

Peter Proksch

Naturstoffe aus Meerestieren – von der Ökologie zur Anwendung als Arzneimittel

Einleitung

Unter den verschiedenen Quellen für die Suche nach neuen Arzneimitteln zur Therapie von Krankheiten und Verletzungen nehmen Substanzen aus der belebten Natur, die so genannten Naturstoffe, eine herausragende Stelle ein. Etwa ein Drittel unserer derzeit verfügbaren Arzneistoffe besteht aus Naturstoffen oder wurde auf Grund von Leitstrukturen aus der Natur entwickelt. Traditionell spielen höhere Pflanzen als Quelle von Arzneistoffen dabei eine besonders wichtige Rolle. Die Verwendung von Arzneipflanzen lässt sich weit in der Menschheitsgeschichte zurückverfolgen, wie z. B. Grabbeigaben belegen. Auch ist die Verwendung von Pflanzen für arzneiliche Zwecke keineswegs auf den Menschen beschränkt, sondern wird z. B. auch bei frei lebenden Menschenaffen (u. a. für die Behandlung von Wunden oder bei Befall durch Darmparasiten) beobachtet.

Mit der Entwicklung der ersten Antibiotika, wie z. B. des Penicillins und des Streptomycins um die Mitte des letzten Jahrhunderts, rückten Mikroorganismen als Arzneistoffquellen in den Vordergrund. Die Erfolge in der Bekämpfung vieler bis dahin tödlich verlaufender Infektionskrankheiten wurden erst durch die Entdeckung antibiotisch aktiver bakterieller oder pilzlicher Naturstoffe ermöglicht.

Erstaunlicherweise jedoch stammen nahezu alle bis zum heutigen Tag aus der Natur entwickelten Arzneistoffe ausschließlich aus solchen Organismen, die auf dem Land leben (so genannte terrestrische Organismen), obwohl doch ca. 70 Prozent der Erdoberfläche durch die Ozeane bedeckt sind und die Weltmeere eine immense Vielfalt an Lebensformen beherbergen. Von jeher spielen die Meere eine wichtige Rolle für die Ernährung des Menschen, als Quelle für Arzneistoffe blieben sie dagegen über eine lange Zeit hinweg unberücksichtigt.

Dieser Zustand änderte sich zu Beginn der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts, als Bergmann und Feeney 1951 erstmals ungewöhnliche Nucleoside namens Spongouridin und Spongothymidin aus dem Meeresschwamm *Cryptotethya crypta* isolierten.¹ Nucleoside sind Bausteine von Nucleinsäuren. Die aus dem Schwamm isolierten Verbindungen weichen von den in menschlichen Zellen vorkommenden Nucleosiden jedoch durch bestimmte strukturelle Merkmale ab. Dies führt dazu, dass es in Anwesenheit solcher Nucleosid-Analoga zu einem Abbruch der Nucleinsäure-Synthese kommt, was man sich heutzutage gezielt für die Behandlung von Krebserkrankungen bzw. von viralen Infektionen zu Nutze macht. Die Entdeckung des Spongouridins und Spongothymidins aus Schwämmen führte zur Entwicklung von antiviralen Arzneistoffen wie dem Aciclovir, das z. B. zur Behandlung von Herpesinfektionen eingesetzt wird. Das darauf erwachende Interesse an pharmakologisch aktiven marinen Naturstoffen wurde nochmals verstärkt durch

¹ Vgl. Bergmann und Feeney (1951).

die Entdeckung von Prostaglandinderivaten in der karibischen Weichkoralle *Plexaura homomalla*² zu einer Zeit, als die Bedeutung der Prostaglandine als wichtige Mediatorstoffe z. B. für die Entstehung von Fieber und Entzündungen gerade erkannt worden war.

Seitdem sind etwa 30 Jahre vergangen, während derer die Zahl bekannter Naturstoffe aus marinen Organismen auf weit über 10.000 angewachsen ist. Die Fortschritte in der Auffindung, Isolierung und strukturellen Identifizierung mariner Naturstoffe hängen unmittelbar mit Weiterentwicklungen der Tauchtechnik zusammen, die es marinen Biologen und Naturstoffforschern gestatten, sich routinemäßig zumindest bis in Wassertiefen von ca. 40 Meter vorzuwagen und ihre Forschungsobjekte in ihrer natürlichen Umgebung zu beobachten, sowie mit Fortschritten in der Spektroskopie von Naturstoffen, die es ermöglichen, auch die häufig besonders komplexen Strukturen mariner Naturstoffe aufzuklären.

Schaut man sich diejenigen Organismengruppen an, die auf dem Land bzw. im Meer bislang die meisten biologisch aktiven Naturstoffe hervorgebracht haben, so tun sich deutliche Unterschiede auf: In der Gruppe terrestrischer Organismen sind ganz eindeutig die höheren Pflanzen an erster Stelle zu nennen. Im Meer dagegen sind Wirbellose (so genannte Invertebraten), wie z. B. Schwämme, Tunikaten oder (zumeist schalenlose) Schnecken, deutlich vor den Algen die reichsten Naturstoffquellen. Dies wird sofort klar, wenn man diejenigen marinen Naturstoffe, die sich gegenwärtig in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung befinden, und ihre Herkunft betrachtet: Von den etwa 13 derzeit in klinischer Prüfung befindlichen marinen Naturstoffen (oder Naturstoffanaloga) stammen zwölf aus Invertebraten, lediglich eine Verbindung, das Squalamin-Lactat, wird aus Haien als Vertretern mariner Wirbeltiere gewonnen.³ Am weitesten in der Arzneistoffentwicklung fortgeschritten sind von den erwähnten 13 Verbindungen das Ziconotid sowie das Ecteinascidin 743 (ET 743). Beim Ziconotid handelt es sich um ein neuartiges Schmerzmittel, das aus dem Gift mariner Kegelschnecken (*Conus*-Arten) stammt und von den Fische jagenden Schnecken zum Lähmen ihrer Beutetiere verwendet wird, während das ET 743 aus marinen Tunikaten gewonnen wird und zukünftig als neues Medikament zur Chemotherapie von verschiedenen Tumorerkrankungen dienen soll.⁴

Wenn wir von marinen wirbellosen Organismen, wie z. B. Schwämmen, als Quellen von pharmakologisch aktiven Naturstoffen sprechen, müssen wir uns vergegenwärtigen, dass diese niederen Tiere in der Regel immer in einer komplexen, bis heute kaum verstandenen Lebensgemeinschaft mit diversen Mikroorganismen (meist Bakterien bzw. Cyanobakterien) leben, die, wie wir später noch sehen werden, zum Teil einen beträchtlichen Anteil an der Biomasse ihrer Wirte ausmachen. Die Vermutung ist nahe liegend, dass diese mit Schwämmen und anderen Invertebraten assoziiert lebenden Prokaryoten auch einen Beitrag zum Naturstoffmuster des gesamten Organismus durch eigenständige Biosyntheseleistungen liefern.⁵ In der Tat erscheint diese Hypothese glaubhaft, wenn man sich auffallende strukturelle Analogien zwischen Naturstoffen aus marinen Invertebraten und aus Bakterien bekannten Verbindungen anschaut⁶ oder versucht, der Frage nach den

² Vgl. Weinheimer und Spraggins (1969).

³ Vgl. Proksch *et al.* (2002).

⁴ Vgl. Proksch *et al.* (2002).

⁵ Vgl. Proksch *et al.* (2002).

⁶ Siehe hierzu auch weiter unten den Teil: „Staurosporinderivate aus der Seescheide *Eudistoma toalensis* und dem Plattwurm *Pseudoceros* sp.“.

eigentlichen Produzenten der Verbindungen durch Untersuchungen zur Lokalisierung der betreffenden Substanzen, z. B. in Schwämmen, nachzugehen.⁷

Unabhängig von der vermuteten Rolle von Prokaryoten an der Naturstoffausstattung von marinen Invertebraten ist es jedoch zunächst überraschend, dass im Meer die Mehrzahl pharmakologisch aktiver Naturstoffe aus Tieren und nicht, wie auf dem Land üblich, aus Pflanzen isoliert wird. Eine einleuchtende Erklärung für das gehäufte Auftreten bioaktiver Naturstoffe in wirbellosen Organismen liegt in der Ökologie dieser vielfältigen Organismen begründet. Marine Invertebraten, wie z. B. Schwämme oder Tunikaten, sind ähnlich wie Pflanzen sessile Organismen, die auch bei Angriff eines Feindes nicht zur Flucht befähigt sind und ferner über keinen schützenden Panzer oder andere morphologische Schutzmechanismen verfügen. Viele Schwämme oder andere Invertebraten leben darüber hinaus exponiert auf Felsen oder Korallenriffen und sind daher z. B. für Fische meist leicht zu entdecken. Ferner stellen gerade Schwämme für carnivore Organismen auf Grund ihrer hohen Stickstoffgehalte im Meer, wo der Stickstoffgehalt zu den limitierenden Faktoren zählt, eine metabolisch lohnende Nahrungsquelle dar. Woran liegt es dann, dass Schwämme und andere marine Invertebraten von den meisten Fischen in der Regel gemieden werden? Die Antwort liegt eindeutig in den Naturstoffen dieser Organismen, die oft fraßhemmend wirken und/oder toxische Eigenschaften besitzen und auf diese Weise ihre Produzenten wirksam vor möglichen Gefahren aus ihrer Umwelt schützen. Die Erforschung der vielfältigen Wechselwirkungen zwischen marinen Invertebraten und räuberischen Fischen und anderen Fressfeinden ist ein faszinierendes Kapitel aus dem Bereich der Chemischen Ökologie, die sich die Erforschung von stofflich bedingten Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen zur Aufgabe gemacht hat. Gleichzeitig ermöglicht die ökologische Betrachtung mariner Naturstoffe unter funktionellen Gesichtspunkten eine rationale Auswahl mariner Organismen für ein Wirkstoffscreening unter pharmazeutisch-medizinischen Gesichtspunkten, da wichtige intrazelluläre Signalketten (mithin Zielmoleküle für Arzneistofftherapien) während der Evolution oft beibehalten wurden. Ich möchte in diesem Beitrag Beispiele aus unserer eigenen wissenschaftlichen Arbeit mit marinen Naturstoffen vorstellen, die dem Leser zum einen die postulierte ökologische Funktion dieser Verbindungen vor Augen führen und zum anderen die erwähnte Parallelität zwischen Ökologie und pharmazeutischer Wirkstoffsuche beleuchten sollen. Im letzten Teil dieses Beitrages möchte ich einige Untersuchungen aufführen, die zur Verdeutlichung der Rolle von prokaryotischen Symbionten an der Biosynthese von Naturstoffen in Schwämmen und anderen Invertebraten dienen und neben der chemischen auch die biologische Komplexität der vorgestellten Organismen darstellen sollen.

Pyridoacridinalkaloide und die chemische Verteidigung tropischer Oceanapia-Schwämme

Schwämme der Gattung *Oceanapia* gehören im Indopazifischen sowie im Pazifischen Ozean zu den häufiger vorkommenden Schwammarten. Im Rahmen unserer Untersuchungen zur chemischen Ökologie tropischer Schwämme fiel der bisher taxonomisch unbeschriebene Schwamm *Oceanapia* sp. auf, der in Mikronesien (Insel Truk) in wenigen Me-

⁷ Siehe hierzu auch weiter unten den Teil: „Hinweise zur Beteiligung von endosymbiontischen Bakterien an der Naturstoffbiosynthese in marinen Schwämmen und Bryozoen“.

tern Wassertiefe auf sandigem Grund vorkommt. Der Schwamm wurde von den zahlreich vorkommenden Fischen offensichtlich gemieden. Ein Biotest am Standort des Schwammes, bei dem ein Lösungsmittel-extrakt von *Oceanapia* sp. in physiologischer Konzentration in künstliches Fischfutter eingearbeitet und anschließend unter Wasser gemeinsam mit unbehandelten Kontrollen den am Standort des Schwammes vorkommenden Fischen angeboten wurde, bestätigte unsere anfängliche Vermutung: Die mit dem Schwammextrakt behandelten Futterstücke wurden klar gemieden, während die Kontrollstücke gefressen wurden.⁸ Die von Biotests begleitete Fraktionierung des Schwammextraktes resultierte in der Isolierung von Pyridoacridinalkaloiden, wie z. B. dem Kuanoniamin C und D, als den maßgeblichen Verbindungen für die fraßhemmende Wirkung des Extraktes. Beide Alkaloide, die auch die Pigmente des rot gefärbten Schwammes darstellen, erwiesen sich in Fraßversuchen am Standort von *Oceanapia* sp. in den gleichen Konzentrationen wie im Schwamm vorliegend als stark fraßhemmend gegenüber der natürlich vorkommenden Fischgesellschaft.⁹ Selbst auf Schwämme spezialisierte Fische, wie z. B. der Kaiserfisch *Pomacanthus imperator*, wurden in Aquarienversuchen durch die Anwesenheit von Kuanoniaminen im Fischfutter abgeschreckt.

Betrachtet man den Schwamm *Oceanapia* sp. genauer, so stellt man fest, dass lediglich ein relativ kleiner Teil des Schwammkörpers (der Schlot zum Einstrudeln der Nahrung sowie das „Capitum“, ein kugelig terminaler Abschnitt des Schlotes, der zur vegetativen Verbreitung dient) in das Wasser hineinragt, der weitaus größere Teil des Schwammes jedoch im sandigen Substrat verborgen lebt und im Vergleich zu den oben genannten exponierten Schwammteilen versteckt und damit vor Fischen geschützt ist. Die Alkaloidkonzentrationen in den verschiedenen Schwammteilen spiegeln dies wider: Die im Sand verborgene Basis des Schwammes verfügt lediglich über eine Gesamtalkaloidkonzentration von ca. 0,8 Prozent bezogen auf das Trockengewicht. Die in das Wasser hineinragenden Schwammteile hingegen weisen deutlich höhere Alkaloidkonzentrationen auf. Im Fall der Schlote und der Capita werden Konzentrationen an Kuanoniaminen gemessen, die bis zu fünf Prozent des Trockengewichtes erreichen können.¹⁰ Besonders gefährdete Schwammteile werden mithin durch die Akkumulation besonders hoher Alkaloidkonzentrationen geschützt – eine Beobachtung, die dem eigentlich für Pflanzen aufgestellten „Plant Appearance Model“ bzw. der „Optimal Defense Theory“ entspricht.¹¹ Beide Theorien postulieren eine positive Korrelation zwischen chemischer Verteidigung und der Gefahr, von Fressfeinden gefunden zu werden, bzw. sagen aus, dass wichtige Pflanzenorgane (z. B. für die sexuelle oder vegetative Vermehrung grundlegende Strukturen) durch Akkumulation hoher Naturstoffkonzentrationen besonders wirksam vor dem Angriff von Fressfeinden geschützt werden. Offensichtlich kann auch die Alkaloidverteilung im Schwamm *Oceanapia* sp. gut durch die beiden genannten Modelle erklärt werden.

⁸ Vgl. Schupp *et al.* (1999a).

⁹ Vgl. Schupp *et al.* (1999a).

¹⁰ Vgl. Schupp *et al.* (1999a).

¹¹ Vgl. Feeny (1976) und Rhoades und Cates (1976).

Staurosporinderivate aus der Seescheide *Eudistoma toalensis* und dem Plattwurm *Pseudoceros* sp.

Wiederum in Mikronesien, diesmal jedoch in einem Mangrovensumpf auf Truk, wurden wir auf die Seescheide *Eudistoma toalensis* aufmerksam, die als weiches, watteähnliches Gebilde auf den unter Wasser befindlichen Wurzeln von Mangroven wächst.¹² Die Seescheide wies, wie zuvor der Schwamm *Oceanapia* sp., keine erkennbaren Fraßspuren von Fischen auf. Lediglich Exemplare des marinen Plattwurms *Pseudoceros* sp. wurden auf der Seescheide gefunden. Basierend auf den Unterwasserbeobachtungen vor Ort lag auch in diesem Fall die Vermutung nahe, dass *E. toalensis* über einen Fraßschutz gegenüber Fischen verfügt. Da keinerlei morphologische Abwehrmechanismen erkennbar waren, konnte auch hier die Abwehr nur eine chemische sein. Wir überprüften diese Hypothese durch einen Biotest am Standort von *E. toalensis*, indem wir einen Lösungsmittelextrakt der Seescheide in physiologischer Konzentration in künstliches Fischfutter einarbeiteten und anschließend den im Mangrovensumpf vorkommenden Fischen gemeinsam mit unbehandelten Futterstücken anboten. In diesem Wahlversuch entschieden sich die Fische in hoch signifikanter Weise für die unbehandelten Futterstücke, was unsere Hypothese zur chemischen Abwehr von *E. toalensis* untermauerte.

Durch Fraktionierung des Seescheidenextraktes gelang die Isolierung mehrerer Staurosporinderivate.¹³ Das Staurosporin wurde erstmals 1977 durch Omura *et al.* aus Actinomyceten, wie *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *Staurosporea*, isoliert.¹⁴ In den vergangenen Jahren konnten Staurosporinderivate, die bislang ausschließlich als mikrobielle Naturstoffe galten, auch aus mehreren marinen Invertebraten, u. a. aus Seescheiden und Schnecken, isoliert werden. Diese Organismen sind ebenso wie *E. toalensis* Nahrungsfiltrierer und filtern aus dem Seewasser Bakterien und Detrituspartikel. Es ist daher denkbar, dass typische mikrobielle Metabolite wie die Staurosporine, obwohl sie in Invertebraten gefunden werden, nicht von diesen im Rahmen der Biosynthese gebildet werden, sondern auf eingestrudelte Bakterien zurückgeführt werden können. Eine Alternative zu dieser Hypothese, die das wiederholte Auffinden von strukturell sehr unterschiedlichen bekannten bakteriellen Naturstoffen in marinen Tunikaten, Schnecken oder Schwämmen erklärt, sieht in Bakterien, die als Endosymbionten in vielen marinen Invertebraten leben,¹⁵ die eigentlichen Produzenten dieser ungewöhnlichen und für Eukaryonten unerwarteten Naturstoffe.¹⁶ Für die erste der beiden genannten Hypothesen (Aufnahme und Speicherung von Naturstoffen über die Nahrungskette) gibt es bereits Beweise in Bezug auf andere marine Invertebraten. So konnte z. B. gezeigt werden, dass der Proteinphosphatase-Hemmstoff Okadainsäure, der erstmals aus Schwämmen isoliert wurde, ursprünglich auf Dinoflagellaten zurückgeht, die von den Schwämmen eingestrudelt werden.¹⁷ Die zweite Hypothese (Biosynthese von Naturstoffen in Invertebraten durch endosymbiontische Mikroorganismen) ist experimentell wesentlich schwerer zu belegen, da es bislang nicht gelungen ist,

¹² Vgl. Schupp *et al.* (1999b).

¹³ Vgl. Schupp *et al.* (1999b) und Schupp *et al.* (2002).

¹⁴ Vgl. Omura *et al.* (1977).

¹⁵ Vgl. z. B. Thoms *et al.* (2003).

¹⁶ Vgl. Proksch *et al.* (2002).

¹⁷ Vgl. Murakami *et al.* (1982).

endosymbiontische Bakterien z. B. aus Schwämmen zu isolieren und sie unabhängig von ihren Wirten zu kultivieren.¹⁸

Eine von beiden Hypothesen könnte zweifellos auch das Vorkommen von Staurosporinen in der Seescheide *E. toealensis* erklären. Interessanterweise werden Staurosporin und mehrere seiner Derivate jedoch nicht nur in den Seescheiden, sondern auch in den auf den Seescheiden beobachteten Plattwürmern *Pseudoceros* sp. nachgewiesen. Ein Extrakt aus den Plattwürmern hatte sich in den zuvor geschilderten Wahlversuchen mit Fischen ebenso wie der Extrakt aus der Seescheide als stark fraßhemmend erwiesen. Die Naturstoffanalyse des Plattwurmextraktes zeigte, dass auch in den Plattwürmern das gleiche Spektrum an Staurosporinderivaten vorlag wie zuvor in der Seescheide gefunden. Offensichtlich hatten die Plattwürmer die Staurosporine aus der Seescheide aufgenommen und sogar angereichert, da die Gesamtkonzentration an Staurosporinen in den Plattwürmern deutlich höher war als in der Seescheide. Zumindest in den Plattwürmern reicht die Konzentration an Staurosporinen aus, um Fische abzuschrecken, wie Fischfütterungsversuche am natürlichen Fundort von *E. toealensis* und *Pseudoceros* sp. ergaben. Dies trifft jedoch nicht für die Seescheiden zu. Hier reichen die Staurosporinkonzentrationen nicht aus, um einen effektiven Fraßschutz zu gewährleisten. Da der Extrakt der Seescheide dennoch signifikant fraßhemmend war, muss in diesem Fall das Vorhandensein weiterer, bisher nicht identifizierter Schutzstoffe postuliert werden, die es zu finden gilt.

Das Vorkommen von Staurosporinen in Seescheide und Plattwurm ist ein gutes Beispiel für die in der Einleitung erwähnte und oft zu beobachtende Korrelation zwischen ökologischer Funktion und pharmakologischer Aktivität von marinen Naturstoffen. So erweisen sich Staurosporin und seine Analoga nicht nur als fraßhemmend gegenüber Fischen, sondern sind darüber hinaus auch sehr wirksame Hemmstoffe von Proteinkinasen, wie z. B. der Proteinkinase C.¹⁹ Die Proteinkinase C mit ihren verschiedenen Isoformen stellt ein interessantes Zielmolekül für die Krebstherapie dar. Ein Staurosporin-Analogon, das 7-Hydroxystaurosporin, befindet sich auf Grund seiner Kinase-Hemmwirkung derzeit in der klinischen Prüfung als potentieller neuer Wirkstoff für die Chemotherapie bei Krebserkrankungen.²⁰

Bromierte Isoxazolinalkaloide in den mediterranen Schwämmen *Aplysina aerophoba* und *Aplysina cavernicola*

Beispiele für die ökologische Bedeutung mariner Naturstoffe im Rahmen der Wechselwirkung von Invertebraten und möglichen Fressfeinden, wie z. B. Fischen, finden sich jedoch nicht nur in den Tropen, sondern auch in den gemäßigten Breiten, wie z. B. im Mittelmeer. Ein gutes Beispiel hierfür liefern Schwämme der Gattung *Aplysina*, die im Mittelmeer mit den beiden Arten *A. aerophoba* und *A. cavernicola* vertreten ist. *A. aerophoba* gehört zu den häufigeren Schwammarten des Mittelmeeres und wird bereits in Wassertiefen ab ca. 0,5 Meter angetroffen. Die verwandte Art *A. cavernicola* besiedelt vornehmlich größere Tiefen und lebt häufig in Höhlen oder unter felsigen Überhängen.

¹⁸ Siehe hierzu aber weiter unten den Teil: „Hinweise zur Beteiligung von endosymbiontischen Bakterien an der Naturstoffbiosynthese in marinen Schwämmen und Bryozoen“.

¹⁹ Vgl. Tamaoki *et al.* (1986).

²⁰ Vgl. Akiyama *et al.* (1999).

Beide *Aplysina*-Arten akkumulieren strukturell ungewöhnliche, dibromierte Isoxazolinalkaloide, wie z. B. das Aerophobin-2 oder das Isofistularin-3, die nur in der Schwammordnung *Verongida* angetroffen werden. Diese biogenetisch aus dem Tyrosin und einem biogenen Amin hervorgegangenen marinen Alkaloide werden von den Schwämmen in Konzentrationen bis zu zehn Prozent ihres Trockengewichtes akkumuliert. Verletzt man die Schwämme mechanisch, so kommt es im verwundeten Gewebe durch Zusammenbrechen der intrazellulären Kompartimentierung zu einer schnellen, enzymkatalysierten Biotransformation, während derer die Isoxazolinalkaloide unter Ringöffnung gespalten werden und das Aeroplysinin-1 entsteht. Letzteres wird in einer zweiten Reaktion zum Dienon umgewandelt.²¹ Sowohl das Aeroplysinin-1 als auch das Dienon zeichnen sich durch eine starke antibakterielle Wirkung gegenüber marinen Bakterien aus und wirken ferner cytostatisch.²² Beide Wirkungen dürften für den Wundschutz nach einer Verletzung des Schwammgewebes wichtig sein, indem sie das Eindringen von pathogenen Keimen verhindern. Die cytostatische Wirkung des Aeroplysinin-1 erstreckt sich auch auf menschliche Krebszellen und hindert diese am Wachstum. Es konnte gezeigt werden, dass Aeroplysinin-1 ein potenter Inhibitor vom EGF-Rezeptor abhängigen Tyrosinkinase ist, einer Gruppe von Proteinkinase, die am Entstehen von Krebserkrankungen beteiligt ist.²³ Die nativen Schwammalkaloide, wie z. B. das Aerophobin-2, das in beiden Schwammarten vorkommt, oder das Aerothionin, das lediglich in *A. cavernicola* akkumuliert, weisen fraßhemmende Wirkung gegenüber marinen Fischen, wie z. B. *Blennius sphinx* oder *Thalassoma*-Arten, auf, besitzen dafür aber keine antibakterielle oder cytostatische Wirkung.

Wie so häufig im Rahmen von Räuber-Beute-Beziehungen zu beobachten, gibt es jedoch auch im Fall von *Aplysina*-Schwämmen spezialisierte Räuber, die es geschafft haben, die Giftbarriere ihrer Beuteorganismen zu überwinden und sich dadurch im Vergleich zu nicht angepassten Räubern eine ökologische Nische zu erobern. Ein solcher auf *Aplysina*-Schwämme spezialisierter Fressfeind ist die Meeresschnecke *Tyrodina perversa*, die insbesondere auf *A. aerophoba* häufig anzutreffen ist und zum Teil tiefe Löcher in das Schwammgewebe frisst. Die Schnecken nehmen über die Schwammnahrung die bromierten Isoxazolinalkaloide auf, die sie anschließend über den ganzen Weichkörper verteilen. Die höchsten Alkaloidkonzentrationen finden sich anschließend im Mantelgewebe sowie auch in den Eigelegen.²⁴ Die Alkaloide werden so an die Nachkommenschaft weitergegeben. Unklar ist noch, ob auch die Veliger-Larven Alkaloide aufweisen oder ob die Verbindungen in den Eihüllen verbleiben. Auf Grund von Fischfütterungsversuchen mit Extrakten aus *T. perversa* ist klar, dass auch die Schnecken einen chemischen Fraßschutz vor Fischen genießen.²⁵ Es ist naheliegend anzunehmen, dass dieser Fraßschutz durch die über die Nahrung aufgenommenen Schwammalkaloide vermittelt wird, genaue Untersuchungen hierzu fehlen aber noch.

Offen ist weiterhin die Frage, ob und inwieweit die in *Aplysina*-Schwämmen besonders zahlreich vorkommenden assoziierten Mikroorganismen an der Biosynthese der bromierten Isoxazolinalkaloide beteiligt sind. Immerhin belegen elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass bis zu 40 Prozent der Biomasse dieser Schwämme aus Bakterien besteht,

²¹ Vgl. Ebel *et al.* (1997).

²² Vgl. Teeyapant *et al.* (1993) und Weiss *et al.* (1996).

²³ Vgl. Kreuter *et al.* (1992).

²⁴ Vgl. Ebel *et al.* (1999).

²⁵ Vgl. Becerro *et al.* (2003).

die zum größten Teil extrazellulär, aber auch in den Schwammzellen selbst nachgewiesen werden können.²⁶ Früher war man in Bezug auf die taxonomische Zuordnung und Charakterisierung von Bakterien-Assoziaten in marinen Schwämmen oder in anderen Invertebraten ausschließlich auf die Kultivierbarkeit der betreffenden Mikroorganismen oder, bei nicht kultivierbaren Bakterien, auf eine grobe morphologische Charakterisierung mittels mikroskopischer Methoden angewiesen. Dies erwies sich oft als völlig unzureichend. Zum einen gibt die morphologische Plastizität von Bakterien keineswegs ihre tatsächliche taxonomische Diversität wieder, zum anderen ist in der Regel nur ein sehr kleiner Prozentsatz der tatsächlich in Schwämmen vorkommenden Bakterien mit den derzeit zur Verfügung stehenden mikrobiologischen Methoden kultivierbar. Im Fall von *A. aerophoba* erwiesen sich zum Beispiel weniger als ein Prozent der tatsächlich im Schwamm vorkommenden Bakterien als kultivierbar.²⁷

Ein wichtiger methodischer Durchbruch in der taxonomischen Charakterisierung von bakteriellen Lebensgemeinschaften, der unabhängig von der Kultivierbarkeit der betreffenden Mikroorganismen ist, wurde durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden, wie z. B. der *In-situ*-Hybridisierung mittels fluoreszenzmarkierter Oligonucleotidsonden, erreicht, die spezifisch an die 16S-rRNA von Bakterien binden.²⁸ In einer der ersten Untersuchungen zur bakteriellen Diversität in marinen Schwämmen, die sich dieser kultivierungsunabhängigen Methode bediente, untersuchten Friedrich *et al.* (1999) und Friedrich *et al.* (2001) die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in *A. aerophoba* und *A. cavernicola*. Beide Schwämme waren sich in Bezug auf ihre assoziierten Bakterien sehr ähnlich. Delta-Proteobakterien dominierten jeweils, gefolgt von Bakterien mit hohem GC-Gehalten, gamma-Proteobakterien und solchen des Bacteroides Clusters.

Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften in *A. aerophoba* und *A. cavernicola* ist bemerkenswert stabil und unabhängig von äußeren Faktoren. Im Rahmen von Transplantationsversuchen, die vor Elba durchgeführt wurden, wurden Exemplare von *A. cavernicola* in 40 Meter Tiefe schonend gesammelt und anschließend in 7, 12 und 15 Meter Wassertiefe wieder auf dem Substrat verankert. Nach drei Monaten wurden die transplantierten Schwämme sowie die Schwämme vom Originalstandort gesammelt und auf ihre Bakteriengesellschaften mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) von PCR-amplifizierten partiellen 16S rRNA Gensequenzen untersucht.²⁹ Ein Vergleich der Bandenmuster in der DGGE von Schwämmen des Originalstandortes (40 Meter Wassertiefe) mit denen der transplantierten Schwämme ergab eine erstaunlich hohe Übereinstimmung, die auf eine bemerkenswerte Konstanz der Bakteriengemeinschaften unabhängig von äußeren Faktoren, wie z. B. Licht und Strömungsverhältnisse, schließen lässt. Auch die Alkaloidmuster der verschiedenen Schwämme waren konstant und zeigten während der Dauer des Experimentes keine Beeinflussung durch Umweltfaktoren. Insgesamt wurden sieben bei den verschiedenen Schwammproben konstant auftretende Banden aus den DGGE-Gelen sequenziert. Ein Vergleich der erhaltenen Gensequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken ergab ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Acidobakterien nahestehenden Bakterien, die bisher ausschließlich in den Schwämmen *Theo-*

²⁶ Vgl. Friedrich *et al.* (1999).

²⁷ Vgl. Friedrich *et al.* (2001).

²⁸ Vgl. Friedrich *et al.* (1999), Friedrich *et al.* (2001) und Hentschel *et al.* (2001).

²⁹ Vgl. Thoms *et al.* (2003).

nella swinhoei und *A. aerophoba* und sonst in keiner anderen marinen Quelle nachgewiesen werden konnten.³⁰ Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Bakterien um schwammspezifische mikrobielle Symbionten handelt. Ob diese oder andere in *Aplysina*-Schwämmen vorkommenden mikrobiellen Symbionten an der Biosynthese der bromierten Isoxazolinalkaloide beteiligt sind, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch offen.

Hinweise zur Beteiligung von endosymbiontischen Bakterien an der Naturstoffbiosynthese in marinen Schwämmen und Bryozoen

In anderen Fällen ist unser Wissen um eine Beteiligung von Bakterien an der Biosynthese von biologisch aktiven Naturstoffen in marinen Schwämmen und anderen Invertebraten wesentlich konkreter als bei *Aplysina*-Schwämmen. Ein Beispiel hierfür ist der oben bereits genannte Schwamm *Theonella swinhoei*, der im Pazifik und im Indopazifik vorkommt. Exemplare des Schwammes, die bei den Philippinen und in Mikronesien gesammelt wurden, weisen u. a. das cyclische Peptid Theopalauamid sowie das Makrolid Swinholid A auf. Während das Theopalauamid inhibierend auf das Wachstum von Pilzen wirkt, zeichnet sich das Swinholid A durch starke cytotoxische Aktivität aus. Nach mechanischem Aufschluss des Schwammgewebes konnten mittels differentieller Zentrifugation verschiedene Zellfraktionen erhalten werden, die aus schwammassoziierten Bakterien bzw. aus Schwammzellen bestanden. In einer Fraktion, die hauptsächlich filamentöse Bakterien aufwies, wurde das Theopalauamid als Hauptkomponente detektiert, während sich das Swinholid A in einer anderen Fraktion wiederfand, die vornehmlich unizelluläre Bakterien aufwies.³¹ Die Theopalauamid produzierenden Bakterien sind mittlerweile mittels 16S rDNA Gensequenzierung als den Myxococcales verwandte delta-Proteobakterien identifiziert worden.³² Versuche, dieses Bakterium in Kultur zu nehmen, schlugen bislang allerdings fehl.

Ein weiteres Beispiel, das die Bedeutung von assoziierten Prokaryoten für die Naturstoffbiosynthese in marinen Schwämmen belegt, liefert der Schwamm *Dysidea herbacea* vom Great Barrier Reef in Australien. Der Schwamm akkumuliert sowohl verschiedene Sesquiterpene als auch das chlorierte Aminosäurederivat 13-Demethylsodysidenin.³³ Bis zu 50 Prozent der Schwamm biomasse bestehen aus Cyanobakterien der Art *Oscillatoria spongeliae*. Eine ähnliche Aufarbeitung des Schwammgewebes wie weiter oben für *T. swinhoei* bereits beschrieben lieferte eine aus den Cyanobakterien bestehende Fraktion, die das chlorierte Aminosäurederivat als Hauptkomponente aufwies, sowie eine Fraktion, die vornehmlich aus Schwammzellen bestand und die Sesquiterpene beinhaltete.

Das Moostierchen (Bryozoe) *Bugula neritina* ist die Quelle für eine interessante Gruppe strukturell komplexer macrozyklischer Lactone, der Bryostatine. Das Bryostatin I befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phase II) als potentiell neues Medikament gegen bestimmte Formen von Krebserkrankungen.³⁴ Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch dieser pharmakologisch wichtige Naturstoff auf assoziierte Bakterien als eigentliche Produzenten zurückzuführen ist. In Aquarien gehaltene Exemplare von *B. neritina*

³⁰ Vgl. Thoms *et al.* (2003) und Hentschel *et al.* (2002).

³¹ Vgl. Bewley *et al.* (1996) und Bewley und Faulkner (1998).

³² Vgl. Schmidt *et al.* (2000).

³³ Vgl. Unson und Faulkner (1993).

³⁴ Vgl. Proksch *et al.* (2002).

reagieren z. B. auf eine Behandlung mit Antibiotika durch Verringerung der Anzahl endosymbiontischer Bakterien und Abnahme des Gehaltes an Bryostatinen. An der Biosynthese der makrozyklischen Grundstruktur der Bryostatine sind wahrscheinlich Polyketidsynthasen beteiligt. Genfragmente der Polyketidsynthase vom Typ I konnten aus bakteriellen Symbionten von *B. neritina* kloniert werden. Eine dazu homologe RNA-Sonde bindet ausschließlich an die bakteriellen Symbionten, nicht aber an symbiontenfreie Zellen von *B. neritina*.³⁵

Ausblick

Das Aufspüren funktioneller Aspekte mariner Naturstoffe aus Invertebraten, wie es in diesem Beitrag versucht wurde, zeigt die enge Verzahnung von Biologie und Chemie. Ohne die zumeist komplexen Strukturen der vielfältigen heute bekannten marinen Naturstoffe sind ihre Produzenten in der Regel in der Auseinandersetzung mit Fressfeinden am natürlichen Standort nicht überlebensfähig. Die „chemische Waffe“ ist der Schlüssel zum Überleben, wobei das Beispiel der *Aplysina*-Schwämme und der an sie angepassten *Tylodina*-Schnecken zeigt, dass es niemals einen absoluten Schutz gibt, sondern dass sich im Laufe der Koevolution zwischen Beuteorganismen und Räubern Spezialisten gebildet haben, die die ihnen entgegengesetzte Giftbarriere durchbrechen und sich auf diese Weise eine ökologische Nische erobern. In manchen Fällen, wie bei der Interaktion von *Aplysina* und *Tylodina*, geht die Anpassung der Räuber so weit, dass sie sogar das Giftarsenal ihrer Beutetiere übernehmen und dieses eventuell zum eigenen Schutz einsetzen. Das Studium mariner Naturstoffe unter ökologischen Gesichtspunkten bietet demnach faszinierende Einblicke in die verschiedenen Interaktionen von Organismen, die genauso komplex und vielfältig sind wie die ihnen zu Grunde liegenden Moleküle. Gleichzeitig bietet diese Sichtweise aber auch einen Ansatz zu einer gerichteten Wirkstoffsuche im Meer unter pharmazeutisch-medizinischen Gesichtspunkten. Substanzen, die sich im harten Daseinskampf als Waffen zum Überleben bewährt haben, sind von der Natur auf biologische Aktivität hin optimiert und zeigen auch in pharmakologischen Testsystemen häufig Wirkungen, die sie als Kandidaten für eine Arzneistoffentwicklung z. B. im Indikationsgebiet „Krebserkrankungen“ interessant machen. Die hauptsächlich im vorhergehenden Teil vorgestellten und erst in den Anfängen verstandenen Wechselbeziehungen zwischen marinen Invertebraten und den in ihnen lebenden Mikroorganismen beleuchten einen faszinierenden Aspekt der Symbioseforschung, der besonders durch die Verfügbarkeit molekularbiologischer Methoden neue spannende Einblicke in komplexe marine Lebensgemeinschaften verspricht. Aber nicht nur die Grundlagenforschung kann von diesen neuen Forschungsansätzen profitieren. Auch die Anwendbarkeit mariner Naturstoffforschung im Hinblick auf eine eventuelle Nutzung bioaktiver Metabolite als Medikamente könnte einen gewaltigen An Schub erfahren, wenn es gelingt, tatsächlich mikrobielle Endosymbionten als Produzenten pharmakologisch wichtiger Naturstoffe z. B. in Schwämmen oder Seescheiden zu identifizieren und diese Mikroorganismen außerhalb ihrer Wirte zu kultivieren. Durch diesen biotechnologischen Ansatz (so er erfolgreich ist) könnte erstmals die Nachhaltigkeit mariner Naturstoffe ohne Schädigung natürlicher Ressourcen (d. h. das Sammeln am natürlichen Standort) erreicht werden. Gerade die Nachhaltigkeit ist derzeit noch ein großes

³⁵ Vgl. Haygood und Davidson (1997).

Problem, das der Entwicklung vieler pharmakologisch vielversprechender mariner Naturstoffe im Wege steht bzw. diese verlangsamt. Es ist daher zu hoffen, dass durch eine enge Zusammenarbeit von marinen Naturstoffforschern mit anderen Disziplinen, wie der Mikrobiologie, Molekularbiologie und Biotechnologie, die Marktreife von Arzneistoffen aus dem Meer bald in greifbare Nähe rückt.

Danksagungen: Ich möchte all meinen gegenwärtigen und früheren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die an den vorgestellten Projekten unserer Gruppe mitgewirkt haben, besonders aber Frau Dr. Edrada und Frau Dr. Teeyapant sowie Herrn Dr. Ebel, Herrn Dr. Schupp und Herrn Thoms, an dieser Stelle für ihren Einsatz und Enthusiasmus herzlich danken. Mein Dank gilt ferner der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für die langjährige finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

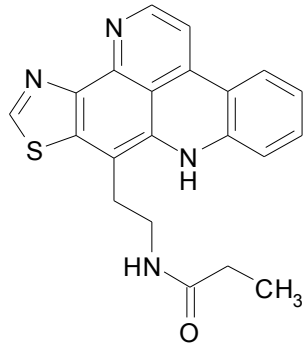
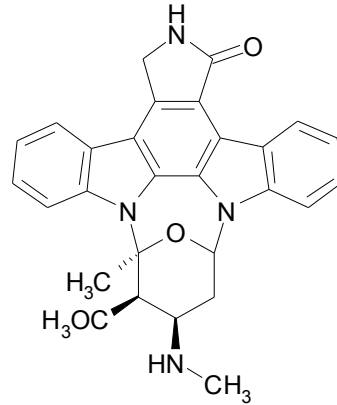
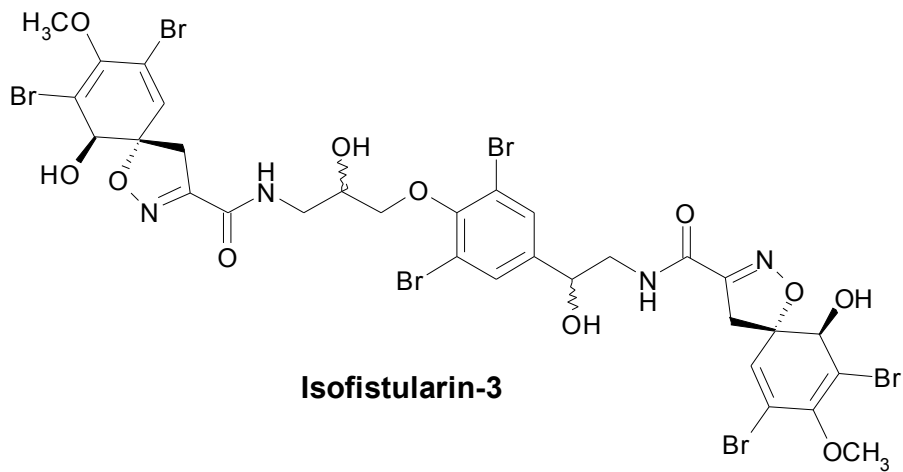
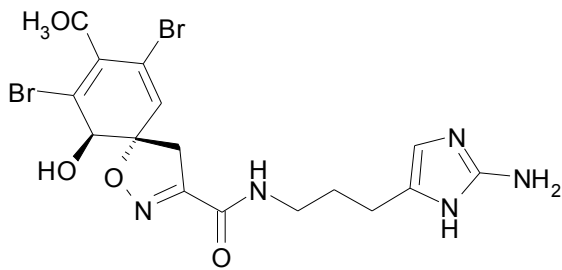
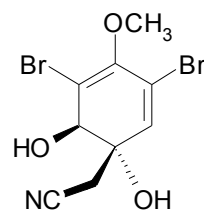
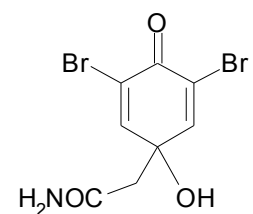
**Kuanoniamin C****Staurosporin****Isofistularin-3****Aerophobin-2****Aeroplysin-1****Dienon**

Abb. 1: Strukturformeln

Bibliographie

- AKIYAMA, T., M. SHIMIZU, M. OKABE, T. TAMAOKI und S. AKINAGA. „Differential effects of UCN- 01, staurosporine and CGP 41251 on cell cycle progression and CDC2/cyclin B1 regulation in A-431 cells synchronized at M phase with nocodazole“, *Anti-Cancer Drugs* 10 (1999), 67-78.
- BERGMANN, W. und R. FEENEY. „Contribution to the study of marine sponges. 32. The nucleosides of sponges“, *Journal of Organic Chemistry* 16 (1951), 981-987.
- BECERRO, M. A., X. TURON, M. J. URIZ und J. TEMPLADO. „Can a sponge feeder be a herbivore? *Tylodina perversa* (Gastropoda) feeding on *Aplysina aerophoba* (Demospongiae)“, *Biological Journal of the Linnean Society* 78 (2003), 429-438.
- BEWLEY, C. A., N. D. HOLLAND und D. J. FAULKNER. „Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts“, *Experientia* 52 (1996), 716-722.
- BEWLEY, C. A. und D. J. FAULKNER. „Lithistid sponges: Star performers or hosts of the stars?“ *Angewandte Chemie Internationale Edition* 37 (1998), 2162-2178.
- EBEL, R., M. BRENZINGER, A. KUNZE, H. J. GROSS und P. PROKSCH. „Wound activation of protoxins in the marine sponge *Aplysina aerophoba*“, *Journal of Chemical Ecology* 23 (1997), 1451.
- EBEL, R., A. MARIN und P. PROKSCH. „Organspecific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*“, *Biochemical Systematics and Ecology* 27 (1999), 769-777.
- FEENEY, P. „Plant apparency and chemical defense“, *Recent Advances of Phytochemistry* 10 (1976), 1-40.
- FRIEDRICH, A. B., H. MERKERT, T. FENDERT, J. HACKER, P. PROKSCH und U. HENTSCHEL. „Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analysed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)“, *Marine Biology* 134 (1999), 461-470.
- FRIEDRICH, A. B., I. FISCHER, P. PROKSCH, J. HACKER und U. HENTSCHEL. „Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*“, *FEMS Microbiology Ecology* 38 (2001), 105-113.
- HAYGOOD M. G. und S. K. DAVIDSON. „Small-subunit rRNA genes and *in situ* hybridization with oligonucleotides specific for the bacterial symbionts in the larvae of the bryozoan *Bugula neritna* and proposal of *Candidatus Endobugula sertula*“, *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), 4612-4616.
- HENTSCHEL, U., M. SCHMID, M. WAGNER, L. FIESELER, C. GERNERT und J. HACKER. „Isolations and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*“, *FEMS Microbiology Ecology* 35 (2001), 305-312.
- HENTSCHEL, U., J. HOPKE, M. HORN, A. B. FRIEDRICH, M. WAGNER, J. HACKER und B. S. MOORE. „Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans“, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) (9), 4431-4440.
- KREUTER, M.H., A. ROBITZKI, S. CHANG, R. STEFFEN. „Production of the cytostatic agent aeropylsinin by the sponge *Verongia aerophoba* in *in vitro* culture“, *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Pharmacology, Toxicology, and Endocrinology* 101 C (1992) (1), 183-187.
- MURAKAMI, Y., Y. OSHIMA und T. YASUMOTO. „Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*“, *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science* 48 (1982), 69-72.

- OMURA, S., Y. SASAKI, Y. IWAI und H. TAKESHIMA. „Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism“, *Journal of Antibiotics* 48 (1977), 535-458.
- PROKSCH, P., R. A. EDRADA und R. EBEL. „Drugs from the seas – current status and microbiological implications“, *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2002), 125-134.
- RHOADES D. F. und R. G. CATES. „Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry“, *Recent Advances in Phytochemistry* 10 (1976), 168-213.
- SCHMID, E. W., A. Y. OBRAZTSOVA, S. K. DAVIDSON, D. J. FAULKNER und M. G. HAYGOOD. „Identification of the antifungal peptide containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, „*Candidatus Entotheonella palauensis*“, *Marine Biology* 136 (2000), 969-977.
- SCHUPP, P., C. EDER, V. PAUL und P. PROKSCH. „Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications“, *Marine Biology* 135 (1999a), 573-580.
- SCHUPP, P., V. WRAY, C. EDER, P. SCHNEIDER, M. HERDERICH, V. PAUL und P. PROKSCH. „Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toetalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp.“, *Journal of Natural Products* 62 (1999b), 959-962.
- SCHUPP, P., P. PROKSCH, V. WRAY. „Further new staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toetalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp.“, *Journal of Natural Products* 65 (2002), 295-298.
- TAMAOKI, T., H. NOMOTO, I. TAKAHASHI, Y. KATO, M. MORIMOTO und F. TOMITA. „Staurosporine a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135 (1986), 397-402.
- TEEYAPANT, R., H. J. WOERDENBAG, P. KREIS, J. HACKER, V. WRAY, L. WITTE und P. PROKSCH. „Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*“, *Zeitschrift für Naturforschung* 48c (1993), 939-945.
- THOMS, C., M. HORN, U. HENTSCHEL und P. PROKSCH. „Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation“, *Marine Biology* 143 (2003), 685-692.
- UNSON, M. D. und D. J. FAULKNER. „Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera)“, *Experientia* 49 (1993), 349-353
- WEINHEIMER, A. J. und R. SPRAGGINS. „The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. Chemistry of coelenterates. XV.“, *Tetrahedron Letters* 15 (1969), 5185-5188.
- WEISS, B., R. EBEL, M. ELBRÄCHTER, M. KIRCHNER und P. PROKSCH. „Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*“, *Biochemical Systematics and Ecology* 24 (1996), 1-12.