen Materials und das exklusive Auftreten von 5 α (H)-Stanolen-Isomeren deuten auf eine stereochemische Umwandlung von Nahrungssterolen durch hexactinellide Schwämme oder durch ihre assoziierten Mikroorganismen hin. Dies wird gestützt durch den Nachweis von 3-Steroidketonen, die als Zwischenprodukte der Transformation von

Δ^5 -Sterolen zu Stanolen angesehen werden (BLUMENBERG *et al.*, 2002 und Zitate darin). Dieser Prozess, der vom Cholesterin zur Biosynthese von 5α (H)-Cholestanol führt, wurde für zwei Seesterne nachgewiesen (*Asterias rubens*, *Porania pulvillus*) und scheint auch innerhalb der Klasse Hexactinellida der dominante Prozess zu sein. Demzufolge ist die *de novo*-Synthese kein Mechanismus, der in diesen Organismen stattfindet. Eine umfassende Diskussion findet sich in BLUMENBERG *et al.* (2002) im Anhang E.2.

Die in dieser Studie durchgeführte Analyse des Steroidinventars von 52 Arten der Demospongiae und Hexactinellida zeigt, dass die Steroidsynthese in Vertretern der Hexactinellida eine deutlich geringere Variabilität innerhalb der phylogenetisch ursprünglichen Gruppe aufweist. Gegenüber den Demospongiae stellt die vorgeschlagene Annahme der Modifizierung nahrungsstämmiger Stenole durch hexactinellide Schwämme möglicherweise ein basales Muster der Steroidbiosynthese dar, die in der *de novo*-Synthese 'unkonventioneller' Sterole (z.B. 19-Norstanole in *A. infundibuliformis*. oder Cyclopropylsterole in *P. crassa* und *Haliclona* sp. 1) und der Zunahme einer taxonomiebasierten Differenzierung in den Demospongiae ihre Weiterentwicklung fand.

5.3 Spezifische Primär- und Sekundärstoffe von Demospongiae und Hexactinellida – Niedermolekulare Sekundärstoffe

Zusätzlich zur Strukturdiversität der beschriebenen Primärstoffe gelten Schwämme als produktive Quelle bioaktiver Sekundärmetabolite (PAWLIK, 1993). Bis jetzt wurden aus über 400 Poriferaspezies doppelt so viele Strukturen wie aus Cnidaria und Algen, fünfmal mehr als aus Mollusken und Echinodermen und siebenmal mehr als aus Ascidien isoliert und publiziert (VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999; MUNRO and BLUNT, 2000). Die identifizierten Substanzen weisen verschiedenartige pharmakologische Wirkweisen auf, die u.a. antimikrobielle, antitumoral/cytotoxische oder enzymhemmende Effekte umfassen.

Die weitaus meisten Daten zur Sekundärmetabolitproduktion innerhalb der Porifera liegen zur Klasse der Demospongiae vor. Dagegen existieren nur wenige Naturstoffdaten zur Gruppe der Calcarea (neun Spezies; MUNRO and BLUNT, 2000) und einzig MCCLINTOCK and BAKER (1997) wies die biologische Aktivität der Extrakte zweier antarktischer hexactinellider Vertreter nach. Allerdings wurden in dieser Studie keine Sekundärmetaboliten aus den Hexactinellida isoliert, sondern vielmehr ausschließlich die Toxizität organischer Extrakte getestet, so dass über den chemischen Ursprung der biologischen Aktivität von den Autoren keine Aussagen getroffen werden konnten.

Generell befassen sich die meisten naturstoffrelevanten Arbeiten mit der Beschreibung von Sekundärmetaboliten und der Charakterisierung ihrer pharmakologischen Aktivität. Dagegen beziehen sich nur wenige Studien auf die chemotaxonomische Relevanz des Auftretens distinkter Substanzen und/oder Verbindungsklassen in den Porifera. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass einige spezifische Komponentenklassen in bestimmten Taxa dominieren und demzufolge zusätzlich zu den Primärstoffen chemotaxonomische Informationen auch anhand von Sekundärmetaboliten erhalten werden können (s. VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999 und Zitate darin). So ist beispielsweise bekannt, dass Peroxypolyketide gehäuft in Vertretern der Unterklasse Homoscleromorpha (PATIL *et al.*, 1996b; BRAEKMAN *et al.*, 1998; COMPAGNONE

et al., 1998) und stickstofffunktionalisierte Sesquiterpene (Isonitrile, Isocyanate und Isothiocyanate) vornehmlich in der Ordnung Halichondrida auftreten (DUMDEI *et al.*, 1997; CLARK *et al.*, 2000). Azyklische Acetylenverbindungen kommen in der Ordnung Haplosclerida (CHILL *et al.*, 2000) und spezifische Bromindolalkaloide in der Familie Geodiidae vor (VAN SOEST *et al.*, 1998; SÖLTER *et al.*, 2002). Zusätzlich zu den genannten niedermolekularen Naturstoffen sind eine Reihe weiterer Substanzen und Verbindungsklassen beschrieben, die dominant in bestimmten Taxa auftreten. Gleichwohl besteht in taxonomischer Hinsicht für nahezu keine Substanzklasse eine Ausschließlichkeit des Auftretens (VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999). Ferner ist problematisch, dass die distinkte Quelle der Sekundärmetaboliten für die wenigsten Schwämme geklärt werden konnte. Mögliche Produzenten neben dem Schwamm sind auch die assoziierten Mikroorganismen (z.B. BEWLEY and FAULKNER, 1998; FAULKNER *et al.*, 1999). Allerdings gilt die symbiotischen Beziehungen als derart spezifisch (WILKINSON, 1984; BEWLEY and FAULKNER, 1998), dass der Schwamm und die SAM zusammen den Gesamtorganismus bilden und demzufolge, trotz Unklarheiten bezüglich des Produzenten, schwammrelevante chemotaxonomische Aussagen ermöglicht werden.

Im Folgenden wird das Vorkommen charakteristischer niedermolekularer Verbindungen in den analysierten Schwämmen beschrieben und ihre chemotaxonomischen Aussagen diskutiert.

5.3.1 Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanat-Sesquiterpenoide und Diterpenfurane

Allgemein

Strukturell leiten sich Sesquiterpene von drei vielfältig verknüpften Isopreneinheiten ab. Sie besitzen 15 Kohlenstoffatome und sind durch ihre geringe Molekülgröße häufig flüchtig (FOX and WHITESELL, 1995). Diterpene werden dagegen aus vier Isoprenoideinheiten aufgebaut und liegen häufig in tri- und tetracyclischer Form vor. Sesqui- und Diterpenoide können funktionalisiert und unfunktionalisiert vorliegen und sind eine wichtige Klasse marin und terrestrisch gebildeter Primär- und Sekundärmetaboliten.

Bis 1990 waren etwa 1000 strukturell unterschiedliche Sesquiterpenoide bekannt (LUCKNER, 1990). Abbildung 5.22 fasst zwei häufig auftretende Verbindungen dieser Substanzklasse zusammen. Dargestellt ist zum einen Farnesol, das ein wichtiger Bestandteil der Bakteriochlorophylle *c,d* und *e* und eine Schlüsselsubstanz in der Biosynthese von zyklischen Isoprenoiden ist. Ferner ist Caryophyllen beispielhaft für die verbreiteten sesquiterpenoiden etherischen Öle aus der Gewürznelke aufgeführt. Obwohl die Wirkung der meisten Sesquiterpenoide in Organismen unbekannt ist, wurde für einige eine biologische Aktivität nachgewiesen. So agieren sie in vielen höheren Pflanzen als Abwehrstoff, und aus Insekten sind eine Reihe von Sesquiterpenoide als Pheromone beschrieben (LUCKNER, 1990). Wegen ihrer Wirksamkeit sind sie seit Jahrhunderten in vielen Kulturen Komponenten verschieden

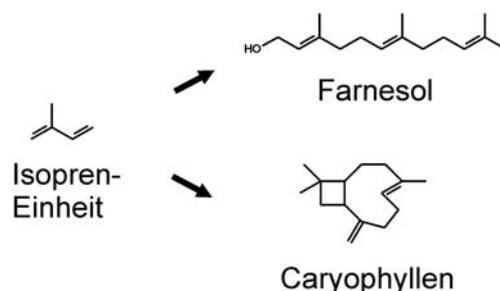


Abbildung 5.22 Struktur einer Isopreneinheit und ausgewählter Sesquiterpenoide

wirkender Arzneien und werden u.a. wegen ihrer häufig antiseptischen Eigenschaften eingesetzt (FOX and WHITESELL, 1995).

Eine ungleich höhere Vielfalt an strukturellen Kombinationsmöglichkeiten liegt in der Klasse der Diterpene vor. Ähnlich den Sesquiterpenoiden werden Diterpene von terrestrischen und marinen Organismen häufig als Toxine und Hormone synthetisiert (LUCKNER, 1990). Neben ihrer Sekundärstofffunktion sind sie aber auch Bestandteil wichtiger Primärlipide. So basiert das Phytol ebenso auf einer Diterpenstruktur wie die Membranbestandteile von Archaea, z.B. Archaeol.

Auch in marinen Invertebraten sind Sesquiterpenoide und Diterpene weit verbreitete Verbindungsklassen. So finden sich beispielsweise Sesquiterpene in den Lipiden von Nudibranchia der Spezies *Phyllidia pulitzeri* und der Weichkoralle *Sinularia intacta* (PAWLIK, 1993; ANJANEYULU *et al.*, 1999). Die größte marine Quelle von Sesquiterpenoiden stellen jedoch Schwämme dar. So waren schon 1979 fünfzig verschiedene Sesquiterpene aus elf Schwammspezies bekannt (BERGQUIST, 1979), und in der Folge sind eine Vielzahl weiterer strukturverwandter Komponenten publiziert worden (z.B. HIROTA *et al.*, 1996; KÖNIG *et al.*, 1996; DUMDEI *et al.*, 1997; PAUL *et al.*, 1997). In jüngerer Zeit wurde insbesondere die Untersuchung von stickstofffunktionalisierten zyklischen Sesquiterpenoiden (insbesondere Axoisnitrile) ausgedehnt, da ihre toxische Wirkung auf den filamentösen malariaauslösenden Protozoa *Plasmodium falciparum* festgestellt worden ist (ANGERHOFER *et al.*, 1992; WRIGHT *et al.*, 1996). Diese Studien haben die biologischen Funktionen von Axoisnitrilen zum Mittelpunkt, sie diskutieren dagegen nicht die chemotaxonomische Relevanz des Auftretens dieser ungewöhnlichen Verbindungsklasse. Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Studie beleuchtet.

Wie oben dargestellt, können Sesquiterpenoide und Diterpene in zyklischer, azyklischer und verschieden funktionalisierter Form vorliegen. Aufgrund der Fülle strukturell diverser Terpene und der geringen chemotaxonomischen Aussagekraft vieler unspezifischer Komponenten richtet sich die folgende Beschreibung schwammstämmiger Substanzen auf zwei charakteristische Verbindungsgruppen. Zum einen wird das Auftreten von zyklischen Sesquiterpenoiden mit Isonitril-, Isocyanat-, und Isothiocyanat-Gruppe aus einigen Schwämmen der Hali-chondrida beschrieben. Zum anderen wird das Vorkommen von Diterpenoidfuranonen diskutiert, deren Furanonkörper an eine Alkylkette gekoppelt sind (sog. Ambliofuran, Hexahydroambliofuran, Spongian-16-on).

Analytik

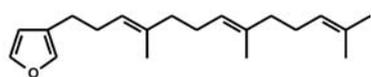
Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanat-Sesquiterpenoide

In folgenden beschriebenen Spezies konnten mehrere Kohlenwasserstoffe entdeckt werden, deren Fragmentierung auf Komponenten mit einer Sesquiterpenoidgrundstruktur hindeuten (M^+ 204, m/z 189, 161, 105). Des Weiteren wurden stickstofffunktionalisierte Sesquiterpenoide nachgewiesen. Generell erfolgte die massenspektrometrische Charakterisierung stickstoffhaltiger Sesquiterpenoide anhand distinkter Fragmente, die sich aus der Abspaltung der funktionellen Gruppen ergeben. Die dabei entstehenden Restfragmente resultieren aus dem unfunktionalisierten Sesquiterpengrundgerüst (Axane; POSSNER, 2003). Diese Kohlenwasserstoffgerüstzyklen können anhand massenspektrometrischer Daten nicht näher identifiziert werden. Die MS-Analyse entsprechender Verbindungen weist bei Isonitrilen ein deutliches Fragment von M^+-27 (Isonitrilgruppe), bei Isocyanaten von M^+-43 (Isocyanatgruppe) und bei Isothiocyanaten von M^+-59 (Isothiocyanatgruppe; KASSÜHLKE *et al.*, 1991; HIROTA *et al.*, 1996) auf. Die Erhöhung

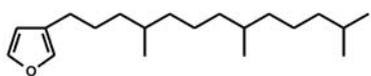
des Fragmentes $M^+ - 43$ ist allerdings nicht eindeutig auf Isocyanate zurückzuführen und kann auch aus der Abspaltung einer Isopropyleinheit stammen (POSSNER, 2003). Die entsprechenden Massenspektren finden sich im Anhang D. Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung oben genannter funktioneller Gruppen ist anhand von GC-IR-Spektren möglich. So ist beispielsweise bei Isothiocyanaten eine deutlich Absorption bei 2085 cm^{-1} vorhanden (HIROTA *et al.*, 1996). Entsprechende Untersuchungen wurden von POSSNER (2003) an *Phakellia ventilabrum* vollzogen.

Diterpenfuran (Ambliofuran, Hexahydroambliofuran, Spongian-16-on)

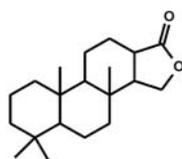
Furanoditerpene wurden in der Kohlenwasserstofffraktion einiger Schwämme identifiziert. Die



Ambliofuran



Hexahydroambliofuran



Spongian-16-on

Abbildung 5.23 Struktur der Diterpene Ambliofuran, Hexahydroambliofuran und Spongian-16-on

Charakterisierung erfolgte anhand massenspektrometrischer Fragmentierung. So weist die Verbindung Ambliofuran (4,8,12-Trimethyltrideca-3,7,11-trienfuran; Abb. 5.23) einen Moleküllenpeak bei 286 auf und zeigt neben dem dominanten Fragment 81 weiterhin Bruchstücke bei m/z 271, 217, 149 und 69 (KARUSO and TAYLOR, 1986). Die MS-Analyse des gesättigten Analogons Hexahydroambliofuran (4,8,12-Trimethyltridecafuran; Abb. 5.23) resultiert, neben der Molekülmasse 292, in den Fragmenten m/z 81, 82, 95 und 109.

Ein weiteres Diterpenoid konnte anhand der MS-Fragmentierung identifiziert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das sehr seltene Spongian-16-on (Abb. 5.23), das neben dem dominanten Bruchstück 191 und einem M^+ von 304 außerdem Fragmente bei m/z 289, 191, 180, 95, 81 und 69 zeigt (HAMBLEY *et al.*, 1990).

Ergebnisse

Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanat-Sesquiterpenoide in Kaltwasserdemospongien

Zwei Spezies der analysierten Kaltwasserdemospongiae enthalten Verbindungen, deren Massenspektren auf stickstoffsubstituierte Sesquiterpenoide hindeuten. So weist der axinellide Schwamm *Phakellia ventilabrum* mehrere homologe Folgen verschiedener Sesquiterpenoide ($C_{15}H_{24}$) mit Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanat-Substitution auf (POSSNER, 2003). Zusätzlich zu diesen spezifischen Komponenten besitzt *P. ventilabrum* sehr seltene chlorierte Sesquiterpenoide (POSSNER, 2003). Stickstofffunktionalisierte Sesquiterpenoide konnten durch GC-MS-Analysen ebenfalls in *Axinella rugosa* gefunden werden. Allerdings deuten unterschiedliche Fragmentierungen und ein verschiedenartiges Elutionsverhalten auf strukturelle Abweichungen des Sesquiterpenoidgerüsts im Vergleich zu denen in *P. ventilabrum* hin. Des Weiteren enthält *A. rugosa* keine Isonitrile. Innerhalb der Sesquiterpenoide von *P. ventilabrum* stellen diese jedoch die weitaus überwiegendere dar. Die seltenen Isocyanate ($M^+ 247$) liegen in beiden Spezies vor. Beide Schwämme gehören der Ordnung Halichondrida an.

Diterpenfurane (Ambliofuran, Hexahydroambliofuran und Spongian-16-on) in Kaltwasserdemospongien

In zwei Spezies der Demospongiae konnten Diterpenfurane identifiziert werden. Es handelt sich dabei um *Dendrilla cirsiodes* und Unknown sp. 5, die beide der Ordnung Dendroceratida angehören. In beiden Schwämmen dominiert Hexahydroambliofuran über das ungesättigte Äquivalent Ambliofuran. Neben einer Reihe weiterer Diterpenoide, deren Strukturen massenspektrometrisch nicht näher identifiziert werden konnten, verfügen beide Schwämme zusätzlich über das sog. Spongian-16-on (Abb. 5.24).

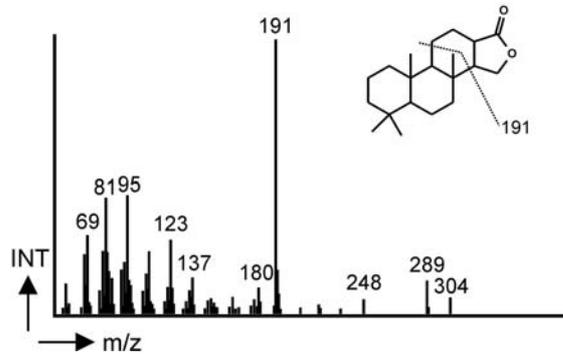


Abbildung 5.24 Massenspektrometrische Fragmentierung von Spongian-16-on aus *Dendrilla cirsioides*

Niedermolekulare Sekundärstoffe in Vertretern der Hexactinellida

Keiner der untersuchten hexactinelliden Schwämme enthält nieder molekulare Verbindungen mit potenzieller Sekundärmetabolitfunktion als Bestandteil seines Lipidinventars.

Diskussion

In dieser Studie konnten potenzielle Sekundärstoffe mit Sesquiterpenoid- und Diterpengrundstruktur nachgewiesen werden, welche chemotaxonomische Rückschlüsse erlauben. Hierbei handelt es sich um zyklische Sesquiterpenoid-Isonitrile, -Isocyanate und -Isothiocyanate sowie aliphatische bzw. zyklische Diterpene, die an einen Furankörper gekoppelt sind.

Stickstoffsubstituierte zyklische Sesquiterpenoide sind aus einer Reihe von Demospongiae beschrieben, wobei die Häufigkeit der verschiedenen Funktionalitäten variiert. So sind entsprechende Isonitrile und Isothiocyanate in Porifera relativ häufig, jedoch bislang ausschließlich aus den Familien Axinellidae, Agelasidae und Halichondriidae (Ordnung: Halichondrida) bekannt. Die korrespondierenden Isocyanate sind dagegen sehr selten und erst in Arbeiten über einen Schwamm der Spezies *Cyocalypta* sp. (Familie Halichondriidae) publiziert worden (GULAVITA *et al.*, 1986). Somit ist *Phakellia ventilabrum* erst der zweite Organismus, in dem diese Verbindungsklasse nachgewiesen werden konnte. Wie oben beschrieben gelten Isonitrile, Isocyanate und Isothiocyanate als biologisch aktiv und werden wahrscheinlich von marinen Invertebraten als Defensivmetaboliten synthetisiert (THOMPSON *et al.*, 1985). Dennoch ist die Rolle dieser Verbindungen in den Kaltwasserdemospongien *P. ventilabrum* und *Axinella rugosa* bisher nicht untersucht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu toxischen Verbindungen tropischer Verwandter scheint sie jedoch auch in diesen Organismen als Abwehrstoff eingesetzt zu werden. Abgesehen von der ökologischen Funktion dieser Sesquiterpenoide gelten sie aufgrund ihres taxonomisch begrenzten Vorkommens als Markerverbin-

dungen tropischer und subtropischer Vertreter der Ordnung Halichondrida (VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999) und auch in Kaltwasserdemospongiae sind sie Bioindikatoren für zwei der sechs analysierten Spezies dieses Taxons.

Zur Biosynthese von Isonitrilen und Isothiocyanaten in Schwämmen liegen einige Studien vor, die auf dem Einsatz ^{14}C -markierter Tracersubstanzen basieren. Im Zuge dieser Studie wurden ebenfalls Untersuchungen zur Bildung dieser Substanzen durchgeführt, deren Ergebnisse in Kapitel 6.2 dargestellt sind.

Zusätzlich zu den Sesquiterpenoiden konnten potenzielle Sekundärmetabolitditerpene als Bestandteil der Lipide zweier Arten der Dendroceratida aufgezeigt werden. So finden sich in *Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 5 Ambliofuran und insbesondere Hexahydroambliofuran. Beide Verbindungen enthalten einen Furankörper in ihrer Struktur. Diese wurden bislang ausschließlich aus mehreren Arten der Ordnung Dendroceratida nachgewiesen. Neben weiteren Diterpenen sind zwei *Darwinella*-Spezies, *Dendrilla rosea* und *Dysidea ambliia* als Produzenten beider Verbindungen beschrieben worden (BERGQUIST *et al.*, 1985; KARUSO *et al.*, 1986; KARUSO and TAYLOR, 1986). Obwohl die Rolle dieser Verbindungen als Sekundärmetabolit wahrscheinlich ist und die Gesamtextrakte eine hohe biologische Aktivität aufweisen, konnte für Ambliofuran in zwei Studien keine toxische Wirkung auf ausgewählte Fischarten und marine Pilze gezeigt werden (THOMPSON *et al.*, 1985; PAWLIK, 1993). Dagegen wurde nachgewiesen, dass von strukturell verwandten Komponenten, wie beispielsweise dem Furanditerpen Ambliol, eine deutliche Toxizität gegenüber potenziellen Fraßfeinden und infektiösen Eubakterien ausgeht. Neben den beschriebenen Verbindungen sind Vertreter der Dendroceratida eine reichhaltige Quelle verschiedenartiger zyklischer funktionalisierter Diterpene (BERGQUIST *et al.*, 1985; KARUSO *et al.*, 1986; KARUSO and TAYLOR, 1986; HAMBLEY *et al.*, 1990; TAYLOR and TOTH, 1997). Ein Beispiel dieser Vielfalt ist das sog. Spongian-16-on, welches in *Chelonaplysilla violacea*, *Dictyodendrilla cavernosa* und *Aplysilla* var. *sulphurea* nachgewiesen wurde (HAMBLEY *et al.*, 1990; KERNAN *et al.*, 1990; TAYLOR and TOTH, 1997). Diese Verbindung gilt als biosynthetisches Edukt der vielfältigen Komponentenklassen der Aplyroseole und Dendrillole, die ebenfalls einzig aus Vertretern der Dendroceratida bekannt sind (TAYLOR and TOTH, 1997). Spongian-16-on konnte in dieser Studie in den Dendroceratida *Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 5 nachgewiesen werden und ist somit eine nicht auf tropische und subtropische Gewässer beschränkte Markerverbindung dieser Ordnung.

Das Fehlen von niedermolekularen Sekundärmetaboliten in Porifera der Klasse Hexactinellida ist ein weiterer Hinweis auf den vergleichsweise konservativen Metabolismus in diesen urtümlichen Organismen. Dennoch bleibt das Wirkgefüge unklar. So können die fehlenden Sekundärstoffe die Folge des geringen Konkurrenzdruckes in deren Habitaten oder Ursache für die Besiedlung von Rückzugsarealen wie die Tiefsee sein.

Die erstmalig in dieser Studie durchgeführte umfassende Analyse des Naturstoffinhaltes borealer Demospongiae legt nahe, dass die gängige Ansicht einer grundsätzlich geringen Potenz von Kaltwasserinvertebraten bezüglich der Synthese pharmakologisch interessanter Sekundärmetaboliten nicht korrekt ist. Neben den hier dargestellten Verbindungsklassen, die in Vergleichsstudien eine hohe biologische Wirksamkeit gezeigt haben, konnten zusätzliche Substanzen in einer Reihe weiterer Kaltwasserspezies beobachtet werden. Allerdings konnten

von diesen bislang ausschließlich Teilstrukturen näher charakterisiert werden und sind daher Bestand weiter gehender Analysen. Dennoch zeigen die Daten dieser Arbeit bezüglich des Sekundärstoffinventars borealer Schwämme, dass auch in diesen Lebensräumen ein hohes pharmakologisches Potenzial in den dort vorkommenden Porifera vorliegt.

Unknown sp. 10	He.-'Lyssak.'-?		●	■ □	● ●	
Unknown sp. 11	He.-'Lyssak.'-?		●	■ □	● ●	
<i>Farrea</i> (?) sp.	He.-Hexact.-Farr.		●	□ ■	● ●	
<i>Ipheton panicea</i>	He.-Hexact.-Aphro.	P	●	□ ■ □	●	
<i>Heterochone</i> sp.	He.-Hexact.-Aphro.		●	□ □ ■ □		
Unknown sp. 12	He.-Hexact.-Aphro.	P	●	□ □ ■ □	● ●	
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Am.-Am.-Hyal.	T	●	□ □ □ □	● ●	
<i>Hyalonema</i> sp. 2	Am.-Am.-Hyal.	T	●	■ □ □	● ●	
Unknown sp. 13	Am.-Am.-Hyal.	T	●	□ ■ □ □	● ●	
Unknown sp. 14	Am.-?	T	●	□ □ ■ □	● ●	

Tabelle 5.12 Zusammenfassung charakteristischer Lipidmerkmale von Kaltwasserdemospongien und Hexactinellida. Taxonomische Einteilung siehe Tab. 4.1 und 4.2; Markierung = enthalten; gefüllt = hohe Konzentration (Spurenmengen sind nicht aufgeführt); T = 4,8,12-Trimethyltridecansäure, P = 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure); NS = Naturstoffe (Sekundärmetaboliten); grau unterlegt = nicht analysiert

5.4.1 Klasse Demospongiae

Alle untersuchten Vertreter der Demospongiae (n=32) enthalten in unterschiedlichen Konzentrationen und Verteilungen mittel- bis langkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren, die demnach ein konstituierendes Merkmal borealer Arten sind.

Unterklasse *Homoscleromorpha* (n = 1)

Fettsäuren – Schwämme der Ordnung *Homoscleromorpha* bilden offensichtlich eine Ausnahme bei dem Aufbau langkettiger Fettsäuren. Der untersuchte Schwamm der *Homoscleromorpha* – *Plakortis* sp. – enthält ausschließlich eine $21\Delta^{5,9}$ und keine höher molekularen Homologe dieser Verbindung, wie dies auch in anderen Vertretern dieser Ordnung beobachtet werden konnte (BERGQUIST *et al.*, 1984; CARBALLEIRA and SHALABI, 1990). Neben der Synthese mittlkettiger FA $\Delta^{5,9}$ enthält die untersuchte Art eine massenspektrometrisch charakterisierte $20\Delta^{6,14}$ -Carbonsäure, die auch aus dem Verwandten *Plakortis halichondroides* beschrieben wurde (CARBALLEIRA and SHALABI, 1990).

Unterklasse *Tetractinomorpha* (n = 8)

Sterole – Generell sind tetractinomorphe Demospongien weniger variabel in ihrer Sterolsynthese als die Ceractinomorpha. Weder deutliche Varianzen in der Kohlenstoffanzahl (nahezu keine Sterole mit C₂₆ und C₃₀, Ausnahme: *Thenia muricata*) noch 'unkonventionelle' Sterole konnten im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen werden (vgl. BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1986).

Ordnung Astrophorida (n = 7)

Fettsäuren – Neben den wahrscheinlich SAM-stämmigen nieder molekularen Fettsäuren weisen alle Astrophorida zusätzlich zu den LCFA $\Delta^{5,9}$ auch kurzkettige Fettsäuren (C₁₆ und C₁₈) mit der für Demospongiae typischen $\Delta^{5,9}$ -Dehydrierung auf. Diese sind bislang aus keinem Mikroorganismus beschrieben wurden. Die einzige Ausnahme diesbezüglich bildet *Thenia muricata*.

Sterole – Die Dominanz von Δ^5 mit einer Doppelbindung in der Seitenkette an Position C-24 Sterolen ist ein konstituierendes Merkmal dieser Ordnung, denn neben den drei *Geodia*-Arten, *Stryphnus ponderosus* und *Thenia muricata*, die hohe Konzentrationen an 24-Methylencholesterol beinhalten, weist u.a. *Pachymatisma johnstonii* mit Fucosterol das C₂₉-Strukturäquivalent als dessen Hauptkomponente auf (Tab. 5.8). Dennoch erscheint dieses Charakteristikum durch die ubiquitäre Verbreitung dieser Sterole als wenig spezifisch.

Ordnung Hadromerida (n = 1)

Fettsäuren – *Tentorium semisuberites* weist hohe Trimethyltridecansäure- (TMTD) Gehalte auf und unterstützt damit die Annahme, dass diese Verbindung ein verbreitetes Merkmal der Hadromerida ist (CARBALLEIRA *et al.*, 1989a).

Sterole – Das Sterolinventar von *T. semisuberites* wird dominiert von 5 α (H)-Cholestanol. Diese ringgesättigte Verbindung wurde in vielen weiteren Arten der Hadromerida in hohen Konzentrationen nachgewiesen (DELSETH *et al.*, 1979; BERGQUIST *et al.*, 1980).

Unterklasse Ceractinomorpha (n = 23)

Sterole – Innerhalb der Ordnung Ceractinomorpha wurden neben Varianzen in der Kettenlänge 'konventioneller' Sterole unterschiedliche, sehr spezifische 'unkonventionelle' Sterole identifiziert (z.B. $\Delta^{5,7}$ -ringungesättigte Sterole, 19-Norsterole und Sterole mit Cyclopropylseitenkette). Dies deutet auf eine gegenüber den Tetractinomorpha stärker divergente Sterolsynthese hin.

Ordnung Poecilosclerida (n = 7)

Familie Microcionidae (n = 2)

Sterole – Neben *Antho dichotoma* und *Clathria barleii* enthalten zwar eine Reihe weiterer Spezies Δ^0 -Steroide, jedoch dominieren sie das Steroidinventar dieser beiden Vertreter deutlich. Neben den Arten dieser Studie wurden auch in anderen Microcionidae hohe Gehalte an Stanolen beschrieben (BERGQUIST *et al.*, 1986).

Ordnung Haplosclerida (n = 6)

Fettsäuren – In der Ordnung Haplosclerida ist die Fähigkeit zur Synthese von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ verbreitet (z.B. GARSON *et al.*, 1994). Dies konnte auch in dieser Studie gezeigt werden. So weisen *Oceanapia robusta*, *Petrosia crassa* und *Hemigellius pumiceus* Verbindungen dieser Komponentenklasse auf.

Sterole – Aus Arten der Familie Haplosclerida sind spezifische Sterole bekannt, deren Seitenkette eine Cyclopropyleinheit beinhaltet (FATTORUSSO *et al.*, 1975; SICA and ZOLLO, 1978; CHO and DJERASSI, 1987; DJERASSI and SILVA, 1991; GAUVIN *et al.*, 1998).

Familie Chalinidae (n = 3)

Sterole – Der Schwamm *Haliclona* sp. 1 enthält Sterole mit einer charakteristischen Cyclopropylseitenkette. So setzen sich die Steroide dieser Art u.a. aus den C₂₉-Stanolen Calysterol, Calystanol und deren Isomeren 23H- und 24H-Isocalysterol zusammen.

Familie Petrosiidae (n = 1)

Fettsäuren – Ein weiterer Produzent von TMTD ist *Petrosia crassa*. Offensichtlich ist die Isoprenoidsäure TMTD in dieser Familie sehr verbreitet, denn neben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Petrosia*-Art synthetisieren alle bislang analysierten Petrosiidae diese Verbindung (AYANOGLU *et al.*, 1982; CARBALLEIRA and SHALABI, 1993).

Sterole – *Petrosia crassa* des Norwegenschelfs weist das sog. Petrosterol mit 75.5% des Steroidinventars auf. Zusätzlich enthält diese Art weitere cyclopropylhaltige Steroide (22,23-Dihydrocalysterol und Petrostanol), so dass insgesamt etwa 90% der Gesamtsterole von dieser 'unkonventionellen' Verbindungsklasse gebildet werden. Petrosterol konnte auch in weiteren Petrosiidae nachgewiesen werden (*Petrosia ficiformis*, *Petrosia hebes* und *Petrosia spheroida*; SICA and ZOLLO, 1978; CHO and DJERASSI, 1987; GAUVIN *et al.*, 1998) und zeigt damit die chemotaxonomische Relevanz dieser seltenen Verbindung. Dennoch scheint das Vorkommen von Cyclopropylseitenketten kein allgemeingültiges Merkmal der Petrosii-

dae zu sein, denn eine Reihe weiterer Vertreter dieser Familie haben keine Cyclopropylsterole (FROMONT *et al.*, 1994)

Ordnung Halichondrida (n = 6)

Fettsäuren – Zusätzlich zum Vorkommen von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ in einigen Spezies der Ordnung Haplosclerida ist diese lipidchemische Besonderheit in den Halichondrida besonders ausgeprägt (z.B. LAM *et al.*, 1989; DJERASSI and LAM, 1991). Von den hier untersuchten Spezies konnte ausschließlich *Hymeniacidon aff. fallax* nicht als Produzent dieser Verbindungsklasse identifiziert werden. Alle weiteren Arten enthalten bromierte Fettsäuren mit bis zu 76% ihrer Gesamtcarbonsäurefraktion. Des Weiteren überwiegt in den Lipiden der Halichondrida Phytansäure (fünf der sechs Arten), eine Verbindung, die auch bei tropischen und subtropischen Vertretern hoch konzentriert nachgewiesen wurde (CARBALLEIRA and EMILIANO, 1993). Allerdings sind auch Halichondrida beschrieben, die nur durch geringe Konzentrationen oder durch das Fehlen von Phytansäure gekennzeichnet sind (CARBALLEIRA *et al.*, 1987; GILLAN *et al.*, 1988; CHRISTIE *et al.*, 1994; BARNATHAN *et al.*, 1996).

Sekundärmetaboliten – Stickstoffsubstituierte zyklische Sesquiterpenoide sind aus einer Vielzahl von Arten der Demospongiae beschrieben. So sind entsprechende Isonitrile und Isothiocyanate in Porifera zwar häufig, jedoch bislang beschränkt auf Spezies der Familien Axinellidae, Agelasidae und Halichondridae (Ordnung: Halichondrida). Sie gelten aufgrund ihres taxonomisch begrenzten Vorkommens als Markerverbindungen tropischer und subtropischer Vertreter dieser Taxa (VAN SOEST and BRAEKMAN, 1999). In Kaltwasserdemospongiae scheinen sie darüber hinaus Bioindikatoren für zwei der sechs analysierten Spezies dieser Ordnung zu sein (*Phakellia ventilabrum* und *Axinella rugosa*). Die korrespondierenden Isocyanate sind dagegen sehr selten und, neben der in dieser Arbeit analysierten *Phakellia ventilabrum*, erst aus einem Schwamm der Spezies *Cyocalypta* sp. (Familie Halichondriidae) bekannt (GULAVITA *et al.*, 1986).

Familie Axinellidae (n = 4)

Sterole – In der Familie Axinellidae ist die Synthesefähigkeit von $\Delta^{5,7}$ -Steroiden verbreitet (DE ROSA *et al.*, 1973; BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1991) und auch in *Phakellia ventilabrum* ist diese Verbindungsklasse dominant. *Axinella infundibuliformis* vom Sula-Rücken beinhaltet ausschließlich Stanole mit dem seltenen 19-Nor-Grundgerüst. In marinen Organismen sind 19-Norstanole einzig aus der mediterranen *Axinella polypoides* beschrieben (DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE and SODANO, 1974a) und sind somit ein eindeutiges, aber wenig verbreitetes Merkmal distinkter Spezies der Axinellida.

Ordnung Dendroceratida (n = 4)

Fettsäuren – *Dendrilla cirsioides* enthält neben LCFA $\Delta^{5,9}$ eine Verbindung mit dem sehr ungewöhnlichen $\Delta^{6,11}$ -Doppelbindungsmuster. Diese ist bisher ausschließlich aus dem Schwamm *Euryspongia rosea* beschrieben worden (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989), welcher der Familie Dictyocertidae angehört (Ordnung: Dendroceratida).

Sterole – Zwei der vier untersuchten Arten (*Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 5) weisen hohe Konzentrationen an $\Delta^{5,7}$ -ungesättigten Sterolen auf, deren dominantes Vorkommen auch aus anderen Dendroceratida nachgewiesen wurde (DE ROSA *et al.*, 1973; BERGQUIST *et al.*, 1980; BERGQUIST *et al.*, 1991).

Sekundärmetaboliten – Spezies der Dendroceratida gelten als Produzenten furanhaltiger Diterpene. So weisen *Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 5 Ambliofuran und insbesondere Hexahydroambliofuran auf. Neben weiteren Diterpenen sind zwei *Darwinella*-Spezies, *Dendrilla rosea* und *Dysidea ambliia*, als Produzenten beider Verbindungen beschrieben worden (BERGQUIST *et al.*, 1985; KARUSO *et al.*, 1986; KARUSO and TAYLOR, 1986). Zusätzlich zu a-

zyklischen Furanditerpenen sind Vertreter der Dendroceratida eine reichhaltige Quelle verschiedenartiger zyklischer funktionalisierter Diterpene (BERGQUIST *et al.*, 1985; KARUSO *et al.*, 1986; KARUSO and TAYLOR, 1986; HAMBLEY *et al.*, 1990; TAYLOR and TOTH, 1997). Das sog. Spongian-16-on ist ein Beispiel für diese vielfältige Verbindungsklasse. Beschrieben ist Spongian-16-on aus *Chelonaplysilla violacea*, *Dictyodendrilla cavernosa* und *Aplysilla* var. *sulphurea*, die alle der Ordnung Dendroceratida angehören (HAMBLEY *et al.*, 1990; KERNAN *et al.*, 1990; TAYLOR and TOTH, 1997). Spongian-16-on konnte in dieser Studie in zwei der untersuchten vier Arten der Dendroceratida (*Dendrilla cirsioides* und Unknown sp. 5) identifiziert werden und ist somit eine nicht auf tropische und subtropische Gewässer beschränkte Markerverbindung dieser Ordnung.

5.4.2 Klasse Hexactinellida

Fettsäuren – Alle Hexactinellida (n=23) weisen ähnlich hohe Konzentrationen an LCFA $\Delta^{5,9}$ wie die untersuchten Demospongiae auf und zeigen so, dass die sog. 'demospongiac acids' kein auf die Demospongiae beschränktes Merkmal sind.

Sterole – Des Weiteren enthalten Hexactinellida ein vergleichsweise gering differenziertes Steroidinventar, das jedoch auffällige Verbindungen enthält. So sind, neben Cholesterol und den C₂₄-alkylierten Homologen, 5 α (H)-Stanole und insbesondere die korrespondierenden, sehr seltenen 3-Stanone in den Hexactinellida sehr verbreitet und auf Vertreter dieser Poriferaklasse beschränkt (BLUMENBERG *et al.*, 2002). Generell variiert die Lipidzusammensetzung hexactinellider Schwämme kaum, so dass im Gegensatz zu den Demospongiae nur wenige Verbindungen chemotaxonomische Aussagen ermöglichen.

Unterklasse Hexasterophora (n = 19)

Fettsäuren – In allen untersuchten Arten der Hexasterophora ist Phytansäure in variablen Konzentrationen enthalten.

Unterklasse Amphidiscophora (n = 4)

Fettsäuren – Abweichend von den analysierten Vertretern der Hexasterophora ist in den Amphidiscophora keine Phytansäure, sondern ausschließlich TMTD enthalten, so dass anhand der Isoprenoidsäuren eine Unterscheidung der beiden Unterklassen möglich ist.

5.5 Lipidchemischer Versuch über die phylogenetische Beziehung von Demospongiae und Hexactinellida

Im Gegensatz zu der anerkannten Ansicht, dass Porifera monophyletischen Status besitzen, werden die evolutionär-phylogenetischen Beziehungen der rezenten Poriferaklassen Demospongiae und Hexactinellida seit längerem kontrovers diskutiert. So lassen sich zwei generell unterschiedliche Ansätze erkennen, die entweder (i) von einer engen Beziehung der Calcarea und den Demospongiae (unter Abtrennung der Klasse Hexactinellida) oder (ii) von einer phylogenetischen Verknüpfung der Demospongiae und der Hexactinellida (unter Ausschluss der Calcarea) ausgehen (ADAMS *et al.*, 1999 und Zitate darin). Beide Ansätze basieren auf Daten, die aus Untersuchungen der Zellmorphologie, Skelettbildung, Larvalentwicklung und – in jüngerer Zeit – vergleichender Gensequenzen stammen. Die Hauptargumente, die zur Zusammenfassung der Klassen Calcarea und Demospongiae führen, resultieren aus der im Gegensatz zu dem einzigartigen syncytialen Aufbau der Hexactinellida (Subphylum Symplesma) vorhandenen Ähnlichkeit in der Zellstruktur (REISWIG and MACKIE, 1983). Aus diesem Grund wurde für Calcarea und Demospongiae das Subphylum Cellularia oder, wegen des Fehlens einer Pinacodermschicht bei den Hexactinellida, das der Pinacophora vorgeschlagen (REITNER and MEHL, 1996). Unterstützt wird diese These durch die vergleichenden Aminosäure-Sequenzierungen jeweils eines Vertreters der drei Klassen (KRUSE *et al.*, 1998) und die geringen Übereinstimmungen des Hsp70-Gens in Demospongiae und Calcarea (BORCHIELLINI *et al.*, 1998). Die These der näheren Verwandtschaft der Hexactinellida zu den Demospongiae dagegen beruht auf ihren Ähnlichkeiten in der Larvalentwicklung (BÖGER, 1988), der Skelettstruktur (Silikatnadeln bei Demospongiae und Hexactinellida, Calcitnadeln bei den Calcarea) und auf rRNA-Untersuchungen, die an einer Reihe von Arten durchgeführt wurden (CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996; ADAMS *et al.*, 1999; MEDINA *et al.*, 2001). Ein zusätzliches Resultat dieser Analysen war die offensichtlich enge Verwandtschaft der Calcarea zu den Rippenquallen (Phylum Ctenophora) und ihre relativen Nähe zu anderen höheren Invertebraten.

Lipidchemische Daten wurden in der Diskussion beider Hauptthesen nicht berücksichtigt, da insbesondere das Inventar der Hexactinellida bislang nicht bekannt war. Somit bilden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Studie erzielt wurden, erstmals die Möglichkeit, die enzymatisch bedingte Fettsäuresynthese der drei Klassen zu vergleichen und in die oben genannten Ergebnisse und Hypothesen miteinzubeziehen.

Seit langem ist bekannt, dass alle Schwämme der Demospongiae mittkettige und langkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren produzieren. Neben dem fehlenden Nachweis in allen anderen bislang publizierten Organismen konnten sie auch nicht in Vertretern der Calcarea belegt werden (BERGQUIST *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1984). Aus diesem Grund wurde für diese Komponentenklasse der Begriff 'demospongiic acid' vorgeschlagen (LITCHFIELD and MORALES, 1976; DJERASSI and LAM, 1991). Als Voraussetzung zur Bildung von LCFA $\Delta^{5,9}$ gilt ein sehr spezifisches Fettsäure-Enzymsystem, welches zur Verlängerung kurzkettiger, wahrscheinlich exogener Vorläufermoleküle (bakteriell?) und einer sukzessiven Dehydrierung an den Positionen fünf und neun der Carbonsäuren führt (DJERASSI and LAM, 1991). Ein Hauptergebnis, das im Zuge dieser Studie erzielt wurde, ist der Nachweis dieser Eigenschaft nicht nur in der Klasse Demospongiae, sondern auch in allen untersuchten Hexactinellida. Dagegen fehlt dieses

Merkmal in den Calcarea (THIEL *et al.*, 2002). Neben dieser grundsätzlichen Übereinstimmung in der Lipidstruktur der Kieselschwämme konnten allerdings auch Unterschiede nachgewiesen werden. So scheinen die Hexactinellida lipidchemisch konservativ gegenüber den Demospongiae, denn sie synthetisieren strukturell weniger diverse Carbonsäuren mit einem deutlichen Maximum polyungesättigter $30\Delta^{5,9}$ -Säuren. Dagegen finden sich in den Demospongiae Abweichungen in Struktur, Kettenlänge und Substitution dieser Markerkomponenten (s. Kap. 5.1; z.B. DJERASSI and LAM, 1991). Des Weiteren ist das Steroidinventar in Vertretern der Hexactinellida, entgegen der Vielfalt in den Demospongiae, auf wenige Verbindungen beschränkt und weist so zusätzlich auf eine ancestrale Zellstruktur in diesem Schwammtaxon hin (BLUMENBERG *et al.*, 2002 und Zitate darin). So scheinen hexactinellide Schwämme Nahrungssterole aufzunehmen und zu modifizieren, viele Demospongiae dagegen, als mögliche evolutionäre Weiterentwicklung, zur *de novo*-Sterolsynthese fähig zu sein. Ein Vergleich der Sterolsynthese zu der der Calcarea ist schwierig, da umfassende Vergleichsdaten fehlen und nur wenige Arten untersucht sind (BERGQUIST *et al.*, 1986). Die wenigen Daten weisen jedoch auf eine Predominanz von 3β -ol- Δ^5 -Sterolen und das Fehlen ungewöhnlicher Ring- und Seitenketten-Strukturen, wie sie aus den Demospongiae beschrieben sind.

Neben den Primärstoffen wurden in dieser Studie Untersuchungen zum Sekundärmetabolitinhalt durchgeführt. Entgegen dem Nachweis spezifischer Metaboliten in einigen Kaltwasserarten der Demospongiae (s. Kap. 5.3) und in einer Fülle weiterer Naturstoffpublikationen zu dieser Klasse (MUNRO and BLUNT, 2000), scheinen hexactinellide Schwämme keine Abwehrsubstanzen zu bilden. Das Fehlen dieser Substanzen ist ein weiterer Hinweis auf den vergleichsweise konservativen Lipidmetabolismus in den urtümlichen Hexactinellida. Dennoch bleibt unklar, ob dieses Merkmal aufgrund der geringeren Konkurrenz in ihren rezenten Habitaten zurückzuführen ist, oder ob diese Organismen eher dadurch bedingt vornehmlich in diesen 'Rückzugs'-Arealen siedeln.

Unabhängig von den phylogenetischen Aussagen, die anhand lipidchemischer Parameter möglich sind, konnten weiterhin Hinweise auf die Vorläuferorganismen des Phylums Porifera erzielt werden. Diesbezüglich wird von einigen Autoren angenommen, dass die Organisation begeißelter Protozoa (Ciliophora) als Vorstufe der Schwammentwicklung anzusehen ist (CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996 und Zitate darin). Diese These wird durch Markerkomponenten gestützt, die möglicherweise lipidchemische Relikte dieser Flagellaten sind und im Rahmen dieser Arbeit in einigen Schwämmen nachgewiesen werden konnten. So sind beispielsweise in einer Reihe von Schwämmen ausgesprochen hohe Gehalte sog. Plasmalogene (vinylethergebundene Phospholipide) beschrieben worden (s. Kap. 5.1.6; DEMBITSKY *et al.*, 1989), die ebenfalls eine dominante Komponentenklasse in den Ciliophora sind (KANESHIRO, 1987). Weitere charakteristische Biomarker begeißelter Protozoa sind die seltenen $\Delta^{6,11}$ -Carbonsäuren (KOROLY and CONNER, 1976), die als Bestandteile der Demospongiae *Tentorium semisuberites* und *Dendrilla cirsioides* in dieser Arbeit und von *Euryspongia rosea* in einer anderen Studie (CARBALLEIRA and MALDONADO, 1989) gezeigt werden konnten. Denkbar, wenn auch aufgrund fehlender entsprechender Nachweise in der schwammassoziierten Mikroorganismenpopulation eher unwahrscheinlich, ist auch eine Assoziation von Schwämmen mit Ciliophora, die zu den hohen Konzentrationen dieser Biomarker führt. Glaubhafter

erscheint eher das Vorhandensein von Relikten einer ursprünglichen Lipidbiosynthese, die in einigen Arten der Porifera konserviert wurde. Allerdings finden sich in den Hexactinellida – der generellen Annahme einer phylogenetisch basalen Position dieser Klasse widersprechend – keine $\Delta^{6,11}$ -Fettsäuren und Plasmalogene nur sehr untergeordnet. Das Fehlen dieser ursprünglichen Merkmale in hexactinelliden Schwämmen deutet entweder auf eine spätere Abspaltung der Hexactinellida von den Demospongiae und so auf eine progressivere Phylogenie des erstgenannten Taxons hin. Gestützt wird diese These durch die Funde fossiler Schwämme in Zentral Guizhou (Süd China), die ein Alter von ~580 Ma Jahren aufweisen (LI *et al.*, 1998). Die dabei untersuchten Phosphatgesteine enthalten silikatische Spiculae mit monoaxonomaler Struktur und stammen wahrscheinlich von Vertretern der Klasse Demospongiae. Denkbar ist jedoch auch, dass die Abwesenheit relikthafter Charakteristika in den Hexactinellida mit deren syncytialer Zellstruktur zusammenhängt und somit ursprüngliche Merkmale einer wahrscheinlich vorhandenen primitiven Mehrzelligkeit verloren gegangen sind (KRUSE *et al.*, 1998). Diese Möglichkeit erscheint plausibler, da alle anderen Lipiddaten dieser Studie auf eine basalere Position der Hexactinellida gegenüber den Demospongiae hindeuten.

Die Einbeziehung des in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Vergleichs der Lipiddaten von Hexactinellida und Demospongiae in die beiden Hauptthesen zur Phylogenie beider Klassen lässt folgende Schlüsse zu. Zwischen beiden Klassen, unter Ausschluss der Calcarea, konnten gleiche Lipidgrundmuster und damit

Enzymsysteme zur Synthese essenzieller Membransäuren nachgewiesen werden, die eine sehr enge verwandtschaftliche Beziehung nahe legen (THIEL *et al.*, 2002). Somit deuten diese bislang in die Diskussion nicht integrierten Ergebnisse der Membranphysiologie, auf die These A und widersprechen der Annahme, dass Calcarea und Demospongiae den Hexactinellida gegenübergestellt werden müssen (These B in Abb. 5.25). Zusätzlich deuten die Lipidinventare der Kieselchwämme insgesamt auf eine konservativere Ausprägung der Hexactinellida, da ihre Carbonsäuren und Sterole, im Unterschied zu den Demospongiae, strukturell weniger divers und durch das Fehlen

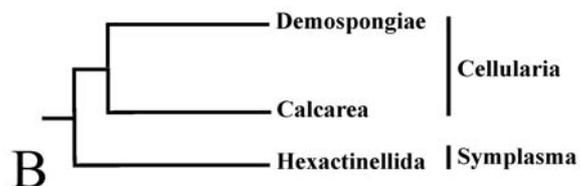
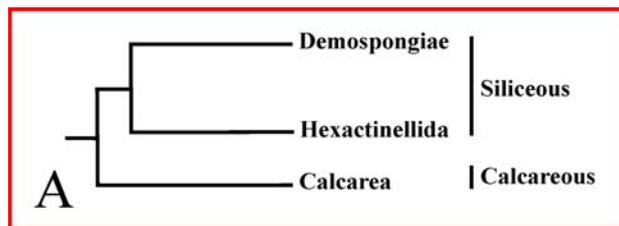


Abbildung 5.25 Hypothesen zur Phylogenie der drei rezenten Porifera-Klassen, basierend u.a. auf der chemischen Zusammensetzung der Spiculae und der Zellorganisation. (aus ADAMS *et al.*, 1999; A nach BÖGER, 1988; B nach REISWIG and MACKIE, 1983); rote Umrandung markiert die Hypothese, die durch lipidchemische Daten dieser Studie unterstützt wird

ungewöhnlicher Substituenten gekennzeichnet sind. Demnach scheinen die Hexactinellida eine ancestrale Linie der Kieselchwämme zu sein, von denen sich die Demospongiae abgespalten haben. Diese haben dann aufgrund ihrer variableren Biosynthesestrategien und der Möglichkeit zur Produktion von Abwehrsubstanzen eine deutlich größere Ausbreitung erlangt und führten so zudem zur Verdrängung der Hexactinellida in die Tiefsee- und Kaltwasserbereiche.

6 Ergebnisse und Diskussion Teil 2 – Untersuchungen zur Rolle und Biosynthese von Lipidkomponenten in Kaltwasserdemospongien

In den folgenden Kapiteln werden Daten vorgestellt und diskutiert, die Informationen zu Rolle und Biosynthese distinkter Lipide in Porifera liefern. Die Ergebnisse sind in drei Abschnitte untergliedert, wovon der erste (1.) mögliche Kaltwasseradaptation in den Lipiden borealer Demospongiae beschreibt. Die beiden Folgenden (2. und 3.) beziehen sich auf Untersuchungen zur Biosynthese spezifischer Komponenten, die mit Hilfe zweier unterschiedlicher Ansätze bearbeitet wurden. Beide Verfahren wurden erstmalig an marinen Invertebraten durchgeführt und stellen so eine Erweiterung vorhandener Analyseverfahren dar.

1. Die Funktion von Lipidkomponenten in den Porifera ist weit gehend unerforscht. Die wenigen Studien beziehen sich meist auf die Rolle möglicher Sekundärmetaboliten im Defensivsystem von Schwämmen (MCCLINTOCK and BAKER, 1997; NISHIYAMA and BAKUS, 1999; SCHUPP *et al.*, 1999a; ASSMANN *et al.*, 2000). Die distinkte Rolle von Primärlipiden wird dagegen nur am Rande behandelt, wenn strukturelle Auffälligkeiten beschrieben und deren mögliche Funktionen im Organismus diskutiert wurden (JEFFERTS *et al.*, 1974; HAHN *et al.*, 1988). Wichtiger Bestandteil dieser Diskussion ist die Frage nach Lipidanpassungen von Schwämmen an kalte Temperaturen. Hier waren aufgrund fehlender Vergleichsdaten borealer Vertreter bislang keine allgemeinen Aussagen möglich. Dies wird mit Hilfe des in dieser Studie erzeugten Datensatzes versucht (Kap. 6.1).

Die Basis bisheriger Biosynthesestudien zur Klärung von Edukt-Produkt-Beziehungen bildet der Einsatz ^{14}C -radiomarkierter Tracersubstanzen. Diese Methode erfordert allerdings einen erheblichen analytischen Aufwand und hohe Sicherheitsstandards. Jüngere Ansätze nutzen daher bevorzugt Verbindungen, die entweder mit stabilen Isotopen (^{13}C) markiert sind oder denen ausschließlich das Prinzip der Fraktionierung stabiler Isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) zwischen Edukt und Produkt eines Biosynthesepfades zugrunde liegt. Dieses relativ neue Verfahren wird seit etwa 20 Jahren erfolgreich in der Geo- und Biogeochemie eingesetzt und laufend zur Klärung zusätzlicher Fragestellungen erweitert. Der Hauptvorteil ^{13}C - gegenüber ^{14}C -basierter Markierungsexperimente ist – bei vergleichbarer Aussagekraft – die nicht vorhandene radioaktive Strahlung, die den Umgang bei der Synthese, dem Hantieren und der Analyse ungleich vereinfacht.

Die Messung der Verhältnisse stabiler Isotope an Lipidbestandteilen mit Hilfe der gekoppelten Gaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS) erlaubt allerdings auch ohne Tracer-Substanzen eine Unterscheidung von Edukt und Produkt einer biosynthetischen Beziehung. Dem zugrunde liegt die Beobachtung, dass Prozesse in Organismen, bei denen eine Transformation oder ein Transport in der Zelle ablaufen, zu einer Diskriminierung des schwereren Isotops (^{13}C) und so zu einer Verringerung des Isotopenverhältnisses führen ($\delta^{13}\text{C}$).

Der Unterschied beider methodischer Ansätze, die die Messung stabiler Isotope nutzen, liegt in deren Aussagekraft. So ermöglicht die Verabreichung ^{13}C -markierter Komponenten die Verfolgung in bis heute unbekannte Verbindungen und Kompartimente und zeigt so möglicherweise neue Biosynthesezusammenhänge auf. Bei bekanntem biosynthetischem Zusam-

menhang, aber unbekannter Richtung des Pfades reicht oftmals die Analyse mit Hilfe der GC-C-IRMS aus, da dieser Prozess häufig von einer Fraktionierung begleitet wird.

Mit beiden Verfahren (Einsatz ^{13}C -markierter Tracersubstanzen, Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes an natürlichen Lipidfraktionen) wurden die folgenden Fragestellungen beispielhaft anhand des Schwammes *Phakellia ventilabrum* beleuchtet, um Aussagen zum Ursprung und/oder biosynthetischen Zusammenhängen bestimmter Verbindungen zu gewinnen. Dieser Schwamm wurde für die Untersuchungen ausgewählt, da er Komponentenklassen enthält, deren Biosynthesepfade mit den verwendeten Methoden analysiert werden können, und da er ein verbreiteter Vertreter in den Kaltwasserregionen des Nordatlantiks ist.

2. Zur Biosynthese spezifischer Lipidkomponenten in Schwämmen liegen eine Reihe von Daten vor. Diese beleuchten die Synthese von Sterolen, Lipidsäuren und verschiedenen Sekundärmetaboliten (z.B. RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; DJERASSI and LAM, 1991; DJERASSI and SILVA, 1991; GARSON, 1993; GINER, 1993). Ein Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass Schwämme offensichtlich eubakteriell produzierte Verbindungen ihrer assoziierten Bakterien nutzen, um eigene Lipide zu bilden. Dies unterstreicht die Relevanz dieser Symbiose (RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; HAHN *et al.*, 1988). Neben den Eubakterien als Bestandteil der schwammassoziierten Mikroorganismen (SAM) wurde jüngst eine größere Verbreitung von Archaea in Porifera nachgewiesen (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002; PAPE *et al.*, 2002). Ein biosynthetischer Zusammenhang beider Organismen konnte allerdings noch nicht aufgezeigt werden, obwohl Schwämme strukturell ähnliche Verbindungen enthalten, die möglicherweise aus den Lipiden von Archaea resultieren. Diese Beziehung wurde mit Hilfe der Zufuhr ^{13}C -markierten Archaeols untersucht und mit Hilfe weiterer begleitend durchgeführter Ansätze diskutiert.
3. Nur wenige Daten liegen zur Biosynthese bromierter Fettsäuren und der intrakonversionellen Beziehung zwischen pharmakologisch hoch potenten Isonitril- und Isothiocyanatsesquiterpenoiden vor. Entsprechende Daten beziehen sich auf wenige tropische Schwämme und sind teilweise widersprüchlich. Beide Komponentengruppen liegen in *P. ventilabrum* vor. Aus diesem Grund und aufgrund der borealen Herkunft wurde *P. ventilabrum* ausgewählt, um biosynthetische Fragestellungen in dem Schwamm mit Hilfe natürlicher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse zu bearbeiten.

6.1 Lipidadaptionen psychrophiler Organismen

Im Zuge dieser Studie wurden u.a. ester gebundene Membransäuren von 32 Demospongiae untersucht, deren Lebensraum eine Umgebungstemperatur von etwa 8°C aufweist (s. Kap. 4.1). Somit sind diese Organismen gezwungen, durch strukturelle Modifikationen in ihren Lipiden ausreichend die Flexibilität und Permeabilität ihrer Zell- und Organellenmembranen zu regulieren. An einer Reihe von Mikroorganismen und Metazoen sind Studien durchgeführt worden, um die Änderungen insbesondere der Membransäurezusammensetzungen zu analysieren und so Kaltwasseradaptionen zu charakterisieren. Entsprechende Anpassungen spiegeln sich in erster Linie in der relativen Zunahme vorhandener spezifischer Verbindungen in den Lipiden wider. So ist beispielsweise bekannt, dass zusätzliche Doppelbindungen und Verzweigungen eine Veränderung der Membraneigenschaften verursachen und so zu einer gesteigerten Fluidität führen. Ein Vergleich thermophiler (Optimum: 42–70°C), mesophiler (20–42°C) und psychrophiler (-5–25°C; SCHLEGEL, 1992) Bakterien derselben Gattung wies beispielsweise einen deutlichen Unterschied im Gehalt ungesättigter Membransäuren nach (thermophile: 10%; mesophile: 37%; psychrophile: 52%; CHAN *et al.*, 1971). Obwohl keine direkte Messung der Membranfluidität durchgeführt wurde, scheinen die untersuchten Clostridien diese durch die Menge an ungesättigten Carbonsäuren zu steuern. Ähnliche Effekte wurden auch für Cyanobakterien und einen Schleimpilz (*Acanthamoeba castellanii*) nachgewiesen (JONES *et al.*, 1994; MURATA, 1994). Zusätzlich zeigte sich in diesen Organismen ein Anstieg kurzkettiger Lipidsäuren bei abnehmender Temperatur. Eine weitere Möglichkeit der Membrananpassung bei niedrigen Umgebungstemperaturen wird in der Zunahme an *anteiso*-Verzweigungen (*ai*) gesehen. Dieser Effekt wurde beim Wachstum von zwei *Bacillus*-Arten beobachtet (SUUTARI and LAAKSO, 1992). Gleichzeitig nehmen allerdings die relativen Gehalte an *iso*-verzweigten Säuren (*i*) ab, so dass sich das absolute Verhältnis von endständig verzweigten zu unverzweigten Verbindungen nicht verändert. Der Anstieg von *ai*-Fettsäuren wird darauf zurückgeführt, dass bei geringen Temperaturen Verbindungen mit niedrigeren Siedepunkten in den Zellwänden bevorzugt werden (SUUTARI and LAAKSO, 1992). So liegt beispielsweise der Schmelzpunkt der *i*-C₁₆-FA (Schmp. = 60°C) 23°C über dem der *ai*-C₁₆-FA (Schmp. = 37°C).

Neben Untersuchungen an Mikroorganismen wurden auch Analysen zur Lipidzusammensetzung von Kaltwassermetazoa durchgeführt. Diese wiesen u.a. in den Hirnen antarktischer Fischarten deutlich höhere Gehalte an polyungesättigten Membransäuren als in Vergleichspezies gemäßiger und subtropischer Gewässer nach (LOGUE *et al.*, 2000). Und auch Schwämme scheinen ähnliche Mechanismen zu nutzen, um ihre Membranfunktionen aufrecht zu halten. Dies zeigen Daten, die aus Vergleichsanalysen einer temperaturtoleranten Art zu verschiedenen Jahreszeiten (Winter und Sommer) und von unterschiedlichen Lokalitäten stammen (HAHN *et al.*, 1988). Der Schwamm *Microciona* enthält als Hauptmembransäuren eine zweifach und eine dreifach ungesättigte Hexacosansäure (26:2 und 26:3), deren Verhältnis je nach Umgebungsbedingungen variiert. Im Winter wurde eine deutliche Zunahme an Hexacostriensäure im Vergleich zum Sommer nachgewiesen. Zusätzlich zeigten sich relative Unterschiede dieser Komponente in einer *Microciona*-Art, die aus der Bucht von New Jersey stammt und einer, die in Gewässern vor Florida gesammelt wurde. Der Schwamm aus New Jersey weist 14% 26:2 und 31% 26:3 auf, dagegen enthält *Microciona* aus Florida 42% 26:2

und nur 10% 26:3 (JEFFERTS *et al.*, 1974). Demnach scheinen auch Porifera die Variation des Gehaltes an polyungesättigten Carbonsäuren direkt als Möglichkeit zu nutzen, um bei kalten Temperaturen die Zellfunktionen gewährleisten zu können. Neben Polyunsättigungen sind in den Membransäuren der untersuchten Demospongiae weitere Strukturmodifikationen enthalten, deren permeabilitätsverändernde Wirkungen in Mikroorganismen nachgewiesen wurden (s.o.). Hierzu zählen *ai*-LCFA $\Delta^{5,9}$, aber auch Verbindungen, deren direkter Bezug zu den Zelleigenschaften bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte. Diese kommen jedoch in hohen Konzentrationen in einigen Spezies vor und werden im Folgenden als mögliche Kaltwasseradaptation diskutiert.

Die Demospongiae-Arten vom Norwegenshelf scheinen in ihrem Auftreten auf den borealen Lebensraum beschränkt zu sein, so dass ein direkter Vergleich der Lipide einer Art aus verschiedenen Temperaturbereichen nicht möglich ist. Deshalb beziehen sich die dargestellten Daten exemplarisch auf Kaltwasserarten der Unterklasse Tetractinomorpha ($n = 8$), deren Lipidinventare mit verwandten Vertretern tropischer Gewässer verglichen werden ($n = 7$). Zusätzlich wird anhand von Kaltwasserdemospongiae der Ordnung Halichondrida vergleichend die Bromierung von LCFA $\Delta^{5,9}$ als ungewöhnliche Lipidanpassung behandelt.

6.1.1 Lipidadaptionen in Kaltwasserdemospongien des Norwegenschelfs

In Kapitel 5.1 sind die Inventare der estergebundenen Membransäuren borealer Demospongiae eingehend dargestellt und unter chemotaxonomischen Aspekten diskutiert worden. Nicht dargelegt wurden Variationen taxonomisch relevanter Verbindungen, die möglicherweise auf Anpassungen an die geringen Umgebungstemperaturen zurückgehen. Wie oben beschrieben konnte für Mikroorganismen gezeigt werden, dass Carbonsäuren mit niedrigen Schmelzpunk-

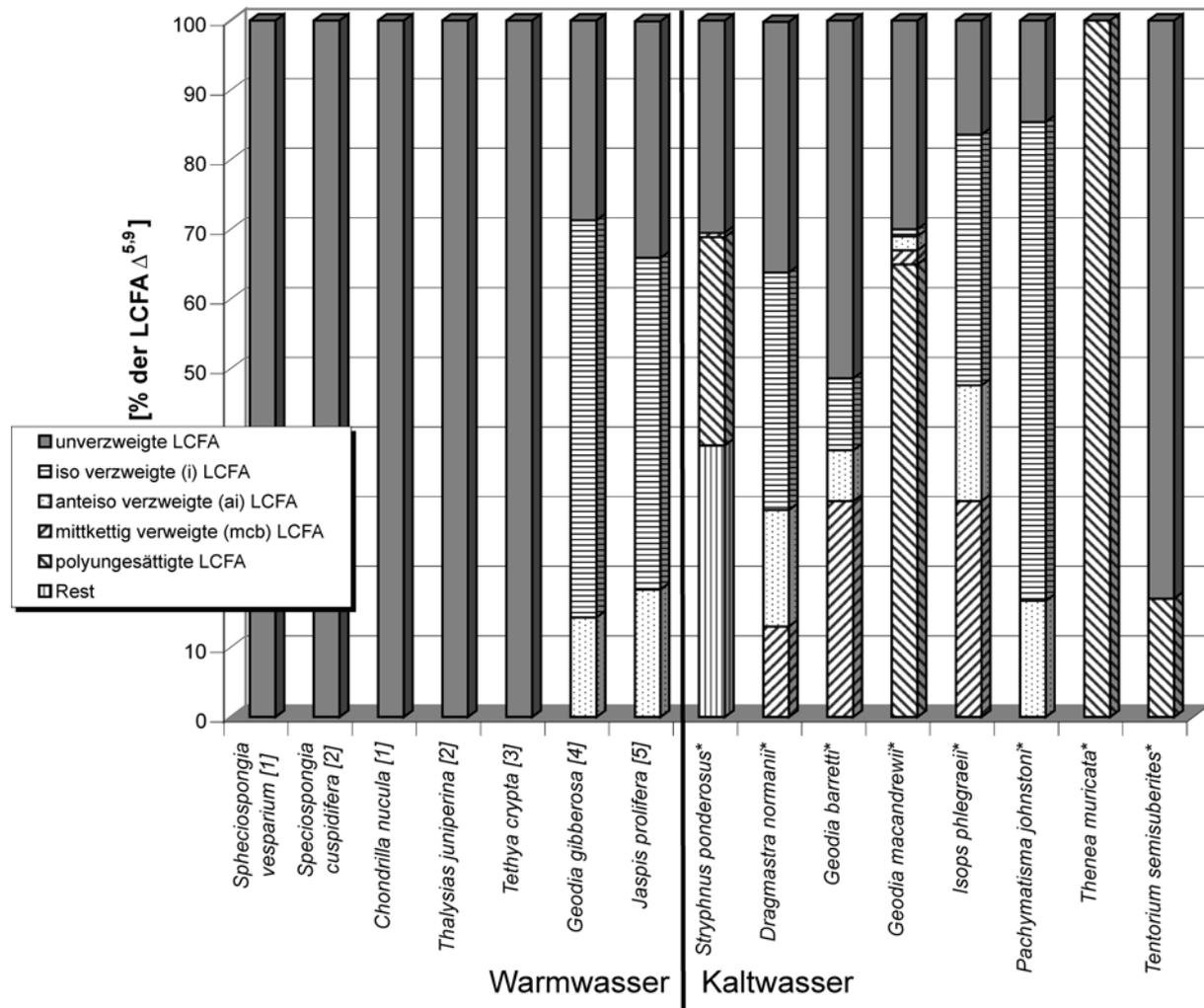


Abbildung 6.1 Relative Lipidsäureverteilungen borealer und tropischer Arten der Unterklasse Tetractinomorpha ([1] CARBALLEIRA *et al.* (1987); [2] CARBALLEIRA *et al.* (1990); [3] CARBALLEIRA and SEPULVEDA (1992); [4] CARBALLEIRA and RODRIGUEZ (1991); [5] CARBALLEIRA *et al.* (1986); * = Daten dieser Studie

ten bevorzugt synthetisiert werden. Ähnliche Favorisierungen können auch für Schwämme angenommen werden. Zu diesen Komponenten zählen polyungesättigte, ai -(ω 3) und mittkettig verzweigte ($\omega > 3$) Carbonsäuren, die einen geringeren Schmelzpunkt als unverzweigte und weniger ungesättigte Strukturäquivalente haben. Wenn auch ein direkter Zusammenhang des Gehaltes mittkettig verzweigter Membransäuren zur Umgebungstemperatur bislang noch nicht gezeigt werden konnte, so ist auch für diese Komponentenklasse wegen ihres vergleichsweise geringen Schmelzpunktes eine Favorisierung wahrscheinlich. So zeigt beispielsweise eine 10Me- C_{16} -Carbonsäure gegenüber einer ai - C_{16} einen um 13°C niedrigeren

Schmelzpunkt und lässt somit für diese Verbindungsklasse ähnliche Bevorzugungen annehmen, wie sie für *ai*-Säuren gezeigt wurde. Entsprechend mittkettig verzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$ sind in den untersuchten Demospongiae teilweise hochkonzentriert enthalten. In Abbildung 6.1 sind die relativen Verteilungen verzweigter und mehrfach ungesättigte Lipidsäuren im Vergleich mit geradkettigen LCFA $\Delta^{5,9}$ am Beispiel von Tetractinomorpha tropischer und kalter Gewässer zusammengefasst. Des Weiteren sind in Tabelle 6.1 die Verhältnisse von *ai*-LCFA $\Delta^{5,9}$ + MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ + LCFA $\Delta^{5,9,x}$ (R_{LCFA}) zu den enthaltenen ‚konventionellen‘ LCFA $\Delta^{5,9}$ dargestellt. Die Lipidstudien zu sieben Tetractinomorpha-Arten aus Puerto Rico und aus australischen Gewässern zeigen, dass in diesen insgesamt nur geringe Variationen ihres Lipidsäuremusters auftreten. Diesbezüglich vorherrschend sind unverzweigte LCFA $\Delta^{5,9}$, die in fünf Exemplaren als alleinige Strukturklasse vorliegen ($R_{LCFA} = 0$; Ordnung Hadromerida). Nur in *Geodia gibberosa* und *Jaspis stellifera*, tropische Tetractinomorpha der Ordnung Astrophorida, sind hohe Konzentrationen an *i*- und – geringer im Gehalt – *ai*-LCFA $\Delta^{5,9}$ nachgewiesen worden, so dass sich für beide ein R_{LCFA} von ~ 0.5 ergibt (Tab. 6.1).

Der R_{LCFA} der meisten Kaltwassertetractinomorpha liegt dagegen deutlich darüber. Abgesehen vom Schwamm *Tentorium semisuberites*, der einen R_{LCFA} von 0.2 aufweist, ist dieser für alle weiteren ≥ 0.7 und hat sein Maximum bei *Isops phlegraei* ($R_{LCFA} = 2.3$). Die vergleichsweise hohen R_{LCFA} borealer Tetractinomorpha deuten darauf hin, dass die Mechanismen der Lipidmodifikation bei niedrigen Temperaturen, wie sie in Mikroorganismen nachgewiesen wurden, auch in Porifera vorkommen. Anscheinend werden in Kaltwasserschwämmen bevorzugt *ai*- bzw. mittkettig methylverzweigte und polyungesättigte Membransäuren synthetisiert, um ihre membranphysiologischen Funktionen gewährleisten zu können.

Zusätzlich zu den genannten strukturellen Modifikationen von Membransäuren, die anhand von Studien auf eine Anpassung an niedrige Temperaturen zurückgeführt werden können, ist eine Komponentenklasse in den borealen Demospongiae stark vertreten, deren physiologische

	<i>Sphaciospongia vespartium</i>	<i>Speciospongia cuspidifera</i>	<i>Chondrilla nucula</i>	<i>Thalysias juniperina</i>	<i>Tethya crypta</i>	<i>Geodia gibberosa</i>	<i>Jaspis stellifera</i>	<i>Stryphnus ponderosus*</i>	<i>Dragmastra normani*</i>	<i>Geodia barretti*</i>	<i>Geodia macandrewii*</i>	<i>Isops phlegraei*</i>	<i>Pachymatisma johnstoni*</i>	<i>Therea muricata*</i>	<i>Tentorium semisuberites*</i>
R_{LCFA}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.48	0.54	0.98	0.98	0.83	0.74	2.3	2.9	1.1	-	0.2

Tabelle 6.1 R_{LCFA} [(*ai*-LCFA $\Delta^{5,9}$ + MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ + LCFA $\Delta^{5,9,x}$)/‚konventionelle‘ LCFA $\Delta^{5,9}$] borealer und tropischer Tetractinomorpha als Indikator für die Kaltwasseradaptation; (* = boreale Arten dieser Studie; andere Arten s. Abb. 6.1)

Rolle bislang ungeklärt ist. So wurden bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ von einigen Autoren zwar als Teil des Abwehrsystems von Porifera angesehen (DEMBITSKY and SREBNIK, 2002), ihr Vorkommen wird jedoch von anderen auf die membranmodifizierende Funktion des Broms zurückgeführt (LAM *et al.*, 1989).

Insbesondere in Kaltwasserspezies der Haplosclerida und Halichondrida sind diese Verbindungen enthalten und bilden in einigen Arten sogar deren Hauptlipidsäuren (s. Kap. 5.1.3). Obwohl entsprechende halogenierte Primärlipide auch aus Warmwasserschwämmen bekannt sind (LAM *et al.*, 1989; DEMBITSKY and SREBNIK, 2002), liegt eine Häufung in den untersuchten Demospongiae des Norwegen-Schelfs vor. Tabelle 6.2 zeigt einen Vergleich der Lipidzusammensetzung von Halichondrida tropischer und gemäßigter Gewässer mit Kaltwasservertretern dieser Ordnung.

	<i>Axinella infundibul.</i> *	<i>Spongosorites</i> gen. *	<i>Phakellia ventil.</i> *	<i>Phakellia robusta</i> *	<i>Axinella rugosa</i> *	<i>Hymeniacidon</i> sp. ¹	<i>Hymeniacid. sang.</i> ²	<i>Agelas conifera</i> ³	<i>Agelas dispar</i> ⁴	<i>Agelas</i> sp. ⁵	<i>Trikentron loeve</i> ⁶	<i>Pseudoxinella</i> cf. <i>lunaech.</i> ⁶	<i>Higginsia tethio.</i> ⁷
LCFA $\Delta^{5,9}$ (inkl. Br-LCFA $\Delta^{5,9}$)	45.2	25	80.6	6.2	48.5	62.9	9.6	35	9.9	8	24.7	30.4	34.2
Bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$	6	15.4	75.9	6.2	38.5	15.7	-	-	-	4.4	-	-	-

Tabelle 6.2 Gehalt an bromierten und nicht bromierten LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Ordnung Halichondrida borealer (* = diese Studie) und gemäßigter Gewässer (Angaben in Gewichts.% der Gesamtlipidsäuren; ¹ LAM *et al.* (1989); ² CHRISTIE *et al.* (1994); ³ DUQUE *et al.* (1993); ⁴ CARBALLEIRA *et al.* (1987); ⁵ CARBALLEIRA and EMILIANO (1993); ⁶ BARNATHAN *et al.* (1996); ⁷ AYANOGLU *et al.* (1983))

Diese Häufung bromierter Membransäuren in borealen Porifera deutet auf eine Anpassung an die speziellen Bedingungen des dortigen Lebensraumes hin. Ausgeschlossen werden kann dagegen eine methodisch bedingte bevorzugte Hydrolyse estergebundener bromierter Carbonsäuren oder eine Artefaktbildung. Entsprechende eigene Vergleichstudien der unterschiedlichen Transveresterungsmethoden, die dies belegt sind im Anhang B dargestellt.

Um weitere Hinweise über die Rolle dieser Verbindungsklasse in den Membranen zu erhalten, wurde eine zusätzliche Untersuchung durchgeführt. Es ist bekannt, dass Schwämme in der Lage sind, Abwehrsubstanzen an gefährdeten Stellen zu lagern, um so den Gesamtorganismus effektiver zu schützen. So zeigt beispielsweise der Schwamm *Oceanapia* sp. deutlich erhöhte Konzentrationen enthaltener Pyridoacridinalkaloide im Capitum, das in die Wassersäule ragt und somit ein exponierter Teil für weidende Organismen darstellt (SCHUPP *et al.*, 1999b). Deshalb wurden die relativen Verteilungen bromierter und nicht bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ in Exemplaren des Schwammes *Phakellia ventilabrum* räumlich differenziert untersucht. Unterschieden wurde dabei der Basal- und der Randbereich. Absolutgehalte sind nicht herangezogen worden, da aussagekräftige Bezugsgrößen fehlen. So variieren die Spiculaedichten und Konzentrationen anderer Lipidklassen (v.a. Sesquiterpenoide), die in *P. ventilabrum* enthalten sind, zwischen beiden Kompartimenten deutlich. Somit würde der Bezug auf das Trockengewicht, aber auch auf die Gesamtlipide zu verfälschten Ergebnissen führen.

Die erzielten Daten zeigen, dass im basalen Bereich eine relative Häufung aller drei enthaltenen Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ gegenüber nicht bromierten LCFA $\Delta^{5,9}$ vorkommt, nicht jedoch im Randbereich, der gegenüber Fraßfeinden gefährdeter ist (Basis: $\text{Br-}24\Delta^{5,9}/24\Delta^{5,9} = 15.3$; Rand: $\text{Br-}24\Delta^{5,9}/24\Delta^{5,9} = 11.4$). Dies deutet auf eine Funktion dieser Komponenten hin, die nicht direkt

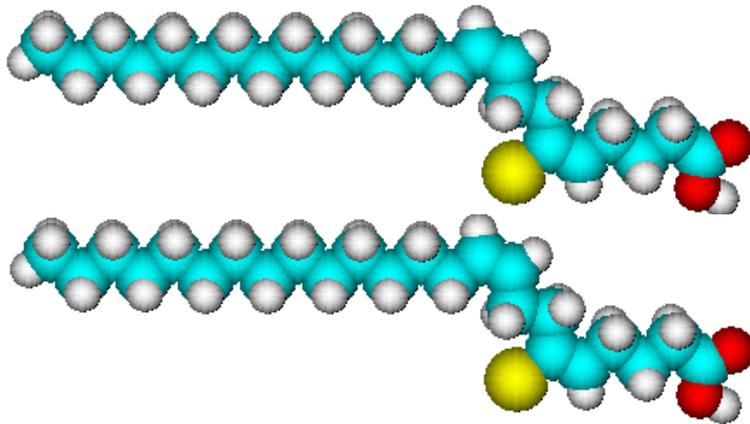


Abbildung 6.2 Kalottenmodell zweier 6-Br-(5Z,9Z)-24 $\Delta^{5,9}$ (als ME) als Bestandteile einer Lipiddoppelschicht

mit der Feindabwehr zusammenhängt. Vielmehr lassen die Daten eine Funktion des Broms in der Membran als Anpassung an kalte Umgebungstemperaturen vermuten. Wenngleich biomechanische Untersuchungen bislang fehlen, ist es denkbar, dass das Bromatom in der Lipiddoppelschicht zu einer Aufweitung und damit zu einer Steigerung von Fluidität und Permeabilität führt (Abb. 6.2).

Der erstmals in dieser Studie durchgeführte Lipidvergleich tropischer und borealer Schwämme deutet darauf hin, dass nicht nur in Mikroorganismen, sondern auch in Porifera bestimmte Verbindungsklassen bevorzugt synthetisiert werden. Hierzu zählen *ai*- und mittkettig verzweigte, polyungesättigte sowie auch bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$. Anscheinend werden diese Fettsäuren produziert, um einen Anstieg von Fluidität und Permeabilität der Schwammzellmembranen zu bewirken.

6.2 Untersuchungen der Biosynthesepfade in *Phakellia ventilabrum* – Stabile Kohlenstoffisotope

Allgemein

Seit geraumer Zeit besteht ein wachsendes Interesse daran, Informationen zu spezifischen Biosynthesepfaden in Organismen zu gewinnen. Entsprechende Daten sind insbesondere unter den Aspekten, das Potenzial der großtechnischen Nutzbarkeit enthaltener Enzyme abzuschätzen, relevant, denn Biosynthesen werden durch spezifische Enzyme katalysiert und durch ihre Wirkung teilweise erst ermöglicht. Diese Biokatalysatoren werden zunehmend für unterschiedlichste Prozesse industriell genutzt, so dass die Suche nach immer neuen Enzymen weiter fortschreitet.

Radio- und nicht radiomarkierte Substanzen werden seit langem zur Untersuchung des Schicksals von Verbindungen und zur Bestimmung von Biosynthesepfaden in Organismen eingesetzt. Sie ermöglichen die Verfolgung bestimmter Moleküle bzw. Atome (s. Kap. 6). Dennoch setzen diese Biosyntheseversuche die Zugabe von Substanzen in lebende Organismen voraus und erschweren insbesondere bei einer schlechten Kultivierbarkeit entsprechende Untersuchungen. Dieses gilt auch für Schwämme, deren Lebensdauer in Aquarien häufig eingeschränkt ist (OSINGA *et al.*, 1999; HOFFMANN *et al.*, 2002). Zudem muss dort von Abweichungen ihrer biosynthetischen Aktivität im Vergleich zum autochthonen Standort ausgegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit, Informationen zur Lipidsynthese in Organismen zu erlangen, bietet die gekoppelte Gaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS). Mit Hilfe dieser Methode werden die Verhältnisse stabiler Isotope von Verbindungen aus komplexen Gemischen gemessen (HAYES *et al.*, 1990; MERRITT *et al.*, 1994; MEIER-AUGENSTEIN, 1999). Bekannt ist, dass natürliche Prozesse zu Diskriminierungen des schwereren Isotops führen können, die damit eine Fraktionierung zwischen Edukt und Produkt verursachen. So wurde beispielsweise bei der Photosynthese eine Fraktionierung für C₃-Pflanzen zwischen 15–25‰ und für C₄-Pflanzen von 5–15‰ beobachtet; dies führt gegenüber dem verwendeten Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$ von atmosphärischem CO₂ -8‰ [vs. PDB]) zu deutlich ¹³C-abgereicherten Lipiden (MEIER-AUGENSTEIN, 1999). Für heterotrophe Bakterien bzw. Metazoa finden sich dagegen nur sehr geringe Unterschiede im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Lipide zur Nahrung, so dass ihre Analyse direkt Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Kohlenstoffpool zulässt (BLAIR *et al.*, 1985). Fraktionierungen wurden, wenngleich in einem sehr geringen Rahmen, auch für die in heterotrophen Organismen ablaufende Synthese spezifischer Lipidkomponenten (z.B. Fettsäuren) nachgewiesen. So sind in einer Studie die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einzelner Membransäuren eines Bakteriums unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen analysiert worden (TEECE *et al.*, 1999). In beiden Ansätzen zeigte sich, dass die als Produktsäure geltende 18 Δ^{11} um 0.5–1.5‰ gegenüber der potenziellen Eduktverbindung 16 Δ^9 an ¹³C abgereichert ist. Dieser Biosyntheseschritt scheint demnach von einer isotopischen Fraktionierung der Kohlenstoffatome begleitet zu werden.

Im Folgenden wurde erstmals die Analyse stabiler Kohlenstoffisotope zur Untersuchung von Biosyntheserouten bromierter Fettsäuren und von stickstoffsubstituierten Sesquiterpenoiden in einem Schwamm (*Phakellia ventilabrum*) genutzt. Zu beiden Komponentenklassen liegen

entsprechende Ergebnisse verwandter Porifera vor, die mit Hilfe von radioaktiv markierten *Tracer*-Substanzen erzielt wurden. So werden zum Einen im Hinblick auf Biosyntheseanalysen neue Verfahren auf seine Eignung getestet, zum Anderen werden erstmalig diesbezügliche Daten zum Schwamm *P. ventilabrum* gewonnen.

Biosynthese bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ in *Phakellia ventilabrum*

In der Natur sind 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ rar und scheinen für wenige marine Schwämme der Ordnungen Halichondrida und Haplosclerida spezifisch zu sein (s. Kap. 5.1.3; DEMBITSKY and SREBNIK, 2002). Die Biosynthese langkettiger, bromierter LCFA $\Delta^{5,9}$ ist für einen Schwamm

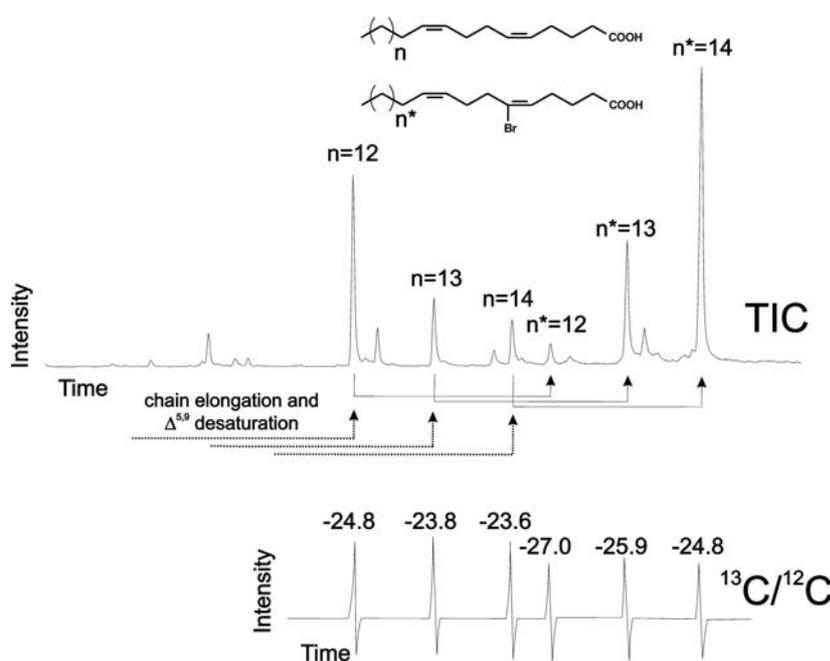


Abbildung 6.3 TIC der Carbonsäuren (als Methylester) von *Phakellia ventilabrum* mit deren $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen ($\delta^{13}\text{C}$ vs. PDB [‰], Stabw. < 0.5 ‰, Mittelwert aus 3 Messungen)

der Familie Hymeniacidonidae untersucht und die Bromierung als letzter Schritt der Membransäuresynthese nachgewiesen worden (LAM *et al.*, 1989). Weitere diesbezügliche Studien fehlen jedoch. Wie in Kapitel 5.1.3 eingehend beschrieben, enthält *Phakellia ventilabrum* entsprechende Membransäuren in hohen Konzentrationen, die an Position C₆ mit Brom substituiert sind. Vor diesem Hintergrund wurde *P. ventilabrum* ausgewählt, um anhand stabiler Kohlenstoffisotope

Informationen zur Bildung von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ zu erlangen. Abbildung 6.3 zeigt den Ausschnitt eines Gaschromatogramms der Fettsäuren (als Methylester) von *P. ventilabrum*. Dominiert wird die Fraktion von drei 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ mit ihren korrespondierenden nicht bromierten Äquivalenten. Zusätzlich sind die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse aller Komponenten aufgeführt.

Für die 24-, 25- und 26 $\Delta^{5,9}$ zeigt sich, dass jeweils die halogenierte Säure um 1.2–2.2‰ an ^{13}C angereichert ist. Diese signifikante Differenz deutet auf eine gerichtete Synthese bromierter Fettsäuren in *P. ventilabrum* aus den unbromierten LCFA $\Delta^{5,9}$ hin. Dies illustrieren die Pfeile in Abbildung 6.3 (vgl. *Hymeniacidon* sp. aus LAM *et al.*, 1989). Demnach wird mit Hilfe einer Bromperoxidase eine Halogenierung vorhandener LCFA $\Delta^{5,9}$ durchgeführt, die zuvor durch Kettenverlängerung und nachfolgender Dehydrierung produziert worden sind. Demzufolge lassen sich die in Abbildung 6.4 dargestellten Routen zur Bildung von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ für *P. ventilabrum* annehmen. Die Ursache der beobachteten Fraktionierung bei

der Halogenierung bleibt unklar. Allerdings sind mehrere Möglichkeiten wahrscheinlich, die jede für sich oder gemeinsam die Diskriminierung von ^{13}C bedingen. Ein Grund könnte die generell höhere Dissoziierungsenergie sein, die aufgebracht werden muss, um eine ^{13}C -H-

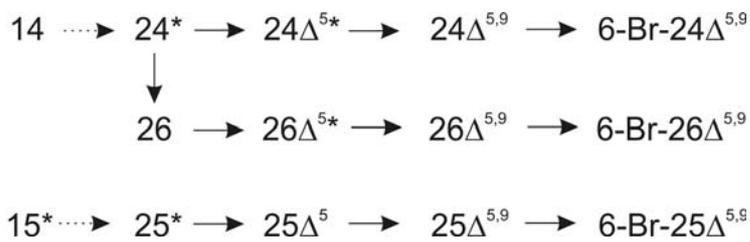


Abbildung 6.4 Potenzielle Biosyntheserouten von LCFA $\Delta^{5,9}$ in *Phakellia ventilabrum* (* = nicht nachgewiesen)

gegenüber einer ^{12}C -H-Bindung aufzuspalten. Die Ursache hierfür ist die geringere Länge der erstgenannten Bindungsform (MEIER-AUGENSTEIN, 1999). Des Weiteren können Fraktionierungen während der Synthese – beim Passieren von Membranen – oder unterschiedliche Bildungsenthalpien für beide Kohlenstoffisotopen bei der Addition von Brom zu einer energetischen Bevorzugung von ^{12}C -enthaltenden Fettsäuren führen.

Biosynthetischer Zusammenhang zwischen Isonitril- und Isothiocyanatesesquiterpenoiden in *Phakellia ventilabrum*

Zusätzlich zu ungewöhnlichen Carbonsäuren weist *P. ventilabrum* verschieden funktionalisierte Sesquiterpenoide auf (s. Kap. 5.3.1; POSSNER, 2003). Diese umfassen z.T. bislang unbekannte Strukturen mit Isonitril-, Isocyanat- und Isothiocyanatfunktionalisierung und sind hinsichtlich ihrer biologischen Rolle nicht eingehend untersucht. Allerdings scheinen diese interessanten Sekundärmetaboliten eine hohe toxische Aktivität zu besitzen. So zeigte (THOMPSON *et al.*, 1985), dass Isonitrile und Isothiocyanate aus *Axinella* sp. stark fraßhindernd auf Fische wirken. Die Toxizität hat zudem pharmakologische Relevanz, denn insbesondere Sesquiterpenoide mit Isonitrilfunktion hemmen das Wachstum des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (KÖNIG *et al.*, 1996).

Mehrere Studien zum Zusammenhang der Biosynthese von Isonitrilen und Isothiocyanaten in marinen Schwämmen wurden mit ^{14}C -Tracern durchgeführt (DUMDEI *et al.*, 1997; SIMPSON and GARSON, 1999). Bei *Acanthella cavernosa* etwa wurde gezeigt, dass dieser Schwamm in der Lage ist, Isocyanide (^{14}CN) zur Synthese von Isonitrilen zu verwenden, um diese dann in Isothiocyanate zu transformieren. Des Weiteren wurde aber auch ein Einbau markierter Thiocyanate (S^{14}CN) in die Sesquiterpenisothiocyanate und eine Interkonversion zu den entsprechenden Isonitrilen nachgewiesen, der demonstriert, dass enzymatisch beide Routen in *A. cavernosa* ablaufen könnten und möglicherweise auch stattfinden (DUMDEI *et al.*, 1997). Vergleichbare Untersuchungen an *Axynissa* n. sp. deuten dagegen darauf hin, dass in diesem axinelliden Schwamm eine enzymatisch katalysierte Umsetzung von anorganischen Isonitrilen zu Isothiocyanaten stattfindet und diese nachfolgend an das Sesquiterpengrundgerüst addiert werden (SIMPSON and GARSON, 1999). Zudem scheinen sich in *Axynissa* n. sp. im Gegensatz zu *A. cavernosa* und *Amphimedon terpensis* keine Isonitrile aus Isothiocyanaten zu bilden (SIMPSON and GARSON, 1999), so dass offensichtlich verschiedene Prozesse zu vergleichbaren Isonitrilen und Isothiocyanaten axinellider Schwämme führen.

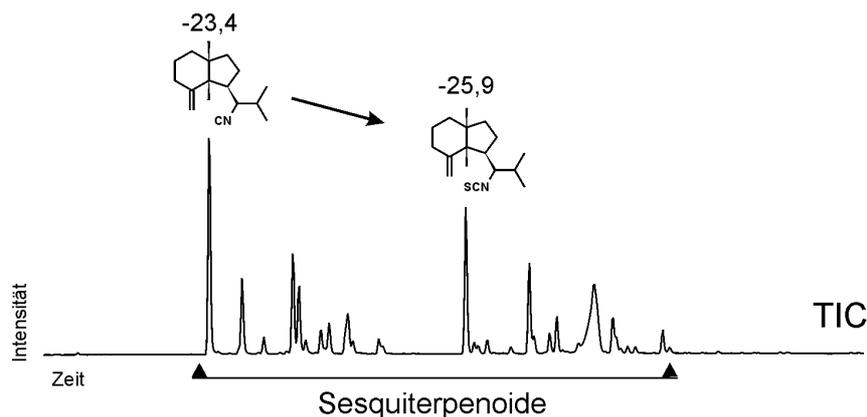


Abbildung 6.5 TIC der funktionalisierten Sesquiterpene aus *Phakellia ventilabrum*. Hervorgehoben sind zwei strukturgleiche Verbindungen mit Isonitril- bzw. Isothiocyanatgruppe. Zusätzlich sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (vs. PDB [‰]; n=3; Stabw. < 0.5 ‰) und der sich daraus ergebende wahrscheinliche Biosyntheseweg dargestellt

In *Phakellia ventilabrum* sind strukturäquivalente Sesquiterpene mit Isonitril- und Isothiocyanatfunktion enthalten, über deren Biosynthese nichts bekannt ist. Um Hinweise zu diesen Synthesebeziehungen zu erlangen, wurden Analysen zu den Verhältnissen stabiler Kohlenstoffisotope durchgeführt.

In Abbildung 6.5 ist das Totalionen-Chromatogramm der Sesquiterpenfraktion von *P. ventilabrum* dargestellt und beispielhaft eine Sesquiterpenstruktur mit Isonitril- und Isothiocyanatgruppe hervorgehoben. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse beider Komponenten weisen eine Veränderung um 2.5‰ in der Isothiocyanatstruktur auf. Diese Differenz lässt keine Schlüsse auf die Verwendung des anorganischen Vorläufers zu (CN oder SCN). Dennoch scheint bei einer interkonversionellen Beziehung beider Sesquiterpenoidspezies – bislang für alle untersuchten Arten nachgewiesen (SIMPSON and GARSON, 1999) – die Dominanz bei der fraktionierenden enzymatischen Transformation des Isonitrils zum Isothiocyanats zu liegen. Damit sind die Prozesse, die in *P. ventilabrum* ablaufen, denen von *A. cavernosa* und *A. terpensis* vergleichbar und setzen ähnliche Enzymsysteme voraus. Der entgegengesetzte Pfad, wie für *Axinyssa* n. sp. beschrieben, wird durch den untersuchten Schwamm nicht durchgeführt.

Die dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass das erstmalig für Biosynthesefragen in Schwämmen eingesetzte Verfahren der Analyse stabiler Kohlenstoffisotope in Organismen genutzt werden kann, um Aussagen zu Produkt und Edukt einer solchen Beziehung zu gewinnen. Zusätzlich liefern diese Daten Informationen zum Enzymsystem in spezifischen Organismen, die insbesondere unter industriellen Aspekten der Enzymverwertung von hohem Interesse sein können.

6.3 Untersuchungen zur Verwendung isoprenoidaler Archaealipide durch den axinelliden Schwamm *Phakellia ventilabrum* – Ist Phytansäure ein indirekter Bioindikator schwammassoziiierter Archaea?

Allgemein

Schwämme gelten als Quelle der Isoprenoidsäuren 4,8,12-Trimethyltridecan- (TMTD) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure) (CARBALLEIRA *et al.*, 1987), die offensichtlich estergebunden in den Phospholipiden vorliegen (s. Kap. 5.1.4; DASGUPTA *et al.*, 1987). Diese sehr ungewöhnliche Form der Bindung von Phytansäure (*sn*-1,2-di-3,7,11,15-Tetramethylhexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoglycerol) wurde anhand von FAB-MS-Untersuchungen der Gesamtmoleküle in *Axinella verrucosa* nachgewiesen (DASGUPTA *et al.*, 1987). Andere Quellen estergebundener Isoprenoidsäuren sind einige Moos-Arten (BUCHANAN *et al.*, 1996) und Abbauprozesse verschiedener Chlorophyllspezies (CRANWELL, 1986). Dennoch sind bislang ausschließlich Schwämme als Produzenten phospholipidgebundener Phytansäure beschrieben und scheinen demnach diese Verbindung als einzige Organismen in ihren Zellmembranen einzulagern.

Die Isoprenoidsäuren liegen in unterschiedlichen Konzentrationen in den Schwämmen vor. So bildet Phytansäure in *Chondrilla nucula* 14% der Lipidsäuren und ist damit eine der höchstkonzentrierten Fettsäuren in diesem Schwamm. Anhand von Zelltrennungsversuchen des Schwammes *Amphimedon compressa* konnte gezeigt werden, dass diese Isoprenoidsäure in der Fraktion der Schwammzellen angereichert ist und demnach nicht direkt aus dessen assoziierten Mikroorganismen stammt (GARSON *et al.*, 1994). In einer Reihe von Lipiduntersuchungen wurde allerdings ebenfalls nachgewiesen, dass Schwämme vorhandene, offensichtlich mikroorganismenstämmige Vorläufermoleküle nutzen, um eigene Lipidkomponenten aufzubauen, so dass möglicherweise SAM eine indirekte Quelle eindeutiger Schwammlipide sind.

Ähnliche Prozesse im Schwamm, die auf ein sog. 'bacterial farming' hindeuten, sind auch für isoprenoidale Schwammlipide denkbar. Allerdings kommen Eubakterien als ursprüngliche Quelle dieser Komponentenklasse nicht in Frage, da autochthon produzierte azyklische Isoprenoide bislang aus keinem Bakterium bekannt sind. Hingegen bauen Archaea ihre Lipide ausschließlich aus Isoprenoiden auf (LANGWORTHY, 1985; GOLDFINE and LANGWORTHY, 1988). Diese Mikroorganismen wurden in jüngeren Studien als Bestandteile der SAM bestimmter Schwämme identifiziert (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002), so dass möglicherweise Archaealipide als Ursprung isoprenoidaler Säuren fungieren.

Als Herkunft isoprenoidaler Säuren in terrestrischen und marinen Milieus und demnach auch fossilen Ablagerungen gilt vornehmlich der Phytylrest des Chlorophyll *a* photosynthetischer Mikroorganismen und höherer Pflanzen. Die Degradation des Chlorophylls unter aeroben und anaeroben Bedingungen ist gut untersucht. Beide Abbauewege resultieren u.a. in den Zwischenprodukten Phytansäure und TMTD (DIDYK *et al.*, 1978; RONTANI *et al.*, 1999), die daher als Marker für Eintrag und Abbau von Chlorophyll angesehen werden. Zusätzlich zu dieser Hauptquelle von TMTD und Phytansäure sind weitere Quellen beschrieben. So wurde gezeigt, dass *sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol (Archaeol), das neben den dominanten zyklischen und azyklischen C₄₀-Tetraetherisoprenoiden ein Hauptlipid vieler Archaea ist (DE ROSA *et al.*,

1976; LANGWORTHY, 1985), zu Phytansäure degradiert werden kann. So wurde beschrieben, dass der Archaeolabbau unter bestimmten Bedingungen – durch eine hydrolytische Spaltung der Phytanylkette – zur Entstehung von Phytanol und durch eine nachfolgend ablaufende Oxidation zur Phytansäure führt (NISSENBAUM *et al.*, 1972).

Archaea sind weit verbreitete Mikroorganismen und nahezu für alle Milieus der Erde beschrieben. So wurden sie in hypersalinen, hydrothermalen und psychothermalen Bereichen angetroffen (DE ROSA *et al.*, 1980; DE ROSA *et al.*, 1991; GAMBACORTA *et al.*, 1994; VAN DE VOSSENBERG *et al.*, 1998). Jüngere Untersuchungen wiesen sie zudem auch als wichtige planktonische, benthische und auch symbiotisch mit Schwämmen assoziierte Organismen nach (PRESTON *et al.*, 1996; HOEFS *et al.*, 1997; SCHOUTEN *et al.*, 2000). Neben Chlorophyll sind Archaea somit eine zusätzliche Quelle isoprenoidaler Biomarker in fossilen Ablagerungen und rezenten Milieus (ANDERSON *et al.*, 1977).

Schon frühzeitig wurde die Stereochemie der Methylverzweigungen innerhalb der Phytylkette genutzt, um Quellen der Phytansäure differenzieren zu können. So wurde festgestellt, dass zwei Diastereomere der Phytansäure vorherrschen, die sich in der Konfiguration der Methylgruppe an Position C₃ unterscheiden (*R* bzw. *S*) (MACLEAN *et al.*, 1968). Die zusätzlichen Isomeriezentren C₇ und C₁₁ liegen meist in der *R*-Konfiguration vor, welche mit der stereochemischen Determinierung dieser Gruppen in den Vorläufermolekülen Chlorophyll und *sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol (Archaeol) zusammenhängt (Abb. 6.6; KATES *et al.*, 1967; BROOKS *et al.*, 1978).

In terrestrischen und marinen Milieus sind demnach *SRR*- und *RRR*-Phytansäure die dominanten Isomere. Die abiotisch induzierte Chlorophylldegradation führt durch die stereospezifische Festlegung der Methylgruppe an Position C₃ zu einem 1:1 Verhältnis von *SRR* zu *RRR* (MACLEAN *et al.*, 1968). So wurde beispielsweise anhand der Isomerenverteilung *RRR* zu

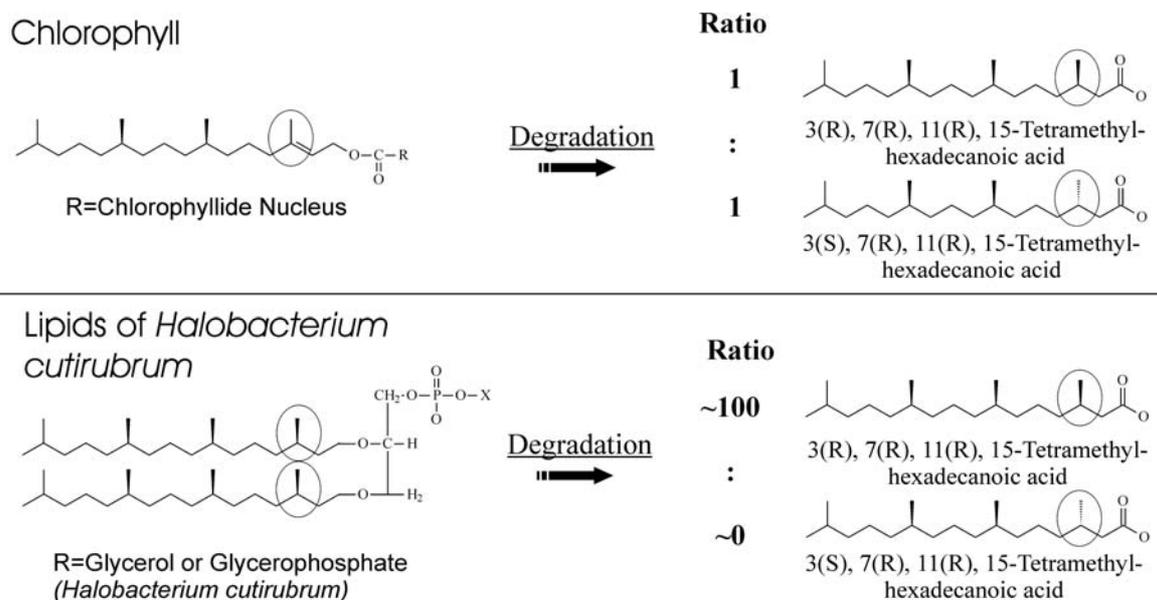


Abbildung 6.6 Stereochemie von Phytansäure als Produkt der abiotischen Umsetzung von Chlorophyll bzw. Archaeol (nach KATES *et al.*, 1967; ANDERSON *et al.*, 1977)

SRR (~1:1) die Phytansäure eozäner Messel-Sedimente auf Phytoleinträge zurückgeführt, die aus der Degradation von Chlorophyll stammen (MACKENZIE *et al.*, 1982).

Einige rezente Organismen und fossile Ablagerungen weisen dagegen eine Anreicherung eines der beiden Isomere auf. Ein Auftreten der Anreicherung eines Isomers konnte in Archaea-dominierten Milieus beobachtet werden. So hat sich gezeigt, dass in dem weit verbreiteten halophilen Archaeum *Halobacterium cutirubum* die Phytylketten der Lipidkomponente *sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol (Archaeol) ausschließlich durch *RRR*-Isomere aufgebaut sind (KATES *et al.*, 1967). Dem zugrunde liegend wurden die hohen Gehalte an *RRR*-Phytansäuren in Sedimenten des Toten Meeres auf die Degradation von Archaealipiden zurückgeführt (ANDERSON *et al.*, 1977). Die Anreicherung von *RRR*-Phytansäure scheint jedoch auf spezifische Milieus beschränkt zu sein. Dagegen wurde beschrieben, dass in vielen marinen Organismen eine Dominanz des *SRR*-Isomers vorliegt (ACKMAN and HOOPER, 1968; MACLEAN *et al.*, 1968). Der Grund hierfür ist unklar, wenn auch bei der biotischen Umsetzung des eingetragenen Phytols eine stereochemische Bevorzugung wahrscheinlich ist. Möglicherweise geht dieses auf Degradationsprozesse im Zooplankton zurück, welches als Stoffwechselendprodukt des Chlorophylls große Mengen Pristan in die Ozeane einträgt (BLUMER *et al.*, 1963). Solch ein biologisch induzierter Phytolabbau gilt als stereochemisch selektiv und wird deshalb als Erklärung für eine Dominanz von *SRR* in marinen Lebensräumen angesehen (MACLEAN *et al.*, 1968). Ähnlich ablaufende Prozesse werden für die mikrobielle Degradation von Chlorophyll angenommen. So konnte beispielsweise für bestimmte Sedimente gezeigt werden, dass die wahrscheinlich mikrobiologisch dominierte, frühdiagenetische Reduktion des Phytols zum Dihydrophytol zu der Dominanz eines Diastereomers führt (BROOKS and MAXWELL, 1974). Die dort ansässige Mikroorganismenfauna wird von Eubakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Cornyebacterium* beherrscht, die stereoselektiv die Doppelbindung des Phytols hydrieren (hauptsächlich zu *SRR*). Andererseits wurde anhand eines phytolreichen Sediments der Shark-Bay gezeigt, dass dort *RRR*-Isomere überwiegen. Obwohl dieses intertidale Milieu durch Salinitäten >50‰ charakterisiert ist, scheinen die *RRR*-Derivate nicht auf halophile Archaea zurückzugehen, wie dies im Toten Meer offensichtlich der Fall ist (>300‰ Salinität; ANDERSON *et al.*, 1977). Vielmehr wurde die eingeschränkte Mikroorganismenpopulation von Cyanobakterien, wie *Lyngbya aestuarii* und *Schizothrix splendida*, für eine Anreicherung der *RRR*-Isomere beim chlorophyllstämmigen Phytolabbau vorgeschlagen (MACLEAN *et al.*, 1968; GOLUBIC and AWRAMIK, 1974). *RRR*-Phytansäuren zeigen insofern nicht zwingend den Abbau von Archaealipiden an, sie können unter bestimmten mikrobiologischen Bedingungen auch auf die stereoselektive Degradation von Chlorophyll zurückgehen.

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass Schwämme vielfältige Mikroorganismen beinhalten, von denen einige phototroph leben oder Nahrung aufnehmen, die zu Teilen aus Chlorophyll besteht. Zudem konnte ein assoziiertes Crenarchaeum (*Cenarchaeum symbiosum*) in *Axinella mexicana* nachgewiesen werden (PRESTON *et al.*, 1996). Weiter gehende Studien belegten die Assoziation mit Archaea als Merkmal der Klasse Hexactinellida (THIEL *et al.*, 2002), der Axinellida (MARGOT *et al.*, 2002) und anderer Schwammtaxa (PAPE *et al.*, 2002). Neben einer möglichen direkten Biosynthese bilden somit Chlorophyll und Archaealipide potenzielle Vor-

läufermoleküle für Isoprenoidsäuren in Schwämmen. Die Herkunft dieser Verbindungen soll im Folgenden anhand zweier Ansätze untersucht werden.

Zunächst wurde die relative Verteilung von Phytansäurediastereomeren (i.e.L. *RRR* und *SRR*) in *Phakellia ventilabrum* analysiert, um anhand der Verhältnisse mögliche Quellen einzugrenzen. Des Weiteren wurde ein *in vitro*-Experiment durchgeführt, bei dem *P. ventilabrum* ^{13}C -markiertes Archaeol verabreicht wurde. Dieser Versuch hatte das Ziel, das Schicksal des ^{13}C -Phytylrestes im lebenden Organismus nachzuvollziehen.

Ergebnisse

Ursprung isoprenoidaler Fettsäuren in Porifera – Diastereomerie (RRR und SRR) estergebundener Phytansäure

Um die stereochemische Verteilung von estergebundener *RRR*- und *SRR*-Phytansäure aus

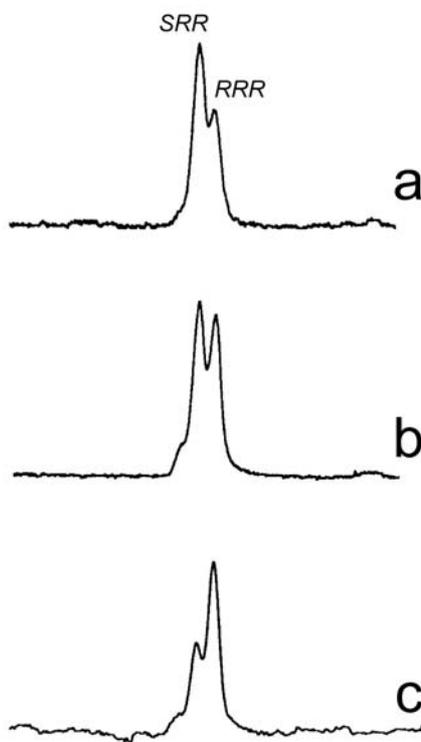


Abbildung 6.7 Diastereomerenverteilung von PhytansäureME in *Phakellia ventilabrum* im Vergleich mit authentischen Standards bekannter *SRR/RRR*-Verteilung; a = PhyME aus *P. ventilabrum* + PhyME-Standard; b = PhyME-Standard; c = PhyME aus Archaeum *Methanosarcina barkeri* (Degradationsprodukt aus dem isoprenoidalen Archaeol)

Phakellia ventilabrum zu charakterisieren, wurden die methyltransveresterten Säuren mit Hilfe einer chiralen gaschromatographischen Säule aufgetrennt und mit Standardsubstanzen bekannter Diastereomerenverteilung verglichen. Hierzu wurde u.a. eine Phytansäure, die eine Dominanz des *RRR*-Isomers aufweist, aus dem Archaeum *Methanosarcina barkeri* eingesetzt (chemisches Degradationsprodukt von Archaeol; ROOS, 1995). Zudem wurde eine aus Chlorophyll gewonnene Phytansäure verwendet, die nahezu ein 1:1-Verhältnis beider Isomere (*RRR:SRR*) aufweist. Mit Hilfe dieser Fraktionen wurden Koinjektionen durchgeführt. Die entsprechenden gaschromatographischen Analysen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W.A. König (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) realisiert.

In Abbildung 6.7 ist die Verteilung der Phytansäureisomere in *P. ventilabrum*

des Sula-Rückens dargestellt. Insgesamt wurde eine Antrennung der Isomere erzielt, die eine relative Abschätzung der stereochemischen Verteilung erlaubt. Die Phytansäure in *P. ventilabrum* weist eine deutliche Dominanz des *SRR*- gegenüber dem *RRR*-Isomer auf.

*Ursprung isoprenoidaler Fettsäuren in Porifera – Schicksal ^{13}C -markierten Archaeols (*sn*-2,3-*di*-*O*-Phytanylglycerol)*

Während eines Forschungsaufenthaltes auf der marinen Feldstation in Bergen (Norwegen, Oktober 2001) bestand die Möglichkeit, *in vitro*-Versuche an Schwämmen durchzuführen. Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges zwischen archaeastämmigen Isoprenoiden und Phytansäure wurde dem axinelliden Schwamm *P. ventilabrum* ^{13}C -markiertes Archaeol injiziert (Bed. s. Methodik im Anhang B). Die Lipidfraktion wurden von den freien Säuren befreit, nachfolgend mit TMCS transesterifiziert, um gebundene Lipidsäuren als Methyl-ester zu gewinnen und diese dann mit Hilfe eines GC-C-IRMS auf ihre $\delta^{13}\text{C}$ -Werte analysiert. Das Archaeol wurde synthetisch in der AG Prof. Dr. W. Francke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) hergestellt und weist eine ^{13}C -Markierung an Position C₁ der an *sn*-3 gekoppelten Phetylkette auf (pers. Mittl. S. Sölter, Hamburg). Abbildung 6.8 stellt die Massenspektren eines unmarkierten Archaeols (aus dem thermophilen Crenarchaeum *Sulfolobus solfataricus*) und dem synthetisch hergestellten ^{13}C -markierten Molekül dar.

Für diesen Versuch ist die Schwammspezies *P. ventilabrum* verwendet worden, da diese (i)

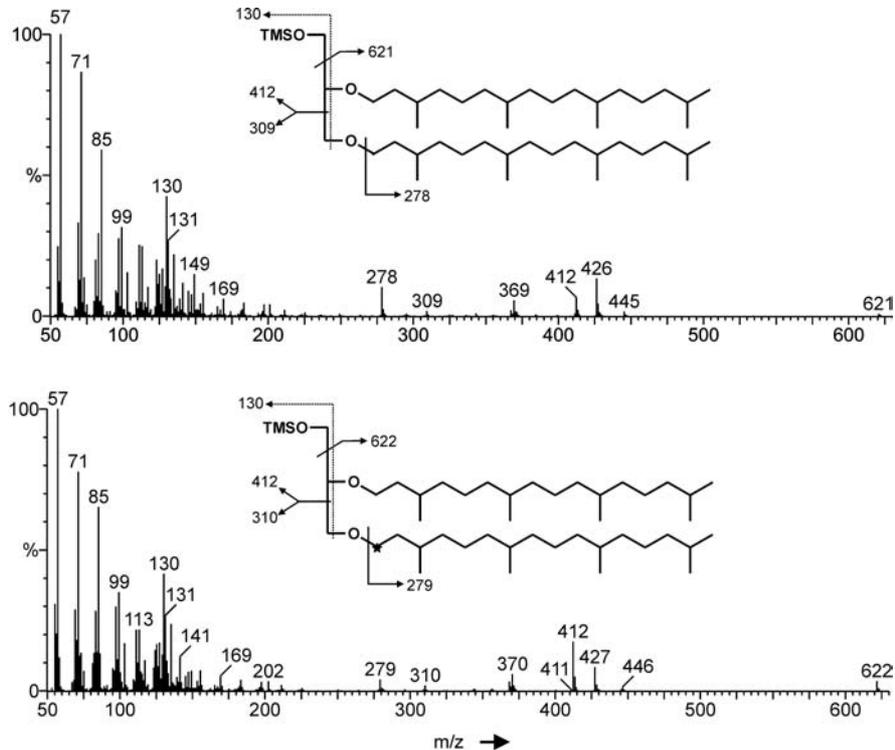


Abbildung 6.8 Massenspektren (EI) von ^{13}C -markiertem und -unmarkiertem Archaeol (gemessen als BSTFA-Derivate)

Phytansäure in großen Mengen enthält (s. Kap. 5.1.4, Tab. 5.5 und 5.6), (ii) FISH-Analysen (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) Hinweise auf Archaea in den SAM erbracht haben (pers. Mittl. F. Hoffmann, Göttingen) und (iii) dieser Schwamm weit verbreitet auf dem Norwegenshelf vorkommt. Zudem gehört *P. ventilabrum* den Axinellida an, ein Taxon, in dem Archaea als assoziierte Mikroorganismen nachgewiesen wurden (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002; PAPE *et al.*, 2002).

In Tabelle 6.3 sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die PhytansäureME zu Beginn, nach sieben und nach vierzehn Tagen im Vergleich zu charakteristischen Schwammlipidsäuren dargestellt.

<i>Zeitpunkt</i>	6-Br-24 Δ ^{5,9}	6-Br-25 Δ ^{5,9}	3,7,11,15- Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure)
Beginn	-24.0	-23.2	-29.1
Tag 7	-24.0	-23.6	-26.5
Tag 14	-23.4	-23.1	-21.8

Tabelle 6.3 $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der estergebundenen Phytansäure und zweier Vergleichslipidsäuren aus *P. ventilabrum* im Verlaufe des Inkubationsversuches mit ^{13}C -markiertem Archaeol (Stabw. $<\pm 0.5$); alle Komponenten wurden nach der Transveresterung als Methylester analysiert [$\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. PDB]

Ausgehend vom $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zu Beginn des Versuches ($-29.1\text{‰} \pm 0.4$ vs. PDB) wurde nach einem Zeitraum von vierzehn Tagen ein signifikanter Anstieg im ^{13}C -Gehalt festgestellt ($\sim +7.5\text{‰}$).

Diskussion

Prokaryotische Mikroorganismen bilden Assoziationen mit Schwämmen und können einen Großteil ihrer Biomasse ausmachen. Der Zusammenhang dieser Beziehung ist bislang nahezu unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass Schwämme kurzkettige Fettsäuren von Eubakterien zum Aufbau eigener Membranverbindungen nutzen (z.B. HAHN *et al.*, 1988). Wenn auch eine direkte Symbiose dieser Organismengruppen bislang nicht gezeigt werden konnte, weisen entsprechende Studien auf eine syntrophische bzw. trophobiotische Beziehung hin, die einseitig nützliche Koexistenzen charakterisieren.

Neben eubakteriellen Mikroorganismen scheinen insbesondere crenarchaeote Archaea in einer Reihe von Schwämmen verbreitet zu sein. Der erste Nachweis eines Archaeums (*Cenarchaeum symbiosum*) wurde aus dem Schwamm *Axinella mexicana* erbracht (PRESTON *et al.*, 1996). In der Folge zeigten sich weitere molekularbiologische und biochemische Hinweise, die eine größere Verbreitung von Archaea als Teil der Mikroorganismengemeinschaft in vielen Schwamntaxa annehmen lassen, als weithin angenommen (PRESTON *et al.*, 1996; SCHLEPER *et al.*, 1998; MARGOT *et al.*, 2002; THIEL *et al.*, 2002; PAPE, 2003). Wie u.a. anhand von Biomarkeranalysen gezeigt werden konnte, scheinen Crenarchaeota die vorherrschende Gruppe unter den schwammassoziierten Archaea zu sein (PAPE *et al.*, 2002). Zusätzlich deuten Daten dieser Studie darauf hin, dass die Archaea in den Schwämmen heterotroph auf C_1 -Komponenten des Schwammes (z.B. Trimethylamin) oder autotroph auf Bicarbonat wachsen. Dennoch liegen zur Art der Beziehung von Archaea und Schwämmen bislang keine Daten vor. Hierzu wurden zwei Experimente durchgeführt, die Hinweise auf die Art der Assoziation ergeben sollten.

Die deutliche Dominanz des *SRR*-Phytansäureisomers in *Phakellia ventilabrum* entspricht der mariner Organismen (ACKMAN and HOOPER, 1968). Sie widerspricht damit Verteilungen, wie sie aus archaeabeesinflussten Sedimenten nachgewiesen wurden, in denen das *RRR*-Isomer

vorherrscht. Als Gründe für die Dominanz des *SRR*- über das *RRR*-Diastereomer ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Denkbar ist, dass der Schwamm Verbindungen der Nahrung verwendet, die aus dem biotischen Abbau von Chlorophyll entstammen. Wie beschrieben findet sich hierbei eine Bevorzugung des *SRR*-Isomers, die wahrscheinlich mit einer stereochemischen Präferenz bei der Degradation durch Zooplankton und bestimmte Bakterien zusammenhängt. Allerdings kann die Dominanz des *SRR*-Phytansäureisomers auch auf schwammassoziierte Archaeen zurückgehen, denn es fehlen umfassende Daten zur stereochemischen Zusammensetzung archaealer Lipide, die über die des halophilen Archaeums *Halobacterium cutirubrum* hinausgehen. Möglicherweise synthetisieren schwammassoziierte oder planktonische Archaea bevorzugt Phytylketten mit *SRR*-Isomerie und würden damit eine Unterscheidung zu Chlorophyllphytylresten erschweren. Diesbezüglich sind weiter gehende Analysen notwendig.

Im Zuge dieser Arbeit wurden erstmalig Versuche durchgeführt, die Aussagen zur biosynthetischen Beziehung von Archaea und Schwämmen erlauben. Das Inkorporierungsexperiment mit ^{13}C -markiertem Archaeol zeigt, dass in Schwämmen Phytylreste aus Archaeaetherlipiden in estergebundene Phytansäure überführt werden. Darauf weist der positive Isotopenshift in der schwammstämmigen Phytansäure im Verlaufe des Versuches hin (s.o.). Über die detaillierte Form der Bindung lassen sich aufgrund des Versuchsaufbaus nur wenige Aussagen treffen. So ist auszuschließen, dass es sich um einfache Abbauprodukte des Archaeols handelt, da die dabei hauptsächlich entstehenden Produkte (freie Säuren, Säuremethylester, Alkohole) dünnschichtchromatographisch abgetrennt wurden. Das Elutionsverhalten der Substanz, aus der die markierte Phytansäure freigesetzt wurde ($R_f < 0.3$, DCM) deutet eher darauf hin, dass die Phytansäure an einen Phosphatidylrest oder an andere polare Gruppen estergebunden vorlag. Eine Unterscheidung beider Möglichkeiten war mit dem gewählten Versuchsansatz nicht möglich. Dennoch scheint es, dass einige Schwammtaxa zumindest syntrophisch oder trophobiotisch mit Archaea – möglicherweise sogar symbiotisch – assoziiert sind.

Ein weiteres interessantes Ergebnis des durchgeführten Versuches ist, dass möglicherweise das Auftreten isoprenoidaler Säuren als indirekter Biomarker einer Archaea-Assoziation herangezogen werden kann. Jedoch sind auch hierzu weiter gehende Untersuchungen nötig.

Der biosynthetische Ablauf des nachgewiesenen Zusammenhanges bleibt unklar. So wurde beobachtet, dass der Abbau von Archaeol zu dem Zwischenprodukt Phytanol führt (NISSENBAUM *et al.*, 1972). Dieser Isoprenoidalkohol konnte in *P. ventilabrum* nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise werden die Lipide mit Hilfe bisher unbekannter Enzyme aufgeschlossen, umgehend zu Phytansäure oxidiert und in die Phospholipide eingebunden, so dass Zwischenprodukte dieses Prozesses nicht nachzuweisen sind.

Weitere Hinweise auf eine weit verbreitete Assoziation von Archaea und marinen Porifera – neben molekularbiologischen Untersuchungen – ergeben sich aus der Existenz spezifischer Archaeabiomarker in einer Reihe von Schwämmen (PAPE, 2003), die hohe Konzentrationen an Phytansäure sowie TMTD beinhalten (s. Kap. 5.1.4). Dies gilt für nahezu alle untersuchten Hexactinellida, wie auch u.a. für Demospongiae der Familie Axinellidae. In ihnen sind neben den beschriebenen Säuren isoprenoidale Kohlenwasserstoffe (2,6,10,15,19-Pentamethyleicosan, C_{25} ; und/oder Lycopan, C_{40}), Di- und Tetraether beschrieben, die alle auf Archaea zurückgeführt werden (PAPE *et al.*, 2002; THIEL *et al.*, 2002; PAPE, 2003).

Möglicherweise ist Phytansäure tatsächlich ein indirekter Biomarker für die Assoziation von Archaea mit marinen Invertebraten. Über den Ursprung der TMTD liegen anhand der durchgeführten Untersuchungen keine Ergebnisse vor. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zur Phytansäure und dem alternierenden Auftreten beider Verbindungen ist hier ebenfalls ein Zusammenhang zu schwammassoziierten Archaeen anzunehmen.

Eine besondere Form der Archaea-Schwamm-Assoziation liegt möglicherweise in endemischen Arten des Baikalsees vor. Dort sind aus einigen Frischwasserschwämmen einzigartige langkettige Isoprenoidsäuren beschrieben (REZANKA and DEMBITSKY, 1993), die eventuell aus einem Kettenverlängerungsprozess archaealer Lipide entstammen.

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden organo-geochemische Methoden angewandt, um vielfältige Fragestellungen zur Chemotaxonomie, Phylogenie und Chemoökologie rezenter Kieselschwämme (Klassen Demospongiae und Hexactinellida) im Vergleich mit der Klasse Calcarea zu beleuchten. Diese Verfahren liefern anhand von Lipidbestandteilen (molekulare Marker; Biomarker) Aussagen, die mit Hilfe anderer Analysen nur unzureichend oder gar nicht zu erzielen sind. Zudem bilden die Lipiduntersuchungen rezenter Organismen die Basis zur Definition sog. 'Chemofossilien', die der Charakterisierung fossiler Lebensräume (Faunenzusammensetzung, Lebensbedingungen, etc.) dienen.

Schwämme (Porifera) wurden als Modellorganismen ausgewählt, da ihr erdgeschichtliches Vorkommen weit in das Proterozoikum reicht und sie als älteste Metazoen überhaupt gelten. Mehr noch, ihr 'Bauplan' hat sich seit ihrer Entstehung nicht grundlegend geändert, so dass Untersuchungen an rezenten Formen dieser sessilen Invertebraten zu Einblicken in die Zellorganisation ursprünglichen vielzelligen Lebens führen. Aus diesem Grund und insbesondere der nachgewiesenen Potenz der Porifera zur Synthese pharmakologisch interessanter Naturstoffe sind sie seit langem Studienobjekt chemisch-orientierter Arbeitsgruppen. Dennoch beschränkten sich die bisher durchgeführten Untersuchungen – aufgrund deren großer Verbreitung – nahezu ausschließlich auf tropische Vertreter der Demospongiae und Calcarea. Dass dieser Studie zugrunde liegende Probenmaterial beinhaltet eine repräsentative Zahl an hexactinelliden Schwammarten ($n = 23$) und Kaltwasserdemospongien ($n = 32$), die derart umfassend chemisch bislang nicht untersucht worden sind. Somit schließen die erzielten Ergebnisse eine entscheidende Lücke der bisherigen Datenlage, um u.a. die kontrovers diskutierten phylogenetischen Zusammenhänge der drei rezenten Schwammklassen hinreichend beschreiben, aber auch, um eine Abschätzung borealer Lebensräume als Quelle von Naturstoffen vornehmen zu können.

Die Daten aus der in dieser Arbeit erstmalig durchgeführten lipidchemischen Analyse hexactinellider Schwämme wurden genutzt, um sie in die bestehenden widersprüchlichen Hypothesen zur Phylogenie der Porifera zu integrieren. So fassen einige Autoren, aus Gründen der Zellstruktur, die Demospongiae mit den Calcarea (Pinacophora bzw. Cellularia) – unter Ausschluss der Hexactinellida (Symplasma) – zusammen. Andere gliedern dagegen die Calcarea aufgrund ihrer Skelettchemie und der Larvalentwicklung von den Kieselschwämmen (Demospongiae und Hexactinellida) ab. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse demonstrieren eindeutig eine enge verwandtschaftliche Beziehung von Hexactinellida und Demospongiae. So synthetisieren alle untersuchten Vertreter der Hexactinellida, unabhängig von Fundort und Lebensraum, langkettige polyungesättigte Fettsäuren, die strukturell denen der Demospongiae entsprechen (LCFA $\Delta^{5,9}$; sog. 'demospongiac acids'). Dagegen fehlen diese Verbindungen in den Calcarea. Die Synthese dieser spezifischen Biomarker setzt ein differenziertes Fettsäure-Enzymsystem voraus, das offensichtlich in beiden Klassen der Kieselschwämme aktiv ist. Dennoch, trotz deutlicher Übereinstimmungen in der Grundstruktur der Lipidsäuren wurden auch Unterschiede innerhalb der Kieselschwämme nachgewiesen. So werden die Fettsäuren nahezu aller hexactinelliden Schwämme von Verbindungen einer Kettenlänge dominiert und auch bezüglich Verzweigungen (endständig und mittkettig) und Substitutionen (Brom, α -Methoxy, α -Hydroxy) wurde bei den Demospongiae eine deutlich größere Variabilität beobachtet.

bachtet. Vergleichbare grundsätzliche Divergenzen zwischen beiden Klassen sind bei der Untersuchung der Steroidinventare festgestellt worden. Diesbezüglich zeigte sich, dass auch innerhalb dieser Verbindungsklasse bei den Demospongiae strukturelle Abweichungen vom Cholesterolgrundgerüst auftreten, die in den Hexactinellida nicht nachgewiesen werden konnten. Zurückgeführt wurden diese Differenzen auf verschiedene Biosyntheseprozesse in den beiden Gruppen. Offensichtlich sind Demospongiae zur progressiveren Synthese von Sterolen in der Lage (*de novo*), hingegen nutzen die Hexactinellida eher Steroide aus der Nahrung, um diese in die eigenen Lipide einzulagern. Abschließend wurde so, unter Einbeziehung lipidchemischer Daten, ein phylogenetischer Versuch unternommen, der eine enge Beziehung zwischen Hexactinellida und Demospongiae vorsieht, in der die Hexactinellida, aufgrund ihres konservativen Lipidmetabolismus, die ursprünglichere Position einnehmen.

Zusätzlich zur Determinierung phylogenetischer Grundzüge innerhalb des Phylums Porifera wurden mit Hilfe von Biomarkern chemotaxonomische Merkmale auf höherem verwandtschaftlichen Level erarbeitet. Hierzu zählen beispielsweise innerhalb der Demospongien seltene langkettige bromierte Fettsäuren (6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$) in den Ordnungen Halichondrida und Haplosclerida, stickstoffhaltige Sesquiterpenoide in den Halichondrida, Diterpenfurane in den Dendroceratida, Cyclopropylsterole in den Haplosclerida sowie Steroidketone (3-Stanone) und Triacenta-5,9,21-triensäure ($30\Delta^{5,9,21}$) in Vertretern der Klasse Hexactinellida. Im Zuge dieser detaillierten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass, entgegen gegensätzlicher Annahmen, Kaltwasserporifera eine Quelle komplexer, pharmakologisch relevanter Naturstoffe sind. Diese Ergebnisse bilden eine wichtige Basis weiter gehender naturstoffbezogener Studien und steigern darüber hinaus die Bedeutung der weit verbreiteten Kaltwasserhabitats innerhalb dieses Zweiges der Forschung.

Der zweite Teil der Arbeit fokussiert auf chemoökologische Funktionen spezieller Zellmembrankomponenten in kalten Habitats und auf andere biosynthetische Zusammenhänge verschiedener Verbindungsklassen in einem weit verbreiteten Schwamm des Nordostatlantiks (*Phakellia ventilabrum*).

Durch den Vergleich mit tropischen Vertretern wurde gezeigt, dass Schwämme, vergleichbar den Mikroorganismen, strukturelle Modifikationen ihrer Fettsäuren nutzen, um eine ausreichende Permeabilität und Fluidität ihrer Zellmembranen zu gewährleisten. Als ungewöhnliches diesbezügliches Merkmal wurde die Bromierung vorgeschlagen, die offensichtlich überproportional häufig von Kaltwasserdemospongien durchgeführt wird. Außerdem wurden mehrere Kriterien wie endständige und mittkettige Methylverzweigungen und Polyunsättigungen in einem Faktor integriert, der die lipidstrukturellen Unterschiede zwischen tropischen und borealen Porifera zusammenfasst.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Ansätze konzipiert und durchgeführt, die die Analyse stabiler Kohlenstoffisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ -Werte) nutzen, um biosynthetische Abläufe in einem Schwamm aufzuklären zu können. Es wurden natürlich auftretende Fraktionierungen nachgewiesen und zur Charakterisierung von Edukt-Produkt-Beziehungen in einem Schwamm herangezogen. Dieses Verfahren wurde am Beispiel zweier Verbindungsklassen (bromierte Fettsäuren, Sesquiterpenoide) vollzogen, und so konnten wertvolle Informationen zu den ablaufenden Mechanismen – und damit zum Enzymsystem – in dem Organismus gewonnen werden. Zudem haben die Ergebnisse gezeigt, dass die vergleichsweise einfache Analyse

von $\delta^{13}\text{C}$ -Werten spezifischer Komponenten in rezenten Organismen ein nützliches Werkzeug bei entsprechenden Fragestellungen ist. Ein großes Interesse jüngerer Arbeiten liegt auf der Assoziation von Schwämmen mit internen Mikroorganismen. Insbesondere die Domäne der Archaea rückt diesbezüglich immer mehr in den Vordergrund, wenn auch die Art der Beziehung immer noch unklar ist. Aus diesem Grund wurde einem Schwamm, während eines *in vitro*-Versuches, ^{13}C -markiertes Archaeol (*sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol) zugeführt, um einen eventuellen Zusammenhang zu den in einigen Schwämmen weit verbreiteten isoprenoidalen Fettsäuren (insbesondere Phytansäure) zu überprüfen. Anhand von $\delta^{13}\text{C}$ -Analysen wurde gezeigt, dass in dem untersuchten Schwamm ein Eintrag der ^{13}C -markierten, ethergebundenen Kohlenstoffkette in die estergebundene Phytansäure stattgefunden hat. Deshalb wurde Phytansäure in Schwämmen als möglicher Biomarker für die Assoziation von Archaea mit Schwämmen vorgeschlagen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum grundsätzlichen Verständnis der ältesten Metazoen – den Porifera – bei. Es konnten spezifische Verbindungen (Biomarker) nachgewiesen und auf bestimmte taxonomische Gruppen eingegrenzt werden, die in zukünftigen Studien eine Zuordnung diagenetischer Abbauprodukte (Chemofossilien) zum Produzenten, zum Habitat sowie zu einer Archaea-Invertebraten-Assoziation zulassen. Des Weiteren wurden wichtige Informationen gewonnen, die für weiter gehende Naturstoffuntersuchungen an Kaltwasserschwämmen fundamental sind.

8 Literatur

- Ackman R. G. and Hooper S. N. (1968) Examination of isoprenoid fatty acids as distinguishing characteristics of specific marine oils with particular reference to whale oils. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**, 549-565.
- Adams C. L., McInerney J. O., and Kelly M. (1999) Indications of relationships between poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 33-43.
- Aiello A., Fattorusso E., and Menna M. (1999) Steroids from sponges: Recent reports. *Steroids* **64**, 687-714.
- Althoff K., Schütt C., Steffen R., Batel R., and Müller W. E. G. (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.* **130**, 529-536.
- Anderson R., Kates M., Baedeker M. J., Kaplan I. R., and Ackmann R. G. (1977) The stereoisomeric composition of phytanyl chains in lipids of Dead Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **41**, 1381-1390.
- Angerhofer C. K., König G., Wright A. D., Sticher O., and Pezzuto J. M. (1992) Antimalarial sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1787-1789.
- Anjaneyulu A. S. R., Gowri P. M., and Murthy M. V. R. K. (1999) New sesquiterpenoids from the soft coral *Sinularia intacta* of the Indian Ocean. *J. Nat. Prod.* **62**, 1600-1604.
- Assmann M., Lichte E., Pawlik J. R., and Köck M. (2000) Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **207**, 255-262.
- Ayanoglu E., Popov S., Kornprobst J. M., Aboud-Bichara A., and Djerassi C. (1983) Phospholipid studies of marine organisms: V. New alpha-methoxy acids from *Higginsia tethyoides*. *Lipids* **18**, 830-836.
- Ayanoglu E., Walkup R. D., Sica D., and Djerassi C. (1982) Phospholipid studies of marine organisms: III. New phospholipid fatty acids from *Petrosia ficiformis*. *Lipids* **17**, 614-625.
- Bakus G. J. and Green G. (1974) Toxicity in sponges and holothurians: A geographic pattern. *Science* **185**, 951-952.
- Barnathan G., Bourgoignon N., and Kornprobst J.-M. (1998) Methoxy fatty acids isolated from the red alga, *Schizymenia dubyi*. *Phytochemistry* **47**, 761-765.
- Barnathan G., Doumenq P., Njinkoue J.-M., Miralles J., Debitus C., Levi C., and Kornprobst J.-M. (1994) Sponge fatty acids. 3. Occurrence of series of n-7 monoenoic and iso-5,9 dienoic long-chain fatty acids in the phospholipids of the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei* Keller¹. *Lipids* **29**, 297-303.
- Barnathan G., Kornprobst J.-M., Doumenq P., and Miralles J. (1996) New unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the axinellida sponges *Trikentrion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*. *Lipids* **31**, 193-200.
- Barnathan G., Miralles J., Gaydou E. M., Boury-Esnault N., and Kornprobst J.-M. (1992) New phospholipid fatty acids from the marine sponge *Cinachyrella alloclada* Uliczka. *Lipids* **27**, 779-784.
- Bergmann W. and Swift A. N. (1951) Marine products. XXX. Component acids of lipides of sponges. *J. Org. Chem.* **16**, 1206-1221.
- Bergquist P. R. (1979) Sponge chemistry – A review. *Coll. Intern. C. N. R. S.* **291**, 383-392.
- Bergquist P. R., Hofheinz W., and Oesterhelt G. (1980) Sterol composition and the classification of the demospongiae. *Biochem. Syst. Ecol.* **8**, 423-435.
- Bergquist P. R., Karuso P., and Cambie R. C. (1985) Taxonomic relationships within the Dendroceratida: A biological and chemotaxonomic appraisal. In *New perspectives in sponge biology* (ed. K. Rützler), Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. London. pp. 72-78

- Bergquist P. R., Karuso P., Cambie R. C., and Smith D. J. (1991) Sterol composition and classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**, 17-24.
- Bergquist P. R., Lavis A., and Cambie R. C. (1986) Sterol composition and classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **14**, 105-112.
- Bergquist P. R., Lawson M. P., Lavis A., and Cambie R. C. (1984) Fatty acid composition and the classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 63-84.
- Bewley C. A. and Faulkner D. J. (1998) Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars? *Angew. Chem.* **110**, 2280-2297.
- Blair N. E., Leu A., Munoz E., Olsen J., Kwong E., and Marais D. J. (1985) Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 996-1001.
- Blumenberg M., Thiel V., Pape T., and Michaelis W. (2002) The steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 415-419.
- Blumer M., Mullin M. M., and Thomas D. M. (1963) Pristane in zooplankton. *Science* **140**, 974.
- Bogenstätter M., Limberg A., Overman L. E., and Tomasi A. L. (1999) Enantioselective total synthesis of the kinesin motor protein inhibitor adociasulfate 1. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 12206-12207.
- Böger H. (1988) Versuch über das phylogenetische System der Porifera. *Meyniana* **40**, 143-154.
- Borchiellini C., Boury-Esnault N., Vacelet J., and Le Parco Y. (1998) Phylogenetic analysis of the Hsp 70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 647-655.
- Braekman J. C., Daloz D., De Groote S., Fernandes J. B., and Van Soest R. W. M. (1998) New polyketides from the sponge *Plakortis* sp. *J. Nat. Prod.* **61**, 1038-1042.
- Brooks P. W. and Maxwell J. R. (1974) Early stage fate of phytol in a recently-deposited lacustrine sediment. *Adv. Org. Geochem., Proc. Int. Meet., 6th, 1973*, 977-991.
- Brooks P. W., Maxwell J. R., and Patience R. L. (1978) Stereochemical relationships between phytol and phytanic acid, dihydrophytol and C₁₈ ketone in recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 1175-1180.
- Buchanan M. S., Hashimoto T., and Asakawa Y. (1996) Phytol esters and Phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. *Phytochemistry* **41**, 1373-1376.
- Buser H. R., Arn H., Guerin P., and Rauscher S. (1983) Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfides adducts. *Anal. Chem.* **55**, 818-822.
- Capon R. J. (2001) Marine bioprospecting – trawling for treasure and pleasure. *Eur. J. Org. Chem.* **4**, 633-645.
- Carballeira N., Emiliano A., and Guzman A. (1999) Facile syntheses for (5Z,9Z)-5,9-hexadecadienoic acid, (5Z,9Z)-5,9-nonadecadienoic acid, and (5Z,9Z)-5,9-eicosadienoic acid through a common synthetic route. *Chem. Phys. Lipids* **100**, 33-40.
- Carballeira N., Maldonado L., Rivera E., and Porras B. (1989a) The fatty acid 4,8,12-trimethyltridecanoic as a common constituent of the phospholipids of the sponge families spirastrellidae and clionidae. *Biochem. Syst. Ecol.* **17**, 311-314.
- Carballeira N. and Pagán M. (2001) New methoxylated fatty acids from the Caribbean sponge *Callyspongia fallax*. *J. Nat. Prod.* **64**, 620-623.
- Carballeira N., Thompson J. E., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1986) Biosynthetic studies of marine lipids. 5. The biosynthesis of long-chain branched fatty acids in marine sponges. *J. Org. Chem.* **51**, 2751-2756.

- Carballeira N. M., Colon R., and Emiliano A. (1998a) Identification of 2-methoxyhexadecanoic acid in *Amphimedon compressa*. *J. Nat. Prod.* **61**, 675-676.
- Carballeira N. M. and Emiliano A. (1993) Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. *Lipids* **28**, 763-766.
- Carballeira N. M., Emiliano A., Hernández-Alonso N., and González F. A. (1998b) Facile total synthesis and antimicrobial activity of the marine fatty acids (Z)-2-methoxy-5-hexadecenoic acid and (Z)-2-methoxy-6-hexadecenoic acid. *J. Nat. Prod.* **61**, 1543-1546.
- Carballeira N. M., Emiliano A., Rodriguez J., and Reyes E. D. (1992a) Isolation and characterization of novel 2-hydroxy fatty acids from the phospholipids of the sponge *Smenospongia aurea*. *Lipids* **27**, 681-685.
- Carballeira N. M. and Lopez M. R. (1989) On the isolation of 2-hydroxydocosanoic and 2-hydroxytricosanoic acids from the marine sponge *Amphimedon compressa*. *Lipids* **24**, 89-91.
- Carballeira N. M. and Maldonado L. (1986) Identification of 5,9-hexadecadienoic acid in the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids* **21**, 470-471.
- Carballeira N. M., Maldonado L., and Porras B. (1987) Isoprenoid fatty acids from marine sponges. Are sponges selective? *Lipids* **22**, 767-769.
- Carballeira N. M. and Maldonado M. E. (1989) On the isolation of the new fatty acid 6,11-eicosadienoic (20:2) and related 6,11-Dienoic acids from the sponge *Euryspongia rosea*. *Lipids* **24**, 665-668.
- Carballeira N. M., Negron V., and Reyes E. D. (1992b) Novel naturally occurring α -methoxy acids from the phospholipids of Caribbean sponges. *Tetrahedron* **48**, 1053-1058.
- Carballeira N. M., Reyes E. D., Sostre A., Rodriguez A. D., Rodriguez A. D., and Gonzales F. A. (1997) Identification of the novel antimicrobial fatty acid (5Z,9Z)-14-methyl-5,9-pentadecadienoic acid in *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* **60**, 502-504.
- Carballeira N. M. and Reyes M. (1995) Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and the zooanthid *Palythoa caribaeorum*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1689-1694.
- Carballeira N. M. and Rodriguez J. (1991) Two novel phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Geodia gibberosa*. *Lipids* **26**, 324-326.
- Carballeira N. M. and Sepulveda J. A. (1992) Two novel naturally occurring α -methoxy acids from the phospholipids of two Caribbean sponges. *Lipids* **27**, 72-74.
- Carballeira N. M. and Shalabi F. (1990) Identification of naturally occurring *trans, trans* Δ 5,9 fatty acids from the sponge *Plakortis halichondroides*. *Lipids* **25**, 835-840.
- Carballeira N. M. and Shalabi F. (1993) Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Petrosia* sp. *J. Nat. Prod.* **56**, 739-746.
- Carballeira N. M. and Shalabi F. (1995) The rare caribbean sponge *Leucosolenia canariensis*: Phospholipid fatty acids and sterols. *Lipids* **30**, 467-470.
- Carballeira N. M., Shalabi F., and Maldonado M. E. (1990) Identification of the new 18-hexacosenoic acid in the sponge *Thalysias juniperina*. *Lipids* **25**, 235-237.
- Carballeira N. M., Shalabi F., and Negron V. (1989b) 2-Hydroxy fatty acids from marine sponges 2. Phospholipid fatty acids of the caribbean sponges *Verongula gigantea* and *Aplysina archeri*. *Lipids* **24**, 229-232.
- Cavaliere-Smith T., Allsopp M. T. E. P., Chao E. E., Boury-Esnault N., and Vacelet J. (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**, 2031-2045.
- Chan M., Himes R. H., and Akagi J. M. (1971) Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic clostridia. *J. Bacteriol.* **106**, 876-881.

- Chill L., Miroz A., and Kashman Y. (2000) Haliclonyne, a new highly oxygenated polyacetylene from the marine sponge *Haliclona* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 523-526.
- Cho J. H. and Djerassi C. (1987) Sterols in marine invertebrates. Part 57. Stereostructure synthesis, and acid-catalysed isomerization of hebestrol - a biosynthetically significant cyclopropyl-containing marine sterol. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1307-1318.
- Christie W. W., Brechany E. Y., Marekov I. N., Stefanov K. L., and Andreev S. N. (1994) The fatty acids of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Black Sea. *Comp. Biochem. Physiol. B* **109**, 245-252.
- Christie W. W., Brechany E. Y., Stefanov K., and Popov S. (1992) The fatty acids of the sponge *Dysidea fragilis* from the Black Sea. *Lipids* **27**, 640-644.
- Clark R. J., Stapleton B. L., and Garson M. J. (2000) New isocyano and isothiocyano terpene metabolites from the tropical marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron* **56**, 3071-3076.
- Compagnone R. S., Piña I. C., Rangel H. R., Dagger F., Suárez A. I., Venkata Rami Reddy M., and Faulkner D. J. (1998) Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*. *Tetrahedron* **54**, 3057-3068.
- Conway K. W., Barrie J. V., Austin W. C., and Luternauer J. L. (1991) Holocene sponge bioherms on the western Canadian continental shelf. *Cont. Shelf Res.* **11**, 771-790.
- Cragg G. M., Newman D. J., and Snader K. M. (1997) Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.
- Cranwell P. A. (1986) Esters of acyclic and polycyclic isoprenoid alcohols: Biochemical markers in lacustrine sediments. *Org. Geochem.* **10**, 891-896.
- Crist B. V. and Djerassi C. (1983) Minor and trace sterols in marine invertebrates 47. A re-investigation of the 19-nor stanols isolated from the sponge *Axinella polypoides*. *Steroids* **42**, 331-343.
- Dai M. C., Chiche H. B., Düzgünes N., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1991) Phospholipid studies of marine organisms: 26. Interactions of some marine sterols with 1-stearoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine (SOPC) in model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **59**, 245-253.
- Dasgupta A., Ayanoglu E., Tomer K. B., and Djerassi C. (1987) High performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry of unusual branched and unsaturated phospholipid molecular species. *Chem. Phys. Lipids* **43**, 101-111.
- Dasgupta A., Ayanoglu E., Wegmann-Szente A., Tomer K., and Djerassi C. (1986) Mass spectral behavior and HPLC of some unusual molecular phospholipid species. *Chem. Phys. Lipids* **41**, 335-347.
- De Rosa M., De Rosa S., and Gambacorta A. (1976) Isoprenoid triether lipids from *Caldariella*. *Phytochemistry* **15**, 1995-1996.
- De Rosa M., Esposito E., Gambacorta A., Nicolaus B., and Bu'Lock J. D. (1980) Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophila*. *Phytochemistry* **19**, 827-831.
- De Rosa M., Minale L., and Sodano G. (1973) Metabolism in porifera -II. * Distribution of sterols. *Comp. Biochem. Physiol. B* **46**, 823-837.
- De Rosa M., Minale L., and Sodano G. (1975) Metabolism in porifera-V. Biosynthesis of 19-norstanols: Conversion of cholesterol into 19-nor-cholestanols by the sponge *Axinella polypoides*. *Experientia* **31**, 758-759.
- De Rosa M., Trincone A., Nicolaus B., and Gambacorta A. (1991) Archaeobacteria: lipids, membrane structures, and adaptation to environmental stresses. In *Life Under Extreme Conditions* (ed. G. Di Prisco), Springer-Verlag. Berlin. pp. 61-87
- Debrenne F. (1999) The past of sponges - sponges of the past. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 9-21.

- Delseth C., Tolela L., Scheuer P. J., Wells R. J., and Djerassi C. (1979) 14. 5α -24-Norcholestan- 3β -ol and (24Z)-stigmasta-5,7,24(28)-trien- 3β -ol. Two new marine sterols from the pacific sponges *Terpios zeteki* and *Dysidea herbacea*¹. *Helv. Chim. Acta* **62**, 101-109.
- Dembitsky V. M. (1988) Quantification of plasmalogen, alkylacyl and diacyl glycerophospholipids by micro-thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **436**, 467-473.
- Dembitsky V. M., Gorina I. A., Federova I. P., and Solovieva V. (1989) Comparative investigation of plasmalogens, alkylacyl, and diacyl glycerophospholipids of the marine sponges (type Porifera, Class Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol. B* **92**, 733-736.
- Dembitsky V. M., Kashin A. G., and Karaganova M. V. (1991) Phospholipid and fatty acid composition of the freshwater sponge *Euspongilla lacustris* from the Volga river estuary. *Comp. Biochem. Physiol. B* **100**, 185-187.
- Dembitsky V. M. and Srebnik M. (2002) Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Prog. Lipid Res.* **41**, 315-367.
- Didyk B. M., Simoneit B. R. T., Brassell S. C., and Eglinton G. (1978) Organic geochemical indicators of palaeoenvironmental conditions of sedimentation. *Nature* **272**, 216-222.
- Djerassi C. (1981) Recent studies in the marine sterol field. *Pure Appl. Chem.* **53**, 873-890.
- Djerassi C. and Lam W.-K. (1991) Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.* **24**, 69-75.
- Djerassi C. and Silva C. J. (1991) Sponge sterols: Origin and biosynthesis. *Acc. Chem. Res.* **24**, 371-378.
- Doss G. A. and Djerassi C. (1988) Sterols in marine invertebrates. 60. Isolation and structure elucidation of four new steroidal cyclopropenes from the sponge *Calyx podatypa*. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8124-8128.
- Doss G. A., Proudfoot J. R., Silva C. J., and Djerassi C. (1990) Biosynthetic studies of marine lipids. 24. Experimental demonstration of an unprecedented cyclopropane-cyclopropane rearrangement in the biosynthesis of the sponge sterol petrosterol. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 305-310.
- Dowling N. J. E., Nichols P. D., and White D. C. (1988) Phospholipid fatty acid and infra-red spectroscopic analysis of a sulphate-reducing consortium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**, 325-334.
- Dumdei E. J., Blunt J. W., Munro M. H. G., Battershill C. N., and Page M. J. (1998) The whys and whats of sponge chemistry: Why chemists extract sponges and what problems does this cause? In *Sponge sciences - multidisciplinary perspectives* (eds. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 353-364
- Dumdei E. J., Flowers A. E., Garson M. J., and Moore C. J. (1997) The biosynthesis of sesquiterpene isocyanides and isothiocyanates in the marine sponge *Acanthella cavernosa* (dendy); evidence for dietary transfer to the nudibranch *Phyllidiella pustulosa*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 1385-1392.
- Dunkelblum E., Tan S. H., and P.J. S. (1985) Double-Bond Location in monounsaturated fatty acids by dimethyl disulfide derivatization and mass spectrometry: Application to analysis of fatty acids in pheromone glands of four lepidoptera. *J. Chem. Ecol.* **11**, 265-277.
- Duque C., Cepeda N., and Martinez A. (1993) The steryl ester and phospholipid fatty acids of the sponge *Agelas conifera* from the Colombian Caribbean. *Lipids* **28**, 767-769.
- Eide L. I. (1979) Evidence of a topographically trapped vortex on the Norwegian continental shelf. *Deep-Sea Res.* **26**, 601-621.
- Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C., and Sica D. (1975) Calysterol: A C₂₉ cyclopropene-containing marine sterol from the sponge *Calyx nicaensis*. *Tetrahedron* **31**, 1715-1716.
- Faulkner D. J. (2002) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 1-48.
- Faulkner D. J., Harper M. K., Salomon C. E., and Schmidt E. W. (1999) Localisation of bioactive metabolites in marine sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 167-173.

- Fox M. A. and Whitesell J. K. (1995) *Organische Chemie – Grundlagen, Mechanismen, bioorganische Anwendungen*. Spektrum der Wissenschaft. Heidelberg Berlin Oxford. pp.930
- Freiwald A. (1998) Geobiology of *Lophelia pertusa* (scleractinia) reefs in the north atlantic. habil., Universität Bremen. Bremen.
- Freiwald A., Hühnerbach V., Lindberg B., Wilson J. B., and Campbell J. (2002) The Sula Reef Complex, Norwegian shelf. *Facies* **47**, 179-200.
- Freiwald A., Wilson J. B., and Henrich R. (1999) Grounding Pleistocene icebergs shape recent deep-water coral reefs. *Sediment. Geol.* **125**, 1-8.
- Friedrich A. B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., and Hentschel U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aphysina caverincola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**, 461-470.
- Fromont J., Kerr S., Kerr R., Riddle M., and Murphy P. (1994) Chemotaxonomic relationships within, and comparisons between, the orders Haplosclerida and Petrosia (porifera: Demospongiae) using sterol complements. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 735-752.
- Fu X., Ferreira M. L. G., Schmitz F. J., and Kelly M. (1999) Tamosterone sulfates: A C-14 epimeric pair of polyhydroxylated sterols from a new oceanapiid sponge genus. *J. Org. Chem.* **64**, 6706-6709.
- Fusetani N. (1996) Bioactive substances from marine sponges. *J. Toxicol. – Toxin Rev.* **15**, 157-170.
- Fusetani N., Shiragaki T., Matsunaga S., and Hashimoto K. (1987) Bioactive marine metabolites XX. Petrosynol and petrosynone, antimicrobial C₃₀ polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* sp.: Determination of the absolute configuration. *Tetrahedron Lett.* **28**, 4313-4314.
- Gambacorta A., Trincone A., Nicolaus B., Lama L., and De Rosa M. (1994) Unique features of lipids of *Archaea*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 518-527.
- Garson M. J. (1993) The biosynthesis of marine natural products. *Chem. Rev.* **93**, 1699-1733.
- Garson M. J., Zimmermann M. P., Battershill C. N., Holden J. L., and Murphy P. T. (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids* **29**, 509-516.
- Gauvin A., Smadja J., Aknin M., and Gaydou E. M. (1998) Cyclopropane-containing sterols in the marine sponge *Petrosia spheroida*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **121**, 451-456.
- Gerwick W. H., Reyes S., and Alvarado B. (1987) Two Malyngamides from the Caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry* **26**, 1701-1704.
- Gillan F. T. and Hogg R. W. (1984) A method for the estimation of bacterial biomass and community structure in mangrove-associated sediments. *J. Microbiol. Meth.* **2**, 275-293.
- Gillan F. T. and Johns R. B. (1980) Input and early diagenesis of chlorophylls in a temperate intertidal sediment. *Mar. Chem.* **9**, 243-253.
- Gillan F. T., Stoilov I. L., Thompson J. E., Hogg R. W., Wilkinson C. R., and Djerassi C. (1988) Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids* **23**, 1139-1145.
- Giner J.-L. (1993) Biosynthesis of marine sterol side-chains. *Chem. Rev.* **93**, 1735-1752.
- Goad L. J. (1981) Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure Appl. Chem.* **51**, 837-852.
- Goad L. J. and Akihisa T. (1997) *Analysis of sterols*. Blackie Academic & Professional. London. pp.437
- Goldfine H. and Langworthy T. A. (1988) A growing interest in bacterial ether lipids. *TIBS* **13**, 217-221.
- Golubic S. and Awramik S. M. (1974) Microbial comparison of stromatolite environments: Shark Bay, Persian Gulf and the Bahamas. *Geol. Soc. Am. Ann. Meetings* **6**, 154-155.

- Grebmeier J. M. and Barry J. P. (1991) The influence of oceanographic processes on pelagic-benthic coupling in polar regions: A benthic perspective. *J. Marine Syst.* **2**, 495-518.
- Guella G., Mancini I., and Pietra F. (1988) Isolation of ergost-4,24(28)-dien-3-one from both astrophorida demosponges and subantarctic hexactinellides. *Comp. Biochem. Physiol. B* **90**, 113-115.
- Gulavita N. K., de Silva E. D., Hagadone M. R., Karuso P., Scheuer J., Van Duyne G. D., and Clardy J. (1986) Nitrogenous bisabolene sesquiterpene from marine invertebrates. *J. Org. Chem.* **51**, 5136-5139.
- Gunatilaka A. A. L., Gopichand Y., Schmitz F. J., and Djerassi C. (1981) Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5α , 8α -epidioxy sterols from four marine organisms. *J. Org. Chem.* **46**, 3860-3866.
- Haack S. K., Garchow H., Odelson D. A., Forney L. J., and Klug M. J. (1994) Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2483-2493.
- Haeckel E. (1874) The gastraea-theory, the phylogenetic classification of the animal kingdom and the homology of the germ-lamellae. *Q. J. Microsc. Sci.* **14**, 142-165.
- Hahn S., Stoilov I. L., Tam Ha T. B., Raederstorff D., Doss G. A., Li H.-T., and Djerassi C. (1988) Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8117-8124.
- Hambley T. W., Poiner A., and Taylor W. C. (1990) The constituents of marine sponges. V. The isolation from *Chelonaplysilla violacea* (Dendroceratida) of Aplyviolene and other Diterpenes, and the determination of the crystal structure of Aplyviolene. *Aust. J. Chem.* **43**, 1861-1870.
- Hansson H. G. C. (1999) NEAT (North East Atlantic Taxa): Scandinavian marine Porifera (Spongiaria) Check list. [<http://www.tmbi.gu.se>].
- Harwood J. L., Jones A. L., Perry H. J., Rutter A. J., Smith K. L., and Williams M. (1994) Changes in plant lipids during temperature adaptation. In *Temperature adaptation of biological membranes* (ed. A. R. Cossins), Portland Press. London Chapel Hill. pp. 107-118
- Hayes J. M., Freeman K. H., Popp B. N., and Hoham C. H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org. Geochem.* **16**, 1115-1128.
- Hentschel E. (1929) Die Kiesel- und Hornschwämme des Nördlichen Eismeers. *Fauna Arctica* **5**, 908-912.
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A. B., Wagner M., Hacker J., and Moore B. S. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431-4440.
- Hirota H., Tomono Y., and Fusetani N. (1996) Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron* **52**, 2359-2368.
- Hoefs M. J. L., Schouten S., De Leeuw J. W., King L. L., Wakeham S. G., and Sinninghe Damsté J. S. (1997) Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3090-3095.
- Hoffmann F., Rapp H. T., Zoller T., and Reitner J. (2002) Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge *Geodia barretti* Bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae). *J. Biotechnol.* **100**, 109 - 118.
- Hooper J. N. A. (2000) *Spongicide. Guide to sponge collection and identification, version August 2000*. Queensland Museum. Brisbane (Australia) [available online: <http://www.qmuseum.qld.gov.au/organisationa/sections/sessilemarineinvertebrates/spong.pdf>]. pp.129

- Hougaard L., Christophersen C., Nielsen P. H., Klitgaard A., and Tendal O. (1991) The chemical composition of species of *Geodia*, *Isops* and *Stryphnus* (Choristida: Demospongia: Porifera) - A comparative study with some taxonomical implications. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**, 223-235.
- Jefferts E., Morales R. W., and Litchfield C. (1974) Occurrence of *cis*-5,*cis*-9-hexacosadienoic and *cis*-5,*cis*-9,*cis*-19-hexacosatrienoic acids in the marine sponge *Microciona prolifera*. *Lipids* **9**, 244-247.
- Jones A. L., Lloyd D., and Harwood J. L. (1994) Temperature adaptation and the membrane lipids of *Acanthamoeba castellanii*. In *Temperature Adaptation of Biological Membranes* (ed. A. R. Cossins), Portland Press. London and Chapel Hill. pp. 119-127
- Kaneda T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**, 288-302.
- Kaneshiro E. S. (1987) Lipids of *Paramecium*. *J. Lipid Res.* **28**, 1241-1258.
- Karuso P., Bergquist P. R., Cambie R. C., Buckleton J. S., Clark G. R., and Rickard C. E. F. (1986) Terpenoid constituents of morphologically similar sponges in the family Aplysillidae. *Aust. J. Chem.* **39**, 1643-1653.
- Karuso T. and Taylor W. C. (1986) The constituents of marine sponges. II The isolation from *Aplysilla rosea* (Dendroceratida) of (5*R**, 7*S**, 8*R**, 9*S**, 10*R**, 13*S**, 14*S**, 15*S**)-15,17-epoxy-17-hydroxy-16-oxospongian-7-yl butyrate (aplyroseol-1) and related diterpenes (aplyroseol-2 to -6). *Aust. J. Chem.* **39**, 1629-1641.
- Kassühlke K. E., Potts B. C. M., and Faulkner D. J. (1991) New nitrogenous sesquiterpenes from the two Phillipine nudibranchs, *Phyllidia pustulosa* and *P. varicosa*, and from a Palauan sponge, *Halichondria* cf. *lendenfeldi*. *J. Org. Chem.* **56**, 3747-3750.
- Kates M., Joo C. N., Palameta B., and Shier T. (1967) Absolute stereochemical configuration of phytanyl (dihydrophytyl) groups in lipids of *Halobacterium cutirubrum*. *Biochemistry* **6**, 3329-3338.
- Kernan M. R., Cambie R. C., and Bergquist P. R. (1990) Chemistry of sponges. IX. New diterpenes from the marine sponge *Dictyodendrilla cavernosa*. *J. Nat. Prod.* **53**, 724-727.
- Kerr R. G. and Baker B. (1991) Marine sterols. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 465-497.
- Khalil M. W., Durham L. J., Djerassi C., and Sica D. (1980) Ficisterol (23-ethyl-24-methyl-27-norcholesta-5,25-dien-3 β -ol). A biosynthetically unprecedented sterol from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 2133-2134.
- Kobayashi M. and Satoh N. (1998) Molecular evidence for early evolution of metazoa. In *Sponge sciences - multidisciplinary perspectives* (eds. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 157-163
- Kokke W. C. M. C., Pak C. S., Fenical W., and Djerassi C. (1979) 137. Minor and trace sterols in marine invertebrates. XII. Occurrence of 24-(*R*+*S*)-Isopropenylcholesterol, 24(*R*+*S*)-Methylcholesta-5,25-dien-3 β -ol, and 24(*R*+*S*)-Methylcholesta-7,25-dien-3 β -ol in the Caribbean sponge, *Verongia cauliformis*. *Helv. Chim. Acta* **62**, 1310-1315.
- Koltun V. M. (1967) *Hyalospongia* or *Hexactinellida* from north and far-east seas of the USSR. Nauka. Leningrad. pp.124
- König G. M., Wright A. D., and Angerhofer C. K. (1996) Novel potent antimalaria diterpene isocyanates, isothiocyanates and isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastella hooperi*. *J. Org. Chem.* **61**, 3259-3267.
- Koroly M. J. and Conner R. L. (1976) Unsaturated fatty acid biosynthesis in *Tetrahymena*. Evidence for two pathways. *J. Biol. Chem.* **251**, 7588-7592.
- Krautter M., Conway K. W., Barrie J. V., and Neuweiler M. (2001) Discovery of a "living dinosaur": Globally unique modern Hexactinellid sponge reefs off British Columbia, Canada. *Facies* **44**, 265-282.

- Kruse M., Leys S. P., Müller I. M., and Müller W. E. G. (1998) Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on the amino acid sequence of the protein kinase C from *Rhabdocalypus dawsoni*. *J. Mol. Evol.* **46**, 721-728.
- Lam W.-K., Hahn S., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1989) Phospholipid studies of marine organisms. 22. Structure and biosynthesis of a novel brominated fatty acid from a Hymeniacidonid sponge. *J. Org. Chem.* **54**, 3428-3432.
- Langworthy T. A. (1985) Lipids of Archaeobacteria. In *The bacteria. A treatise on structure and function*, Vol. VIII (eds. C. R. Woese und R. S. Wolfe), Academic Press. New York. pp. 459-497
- Lankelma J., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1983) Double-bond location in long chain polyunsaturated fatty acids by chemical Ionization-mass spectrometry. *Lipids* **18**, 853-858.
- Lawson M. P., Bergquist P. R., and Cambie R. C. (1984) Fatty acid composition and the classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 375-393.
- Li C.-W., Chen J.-Y., and Hua T.-E. (1998) Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**, 879-306.
- Li H., Düzgünes N., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1988) Analogs of unusual sponge phospholipids synthesis and thermotropic properties of 1,2-di-(6Z, 9Z)-5,9-hexacosadienoyl phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* **48**, 109-117.
- Li L. N., Li H.-T., Lang R. W., Itoh T., Sica D., and Djerassi C. (1982) Minor and trace sterols in marine invertebrates. 31. Isolation and structure elucidation of 23H-Isocalysterol, a naturally occurring cyclopropene. Some comparative observations on the course of hydrogenolytic ring opening of steroidal cyclopropenes and cyclopropanes. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6726-6732.
- Li Y., Ishibashi M., Sasaki T., and Kobayashi J. (1995) New bromine containing unsaturated fatty acid derivatives from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *J. Chem. Res. (S)*, 126-127.
- Lien R. (1983) Pløyemerker etter isfjell på norsk kontinentalsokkel, Institutt for Kontinentalsokkelundersøkelser., pp. 147
- Lim Y. J., Kim J. S., Im K. S., Jung J. H., Lee C.-O., Hong J., and Kim D.-K. (1999) New cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia*. *J. Nat. Prod.* **64**, 46-53.
- Lim Y. J., Lee C.-O., Hong J., Im K. S., and Jung J. H. (2001) Cytotoxic polyacetylenic alcohols from the marine sponge *Petrosia* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 1565-1567.
- Litchfield C., Greenberg A. J., Noto G., and Morales R. W. (1976) Unusually high levels of C₂₄-C₃₀ fatty acids in sponges of the class demospongiae. *Lipids* **11**, 567-571.
- Litchfield C. and Marcantonio E. E. (1978) Occurrence of 5,9,19-octacosatrienoic, 5,9-hexacosadienoic and 17-hexacosenoic acids in the marine sponge *Xestospongia halichondroides*. *Lipids* **13**, 199-202.
- Litchfield C. and Morales R. W. (1976) Are demospongiae membranes unique among living organisms? In *Aspects of sponge biology* (eds. F. W. Harrison und R. R. Cowden), Academic Press. New York. pp. 183-200
- Litchfield C., Tyszkiewicz J., and Dato V. (1980) 5,9,23-Triacontatrienoic acid, principal fatty acid of the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids* **15**, 200-202.
- Logue J. A., De Vries A. L., Fodor E., and Cossins A. R. (2000) Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J. Exp. Biol.* **203**, 2105-2115.
- Luckner M. (1990) *Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals*. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena. pp.563
- Mackenzie A. S., Patience R. L., Yon D. A., and Maxwell J. R. (1982) The effect of maturation on the configuration of acyclic isoprenoid acids in sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **46**, 783-792.

- MacLean I., Eglinton G., Douraghi-Zadeh K., Ackman R. G., and Hooper S. N. (1968) Correlation of stereoisomerism in present day and geologically ancient isoprenoid fatty acids. *Nature* **218**, 1019-1024.
- MacPherson J. C., Pavlovich J. G., and Jacobs R. S. (1998) Phospholipid composition of the granular amoebocyte from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Lipids* **33**, 931-940.
- Madrigal R. V. and Smith Jr C. R. V. (1975) *Taxus baccata* seed oil: a new source of *cis-5,cis-9*-octadecadienoic acid. *Lipids* **10**, 502-504.
- Maldonado M. and Young C. M. (1996) Bathymetric patterns of sponge distribution on the Bahamian slope. *Deep-Sea Res. I* **43**, 897-915.
- Margot C., Catalan C. A. N., Proudfoot J. R., Sodano G., Sica D., and Djerassi C. (1987) Biosynthesis of three cyclopropene-containing sterols in the sponge *Calyx niceaensis*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1441-1442.
- Margot H., Acebal C., Toril E., Amils R., and Fernandez Puentes J. L. (2002) Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* **140**, 739-745.
- McCaffrey M. A., Moldowan J. M., Lipton P. A., Summons R. E., Peters K. E., Jeganathan A., and Watt D. S. (1994) Paleoenvironmental implications of novel C₃₀ steranes in Precambrian to Cenozoic age petroleum and bitumen. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 529-532.
- McClintock J. B. and Baker B. J. (1997) A review of the chemical ecology of Antarctic marine invertebrates. *Amer. Zool.* **37**, 329-342.
- Medina M., Collins A.G., Silberman J.D., and Sogin M.L. (2001) Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9707-9712.
- Mehl D. (1992) *Die Entwicklung der Hexactinellida seit dem Mesozoikum: Paläobiologie, Phylogenie und Evolutionsökologie*. Berliner Geowissenschaftliche Abhandlungen 2 (E). Berlin. pp.164
- Mehl D., Müller I., and Müller W. E. G. (1998) Molecular biological and paleontological evidence that eumetazoa, including porifera (sponges), are of monophyletic origin. In *Sponge sciences – multidisciplinary perspectives* (eds. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 133-156
- Meier-Augenstein W. (1999) Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **842**, 351-371.
- Merritt D. A., Brand W. A., and Hayes J. M. (1994) Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry: methods for isotopic calibration. *Org. Geochem.* **21**, 573-583.
- Minale L., Riccio R., Scalona O., Sodano G., Fattorusso E., Magno S., Mayol L., and Santacroce C. (1977) Metabolism in porifera. VII. Conversion of [7,7-³H₂]-fucosterol into calysterol by the sponge *Calyx niceaensis*. *Experientia* **33**, 1550-1552.
- Minale L. and Sodano G. (1974a) Marine sterols: 19-nor-stanols from the sponge *Axinella polypoides*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1888-1892.
- Minale L. and Sodano G. (1974b) Marine sterols: Unique 3 β -hydroxymethyl-A-nor-5 α -steranes from the sponge *Axinella verrucosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2380-2384.
- Morales R. W. and Litchfield C. (1976) Unusual C₂₄, C₂₅, C₂₆ and C₂₇ polyunsaturated fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 206-216.
- Mortensen P. B., Hovland M., Brattegard T., and Farestveit R. (1995) Deep water bioherms of the scleractinian coral *Lophelia Pertusa* (L.) at 64° N on the Norwegian shelf: structure and associated megafauna. *Sarsia* **80**, 145-158.
- Müller W. E. G. (1997) Evolution of Protozoa to Metazoa. *Theor. Biosci.* **116**, 145-168.
- Munro M. H. G. and Blunt J. W. (2000) Database MarinLit. August 2000

- Murata N. (1994) Genetic and temperature-induced modulation of cyanobacterial membrane lipids. In *Temperature adaptations of biological membranes* (ed. A. R. Cossins), Portland Press. London Chapel Hill. pp. 155-162
- Nes W. R. and McKean M. L. (1977) Biochemistry of steroids and other isopentenoids. *Univ. Park Press*, 416-418.
- Nishiyama G. K. and Bakus G. J. (1999) Release of allelochemicals by three tropical sponges (Demospongiaea) and their toxic effect on coral substrate competitors. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 411-417.
- Nissenbaum A., Baedeker M. J., and Kaplan I. R. (1972) Organic geochemistry of Dead Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **36**, 709-727.
- Osinga R., Tramper J., and Wijffels R. H. (1999) Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.* **1**, 509-532.
- Pape T. (2003) Mikrobielle Biomarker in Schwämmen. Dissertation (in prep.), Universität Hamburg. Hamburg.
- Pape T., Blumenberg M., Thiel V., and Michaelis W. (2002) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Boll. Mus. Ist. biol. Univ. Genova*, (submitted).
- Patil A. D., Freyer A. J., Breen A., Carte B., and Johnson R. K. (1996a) Halistanol disulfate B, a novel sulfated sterol from the sponge *Pachastrella* sp.: Inhibitor of endothelin converting enzyme. *J. Nat. Prod.* **59**, 606-608.
- Patil A. D., Freyer A. J., Carte B., Johnson R. K., and Lahouratate P. (1996b) Plakortides, novel cyclic peroxides from the sponge *Plakortis halichondrioides*: Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. *J. Nat. Prod.* **59**, 219-223.
- Paul V. J., Seo Y., Cho K. W., Rho J.-R., Shin J., and Bergquist P. (1997) Sesquiterpenoids of the drimane class from a sponge of the genus *Dysidea*. *J. Nat. Prod.* **60**, 1115-1120.
- Pawlik J. R. (1993) Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* **93**, 1911-1922.
- Peters K. E. and Moldowan J. M. (1993) *The Biomarker Guide – Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. pp.363
- Possner S. (2003) Neue Naturstoffe aus marinen Invertebraten. Dissertation, Universität Hamburg. Hamburg (in prep.).
- Preston C. M., Wu K. Y., Molinski T. F., and DeLong E. F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbosium* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6241-6246.
- Proksch P. (1991) Biologisch aktive Naturstoffe in marinen Invertebraten. *Biologie in unserer Zeit* **21**, 26-30.
- Raederstorff D., Shu A. Y. L., Thompson J. E., and Djerassi C. (1987) Biosynthetic studies of marine lipids. 11. Synthesis, biosynthesis, and absolute configuration of the internally branched demospongiic acid, 22-methyl-5,9-octacosadienoic acid. *J. Org. Chem.* **52**, 2337-2346.
- Rapp H. T., Klautau M., and Valentine C. (2001) Two new species of *Clathrina* (Porifera, Calcarea) from the Norwegian coast. *Sarsia* **86**, 69-74.
- Ravi B. N., Kokke W. C. M. C., Delseth C., and Djerassi C. (1978) Isolation and structure of 26,27-cycloapsterol (petrosterol) a cyclopropane-containing marine sterol from sponge *Halichondria* sp. *Tetrahedron Lett.*, 4379-4380.
- Reiswig H. M. (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Coll. Internat. CNRS* **291**, 173-180.
- Reiswig H. M. and Mackie G. O. (1983) Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **301**, 419-428.
- Reitner J. and Keupp H. (1989) Basalskelette bei Schwämmen. *Die Geowissenschaften* **7**, 71-78.

- Reitner J. and Mehl D. (1996) Monophyly of the porifera. *Verh. naturwiss. Ver. Hamburg (NF)* **36**, 5-32.
- Rezanka T. and Dembitsky V. M. (1993) Isoprenoid polyunsaturated fatty acids from freshwater sponges. *J. Nat. Prod.* **56**, 1898-1904.
- Rontani J.-F., Bonin P., and Volkman J. K. (1999) Biodegradation of free phytol by bacterial communities isolated from marine sediments under aerobic and denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5484-5492.
- Roos C. (1995) Untersuchungen zur Stereochemie und Analytik von geochemisch relevanten, acyclischen C₂₀-Diterpenen. Diplomarbeit, Universität Hamburg. Hamburg.
- Russell N. J. (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **326**, 595-611.
- Schlegel H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme. Stuttgart - New York. pp.634
- Schleper C., DeLong E. F., Preston C. M., Feldman R. A., Wu K. Y., and Swanson R. V. (1998) Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**, 5003-5009.
- Schouten S., Hopmans E. C., Pancost R. D., and Sinninghe Damsté J. S. (2000) Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14421-14426.
- Schupp P., Eder C., Paul V., and Proksch P. (1999a) Chemistry, ecology and biological activity of the haplosclerid sponge *Oceanapia* sp.; can ecological observations and experiments give a first clue about pharmacological activity? *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 541-549.
- Schupp P., Eder C., Paul V., and Proksch P. (1999b) Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications. *Mar. Biol.* **135**, 573-580.
- Schütze J., Krasko A., Custodio M. R., Efremova S. M., Müller I. M., and Müller W. E. G. (1999) Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 63-73.
- Sica D. and Zollo F. (1978) Petrosterol, the major sterol with a cyclopropane side chain in the sponge *Petrosia ficiformis*. *Tetrahedron Lett.* **9**, 837-838.
- Silva C. J., Giner J.-L., and Djerassi C. (1992) Biosynthetic studies of marine lipids: 37. Enzymatic desaturation of 24(S)-methylcholesterol to 23,24-methylenecholesterol, norficosterol, and norhebestero. Further evidence for an unified biosynthesis of marine sterols with unique side chains. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 295-299.
- Silva C. J., Wünsche L., and Djerassi C. (1991) Biosynthetic studies of marine lipids. 35. The demonstration of de novo sterol biosynthesis in sponges using radiolabeled isoprenoid precursors. *Comp. Biochem. Physiol. B* **99**, 763-773.
- Simpson J. S. and Garson M. J. (1999) Cyanide and thiocyanate-based biosynthesis in tropical marine sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 559-567.
- Skorokhod A., Gamulin V., Gundacker D., Kavsan V., Müller I. M., and Müller W. E. G. (1999) Origin of Insulin receptor-like tyrosin kinases in marine sponges. *Biological Bulletin* **197**, 198-206.
- Smith A. G., Goodfellow R., and Goad L. J. (1972) The intermediacy of 3-oxo steroids in the conversion of cholest-5-en-3 β -ol into 5 α -cholesta-3 β -ol by the starfish *Asterias rubens* and *Porania pulvillus*. *Biochem. J.* **128**, 1371-1372.
- Smith G. M. and Djerassi C. (1987) Phospholipid studies of marine organisms: 14. Ether lipids of the sponge *Tethya aurantia*. *Lipids* **22**, 236-240.
- Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., and Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.

- Sperry S. and Crews P. (1997) Haliclostanoone sulfate and Halistanol sulfate from an Indo-Pacific *Haliclona* sponge. *J. Nat. Prod.* **60**, 29-32.
- Stanley jr. G. D. and Cairns S. D. (1988) Constructional azooxanthellate coral communities: an overview with implications for the fossil record. *Palaios* **3**, 233-242.
- Starmans A., Gutt J., and Arntz W. E. (1999) Mega-epibenthic communities in Arctic and Antarctic shelf areas. *Mar. Biol.* **135**, 269-280.
- Steiner M., Mehl D., Reitner J., and Erdtmann B. D. (1993) Oldest entirely preserved sponges and other fossils from the Lowermost Cambrian and a new facies reconstruction of the Yangtze platform (China). *Berliner Geowiss. Abh.* **9**, 293-329.
- Stryer L. (1995) *Biochemie*. Springer-Verlag. Heidelberg Berlin Oxford. pp.1125
- Suutari M. and Laakso S. (1992) Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 119-124.
- Tabachnik K. R. (1991) Adaption of the hexactinellid sponges to deep-sea life. In *Fossil and recent sponges* (eds. J. Reitner und H. Keupp), Springer-Verlag. Berlin. pp. 378-386
- Tabachnik K. R. and Menshenina L. L. (1999) An approach to the phylogenetic reconstruction of Amphidiscophora (Porifera: Hexactinellida). *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 607-615.
- Taylor J. and Parkes R. J. (1983) The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3303-3309.
- Taylor W. C. and Toth S. (1997) The constituents of marine sponges. VIII Minor diterpenoid metabolites of *Aplysilla rosea* and *A. var. sulphurea*. *Aust. J. Chem.* **50**, 895-902.
- Teece M. A., Fogel M. L., Dollhopf M. E., and Nealson K. H. (1999) Isotopic fractionation associated with biosynthesis of fatty acids by a marine bacterium under oxic and anoxic conditions. *Org. Geochem.* **30**, 1571-1579.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., and Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 60-66.
- Thiel V., Jenisch A., Wörheide G., Löwenberg A., Reitner J., and Michaelis W. (1999) Mid-chain branched alkanolic acids from "living fossil" demosponges: A link to ancient sedimentary lipids? *Org. Geochem.* **30**, 1-14.
- Thompson J. E., Walker R. P., and Faulkner D. J. (1985) Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Mar. Biol.* **88**, 11-21.
- Treibs A. (1934) Chlorophyll- und Hämin-derivate in bituminösen Gesteinen, Erdölen, Erdwachsen und Asphalten. Ein Beitrag zur Entstehung des Erdöls. *Liebigs Annalen* **510**, 42-62.
- Vacelet J. (1999) Outlook to the future of sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 27-32.
- Valentine J. W., Erwin D. H., and Jablonski D. (1996) Developmental evolution of metazoan body-plans: The fossil evidence. *Dev. Biol.* **173**, 373-381.
- van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., and Konings W. N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163-170.
- van Soest R. W. M. and Braekman J. C. (1999) Chemosystematics of porifera: A review. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 569-589.
- van Soest R. W. M., Fusetani N., and Andersen R. J. (1998) Straight-chain acetylenes as chemotaxonomic markers of the marine Haplosclerida. In *Sponge sciences – multidisciplinary perspectives* (eds. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 3-30

- van Soest R. W. M. and Stentoft N. (1988) Barbados deep-water sponges. *Studies on the fauna of Curacao and other Caribbean Islands* **215**, 1-175.
- Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G., and Tonini C. (1987) Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **59**, 694-699.
- Wakeham S. G. and Beier J. A. (1991) Fatty acid and sterol biomarkers as indicators of particulate matter source and alteration processes in the Black Sea. *Deep-Sea Res.* **38**, S943-S968.
- Walkup R. D., Jamieson G. C., Ratcliff M. R., and Djerassi C. (1981) Phospholipid studies of marine organisms: 2. Phospholipids-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids* **16**, 631-646.
- Wijekoon W. M. D., Ayanoglu E., and Djerassi C. (1984) Phospholipid studies of marine organisms 9. New brominated demospongiac acids from the phospholipids of two *Petrosia* species. *Tetrahedron Lett.* **25**, 3285-3288.
- Wilkinson C. R. (1978) Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 161-167.
- Wilkinson C. R. (1984) Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbiosis in marine sponges. *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**, 509-517.
- Willenz P. and Hartmann W. D. (1989) Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges. I. *Ceratoporella nicholsoni* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae: Porifera). *Mar. Biol.* **103**, 387-401.
- Wilson J. B. (1979) The distribution of the coral *Lophelia pertusa* (L.) (*L. prolifera* (Pallas)) in the north-east Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **59**, 149-164.
- Wright A. D., König G. M., Angerhofer C. K., Greenridge P., Linden A., and Desqueroux-Faundez R. (1996) Antimalarial activity: The search for marine-derived natural products with selective antimalarial activity. *J. Nat. Prod.* **59**, 710-716.
- Zelles L. (1997) Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **35**, 275-294.

Anhang

A Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

B Methodik

C Tabellen

D Massenspektren

E Publikationen

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

	Seite
Abbildung 2.1 Abstammungszweig ausgewählter Eukaryoten, basierend auf 18S-rRNA-Daten (leicht verändert nach VALENTINE <i>et al.</i> , 1996; KOBAYASHI and SATOH, 1998)	8
Abbildung 2.2 Hypothesen zur Phylogenie der drei rezenten Porifera-Klassen, basierend u.a. auf der chemischen Zusammensetzung der Spiculae oder der Zellorganisation. (aus ADAMS <i>et al.</i> , 1999; A nach BÖGER, 1988; B nach REISWIG and MACKIE, 1983).	9
Abbildung 3.1 Kalottenmodell einer Phospholipiddoppelschicht (leicht verändert nach STRYER, 1995).	11
Abbildung 4.1 Vorkommen der Hexakoralle <i>Lophelia pertusa</i> (rote Punkte; leicht verändert nach FREIWALD, 1998).	16
Abbildung 4.2 Bathymetrische Karte des Sula-Rückens mit der Lage des 13 km langen <i>Lophelia</i> -Riff Komplexes. Die <i>Echosounder</i> -Aufnahmen zeigen die Riffmorphologie (FREIWALD, 1998).	16
Abbildung 4.3 <i>Lophelia pertusa</i> Korallenstock mit Dorschverandtem und mit verschiedenen Porifera (<i>Geodia macandrewii</i> , <i>Plakortis</i> sp., <i>Mycale lingua</i>), die einen abgestorbenen Korallenblock besiedeln (Sula-Rücken)	17
Abbildung 4.4 Zusammensetzung der Fauna in den verschiedenen Arealen eines Riffes der Hexakoralle <i>Lophelia pertusa</i> . Angaben in Individuen 10m ⁻² , SB=Soft bottom, MS=mixed stone bottom, LR= <i>Lophelia p.</i> rubble, DL=Dead <i>Lophelia p.</i> , LL=Living <i>Lophelia p.</i> (leicht verändert nach MORTENSEN <i>et al.</i> , 1995)	17
Abbildung 4.5 Lokalitäten der Probenkampagnen (Zahlen s. Legende von Tabelle XXX)	20
Abbildung 5.1 SPE 2-Fraktion (s. Methodik im Anhang XXX) der vormals estergebundenen Fettsäuren (als Methylester) von <i>Haliclona</i> sp. 1 (Klasse Demospongiae, Unterklasse Ceractinomorpha, Ordnung Haploclerida).	24
Abbildung 5.2 Allgemeine Struktur einer <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -9-'long chain fatty acid' (LCFA $\Delta^{5,9}$; n>12)	24
Abbildung 5.3 Biosynthese der Hauptmembransäuren in <i>Microciona prolifera</i> (HAHN <i>et al.</i> , 1988; DJERASSI and LAM, 1991).	25
Abbildung 5.4 Struktur und Fragmentierung von 2-(4-methoxycarbonyl-1-methylthiobutan-1-yl)-5-(1-ethylthioheptadecan-1-yl)tetrahydrothiophene. DMDS-Derivat des 26 $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuremethylesters aus <i>Haliclona urceolus</i> .	27
Abbildung 5.5 Struktur und Fragmentierung von N-Octacosan-5,9,21-trienoyl-pyrroldid aus <i>Thenea muricata</i> .	27
Abbildung 5.6 MS-Spektren (EI ⁺) endständig verzweigter, gesättigter CarbonsäureME (<i>i</i> -, <i>ai</i> und unverzweigte 15ME).	33
Abbildung 5.7 Allgemeine Struktur von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ aus Schwämmen (LCFA; n>12)	36
Abbildung 5.8 Gaschromatographische Analysen endständig verzweigter LCFA in <i>Spongosorites genitrix</i> mit EC/FI-Detektoren	37
Abbildung 5.9 Massenspektren der DMDS- und Pyrroldin-Derivate von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ aus <i>Phakellia ventilabrum</i> .	37
Abbildung 5.10 Massenspektren von 4,8,12-TrimethyltridecansäureME und 3,7,11,15-TetramethylhexadecansäureME.	43
Abbildung 5.11 1-O-alk-1-enyl-2-acyl-Glycerophospholipid (Plasmalogen)	51
Abbildung 5.12 Schematischer Ablauf der Vinyletherspaltung (Plasmalogene) mit Hilfe von TMCS/MeOH über Aldehyde zu Dimethylacetalen.	52
Abbildung 5.13 Grundgerüst eines 'konventionellen' Sterols (Ergosterol; Ergost-5en-3 β -ol; 28 $\Delta^{5,24(28)}$)	55
Abbildung 5.14 Cyclisierung von Squalen (a) über Squalen-2,3-oxid (b) zum Lanosterol (c) in eukaryotischen Organismen (leicht verändert nach GOAD and AKIHISA, 1997).	56
Abbildung 5.15 Übersicht über die Steroidstrukturen aus Kaltwasserdemospongien (nur 'konventionelle' Steroide); Legende der Abkürzungen und Auftreten in den untersuchten Arten in Tab. XXX	57

	Seite
Abbildung 5.16 Mögliche Strukturen des C ₃₀ -Steroids in <i>Mycale lingua</i> (Strukturen nach KOKKE <i>et al.</i> , 1979).	60
Abbildung 5.17 a) Totalionenchromatogramm (TIC) der Sterole in <i>Axinella infundibuliformis</i> . b) Massenspektrum und Struktur von 19-Norcholestan-3 β -ol; Abk. s. Tab. XXX	61
Abbildung 5.18 Massenspektrometrische Fragmentierung des dominanten Sterols (Petrosterol) in <i>Petrosia crassa</i>	62
Abbildung 5.19 Charakteristische massenspektrometrische Fragmente von Cyclopropensterolen (Calysterol, 23 <i>H</i> -Isocalysterol, 24 <i>H</i> -Isocalysterol), die möglicherweise in <i>Haliclona</i> sp. 1 enthalten sind (leicht verändert nach DOSS and DJERASSI, 1988 und GOAD and AKIHISA, 1997)	63
Abbildung 5.20 Chromatogramm (FID) der Steroidfraktion von <i>Sympagella</i> nov. sp. (A = ...-5-en-3 β -ol, B = 5 α (H)-...-3 β -ol, C = 5 α (H)-...-3-on)	64
Abbildung 5.21 Biosynthese des 19-Norstanol Grundgerüsts in <i>Axinella polypoides</i> am Beispiel des Eduktes Cholesterol (Cholest-5-en-3 β -ol; DE ROSA <i>et al.</i> , 1975)	67
Abbildung 5.22 Struktur einer Isopreneinheit und ausgewählter Sesquiterpenoide	70
Abbildung 5.23 Struktur der Diterpene Ambliofuran, Hexahydroambliofuran und Spongian-16-on	72
Abbildung 5.24 Massenspektrometrische Fragmentierung von Spongian-16-on aus <i>Dendrilla cirsioides</i>	73
Abbildung 5.25 Hypothesen zur Phylogenie der drei rezenten Porifera-Klassen, basierend u.a. auf der chemischen Zusammensetzung der Spiculae und der Zellorganisation. (aus ADAMS <i>et al.</i> , 1999; A nach BÖGER, 1988; B nach REISWIG and MACKIE, 1983); rote Umrandung markiert die Hypothese, die durch lipidchemische Daten dieser Studie unterstützt wird.	83
Abbildung 6.1 Relative Lipidsäureverteilungen borealer und tropischer Arten der Unterklasse Tetractinomorpha ([1] CARBALLEIRA <i>et al.</i> (1987); [2] CARBALLEIRA <i>et al.</i> (1990); [3] CARBALLEIRA and SEPULVEDA (1992); [4] CARBALLEIRA and RODRIGUEZ (1991); [5] CARBALLEIRA <i>et al.</i> (1986); * = Daten dieser Studie	88
Abbildung 6.2 Kalottenmodell zweier 6-Br-(5 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i>)-24 Δ ^{5,9} (als ME) als Bestandteile einer Lipiddoppelschicht	91
Abbildung 6.3 TIC der Carbonsäuren (als Methylester) von <i>Phakellia ventilabrum</i> mit deren ¹³ C/ ¹² C-Verhältnissen ($\delta^{13}\text{C}$ vs. PDB [‰], Stabw. < 0.5 ‰, Mittelwert aus 3 Messungen)	93
Abbildung 6.4 Potenzielle Biosyntheserouten von LCFA Δ ^{5,9} in <i>Phakellia ventilabrum</i> (* = nicht nachgewiesen)	94
Abbildung 6.5 TIC der funktionalisierten Sesquiterpene aus <i>Phakellia ventilabrum</i> . Hervorgehoben sind zwei strukturgleiche Verbindungen mit Isonitril- bzw. Isothiocyanatgruppe. Zusätzlich sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (vs. PDB [‰]; n=3; Stabw. < 0.5 ‰) und der sich daraus ergebende wahrscheinliche Biosyntheseweg dargestellt.	95
Abbildung 6.6 Stereochemie von Phytansäure als Produkt der abiotischen Umsetzung von Chlorophyll bzw. Archaeol (leicht verändert nach KATES <i>et al.</i> , 1967; ANDERSON <i>et al.</i> , 1977)	97
Abbildung 6.7 Diastereomerenverteilung von PhytansäureME in <i>Phakellia ventilabrum</i> im Vergleich mit authentischen Standards bekannter <i>SRR/RRR</i> -Verteilung; a = PhyME aus <i>P. ventilabrum</i> + PhyME-Standard; b = PhyME-Standard; c = PhyME aus <i>Archaeum Methanosarcina barkeri</i> (Degradationsprodukt aus dem isoprenoidalen Archaeol)	99
Abbildung 6.8 Massenspektren (EI) von ¹³ C-markiertem und -unmarkiertem Archaeol (gemessen als BSTFA-Derivate)	100

Tabellen

Tabelle 4.1 Untersuchte Demospongiae des Mittelnorwegischen Schelfs (Taxonomische Klassifizierung durch F. Hoffmann, J. Reitner (Universität Göttingen) und R.W.M. van Soest (Amsterdam).	18
Tabelle 4.2 Untersuchte Hexactinellida mit Angabe zur Wassertiefe (Taxa bestimmt durch S.A. Pomponi und J. Reed (HBOI, Ft. Pierce Florida), F. Hoffmann und J. Reitner (Universität Göttingen) und S. Gatti (AWI, Bremerhaven). Locations: ¹ Punta Mangle (Galapagos), ² Punta Vicente (Galapagos), ³	20

	Seite
Golf von Chirqui (Panama), ⁴ Kapp Norvegia (Östliche Weddellsee), ⁵ Isla Bartholome (Galapagos), ⁶ Santa Cruz Island (Galapagos), ⁷ Isla Marchena (Galapagos), ⁸ Sula-Rücken (Norwegen), ⁹ Plana Cay (Bahamas), ¹⁰ Rocas Gordon (Galapagos), ¹¹ Lucea (Jamaika), ¹² Teneriffa (Canarische Inseln), ¹³ Charleston Lumps (Süd Carolina), ¹⁴ Turks & Caicos Islands (Karibik), ¹⁵ Wolf Island (Galapagos), ¹⁶ Negril (Jamaika), ¹⁷ Long Island (Bahamas), ¹⁸ Negril (Jamaika), ¹⁹ Hierro (Canarische Inseln)	
Tabelle 5.1 Vorkommen von $\Delta^{5,9}$ -Lipidsäuren in borealen Demospongien. *beinhaltet auch $23\Delta^{5,9}$ Carbonsäuren, ' % LCFA der Gesamtfettsäurefraktion (quantifiziert durch die Ionenspur m/z 74+81). ● = hochkonzentriert, ○ = gering konzentriert	28
Tabelle 5.2 Vorkommen von LCFA $\Delta^{5,9}$ in Vertretern der Hexactinellida; ' % LCFA der Gesamtlipide (Sterole und Fettsäuren; quantifiziert durch den TIC); ● = hochkonzentriert, ○ = gering konzentriert	29
Tabelle 5.3 Vorkommen verzweigter Fettsäuren in Kaltwasserdemospongien (● = vorhanden, ○ = untergeordnet enthalten).	34
Tabelle 5.4 Vorkommen von 6-Br-LCFA $\Delta^{5,9}$ in den untersuchten Kaltwasserdemospongien, (● = vorhanden, ○ = untergeordnet enthalten)	38
Tabelle 5.5 Inventar der estergebundenen Fettsäuren ausgewählter Kaltwasservertreter der Halichondrida, die bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ enthalten	39
Tabelle 5.6 Verteilung estergebundener TMTD (4,8,12-Trimethyltridecansäure) und Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) in Kaltwasserdemospongiae und Hexactinellida.	44
Tabelle 5.7 Dimethylacetale (aus Plasmalogenen) in Kaltwasserdemospongien (fett=sehr hohe Gehalte)	53
Tabelle 5.8 Vorkommen von Sterolen in den Demospongien des Norwegenschelfs; Abk. der Strukturen siehe Abb. XXX	59
Tabelle 5.9 Relative Verteilung der Sterole (ausschl. 19-Norsterole) in <i>Axinella infundibuliformis</i>	61
Tabelle 5.10 Relative Verteilung der Sterole in <i>Petrosia crassa</i> ; Tr=Trace (Spur)	62
Tabelle 5.11 Relative Konzentrationen der Sterole in den Geodiidae <i>Geodia barretti</i> , <i>G. macandrewii</i> und <i>Isops phlegraei</i> ; in Klammern Daten aus HOUGAARD <i>et al.</i> , 1991)	65
Tabelle 5.12 Zusammenfassung charakteristischer Lipidmerkmale von Kaltwasserdemospongien und Hexactinellida. Taxonomische Einteilung siehe Tab. XXX; Markierung = enthalten; gefüllt = hohe Konzentration (Spurenmengen sind nicht aufgeführt); T = 4,8,12-Trimethyltridecansäure, P = 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure); NS = Naturstoffe (Sekundärmetabolite); grau unterlegt = nicht analysiert	76
Tabelle 6.1 R_{LCFA} [(ai-LCFA $\Delta^{5,9}$ + MCBLCFA $\Delta^{5,9}$ + LCFA $\Delta^{5,9,x}$)/'konventionelle' LCFA $\Delta^{5,9}$] borealer und tropischer Tetractinomorpha als Indikator für die Kaltwasseradaptation; Lokalitäten siehe Tab. XXX (* = boreale Arten; diese Studie)	89
Tabelle 6.2 Gehalt an bromierten und nicht-bromierten $\Delta^{5,9}$ -LCFA in Vertretern der Ordnung Halichondrida borealer (* = diese Studie) und gemäßigter Gewässer (Angaben in Gewichts.% der Gesamtlipidsäuren; ¹ LAM <i>et al.</i> (1989); ² CHRISTIE <i>et al.</i> (1994); ³ DUQUE <i>et al.</i> (1993); ⁴ CARBALLEIRA <i>et al.</i> (1987); ⁵ CARBALLEIRA and EMILIANO (1993); ⁶ BARNATHAN <i>et al.</i> (1996); ⁷ AYANOGLU <i>et al.</i> (1983)	90
Tabelle 6.3 $\delta^{13}C$ -Werte der estergebundenen Phytansäure und zweier Vergleichslipidsäuren aus <i>P. ventilabrum</i> im Verlaufe des Inkubationsversuches mit ¹³ C-markiertem Archaeol (Stabw. $\leq \pm 0.5$); alle Komponenten wurden nach der Transveresterung als Methyl ester analysiert [$\delta^{13}C$ in ‰ vs. PDB].	101

Anhang B: Methodik

Übersicht (Analyseschema)

Im Vordergrund der gewählten Extraktionsmethode stand eine schnelle Handhabung, die Möglichkeit sehr geringe Probenmenge einzusetzen (~2 g Nasseinwaage) und eine hohe Reproduzierbarkeit und Effizienz, um die Zielkomponenten (Kohlenwasserstoffe, estergebundene Fettsäuren, Steroide und niedermolekulare, säureresistente Sekundärstoffe) aus rezenten Organismen analysieren zu können. Als geeignet, die meisten Fragestellungen dieser Arbeit nach den oben genannten Kriterien zu behandeln, erwies sich das Verfahren der kombinierten Extraktion und Fettsäure-Transveresterung mit Hilfe von Trimethylchlorsilan/Methanol

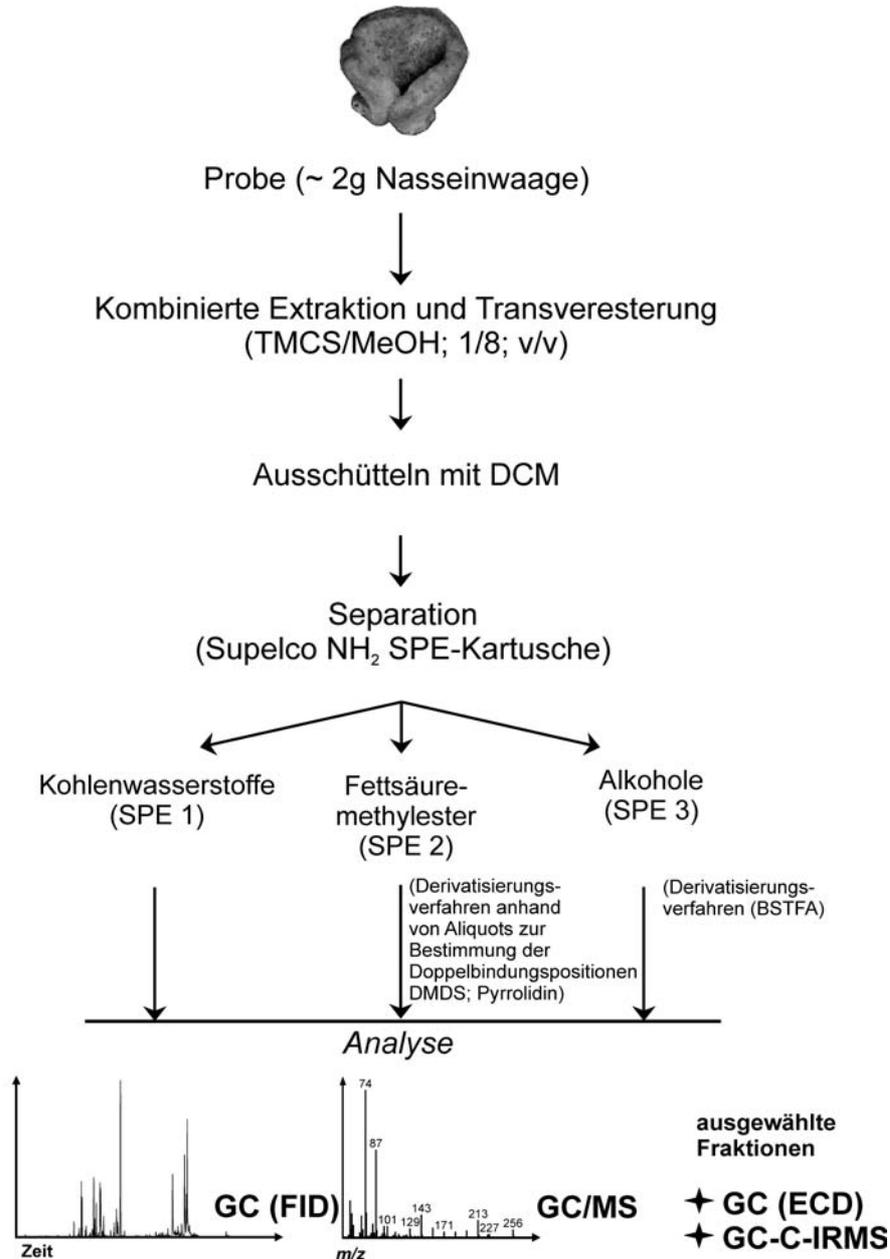


Abbildung B.1: Routinemäßig durchgeführte Probenaufbereitung

(TMCS/MeOH). Ein Vergleich der Effizienz herkömmlicher Extraktions- und Transveresterungsverfahren mit der verwendeten Methode zeigte die hervorragende Eignung von TMCS/MeOH zur Bearbeitung der Fragestellungen. Einzig nachteilig bei diesem Verfahren ist die Zerstörung säurelabiler Komponenten, zu denen einige Sekundärmetaboliten zählen. Zur Gewinnung auch dieser Komponenten wurde ggf. eine herkömmliche Extraktion und nachfolgend eine flüssigchromatographischen Auftrennung (SC, DC) durchgeführt.

Der in dieser Arbeit vorliegende Vergleich des Lipidinventars verschiedener Schwammarten erfordert eine detaillierte Strukturbeschreibung von Fettsäuren und Sterolen. Als hauptsächliches Verfahren wurde die gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie eingesetzt. Diesbezüglich wurden zusätzlich zur Analyse der Komponenten unterschiedliche Derivatisierungen eingesetzt, um z.B. die Doppelbindungspositionen in Lipidsäuren anhand charakteristischer Fragmentierungsschemata bestimmen zu können.

Zusammenfassend stellt das Schema in Abbildung B.1 den routinemäßigen Probenfluss dar. Die teilweise ebenfalls durchgeführte Extraktion ohne Derivatisierung ist in die Abbildung nicht integriert.

I Laborverfahren

II Kombinierte Extraktion und Fettsäure-Transveresterung

Ziel dieser Methode ist es, freie Kohlenwasserstoffe, freie Sterole und säureresistente Sekundärstoffe zu extrahieren und gleichzeitig gebundene Lipidsäuren zu Methylestern umzusetzen. Hierzu werden 1–2 g nasse oder 100–200 mg von der gefriergetrockneten Probe in ein 4 ml Schraubdeckelgläschen mit Tefloninlet eingewogen. Nachfolgend werden 2 ml TMCS/MeOH im Verhältnis 8/1 (v/v) hinzugegeben, die Probe zugeschraubt und auf 80°C für 1h erhitzt. Nach dem Abkühlen werden dem Extrakt etwa 1 ml *n*-Hexan und 1 ml bidestilliertes H₂O hinzugefügt, nachfolgend ins Ultraschallbad gestellt (~10Min.) und die *n*-Hexan Phase abpipettiert. Dieser Schritt wird etwa 3–4 mal bis zur Farblosigkeit wiederholt. Der dadurch gewonnene Extrakt wird unter einem leichten N₂-Strom eingetrocknet und zur Reinigung mit etwa 10 Gelbettvolumina (GV) Dichlormethan (DCM) über eine kleine SiO₂-Säule gespült.

Transveresterung und Extraktion mit Trimethylchlorsilan (TMCS) – Vergleich der Effizienz mit herkömmlichen Transveresterungsmethoden (BF₃ und methanolische HCl)

Um Fettsäuren, die als Ester phospholipidgebunden vorliegen, unter den gegebenen analytischen Voraussetzungen untersuchen zu können, muss eine Transveresterung zu Methylestern durchgeführt werden. Diesbezüglich werden unterschiedliche Methoden verwandt, die im Arbeitsaufwand und der Effizienz variieren. Verbreitet ist ein sauer hydrolytischer Aufschluss, der entweder mit Hilfe von 1N Chlorwasserstoff in Methanol (CARREAU and DUBACQ, 1978; AYANOGLU *et al.*, 1982; CARBALLEIRA and MALDONADO, 1988) oder mit BF₃ in Methanol (GARSON *et al.*, 1994) durchgeführt wird. Eine weitere Methode zur Umesterung ist der Einsatz von TMCS/MeOH. Diese oben beschriebene einfache Methode wurde bezüglich ihrer Umesterungs- und Extraktionseffizienz und ihrer Selektivität gegenüber spezifischen Fettsäuren (bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$) im Schwamm *P. ventilabrum* getestet (für alle Verfahren wurden 2.2 g Nasseinwaage Schwamm verwendet). Für diese Tests wurde der Schwamm *P.*

Fettsäure	BF ₃ /MeOH (10%)		HCl (1N) in MeOH		TMCS/MeOH (12.5%)	
	µg g ⁻¹ Nassgew.	%	µg g ⁻¹ Nassgew.	%	µg g ⁻¹ Nassgew.	%
14	5.8	1.4	2	1.4	5.2	1.5
16	23	5.6	9.2	6.3	22.1	6.5
Phytansäure	30.7	7.2	8.8	6.1	25.9	7.6
24Δ ^{5,9}	39.3	9.2	13.8	9.5	32.3	9.5
24Δ ¹⁷	36.7	8.6	10.4	7.2	27.2	8
25Δ ^{5,9}	22	5.1	4.7	3.2	14.1	4.2
26Δ ^{5,9}	11.4	2.7	2.5	1.7	13.2	3.9
6-Br-24Δ ^{5,9}	19.5	4.6	6.7	4.6	19.8	5.8
6-Br-25Δ ^{5,9}	64.9	15.1	24	16.6	50.2	14.8
6-Br-26Δ ^{5,9}	173.9	40.6	62.9	43.4	129.4	38.1
Gesamtausbeute	428.21	100.1	145	100	339.4	99.9
Isothiocyanat₁	22.7	-	11.0	-	31.3	-

Tabelle B.1 Dargestellt sind die relativen Verhältnisse und Absolutmengen (gegenüber Nassgewicht Schwamm) ausgewählter Fettsäuren (als ME) und eines beispielhaft ausgewählten Isothiocyanatsesquiterpenoids in *P. ventilabrum*

ventilabrum ausgewählt, da dieser neben konventionellen und bromierten LCFA eine Reihe von Naturstoffen enthält, z.B. stickstoffhaltige Sesquiterpenoide.

Tabelle B.1 zeigt, dass alle drei Methoden in der Lage sind, die in *P. ventilabrum* enthaltenen FA in ähnlichen Relationen zu Methylestern umzusetzen. Für alle drei Verfahren gilt zudem, dass bromierte LCFA Δ^{5,9} relativ zu korrespondierenden unsubstituierten LCFA Δ^{5,9} nicht diskriminiert werden. Dies wurde in einer anderen Untersuchung, bei der BF₃/MeOH und HCl/MeOH getestet wurden, für die Umesterungsmethode mit BF₃/MeOH festgestellt (GARSON *et al.*, 1994). Entgegen der relativen Übereinstimmung des FAME-Gesamtinventars variieren die Absolutausbeuten erheblich. So ist die Ausbeute bei HCl/MeOH am geringsten und für BF₃/MeOH am höchsten (~3x). Die Umesterung und Extraktion mit TMCS/MeOH erreichte eine Ausbeute von etwa 80% gegenüber BF₃/MeOH, ergab allerdings eine deutlich höhere Extraktionseffizienz des ausgewählten Isothiocyanatsesquiterpenoids, die etwa 30% über BF₃/MeOH und 60% über HCl/MeOH lag.

Insgesamt verdeutlicht der Vergleich die Eignung von TMCS/MeOH zur Bearbeitung der in dieser Arbeit relevanten Fragestellungen, die eine effiziente Kombination von Extraktion und einhergehender Transveresterung verlangen.

I.II Flüssigchromatographische Auftrennung (SPE)

Der durch TMCS/MeOH-Umesterung und Extraktion erhaltene Gesamtextrakt wird nachfolgend eingengt und in wenige Tropfen *n*-Hexan aufgenommen. Dieses Komponentengemisch wird auf eine SupelcleanTM LC-NH₂ SPE-Kartusche (3 ml) gegeben und in drei Fraktionen unterteilt. Die erste Fraktion beinhaltet zyklische und azyklische Kohlenwasserstoffe und wird mit etwa 1 ml *n*-Hexan über die Kartusche gespült (SPE 1). Die zweite Fraktion wird mit 4 ml eines Gemisches *n*-Hexan/DCM (3/1; v/v) gewonnen und enthält vornehmlich FAME (SPE 2). Hauptkomponenten der dritten Fraktion (5 ml DCM/Aceton; 9/1; v/v) sind Steroidalkohole (SPE 3). Neben den beschriebenen Zielkomponenten werden durch dieses Verfahren, je nach Funktionalität und Molekülgröße, ebenfalls enthaltene Sekundärstoffe separiert.

Alle gewonnenen Fraktionen werden mit einem leichten N₂-Strom bis zur Trockene eingengt, in *n*-Hexan aufgenommen und der quantitativen und qualitativen Analyse zugeführt (GC, GC-MS).

Hauptvorteil der verwendeten Kartuschen ist deren hohe Trenneigenschaft und der daraus resultierende extrem geringe Lösungsmittelverbrauch.

I.III Derivatisierungen zur Strukturanalyse von Lipidsäuren und Alkoholen

Die Strukturuntersuchung von Verbindungen mittels GC/MS erfordert, neben einer guten Chromatographie und damit Verhinderung von Koelutionen auf der gaschromatographischen Säule, eine möglichst eindeutige Fragmentierung bei der Ionisierung. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden unterschiedliche Derivatisierungen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind.

I.IIIa Bestimmung von Doppelbindungspositionen mit Hilfe von Dimethyldisulfid (DMDS)

Die Bestimmung der Position von Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren mit Hilfe von GC/MS ist schwierig. Dies hängt einerseits mit Koelutionen von beispielsweise einfach ungesättigten azyklischen Fettsäuren gleicher Kettenlänge und andererseits mit ähnlichen Fragmentierungsmustern zusammen, die eine Identifizierung der Doppelbindungspositionen verhindern. Zusätzlich erschweren McLafferty-Umlagerungen die Charakterisierung von FAME bei der 'electron impact'-Massenspektrometrie. Eine Methode, die die Identifizierung ermöglicht, ist die Addition von DMDS an die Doppelbindung (BUSER *et al.*, 1983). Entsprechende Addukte ergeben für jede Doppelbindungsposition spezifische Fragmentierungen (s. Anhang D). Dieses Verfahren eignet sich vornehmlich zur Analyse von einfach ungesättigten Fettsäuren, da in der Regel bei mehreren Doppelbindungen eine Molekülgrößen- und Polaritätszunahme entsteht, die eine Kapillarsäulenchromatographie mit den in dieser Arbeit eingesetzten GC-Säulen unmöglich macht. Ausnahmen sind zweifach ungesättigte FAME, deren Doppelbindungen maximal drei Methylgruppen auseinanderliegen (z.B. bei LCFA $\Delta^{5,9}$). Dieser Fall führt, zusätzlich zur Addition zweier Methylsulfide, zu einem Ringschluss und der Bildung eines Thioethers mit charakteristischer Fragmentierung (s. Anhang D; VINCENTI *et al.*, 1987). Dagegen reagieren an Position 6 bromierte LCFA $\Delta^{5,9}$ nicht zu einem Thioether, da offensichtlich das Brom eine Addition an die benachbarte Doppelbindung sterisch verhindert. So zeigen die daraus resultierenden Fragmentierungsschemata, dass nur an der Δ^9 -Doppelbindung zwei Methylsulfide angelagert werden, die Δ^5 -Bindung jedoch unangetastet bleibt.

Die nachfolgend beschriebene Derivatisierung von FAME mit DMDS wurde leicht modifiziert und basiert auf den Methoden von CARLSON *et al.* (1989) und GATELLIER *et al.* (1993).

Etwa 100–200 μl Probe (in *n*-Hexan) werden in einem 4 ml-Schraubdeckelgläschen (mit Tefloninlet) mit 200 μl DMDS und 20–40 μl Iodlösung (60 mg Iod in 1 ml Diethylether) versetzt und das Reaktionsgemisch zugeschraubt bei 50°C für 48h erhitzt. Nachfolgend wird die Probe mit 1 ml *n*-Hexan und 200 μl wässriger Natriumthiosulfatlösung (5% in bidest-H₂O) ausgeschüttelt. Danach wird die Hexanphase abpipettiert und beide Schritte 3 mal wiederholt. Abschließend wird die Hexanphase mit 10 GV DCM über eine kleine SiO₂-Säule eluiert und mit GC und GC/MS analysiert.

I.IIIb Doppelbindungsbestimmungen von mehrfach ungesättigten LCFA mit Hilfe von Pyrrolidin

Das Verfahren der DMDS-Addition eignet sich hervorragend zur massenspektrometrischen Strukturbeschreibung von einfach und zweifach ungesättigten FAME, wenn zwischen den Doppelbindungen nicht mehr als drei Methylengruppen liegen. Bei FAME mit mehr als zwei Doppelbindungen und zweifach ungesättigten FAME, deren Doppelbindungen weiter als o-bengenannt auseinander liegen, lässt sich DMDS nicht zur Strukturaufklärung nutzen.

In diesen Fällen lässt sich mit Hilfe einer Pyrrolidin-Derivatisierung die McLafferty-Umlagerung verhindern, und es ist möglich anhand charakteristischer Fragmentierungen Aussagen über die Doppelbindungspositionen zu treffen (s. Anhang D; WALKUP *et al.*, 1981).

Zur Durchführung der Methode, die nach WALKUP *et al.* (1981) leicht abgewandelt wurde, wird die Probe in ein 4 ml-Schraubdeckelgläschen gegeben, getrocknet und mit etwa 200 µl Pyrrolidin/Essigsäure (10/1; v/v) versetzt. Nachfolgend wird das zugeschraubte Gläschen für 1h auf 100°C erhitzt. Im nächsten Schritt werden der Probe etwa 1 ml Diethylether und HCl (5%) hinzugegeben, die Etherphase abpipettiert und dieser Schritt 3 mal wiederholt. Die Diethylether-Phase wird nun mehrfach in einem Scheidetrichter mit bidestilliertem Wasser ausgeschüttelt, vereinigt, unter einem leichten N₂-Strom getrocknet, die Komponenten in etwa 5 ml *n*-Hexan/Diethylether (1/4; v/v) gelöst und mit diesem Lösungsmittel über eine kleine SiO₂-Säule gespült. Die so gewonnenen Pyrrolidide werden nun per GC/MS analysiert.

I.IIIc Strukturcharakterisierung von Sterolen

Neben der Strukturuntersuchung von FAME bildete die Charakterisierung von Sterolen einen Schwerpunkt dieser Arbeit. Ein Großteil der Sterole liegt frei in der Phospholipidmatrix rezenten Organismen vor und lässt sich mit organischen Lösungsmitteln extrahieren. Generell wurde deshalb die Alkoholfraktion mit Hilfe von Koinjektionen und der massenspektrometrischen Fragmentierung charakterisiert (Vergleich mit der eigenen und der MS-Spektrenbibliothek NIST). Koinjektionen wurden mit folgenden Standards durchgeführt (jeweilige Konzentration 20 mg L⁻¹): Cholesterol (Cholest-5en-3β-ol; 27Δ⁵); Cholestanol (5α(H)-Cholestan-3β-ol, 27Δ⁰), Sitosterin (Stigmast-5en-3β-ol; 29Δ⁵); 24-Methylcholesterol (Ergosta-5,24(28)dien-3β-ol; 28Δ^{5,24(28)}) und Stigmasterin (Stigmast-5,22dien-3β-ol; 29Δ^{5,22}). Die Identifizierung ‚unkonventioneller‘ Sterole erfolgte anhand massenspektrometrischer Charakteristika im Vergleich mit Daten aus der Literatur. In einigen Fällen wurden zusätzlich Derivatisierungen durchgeführt, um Informationen zur Funktionalität und ggf. aufgetretene Koelutionen auszuschließen. In diesen Fällen ist die Silylierung von Hydroxygruppen ein häufig angewendetes Verfahren, um einerseits die Polarität der Komponenten zu verringern und somit deren chromatographische Trennung zu verbessern, und um andererseits anhand einer spezifischen massenspektrometrischen Fragmentierung eine Strukturaufklärung zu erleichtern. Zusätzlich erlaubt die Silylierung durch die Massenzunahme Aussagen über die Anzahl von Hydroxylgruppen. Das zugeschraubte Gläschen wird mit 200 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) versetzt, bei 80°C für 1h in den Ofen gestellt, nachfolgend unter leichtem N₂-Strom getrocknet, in *n*-Hexan aufgenommen und per GC/MS analysiert.

II Analysetechnik

II.I Gaschromatographie (FID, ECD)

Die gaschromatographische Auftrennung der Komponenten wurde mit einem CARLO ERBA GC6000 der Vega Serie durchgeführt ('fused silica'-Kapillarsäule: J&W Scientific DB5-MS; 30 m; ID 0.32 mm; Filmdicke 0.25 µm; Trägergas: H₂). Als Detektoren wurden ein Flammenionisationsdetektor (FID) und ggf. ein 'electron capture'-Detektor (ECD) verwendet, der die Detektion von halogenierten Komponenten ermöglicht. Die Probenaufgabe erfolgte direkt auf die Säule ('on column'). Mit wenigen Ausnahmen wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 80°C(3min)–4°C/min–310°C(20min). Die Chromatogramme wurden mit der BRUKER-Software Chromstar aufgezeichnet und ausgewertet.

Die gaschromatographische Trennung der PhytansäureME wurde im Arbeitskreis Prof. Dr. W. A. König auf einer dort gefertigten Cyclodextrin-Säule (Phase: 2,6-ME-2,3-Pe-γ-CD (50%); Länge 25 m; ID 0.25 mm; Filmdicke 0.13 µm; Trägergas: H₂) durchgeführt und mit einem FID detektiert. Das eingesetzte Temperaturprogramm war wie folgt: 30°C(20min)–1°C/min–155°C(0min).

II.II Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) ermöglicht die Auftrennung von Komponentengemischen und eine nachfolgende massenspektrometrische Fragmentierung der erhaltenen Einzelkomponenten. Anhand des Massenspektrums dieser geladenen Fragmente lassen sich Aussagen zur Struktur und anhand des 'totalen Ionenstroms' (TIC; 'total ion current') zu den Konzentrationen der Verbindungen treffen.

Zur GC/MS-Analyse wurde ein HP6890-GC verwendet, das mit einem MICROMASS Quattro II Quadrupol-MS gekoppelt ist. Das Komponentengemisch wurde direkt ('on column') auf die GC-Kapillarsäule ('fused silica': J&W-Scientific DB5-MS; 30m; ID 0.32 mm; Filmdicke 0.25 µm; Trägergas: He) injiziert, aufgetrennt und über ein mit 300°C betriebenes Interface in das MS überführt (Ionisierungsart: 'electron impact'). Routinemäßig wurde folgendes GC-Programm verwendet: 80°C(3min)–4°C/min–310°C(20min). Die Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte mit der MICROMASS-Software MassLynx (Vs. 3.4).

II.III Gekoppelte Gaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS)

Die Verhältnisse stabiler Kohlenstoffisotope (¹³C/¹²C) organischer Einzelkomponenten wurden mit einem gekoppelten GC-C-IRMS der Firma FINNIGAN analysiert (HP6890-GC gekoppelt mit einem FINNIGAN DeltaPlusXL). Die Injektion der Verbindungen erfolgte mit Hilfe eines CTC A200S-Autosamplers in ein Kaltaufgabesystem der Firma GERSTEL (KAS4, 48°C(0min)–12°C/sec–310°C(10min); Injektionsart: 'splitless'). Nachfolgend wurden die Proben auf einer Kapillarsäule separiert ('fused silica'; HP5-Trace; 30m; 0.25 mm ID; Filmdicke 0.25 µm; Trägergas: He; typisches GC-Programm: 80°C(3min)–4°C/min–310°C(20min)) und als Einzelkomponenten in einem CuO/Ni/Pt-Ofen (940°C) zu CO₂ und H₂O oxidiert. Nachfolgend werden die Gase durch eine Nafion[®]-Membran geleitet und so vom Wasser befreit, und über einen 'open split' ins MS geleitet. Dort wird das CO₂ ionisiert ('electron impact'), im Sektorfeld ¹³CO₂ von ¹²CO₂ getrennt und detektiert. Die Aufzeichnung

und Auswertung erfolgte mit der FINNIGAN-Software ISODAT (Vs. 7.4). Die Angabe der Isotopendaten wird in der Delta-Notation vs. PDB für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ vorgenommen (Stabw. für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \pm 0.5$). Isotopendaten für FAME wurden bezüglich der Derivatisierung korrigiert. Die generelle Standardabweichung (Stabw.) errechnet sich aus den Mittelwerten der Wiederholungsmessungen (≥ 3). Die Abweichungen resultieren aus dem analytischen Fehler des Massenspektrometers und der gaschromatographischen Auftrennung.

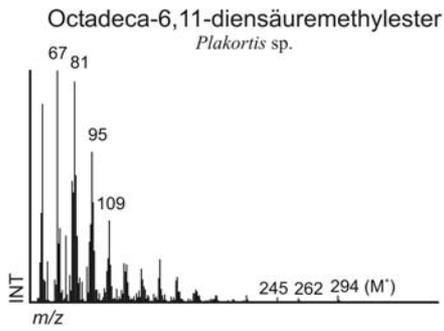
III Sonstiges

III.I Verabreichung von ^{13}C -markiertem Archaeol (*sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol) in *Phakellia ventilabrum*

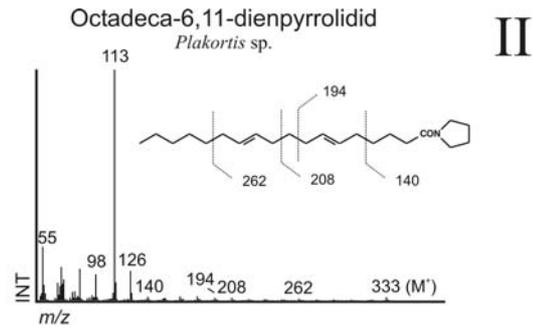
Zu Inkorporierungsversuchen in Schwämmen existieren nur wenige Daten (HAHN *et al.*, 1988; LAM *et al.*, 1991; DUMDEI *et al.*, 1997). Entscheidend bei der Durchführung entsprechender Versuche ist die effiziente Zufuhr der markierten Substanzen. Die oben genannten Autoren verwendeten hierfür die Salze der Tracer-Substanzen und führten sie in einer großen Menge im Seewasser gelöst dem Schwamm zu. Entsprechende Versuchsansätze erfordern ein Vielfaches an markierten Komponenten, die für das im Rahmen dieser Studie durchgeführte Experiment nicht vorlagen. Deshalb wurde ein Verfahren gewählt, dass eine gezielte Verabreichung mit möglichst geringem Einsatz an markierter Substanz ermöglicht. Hierzu wurde eine Lösung von 200 mg L^{-1} Archaeol in Ethanol/sterilem Seewasser (1/4; v/v) hergestellt und $200 \mu\text{l}$ – in $10 \mu\text{l}$ Injektionseinheiten – in das Schwammgewebe gegeben. Vor dem Beginn des Versuches wurde der Schwamm zwei Tage in einem Aquarium gehältert, um ihn an die Nahrungsvoraussetzungen und Strömungsverhältnisse zu gewöhnen. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde der Schwamm stetig mit Fjord-Umgebungswasser aus 40 m Tiefe versorgt. Zudem wurde der Schwamm in einem verdunkelten Aquarium gehalten, um vermehrtes Phytoplanktonwachstum und so hohe Chlorophylleinträge zu verhindern. Um den Fluss des markierten Phytylrests aus dem Archaeol in die Esterfraktionen des Schwammes überprüfen zu können, wurden zu drei Zeitpunkten Gewebeprobe entnommen (0, 7 und 14 Tage).

Die verwendeten Schwämme wurden nach Beendigung der Versuche eingefroren und mit DCM/MeOH (1/1, v/v) 3 mal extrahiert. Die Extrakte wurden dann vereinigt. Zu Beginn ist eine Abtrennung freier Säuren aus dem Extrakt mittels Dünnschichtchromatographie (DCM) vorgenommen worden, um mögliche frei vorliegende, abiotische und biotische Degradationsprodukte des zugeführten Archaeols zu entfernen. Das Elutionsverhalten freier Säuren und von Phospholipiden wurde mit Hilfe von Standardsubstanzen überprüft ($\text{C}_{16}\text{-OOH} = \text{Rf } 0.3$; *sn*-2,3-di-*O*-Hexadecylglycerophosphatidylethanolamin = $\text{Rf } 0.05$). Alle Komponenten unterhalb von $\text{Rf } 0.1$ wurden mit Hilfe von DCM/MeOH (1/1; v/v) von der Dünnschichtplatte extrahiert. Die dabei entstandene Fraktion (inkl. der Phospho- und Glycolipide) wurde mit TMCS transverestert (s.o) und die dadurch erhaltenen FAME-Fraktionen mit GC-MS und mit GC-C-IRMS analysiert.

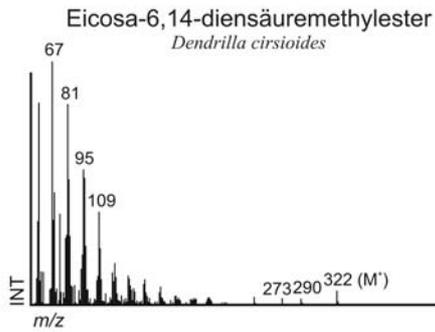
Anhang D Massenspektren



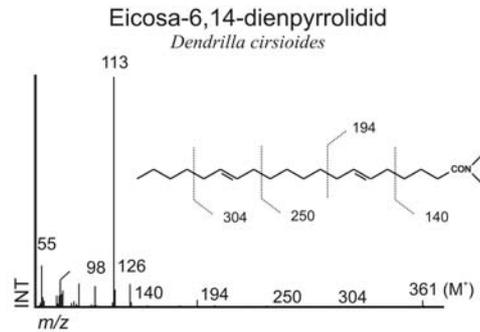
I



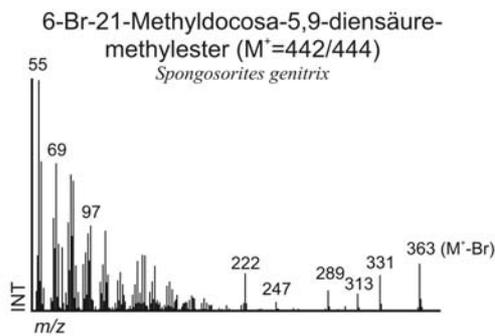
II



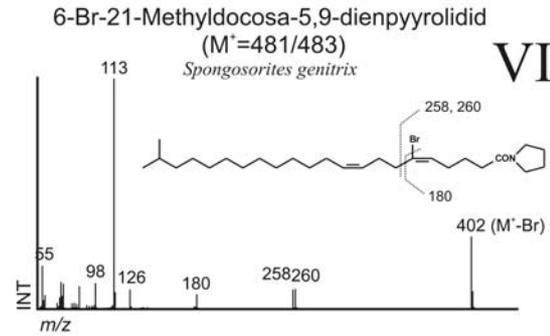
III



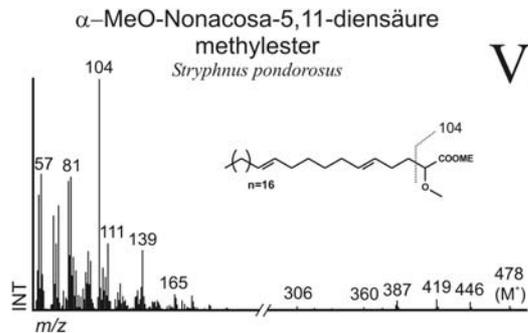
IV



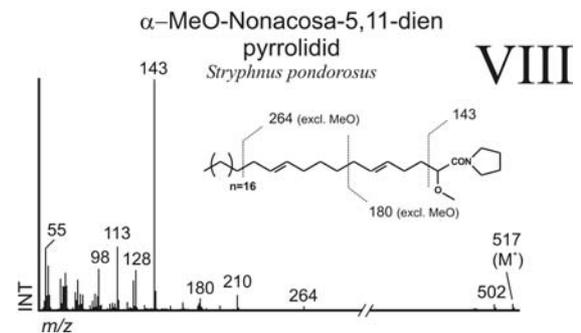
V



VI

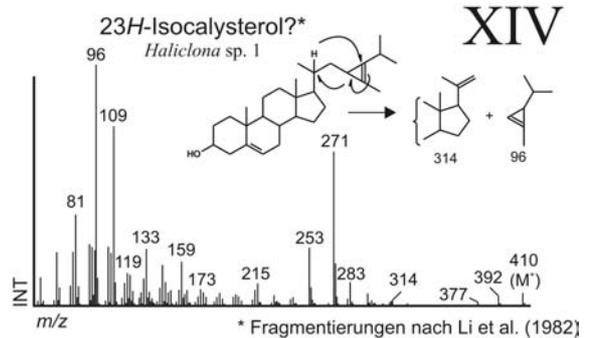
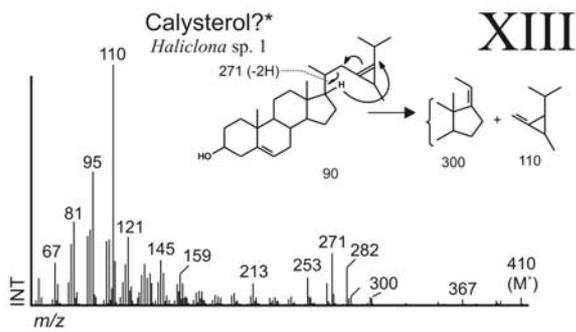
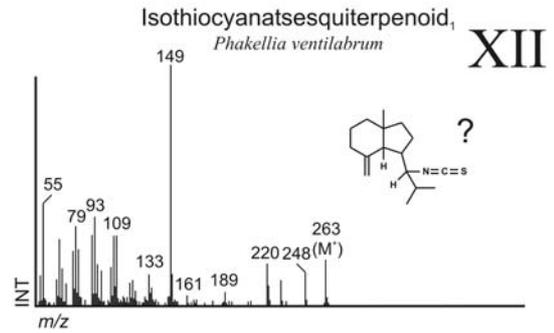
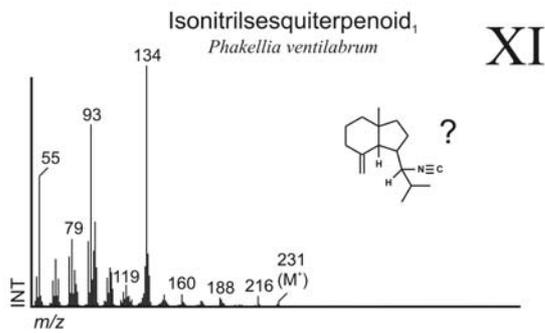
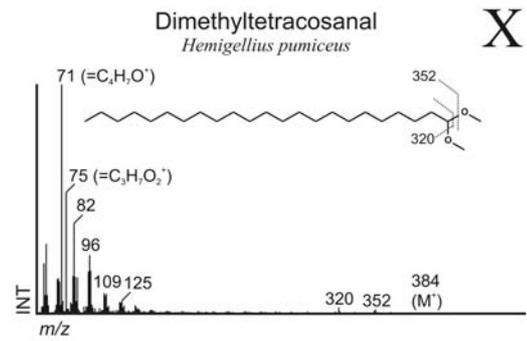
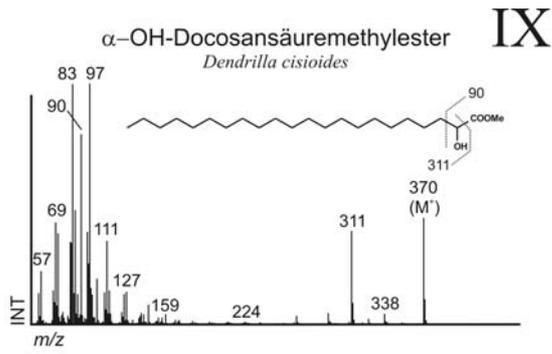


VII



VIII

Anhang D Massenspektren



Anhang E

Publikationen mit direktem Bezug zur vorliegenden Arbeit

- E.1 Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., and Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancestral metazoans. *Naturwissenschaften* **89**, 60-66.
- E.2 Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Pomponi S., and Michaelis W. (2002) Steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 415-419.
- E.3 Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., and Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.
- E.4 Pape, T., Blumenberg, M., Thiel, V., and Michaelis, W. (2002) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Boll. Mus. Ist. biol. Univ. Genova* (submitted)

E.1 Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., and Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancestral metazoans. *Naturwissenschaften*. **89**, 60-66.

Volker Thiel · Martin Blumenberg · Jens Hefter
Thomas Pape · Shirley Pomponi · John Reed
Joachim Reitner · Gert Wörheide · Walter Michaelis

A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges

Received: 15 December 2000 / Accepted: 24 October 2001 / Published online: 10 January 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Hexactinellid sponges are often considered to be the most ancient metazoans. Lipid biomarkers from 23 species were studied for information on their phylogenetic properties, particularly their disputed relation to the two other sponge classes (Demospongiae, Calcarea). The most prominent lipid compounds in the Hexactinellida comprise C_{28} to C_{32} polyenoic fatty acids. Their structures parallel the unique patterns found in demosponge membrane fatty acids ('demospongiic acids') and strongly support a close phylogenetic association of the Demospongiae and the Hexactinellida. Both taxa also show unusual mid-chain methylated fatty acids (C_{15} – C_{25}) and irregular C_{25} - and C_{40} -isoprenoid hydrocarbons, tracers for specific eubacteria and Archaea, respectively. These biomarkers indicate a similar, highly conservative symbiont community, although some shift in the abundance of the associated microbiota was observed. The lack of these features in calcareous sponges further contradicts the still common view that Calcarea and Demospongiae are more closely related to each other than either is to the Hexactinellida.

V. Thiel (✉) · M. Blumenberg · T. Pape · W. Michaelis
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55, 20146 Hamburg,
Germany
e-mail: thiel@geowiss.uni-hamburg.de
Fax: +49-40-428386347

J. Hefter
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

S. Pomponi · J. Reed
Division of Biomedical Marine Research,
Harbor Branch Oceanographic Institution, 5600 US 1 North,
Fort Pierce, FL 34946, USA

J. Reitner
Göttinger Zentrum Geowissenschaften, Universität Göttingen,
Goldschmidtstrasse 3, 37077 Göttingen, Germany

G. Wörheide
Queensland Centre for Biodiversity, Queensland Museum,
P.O. Box 3300, South Brisbane, Qld 4101, Australia

Introduction

It is now well established that the Porifera (sponges) are true animals. Their basic mode of organization and their biochemical properties place them at the very base of the kingdom Metazoa. A characterization as ancestral organisms seems particularly valid for the 450–500 species of the class Hexactinellida (see Hooper 2000). These sponges are considered to be an early branch within the Porifera, characterized by 'hexactine' siliceous spicules and a unique mode of soft body organization. Much of their tissue consists of multinucleate cytoplasm ('choanosyncytium') comprising collared bodies, sharing a common nucleus and linked together by plasmic bridges (Reiswig 1979; Mackie and Singla 1983).

The general monophyly of the Porifera has been proposed, but their interclass relationships are still open to debate. Reiswig and Mackie (1983) assigned separate subphylum status for the Hexactinellida (*Symplasma*), based on their syncytial organization. Accordingly, the Calcarea (calcareous sponges) and the Demospongiae were grouped into the 'cell-bearing' subphylum *Cellularia* and, due to their common possession of a pinacoderm layer, *Pinacophora* (Reitner and Mehl 1996). Alternatively a close relationship between the Hexactinellida and the Demospongiae has been proposed, according to larval similarities and their homology in chemical spicule composition (Böger 1988).

During the last decade, molecular approaches have contributed significantly to understanding sponge phylogeny, although conflicting data have not resolved early metazoan evolution. Based on amino acid sequence data, Müller (1997) calculated that the Porifera, as the first metazoan phylum, diverged from a common ancestor 0.8 Ga (1 Ga = 10^9 years) ago, thus extending the fossil range of these animals by more than 0.2 Ga. Studies on the composition of insulin receptor polypeptides assigned an age of 1.4 Ga to the Hexactinellida, and 1.3 Ga and 1.1 Ga for the separation of the Demospongiae and the Calcarea (Schütze et al. 1999; Skorokhod et al. 1999). A study of the protein coding gene *Hsp70* (Borchiellini et al. 1998) indicated that Demospongiae form a clade with

the Calcarea, excluding the Hexactinellida. However, recent gene sequence analyses supported a common Demospongiae–Hexactinellida taxon, whereas the Calcarea display closer affinities with the Ctenophora (comb jellies) than to Demospongiae (Cavalier Smith et al. 1996; Van de Peer and De Wachter 1997; Collins 1998; Adams et al. 1999; see also Zrzavy et al. 1998).

To further investigate sponge taxonomy, we conducted a study on lipid biomarkers complementary to the classical morphological and molecular biological approaches. Demosponges possess unusual membrane lipids reflecting specific enzyme systems which control biosynthetic properties such as carbon chain elongation and the introduction of distinctive double bonds. In particular, many investigations revealed the presence of unique long-chain fatty acids (LCFA, >C₂₄) in demosponges, the so-called ‘demospongiac’ acids (see Litchfield et al. 1976; Hahn et al. 1988;

Garson et al. 1994, also see van Soest and Braekman 1999 for a review on sponge chemosystematics). These compounds provide excellent targets for chemotaxonomic analyses at the class level. However, previous lipid studies have largely focused on demosponges, and only a few studies on a limited number of species and chemical properties exist for the Hexactinellida (Bergquist et al. 1984; Lawson et al. 1984). Our study aimed to fill this gap with a comprehensive chemical view on hexactinellid lipids and their interrelationships with those of the Demospongiae and Calcarea.

Methods

Twenty-three Hexactinellida, six Calcarea, and eight Demospongiae were studied. For species, taxonomy and sampling locations see Table 1. For sample preparation details, see Table 2 and Fig. 1.

Table 1 Sample list, taxonomy, and sampling locations

Species/Taxonomy		Sample location	Depth (m)
Hexactinellida			
<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora	‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Punta Mangle, Galapagos 445
<i>Acanthascus</i> sp.		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Punta Vincente, Galapagos 440
Unknown sp. 1		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Gulf of Chirqui, Panama 490
<i>Rossella</i> sp. 1		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Rossella</i> sp. 2		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Rossella</i> sp. 3		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Isla Bartholome, Galapagos 440
Unknown sp. 2		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae (?)	Santa Cruz Island, Galapagos 320
<i>Sympagella nux</i>		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Isla Marchena, Galapagos 380
<i>Sympagella</i> nov. sp.		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae-(Strobiliplumicoma)	Sula-Ridge, Norway 285
<i>Euplectella</i> sp.		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Isla Marchena, Galapagos 580
Unknown sp. 3		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Plana Cay, Bahamas 860
Unknown sp. 4		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Rocas Gordon, Galapagos 430
Unknown sp. 5		‘Lyssakinosa’	Lucea, Jamaica 480
Unknown sp. 6		‘Lyssakinosa’	Tenerife, Canary Islands 335
<i>Farrea</i> (?) sp.		Hexactinosida – Farreidae	Charleston Lumps, South Carolina 215
<i>Ipheton panicea</i>		Hexactinosida – Euretidae	Turks & Caicos Islands, Caribbean 480
<i>Heterochone</i> sp.		Hexactinosida – Aphrocallistidae	Isla Marchena, Galapagos 475
Unknown sp. 7		Hexactinosida	Wolf Island, Galapagos 365
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidiscophora	Amphidiscosida – Hyalonematidae	Negril, Jamaica 375
<i>Hyalonema</i> sp. 2		Amphidiscosida – Hyalonematidae	Long Island, Bahamas 800
Unknown sp. 8		Amphidiscosida – Hyalonematidae (?)	Negril, Jamaica 825
Unknown sp. 9		(?)	Hierro, Canary Islands 675
Demospongiae			
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha	Astroforida – Geodiidae	Sula-Ridge, Norway 320
<i>Spirastrella</i> (<i>Acanthochaetetes</i>) <i>wellsi</i>		Hadromerida – Spirastrellidae	Osprey Reef, off Great Barrier Reef 10
<i>Haliclona</i> sp.	Ceractinomorpha	Haplosclerida – Chalinidae	Sula-Ridge, Norway 290
<i>Petrosia crassa</i>		Haplosclerida – Petrosiidae	Sula-Ridge, Norway 320
<i>Astrosclera willeyana</i>		Agelasida – Astroscleridae	Pearl Reef, Great Barrier Reef 15
<i>Agelas oroides</i>		Agelasida – Agelasidae	Banyuls sur Mer, France, Mediterranean Sea 20
<i>Phakellia ventilabrum</i>		Halichondrida – Axinellidae	Sula-Ridge, Norway 290
<i>Axinella infundibuliformis</i>		Halichondrida – Axinellidae	Sula-Ridge, Norway 320
Calcarea			
<i>Grantiopsis</i> sp.	Calcaronea	Leucosoleniida – Grantiidae	Wistari Reef, Great Barrier Reef 5
<i>Sycon</i> sp.		Leucosoleniida – Sycettidae	Northwest Island, Great Barrier Reef 15
<i>Leucaltis (clathria?)</i>	Calcinea	Clathrinida – Leucaltidae	Davies Reef, Great Barrier Reef 20
<i>Leucetta</i> sp.		Clathrinida – Leucettidae	Hook Island, Great Barrier Reef 5
<i>Pericharax heteroraphis</i>		Clathrinida – Leucettidae	Myrmidon Reef, Great Barrier Reef 15
<i>Levinella prolifera</i>		Clathrinida – Levinellidae	Wistari Reef, Great Barrier Reef 5

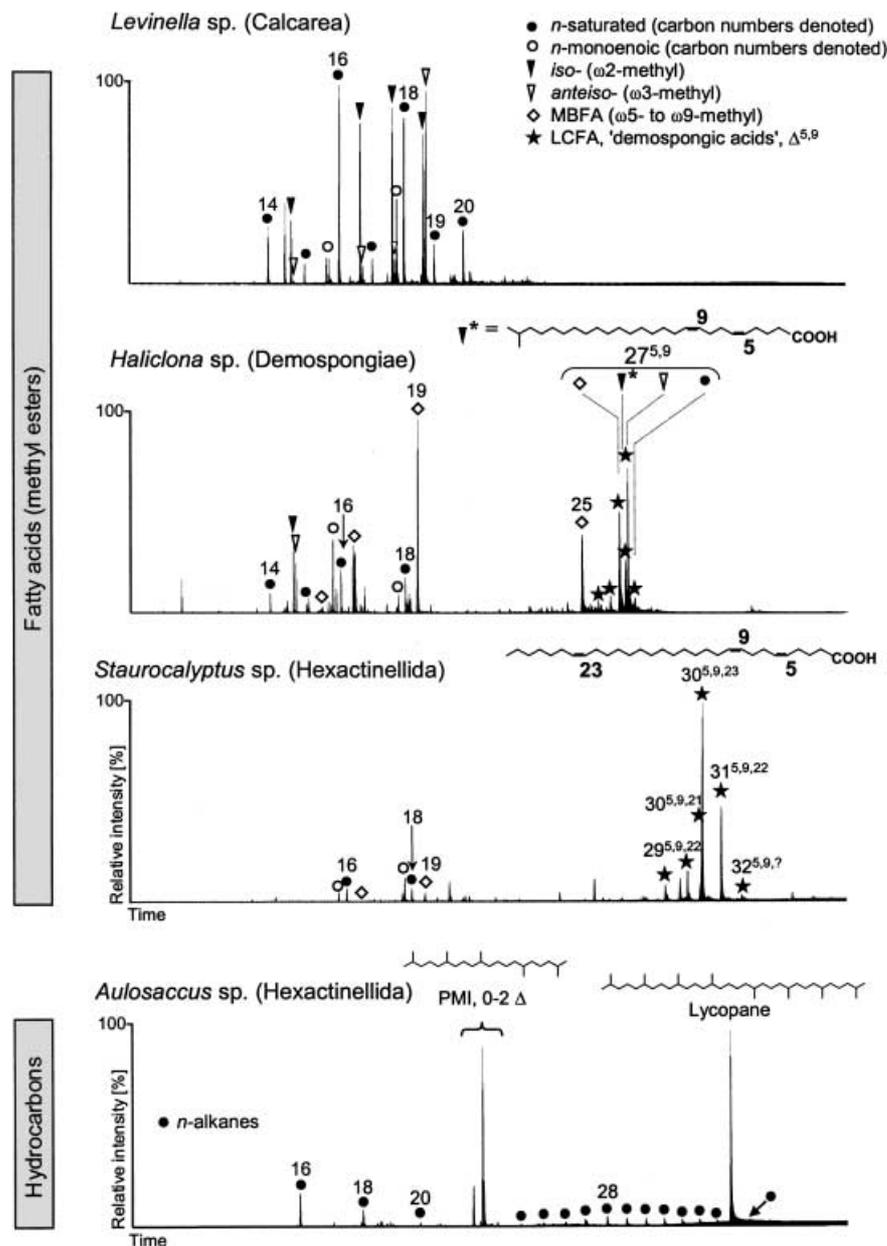
Table 2 Presence and relative abundances of C₂₆ to C₃₂ long-chain fatty acids (LCFA). *Sizes of dots* refer to the relative concentrations with respect to the total amounts of C₂₆ to C₃₂ LCFA (see *lowest row*). *Column A* Absolute concentrations (µg/g_{dry sponge}) of the summed C₃₀ LCFA. *Column B* Relative proportion of C₂₆ to C₃₂ LCFA (%) in the total amount of fatty acids and sterols. Δ includes isomeric mixtures of mid-chain methylated LCFA; □ tetraenoic LCFA (Δ^{5,9,23}); ◇ includes brominated LCFA; *n.a.* not analysed; *i iso* (ω2-methyl) and *anteiso* (ω3-methyl) branched LCFA. Fatty acid methyl esters were obtained by extraction/transesterification of ~200 mg dry sponge matter with trimethylchlorosi-

lane/methanol (1:8; v/v; 2 h, 70°C), re-extraction with *n*-hexane vs H₂O, and filtration of the *n*-hexane layer over silica gel with excess CH₂Cl₂/ethyl acetate (3:1; v/v). Fatty acid methyl esters were separated from the extract by elution over a 500 mg LC-NH₂ aminopropyl (Supelco) solid phase extraction cartridge (rinsing with 1 ml *n*-hexane; 4 ml *n*-hexane/CH₂Cl₂ (3:1; v/v)). The presence of linear vs methyl branched fatty acids was checked by comparison of the GC-retention times and mass spectra of the hydrogenated products with those of reference compounds and published data. Double bond positions were determined on *n*-acyl-pyrrolidide derivatives (Lankelma et al. 1983)

				C ₂₆		C ₂₇		C ₂₈			C ₂₉			C ₃₀			C ₃₁		C ₃₂																		
				Carbon-number (C _n) and double bond position (Δ notation)																																	
		A	B	?	17	19	5,9	5,9	5,9,1	17	19	5,9	5,9,23	5,9,27	17	20	5,9	5,9,22	5,9,27	5,9,21	5,9,23	5,9,25	5,9,27	5,9	5,9,21	5,9,22	5,9,?	?	5,9,23	5,9,?							
Hexactinellida																																					
<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora	1585	50																																		
<i>Acanthascus</i> sp.		878	52																																		
unknown sp. 1		<i>n.a.</i>	55																																		
<i>Rossella</i> sp. 1		<i>n.a.</i>	53																																		
<i>Rossella</i> sp. 2		<i>n.a.</i>	43																																		
<i>Rossella</i> sp. 3		<i>n.a.</i>	59																																		
<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsuk.</i>		1330	47																																		
unknown sp. 2		2420	47																																		
<i>Sympagella</i> <i>nux</i>		2475	46																																		
<i>Sympagella</i> nov. sp.		1111	32																																		
<i>Euplectella</i> sp.		<i>n.a.</i>	30																																		
unknown sp. 3		3787	52																																		
unknown sp. 4		1610	44																																		
unknown sp. 5		480	37																																		
unknown sp. 6		702	32																																		
<i>Farrea</i> (?) sp.		576	39																																		
<i>Ipheton</i> <i>panicea</i>		803	41																																		
<i>Heterochone</i> sp.		663	43																																		
unknown sp. 7		<i>n.a.</i>	40																																		
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidisco-phora	147	27																																		
<i>Hyalonema</i> sp. 2		<i>n.a.</i>	51																																		
unknown sp. 8		1343	26																																		
unknown sp. 9		2237	37																																		
Demospongiae																																					
<i>Geodia</i> <i>baretti</i>	Tetract.	<i>n.a.</i>	14																																		
<i>Spirastrella</i> <i>wellsi</i>		<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>																																		
<i>Haliclona</i> sp.	Ceractinomorpha	<i>n.a.</i>	19																																		
<i>Petrosia</i> <i>crassa</i>		<i>n.a.</i>	14																																		
<i>Astrosclera</i> <i>willeyana</i>		<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>																																		
<i>Agelas</i> <i>oroides</i>		<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>																																		
<i>Phakellia</i> <i>ventilabrum</i>		<i>n.a.</i>	17																																		
<i>Axinella</i> <i>infundibulif.</i>	<i>n.a.</i>	30																																			
Calcarea																																					
6 species (see Table 1)		<i>n.a.</i>	<1																																		
Long-chain unsaturated fatty acids absent																																					

● 5-15% ● 16-30% ● 31-45% ● 46-60% ● 61-100% of total LCFA

Fig. 1 *Top* Total ion currents (TIC) of fatty acids (methyl esters) typical for the Calcarea, Demospongiae, and Hexactinellida. Note the absence of long-chain fatty acids (LCFA) in the Calcarea. *Bottom* Hydrocarbons from *Aulosaccus* sp., with 2,6,10,15,19-pentamethyl-icosane (PMI) derivatives and lycopane as main compounds; a common pattern found for hexactinellids. Hydrocarbons were prepared from the CH₂Cl₂:methanol extract (1:1; v/v) by elution with two-column volumes of *n*-hexane over a silica gel 60 column. Biomarkers were examined by gas-chromatography mass spectrometry (GC-MS), using a Micro-mass Quattro II spectrometer (EI, 70 eV) interfaced to a HP6890 GC with a 30 m fused silica capillary column (DB5-MS, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Carrier gas: He. Temperature regime: 5 min 80°C; 80°C to 310°C at 4°C min⁻¹; 20 min 310°C; quantification via internal standard compounds



Results

Very long carbon chains from C₂₈ to C₃₂ characterize the fatty acid moieties of all hexactinellids (Table 2). As a rule, the most prominent compounds are *n*-C₃₀ polyunsaturated carbon chains, with triaconta-5,9,23-trienoic acid (C₃₀^{5,9,23}) and triaconta-5,9,21-trienoic acid (C₃₀^{5,9,21}) being the most abundant. An exception was found for the Antarctic *Rossella* sp., which contain tetraenoic C₂₉ and C₃₀ LCFA (Δ^{5,9,?,?}) as main compounds. Whereas most demosponges produce dienoic LCFA with 24–28 carbon atoms, the hexactinellid LCFA generally have more C₃₀ polyenoic acids (Fig. 1). Furthermore, in contrast to demosponges, most hexactinellids lack methyl branched carbon chains among their LCFA, although a systematic exception from this rule is found in the Hyalonematidae.

Brominated LCFA, as often observed in demosponges (Garson et al. 1994), were absent in the hexactinellids studied. No LCFA were observed in the Calcarea investigated (Table 3).

In addition to the linear saturated and C₁₆⁹, C₁₈⁹ and/or C₁₈¹¹ monoenoic fatty acids, significant amounts of mid-chain branched fatty acids (MBFA) occur in both hexactinellids and demosponges (Fig. 1, Table 3). These compounds typically show a distinctive structural peculiarity, as they are characterized by isomeric mixtures of C₁₅–C₂₅ homologues (C₁₉ predominant), with single methyl groups located between the ω₅ and ω₉ positions (Thiel et al. 1999). Microscopic analyses revealed a good agreement between MBFA amounts and the overall abundances of associated eubacteria in demosponges. High MBFA contents are observed for *Astrosclera will-*

Table 3 Lipid properties of chemotaxonomic importance. *Filled circles* Significant relative amounts; *open circles* minor relative amounts; *Tr.* trace amounts; *no entry* compound or compound class

absent; *n.a.* not analysed. *LCFA* Long-chain fatty acids; *MBFA* mid-chain branched fatty acids; $\Delta^{x,y}$ double bond position(s); *PMI* 2,6,10,15,19-pentamethylcosane; C_{16}^9 *cis*-hexadec-9-enoic acid

		LCFA $\Delta^{5,9}$	LCFA $\Delta^{5,9}$ mid-chain branched	MBFA	LCFA $\Delta^{5,9}$ brominated	C_{16}^9	PMI, PMIA	Lycopane
Hexactinellida								
Staurocalyptus sp.	Hexasterophora	●		○		●	Tr.	●
Acanthascus sp.		●		○		●	Tr.	●
Unknown sp. 1		●		○		○	●	●
Rossella sp. 1		●	n.a.	n.a.		●	○	
Rossella sp. 2		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Rossella sp. 3		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Aulosaccus cf. mitsuk.		●		Tr.		○	●	●
Unknown sp. 2		●		○		●	Tr.	●
Sympagella nux		●		○		○	○	●
Sympagella nov. sp.		●		●		●	Tr.	●
Euplectella sp.		●		Tr.		●	●	●
Unknown sp. 3		●		○		○	●	●
Unknown sp. 4		●				Tr.	●	●
Unknown sp. 5		●		●		○	●	●
Unknown sp. 6		●		○		○	○	●
Farrea (?) sp.		●				○	●	●
Ipheton panicea		●		○		○	●	●
Heterochone sp.		●		○		●	●	●
Unknown sp. 7		●		○		●	●	●
Hyalonema (?) sp. 1	Amphidiscophora	●	●	●		●	○	●
Hyalonema sp. 2		●	●	○		○	●	●
Unknown sp. 8		●	●	○		●	n.a.	n.a.
Unknown sp. 9		●		○		○	○	●
Demospongiae								
Geodia barretti	Tetractinomorpha	●	●	●		●		
Spirastrella wellsi		●		Tr.		n.a.		
Haliclona sp.	Ceractinomorpha	●	●	●		●		
Petrosia crassa		●	●	●	●	●	Tr.	
Astrosclera willeyana		●		●		n.a.		
Agelas oroides		●		●	○	n.a.		
Phakellia ventilabrum		●		Tr.	●	●		
Axinella infundibulif		●		○	●	●	Tr.	●
Calcarea								
Grantiopsis (cylindr.?)	Calcaronea					○		
Sycon gelatinosum					○			
Leucaltis (clathria?)	Calcinea					○		
Leucetta sp.					○			
Pericharax heteroraph.					Tr.			
Levinella prolifera					●			

eyana (17.5% of the total fatty acids) and *Geodia barretti* (28%) which both contain dense bacterial populations. Only small amounts of MBFA were found in *Spirastrella* ('*Acanthochaetetes*') *wellsi* (1.2%) and in *Phakellia ventilabrum* (0.3%) which both possess only minor quantities of eubacteria. In the Hexactinellida, isomeric MBFA are present in many species, although in smaller amounts than in most demosponges (<5%). MBFA were not observed in the Calcarea studied.

A further remarkable feature of many sponge lipid fractions are acyclic, tail-to-tail linked isoprenoid hydrocarbons with 2,6,10,15,19-pentamethylcosane (PMI, C_{25}) skeletons. PMI and several unsaturated derivatives thereof were observed in all hexactinellids and in particular demosponges (Table 3). All hexactinellids containing the C_{25} isoprenoids also show the presence

of the structurally related C_{40} homologue lycopane (2,6,10,14,19,23,27,31-octamethyldotriacontane) in even higher amounts. Neither PMI, lycopane nor any other irregular isoprenoid has as yet been found in the Calcarea.

Discussion

The very long carbon chains of hexactinellid LCFA and the unusual $\Delta^{5,9}$ -unsaturation are patterns identical to those found in the so-called 'demospongiac acids' which are classically considered unique to the Demospongiae. Incorporation studies revealed that demosponges possess a very active fatty acid chain elongation system and synthesize these LCFA by C_2 elongation of short-chain precursors followed by $\Delta^{5,9}$ desaturation (see Hahn et al.

1988). From our results, a similar mechanism can be proposed to operate in the Hexactinellida. Potential precursors of their most prominent $C_{30}^{5,9,23}$ and $C_{30}^{5,9,21}$ fatty acids are the monoenoic, short-chain homologues C_{16}^9 , C_{18}^9 and/or C_{18}^{11} . These compounds most probably originate from bacterial lipids (Hahn et al. 1988) and occur in significant amounts in all hexactinellids. The co-occurrence of principal LCFA with unique unsaturation patterns implies very similar or identical enzyme systems for their biosynthesis, and provides a convincing argument for a close phylogenetic association of the Demospongiae and the Hexactinellida.

As for the linear compounds, short-chain MBFA can be considered as plausible precursors of mid-chain methylated sponge LCFA. These compounds frequently occur in demosponges, but among the hexactinellids studied, they were restricted to the Hyalonematidae, a phylogenetically 'diverged' taxon of the subclass Amphidiscophorida (Tabachnik and Menshenina 1999). MBFA are common compounds in many eubacteria and their presence in sponges has thus been attributed to non-phototrophic, associated microorganisms rather than to direct synthesis by the host sponge (Gillan et al. 1988; Thiel et al. 1999). However, the complex isomeric MBFA mixtures typically found in sponges have as yet not been reported from other organisms, nor from marine sediments and sea-water. Anticipating a microbial origin, we regard these MBFA as originating from distinctive eubacteria highly adapted to the internal sponge environment.

PMI derivatives are used as specific archaeal biomarkers (Tornabene et al. 1979; Wakeham 1990; Schouten et al. 1997) and thus point at the presence of associated Archaea in the respective sponges. Unlike PMI, direct sources for lycopane have not been reported. Lycopane-type polyenes occur in several halophiles (Langworthy 1985) and were found in a thermophilic Archaeon (Lattuati et al. 1998). Although these compounds are also present in phototrophic, anaerobic eubacteria (Smith 1988), and were even detected in oxic ocean waters (Wakeham 1990), lycopane was plausibly proposed as a sedimentary biomarker for Archaea, when co-occurring with other diagnostic isoprenoid markers (Brassell et al. 1981). For the hexactinellids studied, the co-occurrence with PMI derivatives suggests lycopane as a further indicator for associated Archaea, namely for the deep-water sponges which certainly lack associated phototrophs.

The presence of archaeal isoprenoids in Hexactinellida and Demospongiae meets a previous discovery of psychrophilic crenarchaeotes as demosponge symbionts (Preston et al. 1996). From our data, we suggest that the Hexactinellida and the Demospongiae, to the exclusion of the Calcarea, share essentially the same common microbial communities, based on distinctive archaeal and eubacterial taxa. Although these yet unknown organisms occur in both classes, a more pronounced presence of isoprenoid biomarkers suggests a more crucial affinity for specific Archaea in the Hexactinellida (Table 3). Eubacteria, as evidenced by MBFA, show a marked pres-

ence throughout the demosponges, but a more scattered distribution among the Hexactinellida. Hence it appears that the evolution of both sponge classes may have been accompanied (or controlled?) by a shift in the abundance and/or quality of their associated microbiota. In any case, the occurrence of the biomarker patterns observed independently of the geographical and environmental settings supports the idea that these microbiota are a constituent property of the porifera and have been 'inherited' in the protective environment of their hosts throughout geological times (Wilkinson 1984).

Conclusions

- The membrane fatty acids of the Hexactinellida preserve an ancestral strategy of lipid biosynthesis. It involves the use of bacterial precursor lipids and results in different biomembrane structures and properties than those found in contemporary organisms other than sponges.
- Their unique lipid characteristics put Hexactinellida and Demospongiae into the same phylogenetic group.
- Both classes share a partly similar symbiont distribution, dominated by Archaea in the Hexactinellida and distinctive, sponge-specific eubacteria in the Demospongiae.
- The lipid patterns of the Hexactinellida and the Demospongiae differ from those of the Calcarea, thus a more distant phylogenetic position for the latter.

Acknowledgements We thank the crews of the R.V.s 'Seward Johnson', 'Gwendoline May', 'Poseidon', 'Johnson-Sea-Link' and 'Jago' for excellent collaboration during the field-work, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Th 713/1,2; Mi 157/10; SFB 468/BP1, Re 665/14-1 and -12-1 – Leibniz Award), and the Bundesministerium für Bildung und Forschung for financial support. Five anonymous reviewers have greatly improved the quality of the original manuscript. We also thank Friederike Hoffmann for assistance with sponge taxonomy and Susanne Gatti for providing the Antarctic sponge samples. This paper represents publication No. 3 of the research program BOSMAN (03F0256A).

References

- Adams CL, McInerney JO, Kelly M (1999) Indications of relationships between poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. In: Hooper JNA (ed) *Memoirs of the Queensland Museum. Proceedings of the 5th International Sponge Symposium, Brisbane, 1998*, pp 33–44
- Bergquist PR, Lawson MP, Lavis A, Cambie RC (1984) Fatty acid composition and the classification of the Porifera. *Lipids* 12:63–84
- Böger H (1988) Versuch über das phylogenetische System der Porifera. *Meyniana* 40:143–154
- Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (1998) Phylogenetic analysis of the *Hsp 70* sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol Biol Evol* 15:647–655
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001) *J Evol Biol* 14:171–179
- Brassell SC, Wardroper AMK, Thomson ID, Maxwell JR, Eglinton G (1981) Specific acyclic isoprenoids as biological

- markers of methanogenic bacteria in marine sediments. *Nature* 290:693–696
- Cavalier Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE, Boury-Esnault N, Vacelet J (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can J Zool* 74:2031–2045
- Collins A (1998) Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: an analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15458–15463
- Garson MJ, Zimmerman MP, Battershill CN, Holden JL, Murphy PT (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids* 29:509–516
- Gillan FT, Stoilov IL, Thompson JE, Hogg RW, Wilkinson CR, Djerassi C (1988) Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids* 23:1139–1145
- Hahn S, Stoilov IL, Tam Ha TB, Raederstorff D, Doss GA, Li H-T, Djerassi C (1988) Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J Am Chem Soc* 110:8117–8124
- Hooper JNA (2000) Sponguide. Guide to sponge collection and identification, version August 2000. Queensland Museum, Brisbane, Australia, pp. 129 [available online: <http://www.qmuseum.qld.gov.au/organisation/sections/sessilemarineinvertebrates/spong.pdf>]
- Langworthy TA (1985) Lipids of archaeobacteria. In: Woese CR, Wolfe RS (eds) *The bacteria: a treatise on structure and function*. VIII. Archaeobacteria. Academic Press, New York, pp. 459–497
- Lankelma J, Ayanoglu E, Djerassi C (1983) Double-bond localization in long-chain polyunsaturated fatty acids by chemical ionisation-mass spectrometry. *Lipids* 18:853–858
- Lattuali A, Guezennec J, Metzger JP, Largeau C (1998) Lipids of *Thermococcus hydrothermalis*, an Archaea isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Lipids* 33:319–326
- Lawson MP, Bergquist PR, Cambie RC (1984) Fatty acid composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 12:375–393
- Litchfield C, Greenberg AJ, Noto G, Morales RW (1976) Unusually high levels of C₂₄–C₃₀ fatty acids in sponges of the class Demospongiae. *Lipids* 11:567–570
- Mackie GO, Singla CL (1983) Studies on Hexactinellida. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe 1873). *Proc R Soc Lond B* 301:365–400
- Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9707–9712
- Müller WEG (1997) Evolution of Protozoa to Metazoa. *Theor Biosci* 116:145–168
- Preston CM, Wu KY, Molinski TF, DeLong EF (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Crenarchaeum symbiosum* gen. nov. sp. nov. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6241–6246
- Reiswig HM (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Colloq Int CNRS* 291:173–180
- Reiswig HM, Mackie GO (1983) Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos Trans R Soc Lond B* 301:419–428
- Reitner J, Mehl D (1996) Monophyly of the Porifera. *Verh Naturwiss Ver Hamburg (NF)* 36:5–32
- Schouten S, Maarel JEC van der, Huber R, Sinninghe Damsté JS (1997) 2,6,10,15,19-Pentamethylcosonenes in *Methanobolus bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Org Geochem* 26:409–414
- Schütze J, Krasko A, Custodio MR, Efremova SM, Müller IM, Müller WEG (1999) Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc R Soc Lond B* 266:63–73
- Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Müller IM, Müller WEG (1999) Origin of insulin receptor-like tyrosin kinases in marine sponges. *Biol Bull* 197:198–206
- Smith PF (1988) Archaeobacteria and other specialized bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) *Microbial lipids*. I. Academic Press, London, pp 489–553
- Soest RWM van, Braekman JC (1999) Sponge systematics: a review. *Mem Queensl Mus* 44:569–589
- Tabachnik KR, Menshenina LL (1999) An approach to the phylogenetic reconstruction of Amphidiscophora (Porifera: Hexactinellida). In: Hooper JNA (ed) *Memoirs of the Queensland Museum. Proceedings of the 5th international sponge symposium*, Brisbane, 1998, pp 607–615
- Thiel V, Jenisch A, Wörheide G, Löwenberg A, Reitner J, Michaelis W (1999) Branched alkanolic acids from 'living fossil' demosponges: a link to ancient sedimentary lipids? *Org Geochem* 30:1–14
- Tornabene TG, Langworthy TA, Holzer G, Oro J (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic archaeobacteria. *J Mol Evol* 13:73–83
- Van de Peer Y, De Wachter R (1997) Evolutionary relationships among the eucaryotic crown taxa taking into account site-to-site variation in 18S rRNA. *J Mol Evol* 45:619–630
- Wakeham SG (1990) Algal and bacterial hydrocarbons in particulate matter and interfacial sediment of the Cariaco Trench. *Geochim Cosmochim Acta* 54:1325–1336
- Wilkinson CR (1984) Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proc R Soc Lond B* 220:509–51
- Zrzavý J, Mihulka S, Kepka P, Bezdek A, Tietz D (1998) Phylogeny of the metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14:249–285

Note added in proof Poriferan paraphyly, with elevation of class Calcarea to phylum level ("Calcispongia"), was proposed by Zrzavý et al. (1998) and most recently by Borchiellini et al. (2001). However, a new detailed study using an extended genetic data set (full length 18S and 28S rDNA sequences) could not resolve this issue with sufficient statistical significance (Medina et al., 2001). Hence the proposal of sponge paraphyly is still contentious. Our independent biomarker approach now clearly supports a close genealogical relationship of Demospongiae and Hexactinellida, with a more distant phylogenetic position of Calcarea. However, our data do not necessarily support either poriferan monophyly (due to a lack of outgroup comparison, which is currently in progress).

ERRATUM

Volker Thiel · Martin Blumenberg · Jens Hefter
Thomas Pape · Shirley Pomponi · John Reed
Joachim Reitner · Gert Wörheide · Walter Michaelis

A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges

Published online: 26 March 2002
© Springer-Verlag 2002

Naturwissenschaften (2002) 89:60–66

Due to an unfortunate error during the typesetting process, three entries which should have been in column 7 ($C_{16}\Delta^9$) were put in column 6 (LCFA $\Delta^{5,9}$ brominated) of Table 3. The correct table is printed below.

The online version of the original article can be found at
<http://dx.doi.org/10.1007/s00114-001-0284-9>

V. Thiel (✉) · M. Blumenberg · T. Pape · W. Michaelis
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55,
20146 Hamburg, Germany
e-mail: thiel@geowiss.uni-hamburg.de
Fax: +49-40-428386347

J. Hefter
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

S. Pomponi · J. Reed
Division of Biomedical Marine Research,
Harbor Branch Oceanographic Institution,
5600 US 1 North, Fort Pierce, FL 34946, USA

J. Reitner
Göttinger Zentrum Geowissenschaften, Universität Göttingen,
Goldschmidtstrasse 3, 37077 Göttingen, Germany

G. Wörheide
Queensland Centre for Biodiversity, Queensland Museum, P.O.
Box 3300, South Brisbane, Qld 4101, Australia

Table 3 Lipid properties of chemotaxonomic importance. *Filled circles* Significant relative amounts; *open circles* minor relative amounts; *Tr.* trace amounts; *no entry* compound or compound class absent; *n.a.* not analysed. *LCFA* Long-chain fatty acids; *MBFA* mid-chain branched fatty acids; $\Delta^{x,y}$ double bond position(s); *PMI* 2,6,10,15,19-pentamethylcosane; C_{16}^9 *cis*-hexadec-9-enoic acid

		LCFA $\Delta^{5,9}$	LCFA $\Delta^{5,9}$ mid-chain branched	MBFA	LCFA $\Delta^{5,9}$ brominated	C_{16}^9	PMI, PMIA	Lycopane
Hexactinellida								
<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora	●		○		●	Tr.	●
<i>Acanthascus</i> sp.		●		○		●	Tr.	●
Unknown sp. 1		●		○		○	●	●
<i>Rossella</i> sp. 1		●	n.a.	n.a.		●	○	
<i>Rossella</i> sp. 2		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
<i>Rossella</i> sp. 3		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsuk.</i>		●		Tr.		○	●	●
Unknown sp. 2		●		○		●	Tr.	●
<i>Sympagella</i> nux		●		○		○	○	●
<i>Sympagella</i> nov. sp.		●		●		●	Tr.	●
<i>Euplectella</i> sp.		●		Tr.		●	●	●
Unknown sp. 3		●		○		○	●	●
Unknown sp. 4		●				Tr.	●	●
Unknown sp. 5		●		●		○	●	●
Unknown sp. 6		●		○		○	○	●
<i>Farrea</i> (?) sp.		●				○	●	●
<i>Ipheton panicea</i>		●		○		○	●	●
<i>Heterochone</i> sp.		●		○		●	●	●
Unknown sp. 7		●		○		●	●	●
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidiscophora	●	●	●		●	○	●
<i>Hyalonema</i> sp. 2		●	●	○		○	●	●
Unknown sp. 8		●	●	○		●	n.a.	n.a.
Unknown sp. 9		●		○		○	○	●
Demospongiae								
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha	●	●	●		●		
<i>Spirastrella wellsi</i>		●		Tr.		n.a.		
<i>Haliclona</i> sp.	Ceractinomorpha	●	●	●		●		
<i>Petrosia crassa</i>		●	●	●	●	●	Tr.	
<i>Astrosclera willeyana</i>		●		●		n.a.		
<i>Agelas oroides</i>		●		●	○	n.a.		
<i>Phakellia ventilabrum</i>		●		Tr.	●	●		
<i>Axinella infundibulif</i>		●		○	●	●	Tr.	●
Calcarea								
<i>Grantiopsis</i> (cylindr.?)	Calcaronea					○		
<i>Sycon gelatinosum</i>						○		
<i>Leucaltis</i> (<i>clathria</i> ?)	Calcinea					○		
<i>Leucetta</i> sp.						○		
<i>Pericharax heteroraph.</i>						Tr.		
<i>Levinella prolifera</i>						●		

E.2 Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Pomponi S., and Michaelis W.
(2002) Steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**,
415-419.

Martin Blumenberg · Volker Thiel · Thomas Pape
Walter Michaelis

The steroids of hexactinellid sponges

Received: 1 March 2002 / Accepted: 9 June 2002 / Published online: 23 July 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The Hexactinellida ('glass sponges') are commonly considered to be the most basic metazoans. Steroids of 20 species from different taxa were studied for chemotaxonomy and biosynthetic implications. All Hexactinellida contain cholest-5-en-3 β -ol (cholesterol) and/or its saturated derivative 5 α (H)-cholestan-3 β -ol, along with their C-24-alkylated homologues. Where 5 α (H)-stanols are present, they regularly co-occur with their 3-keto analogues. The steroid concentrations generally decrease with increasing carbon numbers, similar to sterol distributions typically found in marine sediments. These features argue against de novo sterol biosynthesis operating in hexactinellid sponges. Rather, we suggest a dietary uptake of Δ^5 -stenols and their stereoselective transformation via 3-keto intermediates to 5 α (H)-stanols.

Introduction

In addition to fatty acids, sterols are basic lipid constituents in eukaryotic cells. Sponges (Porifera), in particular, are known to be a rich source of unique sterols with complex nuclei and side-chain modifications (Djerassi and Silva 1991; Kerr and Baker 1991; Giner 1993; Aiello et al. 1999). The biosynthetic origin of sponge sterols is ambivalent and a subject of ongoing research. Sterols from members of the class Demospongia appear to originate from one or more of the four processes: (1) de novo biosynthesis, (2) dietary uptake, (3) dietary uptake and modification and (4) interaction with associated microorganisms (Goat 1981; Djerassi and Lam 1991).

The study of sponge sterols is not only interesting from a biochemical viewpoint but has also provided relevant information on the taxonomic classification of these

organisms (Bergquist et al. 1991). Although the overall applicability of sterol composition for sponge classification has been questioned (Fromont et al. 1994; van Soest and Braekman 1999), particular compounds may characterize specific taxa such as in the demosponge orders Petrosida (Sica and Zollo 1978; Gauvin et al. 1998) and Axinellida (De Rosa et al. 1973; Minale and Sodano 1974). Previous sterol studies have largely focused on demosponges, due to their diversity and their abundance in shallow-water environments. In contrast, there have only been a few studies on a limited number of species and chemical properties on the classes Calcarea (calcareous sponges) (Bergquist et al. 1986) and, in particular, the Hexactinellida (Guella et al. 1988).

The Hexactinellida are considered to be an early branch within the Porifera. They show 'hexactine' siliceous spicules and a unique mode of soft body organization. Much of their tissue consists of multinucleate cytoplasm ('choanosyncytium') comprising collared bodies, sharing a common nucleus and linked together by plasmic bridges (Reiswig 1979; Mackie and Singla 1983). The oldest remains of hexactinellids have been found in Ediacarian beds (Vendian, Late Precambrian) (Gehling and Rigby 1996; Brasier et al. 1997). Today they inhabit exclusively marine habitats, particularly remote, deeper shelf and slope environments, typically from 200 to 2,000 m water depth.

Recently, it has been shown that the Hexactinellida contain very long chain $\Delta^{5,9}$ unsaturated membrane fatty acids, previously considered to be specific biochemicals of demosponges (Thiel et al. 2002). The co-occurrence of these unique 'demospongiac acids' strongly suggests a close phylogenetic relationship between the Hexactinellida and Demospongiae. Corresponding to recent molecular biological work (e.g. Adams et al. 1999 and references therein) these findings conflict with the traditional view of taxonomists, who assigned separate subphylum or phylum status to the Hexactinellida (Reiswig and Mackie 1983; Bergquist 1985).

Only scattered reports exist on steroids of the Hexactinellida (Guella et al. 1988; Kerr et al. 1990). Nothing is

M. Blumenberg · V. Thiel · T. Pape · W. Michaelis (✉)
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55,
20146 Hamburg, Germany
e-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de
Tel.: +49-40-428385001, Fax: +49-40-428386347

Table 1 Sterols and steroid ketones in the Hexactinellida (% of total sterols). For locations see Thiel et al. (2002). A=5 α (H)- Δ^0 -3 β -ol, B=5 α (H)- Δ^0 -3-one, C= $\Delta^5,22$ -3 β -ol, D= Δ^5 -3 β -ol, E= Δ^4 -3-one, F= $\Delta^5,24(28)$ -3 β -ol. For detailed structures see Fig. 1. $\Delta^{x,y}$ = double bond position(s); Δ^0 denotes a saturated carbon skeleton; + = trace amounts; † = include as yet uncharacterized C₂₇, C₂₈ and C₂₉ 5 α (H)-cholestan-3 β -ol derivatives, for which an additional C-6 hydroxy group is tentatively assigned based on their mass spectra (main compounds in *Staurocalyptus* sp. and *Acanthascus* sp.); †† = contains C-4 monomethylated sterols (trace amount in *Acanthascus* sp., *Farrea* (?), Unknown sp. 7). Unknown sp. 5 contains two C-4 monomethylated sterols (23% of the total sterols) tentatively assigned by their mass spectra as 4 α ,24-dimethyl-5 α (H)-cholestan-3 β -ol and 4 α -methyl-24-ethyl-5 α (H)-cholestan-3 β -ol. Sterols were obtained by repeated extraction

of freeze-dried sponge (~1 g) with 10 ml portions of CH₂Cl₂:methanol (1:1; v/v). The extract was fractionated using a silica gel column (5 \times 1.5 cm; Merck silica gel 60) into (1) hydrocarbons (two column volumes of *n*-hexane) and (2) sterols/ketones (five column volumes of CH₂Cl₂:ethyl acetate, 3:1, v/v). For GC, trimethylsilyl (TMS-) ether derivatives of sterols were analysed using a Carlo Erba GC 6000 (column: 30 m DB5, 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness; detector: FID; carrier gas: H₂; injection: 'on column'; temperature programme: 3 min at 80°C; 80°C to 310°C at 4°C min⁻¹; 20 min at 310°C). For compound identification, GC-MS was performed using a Micromass Quattro II spectrometer interfaced to a HP6890 GC (column and temperature programme as above; carrier gas: He)

	C ₂₆		C ₂₇		C ₂₈					C ₂₉				Others			
	(24-nor)				(24-methyl)					(24-ethyl)							
	A	B	A	B	A	B	C	D	E	A	B	C	D				
Hexasterophora																	
<i>Staurocalyptus</i> sp.																	98*†
<i>Acanthascus</i> sp.																	69†††
Unknown sp. 1	1	1	36	3	2	26	11	1	1	19	12	7	7				
<i>Autosaccus</i> cf. <i>mitsuk.</i>			25	24	14	16	11	4	12	16	11	4	7				13
Unknown sp. 2			39	17	+	17	7	4	10	17	7	7	4				
<i>Sympagella nux</i>			41	30	4	9	7	3	4	9	7	3	3				
<i>Sympagella</i> nov. sp.			64	+	1	21	+	3	3	21	+	3	3				
<i>Euplectella</i> sp.			40	7	2	15	3	1	2	15	3	1	1				
Unknown sp. 3			61		15	20		2	2	20		2	2				
Unknown sp. 4			8	26	1	4	8	1	1	4	8	1	1				40††
Unknown sp. 5			28	27	2	9	12	17	3	9	12	17	7				
Unknown sp. 6			8		10	9		2	6	9		2	2				
<i>Farrea</i> (?) sp.			49	+	4	20	+	4	42	20	+	9	18				††
<i>Ipheton panicea</i>			4	24	3	4	24	3	36	4	24	3	36				
<i>Heterochone</i> sp.																	
Unknown sp. 7																	
Amphidiscophora																	
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1			5	2		2			5	2			2				4
<i>Hyalonema</i> sp. 2			6		+	4			57	4			15				15
Unknown sp. 8			27	4		6	6		26	6	6		13				8
Unknown sp. 9			39	11		19	2		6	19	2		2				3

known about their biosynthesis, although the capacity for sterol side-chain dealkylation has been shown for cell-free extracts from an unknown species (Kerr et al. 1990). The lipid chemistry of the Hexactinellida is nonetheless of particular interest, as no other animal taxon showing such a prolonged, continuous record since the Precambrian is known. Thus, the Hexactinellida may reasonably be regarded as the most ancestral living metazoans. Accordingly, lipid constituents of these 'ultra-conservative' animals could provide an insight into the biosynthetic strategies prevailing at the very early dawn of metazoan evolution. In continuation of our previous work on the fatty acids of the Hexactinellida (Thiel et al. 2002), we here present comprehensive information on steroids in 20 species from representative sub-taxa and different environments worldwide.

Methods

Twenty species of hexactinellid sponges were collected using manned submersibles (Table 1). The sponges were kept below -20°C until analysis. Sterols were obtained by extraction with organic solvents and analysed using gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). For a preparation outline and analytical methods see caption of Table 1. The structural determination and configurational assignments of hydrogen at C-5 of the steroid nucleus (α or β) were achieved by comparison with an authentic standard (5 α (H)-cholestan-3 β -ol). Artefact formation during analytical workup, e.g. through oxidation of sterols to steroid ketones, was checked and ruled out by subjecting reference sterols (cholesterol, 5 α (H)-cholestan-3 β -ol) to the same workup procedure as for the sponge samples.

Results

All the Hexactinellida studied contained steroids in significant concentrations (main compound: 0.29–4.32 mg g⁻¹ dry sponge). Regardless of subtaxa affiliation, all species showed compound mixtures depicting the conventional cholestane C₂₇ skeleton with the unsubstituted or C-24 alkylated (methyl- or ethyl-) side chain, and an oxygen-bearing functional group at C-3 (Table 1, Fig. 1). In general, the concentrations of these compounds decrease with increasing carbon numbers. Moreover, nine species contain trace amounts of compounds with a tentatively assigned 24-norcholesterol side chain, and four species showed C-4 monomethylated sterols in minor abundances. Unconventional modifications of the ring or side-chain carbon skeletons, as found in many demosponges, appear to be absent from the hexactinellids.

Most, though not all, Hexactinellida contain C₂₇–C₂₉ Δ^5 -sterols, with cholesterol generally predominating. Known intermediates occurring during de novo sterol synthesis from squalene, like the 'primitive' C-4 dimethylated sterols, were not observed. Instead, 5 α (H)-stanols are present in most hexactinellids and comprise the most prominent sterols in several species (Table 1, Fig. 1).

As a further remarkable feature, 5 α (H)-cholestan-3-one and its C-24 alkylated derivatives frequently occur

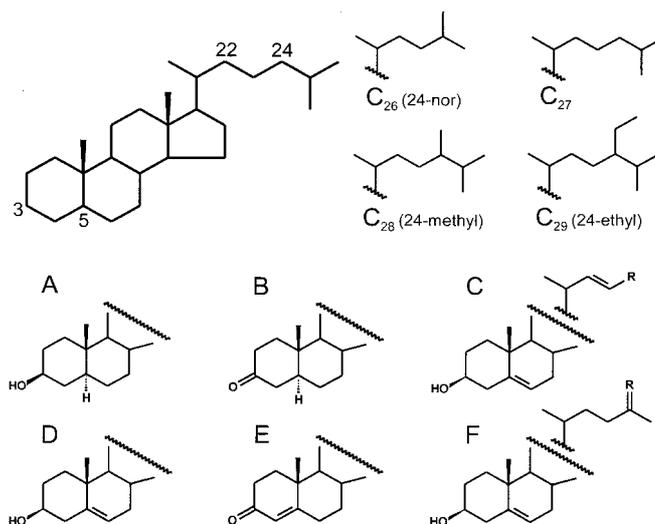


Fig. 1 Structures of the major steroids and steroid ketones. C: R = alkyl; F: R = CH₂

in concentrations of the same order of magnitude as those of their stanol counterparts (Table 1). In four samples, low amounts of cholest-4-en-3-one were also found (*Acanthascus* sp., Unknown sp. 2, *Heterochone* sp., *Hyalonema* (?) sp. 1).

Discussion

The capability for de novo sterol biosynthesis has not yet been examined for the Hexactinellida. The prominence of 5 α (H)-stanols as well as their Δ^5 counterparts may indicate that these sponges (or their microbial associates) are able to reduce the 5,6 double bond to yield the ring-saturated compounds. Biological sources for 5 α (H)-stanols are scarce but, in comparison, these compounds have quite frequently been found in marine invertebrates (Goat 1981) and show high concentrations in a number of demosponges, such as *Penares tylotaster* (Bergquist et al. 1986) and *Terpios zeteki* (Delseth et al. 1979). However, the extreme predominance of saturated sterols in several of the hexactinellids studied (*Aulosaccus* cf. *mitsuk.*, *Sympagella* nov. sp., *Euplectella* sp; see Table 1) is a most outstanding feature among the steroid patterns of living organisms.

It has been proposed that stanols originate from the transformation of dietary Δ^5 sterols (Goat 1981). For the Hexactinellida, we suggest a dietary uptake, unspecific transformation, and accumulation of external precursor sterols in an analogous manner. Indeed, the carbon number distributions found resemble those commonly observed for sterol mixtures from marine particulate matter (C₂₆ << C₂₇ > C₂₈ > C₂₉, see Table 1, and e.g. Gagosian et al. 1982). These sedimentary patterns arise from the ubiquitous production of cholest-5-en-3 β -ol by zooplankton and certain algae, whereas the less abundant C₂₈ and C₂₉ Δ^5 -sterols are common in dinoflagellates, diatoms and green algae (Volkman et al. 1998).

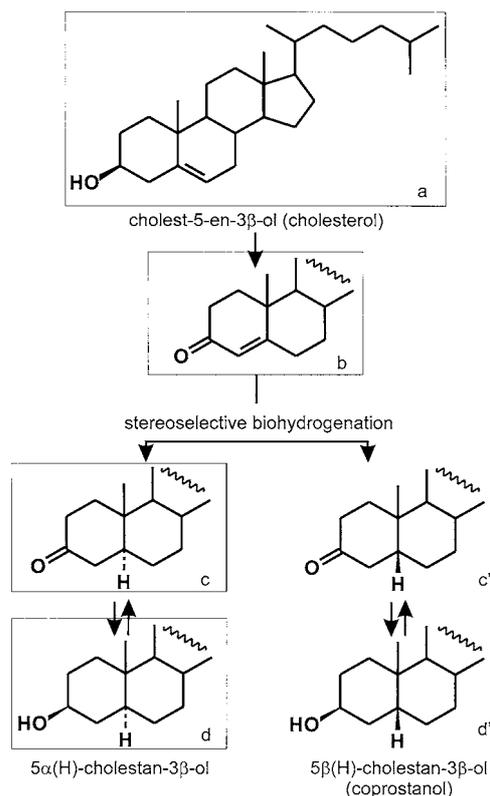


Fig. 2a–d Proposed pathway of Δ^5 -stenol conversion with the intermediacy of 3-steroid ketones (modified after (Goad 1981; Nishimura 1982; Kok et al. 2000)). *In boxes*: proposed stereoselective route of Δ^5 -stenol transformation leading to 5 α (H)-stanols in the Hexactinellida, e.g. for cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol): **a** cholest-5-en-3 β -ol, **b** cholest-4-en-3-one, **c** 5 α (H)-cholestan-3-one, **d** 5 α (H)-cholestan-3 β -ol. **c'** 5 β (H)-cholestan-3-one, **d'** 5 β (H)-cholestan-3 β -ol

Steroid ketones are typically formed as transient intermediates during the biological and abiotic conversion of conventional Δ^5 sterols into stanols (Mackenzie et al. 1982; Kok et al. 2000) (Fig. 2). A possibility for distinguishing between a biogenic versus abiotic conversion pathway is the stereoselectivity of biologically mediated processes. This was shown for an anaerobic bacterium, which catabolizes cholesterol to 5 β (H)-cholestan-3 β -ol (coprostanol) exclusively (Eyssen et al. 1973). Other work has demonstrated that some microorganisms and marine invertebrates (Astrophorida) convert cholesterol via cholest-4-en-3-one and 5 α (H)-cholestan-3-one to 5 α (H)-cholestan-3 β -ol (Smith et al. 1972; Taylor et al. 1981). Hence, the exclusive presence of 5 α (H)-isomers in hexactinellids points to a stereoselective, thus enzymatically driven, pathway of sterol transformation, operated either by the sponge exclusively or assisted by associated microorganisms.

The apparent overlap in steroid compositions among members of the class Hexactinellida virtually prevents further chemosystematic classifications at the intraclass level (Table 1). Nevertheless, our results suggest that neither de novo synthesis of steroids nor carbon skeleton

modifications are prevalent in these sponges. The simplicity and unspecific intraclass variability of hexactinellid steroids may be interpreted as a basic biochemical feature that underlines a deeply branching phylogenetic position for these sponges. However, it is unclear whether the steroids recorded have a discrete biological function or are just metabolic dead-ends accumulating upon an unspecific transformation of conventional marine sterols. Remarkably, even the biological function of sponge sterols in general is still a matter of debate. It has been shown that these compounds cannot modify the properties of phospholipid bilayers based on the unique $\Delta^{5,9}$ -‘demospongiac acids’ (Djerassi and Lam 1991). Hence, the elucidation of the role of hexactinellid steroids and the precise characterization of the biochemical pathways which lead to their formation still require further study.

Acknowledgements We thank the crews of the R/Vs ‘Seward Johnson’, ‘Gwendoline May’, ‘Poseidon’, ‘Johnson-Sea-Link’ and ‘Jago’ for excellent collaboration during the field work. We are indebted to S. Pomponi, J. Reed and J. Reitner for providing the sponge samples and taxonomic classification, respectively. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Th 713/1,2; Re 665/14–1) and the Bundesministerium für Bildung und Forschung for financial support. Three anonymous reviewers have greatly improved the quality of the original manuscript. This paper represents publication no. 11 of the research programme BOSMAN (03F0256A).

References

- Adams CL, McInerney JO, Kelly M (1999) Indications of relationships between Porifera classes using full-length 18S rRNA gene sequences. *Mem Queensl Mus* 44:33–43
- Aiello A, Fattorusso E, Menna M (1999) Steroids from sponges: recent reports. *Steroids* 64:687–714
- Bergquist PR (1985) Porifera relationships. In: Conway Morris S, George JD, Gibson R, Platt HM (eds) *The origins and relationships of lower invertebrates*. Clarendon Press, Oxford, pp 14–28
- Bergquist PR, Lavis A, Cambie RC (1986) Sterol composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 14:105–112
- Bergquist PR, Karuso P, Cambie RC, Smith DJ (1991) Sterol composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 19:17–24
- Brasier M, Green O, Shields G (1997) Ediacarian sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. *Geology* 25:303–306
- De Rosa M, Minale L, Sodano G (1973) Metabolism in Porifera. II. Distribution of sterols. *Comp Biochem Physiol B* 46: 823–837
- Delseth C, Toleda L, Scheuer PJ, Wells RJ, Djerassi C (1979) 5 α -24-Norcholestan-3 β -ol and (24Z)-stigmasta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol: two new marine sterols from the Pacific sponges *Terpios zeteki* and *Dysidea herbacea*. *Helv Chim Acta* 62: 101–109
- Djerassi C, Lam W-K (1991) Sponge phospholipids. *Acc Chem Res* 24:69–75
- Djerassi C, Silva CJ (1991) Sponge sterols: origin and biosynthesis. *Acc Chem Res* 24:371–378
- Eyssen HJ, Parmentier GG, Compennolle FC, De Pauw G, Piessens-Denef M (1973) Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC21,408-*Nova* species. *Eur J Biochem* 36:411–421
- Fromont J, Kerr S, Kerr R, Riddle M, Murphy P (1994) Chemotaxonomic relationships within, and comparisons between, the orders Haplosclerida and Petrosia (Porifera: Demospongiae) using sterol complements. *Biochem Syst Ecol* 22:735–752

- Gagosian RB, Smith SO, Nigrelli GE (1982) Vertical transport of steroid alcohols and ketones measured in a sediment trap experiment in the equatorial Atlantic Ocean. *Geochim Cosmochim Acta* 46:1163–1172
- Gauvin A, Smadja J, Akinin M, Gaydou EM (1998) Cyclopropane-containing sterols in the marine sponge *Petrosia spheroida*. *Comp Biochem Physiol B* 121:451–456
- Gehling JG, Rigby JK (1996) Long expected sponges from the neoproterozoic Ediacara fauna of South Australia. *J Paleontol* 2:185–195
- Giner J-L (1993) Biosynthesis of marine sterol side-chains. *Chem Rev* 93:1735–1752
- Goad LJ (1981) Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure Appl Chem* 51:837–852
- Guella G, Mancini I, Pietra F (1988) Isolation of ergost-4,24(28)-dien-3-one from both Astrophorida demosponges and sub-Antarctic hexactinellides. *Comp Biochem Physiol B* 90:113–115
- Kerr RG, Baker B (1991) Marine sterols. *Nat Prod Rep* 8:465–497
- Kerr RG, Baker BJ, Kerr SL, Djerassi C (1990) Biosynthetic studies of marine lipids. XXIX. Demonstration of sterol side chain dealkylation using cell-free extracts of marine sponges. *Tetrahedron Lett* 31:5425–5428
- Kok MD, Rijpstra IC, Robertson L, Volkman JK, Sinninghe Damsté JS (2000) Early steroid sulfurisation in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). *Geochim Cosmochim Acta* 64:1425–1436
- Mackenzie AS, Patience RL, Yon DA, Maxwell JR (1982) The effect of maturation on the configuration of acyclic isoprenoid acids in sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 46:783–792
- Mackie GO, Singla CA (1983) Studies on Hexactinellida. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe 1873). *Proc R Soc Lond B* 301:365–400
- Minale L, Sodano G (1974) Marine sterols: 19-nor-stanols from the sponge *Axinella polypoides*. *J Chem Soc Perkin Trans* 1:1888–1892
- Nishimura M (1982) 5 β -isomers of stanols and stanones as potential markers of sedimentary organic quality and depositional paleoenvironments. *Geochim Cosmochim Acta* 46:423–432
- Reiswig HM (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Colloq Int CNRS* 291:173–180
- Reiswig HM, Mackie GO (1983) Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos Trans R Soc Lond B* 301:419–428
- Sica D, Zollo F (1978) Petrosterol, the major sterol with a cyclopropane side chain in the sponge *Petrosia ficiformis*. *Tetrahedron Lett* 9:837–838
- Smith AG, Goodfellow R, Goad LJ (1972) The intermediacy of 3-oxo steroids in the conversion of cholest-5-en-3 β -ol into 5 α -cholestan-3 β -ol by the starfish *Asterias rubens* and *Porania pulvillus*. *Biochem J* 128:1371–1372
- Taylor GD, Smith SO, Gagosian RB (1981) Use of microbial enrichments for the study of the anaerobic degradation of cholesterol. *Geochim Cosmochim Acta* 45:2161–2168
- Thiel V, Blumenberg M, Hefter J, Pape T, Pomponi SA, Reed J, Reitner J, Wörheide G, Michaelis W (2002) A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89:60–66
- van Soest RWM, Braekman JC (1999) Chemosystematics of Porifera: a review. *Mem Queensl Mus* 44:569–589
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL, Gelin F (1998) Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Org Geochem* 29:1163–1179

E.3 Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., and Francke W. (2002)
Barettin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.



Barettin, revisited?

Susanne Sölter,^a Ralf Dieckmann,^b Martin Blumenberg^c and Wittko Francke^{a,*}

^aInstitut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg, Germany

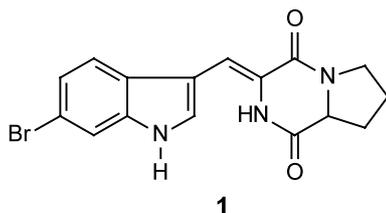
^bMax-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Technische Universität Berlin, Franklinstr. 29, D-10587 Berlin, Germany

^cInstitut für Biogeochemie und Meereschemie, Universität Hamburg, Bundesstr. 55, D-20146 Hamburg, Germany

Received 2 March 2002; accepted 8 March 2002

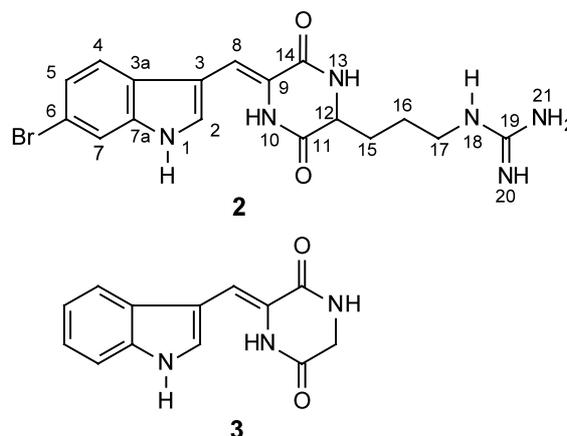
Abstract—A new indole derivative representing a condensation product of 6-bromotryptophan and arginine is the major diketopiperazine produced by the sponge *Geodia baretti*. Strong evidence is provided that this compound represents the correct structure of barettin, which had been described earlier. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Sponges of the family Geodiidae are sources of interesting natural products.^{1,2} Lidgren et al. have described the isolation of a pharmacologically active indole alkaloid from the cold water sponge *Geodia baretti*.^{3,4} On the basis of spectral data they proposed the compound to be the diketopiperazine **1** which they called barettin. An independent synthesis of **1**, however, disproved this structure.⁵ Here we describe the isolation and structure elucidation of the novel diketopiperazine **2** from *G. baretti*, showing spectral data similar to those reported for barettin. We do not suggest a trivial name for **2**, but we believe it to represent the compound that has been originally termed barettin.



The material was collected by submersible at the sula-ridge (Norway) at 300 m depth. The sponge (200 g wet weight) was immediately frozen and kept at -18°C until extraction with acetone. Under reduced pressure, the organic solvent was removed from the aqueous acetone extract. The remaining aqueous solution was extracted with 1-butanol, and the organic layer was concentrated to dryness. The residue was subjected to column chro-

matography (Merck silica 60, 230–400 mesh, 15% CH_2Cl_2 in MeOH, 0.5 bar overpressure) to yield **2** (0.02% wet weight).



Investigations of **2** by HR-ESI-MS gave $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 419.0833 corresponding to the molecular formula of $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{BrN}_6\text{O}_2$ (calcd 419.0831). This shows the molecular weight of **2** to be 59 g/mol (CH_5N_3) higher than that of **1**. Screening for the presence of **1** in the crude extract of *G. baretti* proved to be negative. Investigations by MALDI-TOF did not show any mass signal at m/z 360 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ of **1**); however, a molecular ion cluster at m/z 419, 421 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ratio 1:1), characteristic of a monobrominated compound (like **2**) could be detected.

The ^1H NMR of the new compound showed characteristic signals in the lowfield region indicating a disubstituted indole system.⁶ ^1H – ^1H coupling as well as NOE

Keywords: diketopiperazine; barettin; sponge; *Geodia*.

* Corresponding author. Tel.: +49 (40) 42838-2874; fax: +49 (40) 42838-3834; e-mail: francke@chemie.uni-hamburg.de

Table 1. ^1H NMR (Bruker DRX 500, 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) and ^{13}C NMR (Bruker AMX 400, 101 MHz, D_3COD) data of baretin

Carbon	δ (ppm)	Proton	δ (ppm)	J (Hz)	COSY ^a	HMBC ^b	NOE ^c
C-2	127.45	1-H	12.12	d, $J_{1,2}=2.5$	2-H	C-2, C-3, C-3a	2-H, 7-H, 10-H
		2-H	7.99	d, $J_{1,2}=2.5$	1-H, 8-H	C-3, C-3a, C-7a, C-8	1-H, 10-H
C-3	109.87						
C-3a	127.55						
C-4	120.87	4-H	7.62	d, $J_{4,5}=8.5$	5-H, 7-H	C-3, C-6, C-7a	5-H, 8-H
C-5	224.52	5-H	7.24	dd, $J_{4,5}=8.5$; $J_{5,7}=1.6$	4-H, 7-H	C-3a, C-7	4-H
C-6	117.03						
C-7	115.69	7-H	7.67	d, $J_{5,7}=1.6$	4-H, 5-H	C-3a, C-5	1-H
C-7a	138.42						
C-8	110.95	8-H	6.99	s	2-H, 10-H	C-2, C-3a, C-11, C-14	2-H, 4-H
C-9	123.35						
		10-H	9.63	s	8-H	C-8, C-9, C-11, C-12, C-14	1-H, 2-H
C-11	168.61						
C-12	56.48	12-H	4.07	m	13-H, 15-H	C-11, C-14, C-15, C-16	13-H
		13-H	8.45	d, $J_{12,13}=2.5$	12-H	C-9, C-11, C-12	12-H
C-14	163.36						
C-15	32.62	15-H ₂	1.76–1.84	m	12-H, 16-H	C-11, C-12, C-16	–
C-16	25.11	16-H ₂	1.50–1.63	m	15-H, 17-H	C-12, C-17	17-H
C-17	41.98	17-H ₂	3.16–3.20	m	16-H, 18-H	C-15, C-16, C-19	16-H
		18-H	8.01	t, $J_{17,18}=6.0$	17-H	C-17, C-19	–
C-19	158.61						
		20-/21-H ₃	7.00–7.78	br	–	–	–

^a Correlations of protons in COSY spectra (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

^b Correlations of protons in HMBC spectra (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

^c Correlations of protons in NOESY spectra (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

data suggested 3,6-substitution of the indole nucleus, positioning a bromo substituent at C-6 (similar to many other indole derivatives identified in marine organisms).⁷ An additional signal at 6.99 ppm indicated a methine group in the 3-position of the indole system (consequently conjugated with another double bond). HMBC spectra showed the presence of a diketopiperazine system attached to the bromoindole via this methine group. NOE data proved the corresponding double bond to be *cis*-configured. All data fitted perfectly those reported for baretin and those of dipodazine **3**, a secondary metabolite isolated from *Penicillium dipodomyis*.^{2,8} In the upfield region, signals caused by protons of a continuous spinsystem (12-H, 13-H, 15-H to 18-H) were found. Chemical shifts of carbon atoms belonging to an aliphatic side chain linked to the diketopiperazine strongly pointed to an arginine substructure.⁹ This assignment was further supported by a broad signal between 7.00 and 7.78 ppm (^1H NMR) representing the terminal amino groups of the guanidino moiety which typically exchange protons. ^1H and ^{13}C NMR data as well as couplings resulting from ^1H – ^1H -COSY, HMBC and NOESY experiments are listed in Table 1.

Acknowledgements

Friederike Hoffmann has kindly determined the species,

Dr. Stephan Franke furnished the HR-ESI-MS. This paper represents publication no. 13 of the research program BOSMAN (03F0256 A-D). Financial support was provided by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

References

1. Raverty, W. D.; Thomson, R. H.; King, T. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 1204–1211.
2. Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Manchand, P. S.; Todaro, L. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3091–3093.
3. Lidgren, G.; Bohlin, L.; Bergmann, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3283–3284.
4. In the chemical literature the sponge is called *Geodia baretii*, while biologists call the species *Geodia barretti* after Lucas Barrett.
5. Lieberknecht, A.; Griesser, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4275–4278.
6. Dinsmore, C. J.; Zartman, C. B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6309–6312.
7. Gribble, G. W. *J. Nat. Prod.* **1992**, *47*, 1353–1395.
8. Soerensen, D.; Larsen, T. O.; Christophersen, C.; Nielsen, P. H.; Anthoni, U. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1181–1183.
9. Kalinowski, H.-O.; Berger, S.; Braun, S. *^{13}C NMR-Spektroskopie*; Georg Thieme: Stuttgart, 1984; p. 208.

E.4 Pape T., Blumenberg M., Thiel V., and Michaelis W. (2002) Bi-
phytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Boll. Mus.*
Ist. biol. Univ. Genova (submitted)

BIPHYTANES AS BIOMARKERS FOR SPONGE ASSOCIATED ARCHAEA

PAPE T.*, BLUMENBERG M.*, THIEL V.** & MICHAELIS W.*

*Institut für Biogeochemie und Meereschemie, Universität Hamburg

**Geowissenschaftliches Zentrum, Abteilung Geobiologie, Universität Göttingen

E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de

ABSTRACT

Various sponges of the classes Hexactinellida and Demospongiae were studied for the presence of archaeal biomarkers. In several species four ether-bound isoprenoids of the biphytane series (C₄₀), which are known as abundant lipid constituents of Archaea, were found. The lack of these biomarkers in some sponges implies, that a prominent influence of dietary plankton has to be excluded, and gives evidence that associations of Archaea and specific sponge taxa are more common than previously thought. Highest concentrations of biphytanes were found in the hexactinellid *Anulosaccus* cf. *mitsukuri* and the demosponge *Phakellia ventilabrum*. The structural characteristics of the biphytanes indicate that these compounds are predominantly of crenarchaeotal origin.

KEYWORDS

biphytanes, Crenarchaeota, Hexactinellida, Demospongiae, biomarker

INTRODUCTION

Sponges (phylum Porifera) are the most primitive metazoans whose origins date back to Precambrian times. Numerous taxa are known to maintain diverse prokaryotic communities (WEBSTER *et al.*, 2001; HENTSCHEL *et al.*, 2002; and refs. cited in either). These prokaryote-eukaryote relationships may have formed an integral part in the metazoan evolution (WILKINSON, 1984; BRUNTON & DIXON, 1994).

In general, sponge associated microorganisms (SAM) are considered to be involved in essential ecological processes, like nutrient acquisition (VACELET *et al.*, 1995), the supply of precursor lipids incorporated into sponge cell membranes (HAHN *et al.*, 1988), or the production of secondary metabolites (for refs. see e.g. WEBSTER & HILL, 2001). In particular, for the Demospongiae numerous studies have shown, that their associated microbiota comprise a variety of phylogenetic groups of the domain Bacteria (WEBSTER *et al.*, 2001; HENTSCHEL *et al.*, 2002; among others). Nevertheless, employing diverse techniques it has been shown, that most sponge specific Bacteria elude traditional cultivation methods. Therefore, the ecological functions of most sponge associated Bacteria are still unclear.

Although frequently attempted by applying different methodological approaches, indications for sponge associated Archaea have been reported rarely (PRESTON *et al.*, 1996; FUERST *et al.*, 1999; MARGOT *et al.*, 2002). Up to now, only members of the Crenarchaeota subgroup have unambiguously been identified in halichondrid demosponges. As indicated by phylogenetic surveys, sponge specific Archaea are close affiliates of pelagic crenarchaeotes. However, representatives of non-thermophilic Crenarchaeota resisted isolation in pure culture so far; thus, their general metabolic capabilities remain unknown.

In a recent comprehensive lipid study of numerous sponges from different geographical settings we frequently identified isoprenoid hydrocarbons diagnostic for Archaea (THIEL *et al.*, 2002). These findings prompted us to focus on the presence of biomarkers highly specific for archaeal subgroups in selected sponges. Further on, the biphytane biomarker concentrations were applied for an estimation of archaeal cells in the sponge tissues.

MATERIALS AND METHODS

The sponges analysed for lipid biomarkers are listed in Tab. I. The specimens were sampled by manned submersibles or by triangular dredge and kept at -20°C immediately upon collection. The tissues examined were drawn from the internal parts of the mesohyl and lyophilized prior to analysis.

The samples (2 to 4 g dry weight) were extracted and lipids separated as previously described (MICHAELIS *et al.*, 2002). Briefly, neutral lipids were extracted and saponified by refluxing in a mixture of KOH in CH₃OH, followed by liquid/liquid extraction with *n*-hexane. Fatty acids were obtained by extraction of the acidified residual phase and subsequently methylated. Double bond positions of fatty acid methyl esters were determined by derivatization to their *n*-acylpyrrolidides. From the neutral lipid fraction polar lipids were separated by thin layer chromatography.

The polar lipid fraction, comprising glycerol dibiphytanyl glycerol tetraethers (GDGTs), was subjected to cleavage of ether bonds (HI) and subsequent reduction (LiAlH₄) of the alkyl iodides to hydrocarbons.

Fatty acid methyl esters and hydrocarbons were analysed by capillary gas chromatography (GC) and combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as described elsewhere (MICHAELIS *et al.*, 2002).

Identifications of organic compounds were based on their relative GC retention times, on coinjection with authentic standards prepared from the hyperthermophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus* (DE ROSA *et al.*, 1986), and on comparison of their mass spectra with those of published data (SCHOUTEN *et al.*, 1998). Concentrations were determined by GC using 5 α (H)-cholestane as an internal standard.

RESULTS

The polar lipids of 9 species of the Hexactinellida and the Demospongiae were analysed for the occurrence of archaeal biomarkers. Four archaeal C₄₀ isoprenoids (biphytanes), deriving from GDGTs, were found in 7 species (Tab. I) of 6 orders after ether bond cleavage. Highest amounts of biphytanes in total were observed in the hexactinellid *A. cf. mitsukuri* (2.4 µg g⁻¹ dry wt.) and the demosponge *P. ventilabrum* (0.8 µg g⁻¹ dry wt.).

Species	Order	Sampling location	Water depth [m]	Abundance [Σ C ₄₀]
Hexactinellida				
<i>Aulosaccus cf. mitsukuri</i>	<i>Lyssakinosida</i>	Isla Bartholome, Galapagos	440	●
<i>Ipheton panicea</i>	<i>Hexactinosida</i>	Turks & Caicos	480	●
<i>Hyalonema (?)</i> sp. 1	<i>Amphidiscosida</i>	Negril, Jamaica	375	tr.
<i>Hyalonema</i> sp. 2	<i>Amphidiscosida</i>	Bahamas, Long Island	800	n.d.
Demospongiae				
<i>Geodia barretti</i>	<i>Astrophorida</i>	Sula-Ridge, Norway	320	n.d.
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	<i>Astrophorida</i>	Korsfjord, Norway	100-200	tr.
<i>Mycale lingua</i>	<i>Poecilosclerida</i>	Sula-Ridge, Norway	290	●
<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Halichondrida</i>	Sula-Ridge, Norway	290	●
<i>Phakellia robusta</i>	<i>Halichondrida</i>	Korsfjord, Norway	100-200	●

Tab. I. Taxonomy, sampling locations of sponges, and occurrences of biphytanes (● = high amounts, tr. = trace, n.d. = not detected)

In all sponges comprising biphytanes, these compounds possessing 0 to 3 cycloalkyl rings (C₄₀₀, C₄₀_I, C₄₀_{II} and C₄₀_{III}) were found (Fig. 1). Our experiments indicated, that the acyclic C₄₀₀ and the cyclopentyl ring containing C₄₀_I and C₄₀_{II} in sponges are structurally identical to those identified in *S. solfataricus*. In contrast, the retention time and mass spectral characteristics of the tricyclic C₄₀_{III} compounds in sponges are different to those found in *S. solfataricus*, suggesting that they are structural isomers (HOEFS *et al.*, 1997; DELONG *et al.*, 1998; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002b).

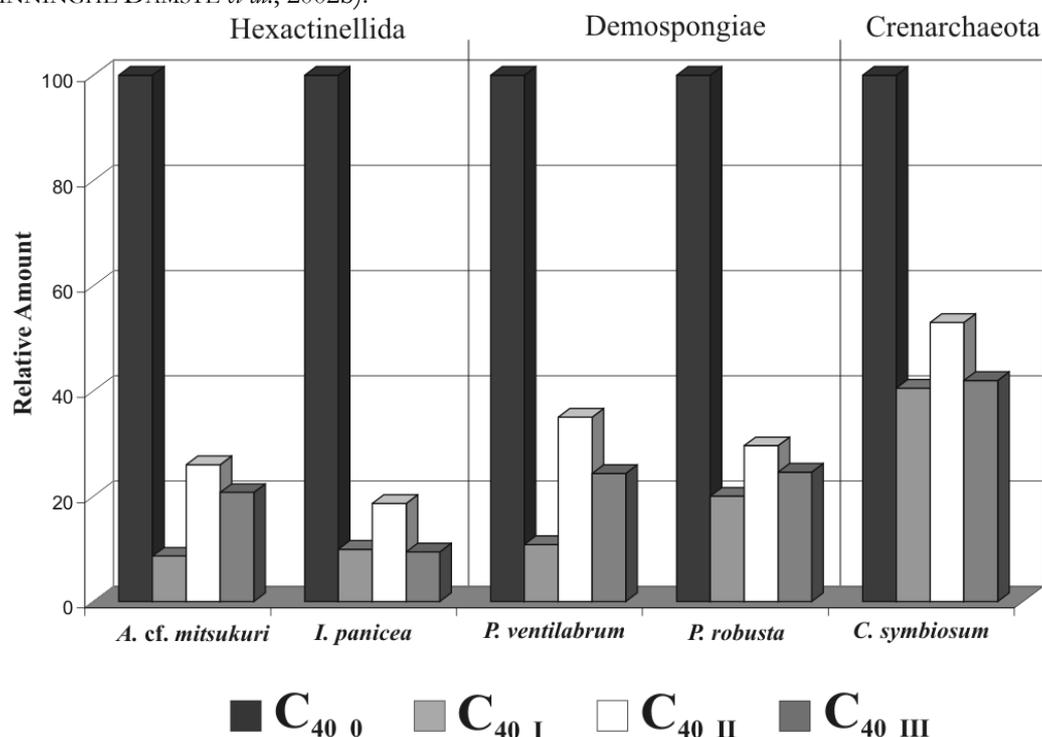


Fig. 1. Abundances of C₄₀₀, C₄₀_I, C₄₀_{II} and C₄₀_{III} (normalized to C₄₀₀) in selected sponges. For comparison abundances in the crenarchaeotal sponge symbiont *C. symbiosum* are shown (data taken from DELONG *et al.*, 1998)

Considering the diverse settings, the qualitative distributions of biphytanes are slightly varying in each sponge, with the acyclic $C_{40\ 0}$ always being the main component followed by the $C_{40\ II}$ homologue (18.6 to 35.0 % relative to the abundance of $C_{40\ 0}$). With one exception (*I. panicea*) the lowest relative abundances were observed for the $C_{40\ I}$ (7.7 to 20 %). Thus, the C_{40} isoprenoid distributions are fairly similar in sponges of different origins and water depth.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

We discovered for the first time ether-derived acyclic ($C_{40\ 0}$) and cyclic ($C_{40\ I\ to\ III}$) biphytanes indicative for Archaea in various sponge orders (Tab. I). These compounds were absent in *Hyalonema* sp. 2 and *Geodia barretti*, suggesting that biphytanes in sponges are sourced by sponge specific Archaea. With regard to our observations, it is remarkable that so far archaeal symbionts were discovered only in halichondrid sponges (PRESTON et al., 1996; MARGOT et al., 2002).

The biosynthesis of bicyclic and tricyclic biphytanes accompanied by the acyclic homologue seems to be diagnostic for the Crenarchaeota subgroup (PEARSON et al., 2001). Indeed, the distribution patterns of biphytanes in the sponges are very similar to those observed in enrichments of the crenarchaeotal sponge symbiont *Cenarcheum symbiosum* (Fig. 1). However, in comparison to *C. symbiosum* a higher relative abundance of the $C_{40\ 0}$ was found in the sponges studied, suggesting an additional contribution by euryarchaeotes (TORNABENE & LANGWORTHY, 1978; KOGA et al., 1993).

Very recently Sinninghe Damsté et al. (2002b) determined by two-dimensional high resolution NMR studies the structure of a GDGT termed crenarchaeol, which is thought to be indicative for pelagic crenarchaeotes. Crenarchaeol comprises a dicyclic and a tricyclic biphytane, the latter possessing two cyclopentyl and one cyclohexyl ring (Fig. 2). The mass spectra of the $C_{40\ III}$ in sponges are similar to those published previously for crenarchaeol derived $C_{40\ III}$ (SCHOUTEN et al., 1998), suggesting that tricyclic biphytanes in our samples emanate from crenarchaeol.

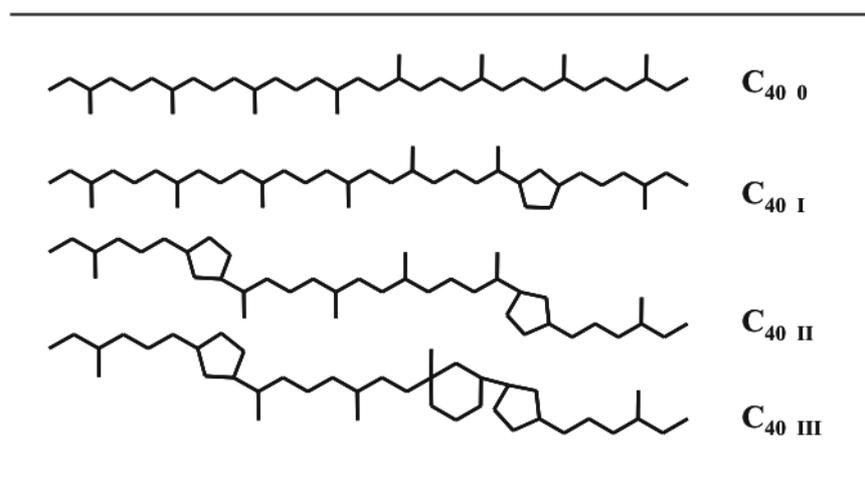


Fig. 2. Structures of biphytanes present in sponges

Based on the total amounts of biphytanes, the minimum portion of archaeal biomass in sponges can be roughly estimated as follows: It is assumed, that one cell of marine Archaea contains 1.0×10^{-15} g GDGT's (SINNINGHE DAMSTÉ et al., 2002a). Considering the quantitative distributions of biphytanes in the sponges examined, one archaeal cell would contain, on average, 0.9×10^{-15} g biphytanes bound in GDGT. For *P. ventilabrum* 0.8×10^{-6} g biphytanes per gram sponge tissue (dry wt.) were measured, which corresponds to about 0.9×10^9 archaeal cells \cdot g⁻¹. Given the cell weight observed for methanogenic Archaea (one cell corresponds to 1.7×10^{-13} g (dry wt.); WHITE et al., 1979), the portion of archaeal biomass in *P. ventilabrum* may be estimated to be $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (dry wt.) sponge tissue.

In comparison, using DAPI staining and microscopic counting, bacterial cells in homogenates of *P. ventilabrum* were calculated to be $2.4 \times 10^{11} \cdot \text{g}^{-1}$ (dry wt.) (*pers. comm. I. Graeber*). Assuming that cells of sponge associated bacteria on average are similar in size and weight to those of the bacterium *Escherichia coli* (one dried cell is equivalent to 1.7×10^{-13} g; (MANCUSO et al., 1990), *P. ventilabrum* would contain about $40.8 \mu\text{g}$ bacterial biomass \cdot g⁻¹ (dry wt.). Thus, it may be concluded that Archaea – though most probably associated to various sponge taxa – in *P. ventilabrum* constitute a comparatively small fraction of SAM.

For a multitude of studies, biomarker analysis has been proven to be an effective and specific tool to document the composition and metabolic capabilities of microorganisms in fossil and recent sample sets. Employing this methodological approach to examine the microbial communities in sponges, our work established for the first time that

- Archaea, as evidenced by the presence of biphytanes, are more common constituents of sponge associated microorganisms than previously thought;
- the distribution of biphytanes in sponges reveals a specific crenarchaeal population in sponges rather than a contribution of pelagic crenarchaeotes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the captain and crew of R.V. 'POSEIDON' as well as K. Hissmann and J. Schauer of the 'JAGO' submersible team for excellent collaboration during field work. We are indebted to Dr. S. Pomponi and Dr. J. Reed for providing sponge samples and taxonomical classification, respectively. Prof. G. Antranikian kindly donated cells of *Sulfolobus solfataricus*.

The valuable assistance in sponge taxonomical work by F. Hoffmann, Prof. J. Reitner and H. T. Rapp is very much appreciated. F. Boenkendorf, K. Peterknecht, S. Beckmann, I. Graeber and I. Kaesler are also thanked for analytical work.

Thanks are also due to the crews of R.V. 'HANS BRATTSTRÖM' and the Marine Biological Station of Bergen University, Norway. Access to these facilities has been supported by the IHP program from the European Union through contract no. HPRI-CT-1999-00056.

This is publication no. 27 of the research program BOSMAN (03F0256A-D). Financial support was provided by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany.

REFERENCES

- BRUNTON F. R., DIXON O. A., 1994 - Siliceous sponge-microbe biotic associations and their recurrence through the Phanerozoic as reef mound constructors. *Palaios* **9**: 370-387.
- DE ROSA M., GAMBACORTA A., GLIOZZI A., 1986 - Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* **50** (1): 70-80.
- DELONG E. F., KING L. L., MASSANA R., CITTONE H., MURRAY A., SCHLEPER C., WAKEHAM S. G., 1998 - Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic Crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (3): 1133-1138.
- FUERST J. A., WEBB R. I., GARSON M. J., HARDY L., REISWIG H. M., 1999 - Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 193-203.
- HAHN S., STOILOV I. L., TAM HA T. B., RAEDERSTORFF D., DOSS G. A., LI H.-T., DJERASSI C., 1988 - Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **110** (24): 8117-8124.
- HENTSCHEL U., HOPKE J., HORN M., FRIEDRICH A. B., WAGNER M., HACKER J., MOORE B. S., 2002 - Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (9): 4431-4440.
- HOEFS M. J. L., SCHOUTEN S., DE LEEUW J. W., KING L. L., WAKEHAM S. G., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., 1997 - Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (8): 3090-3095.
- KOGA Y., NISHIHARA M., MORII H., AKAGAWA-MATSUSHITA M., 1993 - Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol. Rev.* **57** (1): 164-182.
- MANCUSO C. A., FRANZMANN P. D., BURTON H. R., NICHOLS P. D., 1990 - Microbial community structure and biomass estimates of a methanogenic Antarctic Lake ecosystem as determined by phospholipid analyses. *Microb. Ecol.* **19**: 73-95.
- MARGOT H., ACEBAL C., TORIL E., AMILS R., FERNANDEZ PUENTES J. L., 2002 - Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* **140**: 739-745.
- MICHAELIS W., SEIFERT R., NAUHAUS K., TREUDE T., THIEL V., BLUMENBERG M., KNITTEL K., GIESEKE A., PETERKNECHT K., PAPE T., BOETIUS A., AMANN R., JØRGENSEN B.-B., WIDDEL F., PECKMANN J., PIMENOV N. V., GULIN M. B., 2002 - Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297** (5583): 1013-1015; *supporting online material*.
- PEARSON A., MCNICHOL A. P., BENITEZ-NELSON B. C., HAYES J. M., EGLINTON G., 2001 - Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediments: A case study using compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (18): 3123-3137.
- PRESTON C. M., WU K. Y., MOLINSKI T. F., DELONG E. F., 1996 - A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbosium* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6241-6246.
- SCHOUTEN S., HOEFS M. J. L., KOOPMANS M. P., BOSCH H.-J., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., 1998 - Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Org. Geochem.* **29** (5-7): 1305-1319.
- SINNINGHE DAMSTÉ J. S., RIJPSMA W. I. C., HOPMANS E. C., PRAHL F. G., WAKEHAM S. G., SCHOUTEN S., 2002a - Distribution of membrane lipids of planktonic *Crenarchaeota* in the Arabian Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (6): 2997 - 3002.
- SINNINGHE DAMSTÉ J. S., SCHOUTEN S., HOPMANS E. C., VAN DUIN A. C. T., GEENEVASEN J. A. J., 2002b - Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid Res.* **43**: 1641-1654.
- THIEL V., BLUMENBERG M., HEFTER J., PAPE T., POMPONI S. A., REED J., REITNER J., WÖRHEIDE G., MICHAELIS W., 2002 - A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**: 60-66.

- TORNABENE T. G., LANGWORTHY T. A., 1978 - Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* **203**: 51-53.
- VACELET J., BOURY-ESNAULT N., FIALA-MEDIONI A., FISHER C. R., 1995 - A methanotrophic carnivorous sponge. *Nature* **377**: 296.
- WEBSTER N. S., HILL R. T., 2001 - The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**: 843-851.
- WEBSTER N. S., WILSON K. J., BLACKALL L. L., HILL R. T., 2001 - Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (1): 434-444.
- WHITE D. C., DAVIS W. M., NICKELS J. S., KING J. D., BOBBIE R. J., 1979 - Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- WILKINSON C. R., 1984 - Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbiosis in marine sponges. *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**: 509-517.