

*In vivo* Analyse und Lokalisation ökologisch relevanter  
Sekundärmetabolite mariner Makroalgen

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

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

von

**Dipl. Biol. Katharina Grosser**

geboren am 19.07.1982 in Hamburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Georg Pohnert  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Wilhelm Boland  
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30 Oktober 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Biologische Grundlagen . . . . .	2
1.1.1	Metabolite der Algenoberfläche . . . . .	3
1.1.2	Metabolite in der Algenzelle . . . . .	7
1.2	Extraktions- und Lokalisationsmethoden . . . . .	9
1.2.1	Extraktionsmethoden . . . . .	9
1.2.2	Lokalisationsmethoden . . . . .	12
1.3	Raman-Spektroskopie . . . . .	14
1.3.1	Fourier-Transformations-Raman-Spektroskopie (FT-Raman) .	16
1.3.2	Resonanz-Raman-Spektroskopie (RR-Spektroskopie) . . . . .	16
1.3.3	Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS) . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>23</b>
3.1	C <sub>18</sub> -Methode . . . . .	23
3.1.1	Überprüfung der theoretischen Grundlage der C <sub>18</sub> -Methode .	23
3.1.2	Überprüfung der Algenoberflächen auf Verletzung durch die Extraktion mittels C <sub>18</sub> -Material . . . . .	24
3.1.3	Wie effizient ist die C <sub>18</sub> -Methode? . . . . .	31
3.2	Resonanz-Raman-Spektroskopie . . . . .	40
3.2.1	Carotinoide in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> und <i>Ulva</i> sp. . . . .	40
3.2.2	Identifikation der lokalisierten Carotinoide . . . . .	45
3.2.3	Ermittlung der Fucoxanthin-Konzentration in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	49
3.2.4	Laterale Verteilung von Carotinoiden auf <i>F. vesiculosus</i> . . .	51
3.3	FT-Raman-Spektroskopie . . . . .	55
3.3.1	Chemische Zusammensetzung des Wundverschlusses von <i>C.</i> <i>taxifolia</i> . . . . .	56
3.3.2	Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Wundver- schlüsse von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	74

3.3.3	Verteilung von Caulerpenin innerhalb von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	82
3.4	CARS-Mikroskopie . . . . .	92
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>102</b>
5.1	Organismen . . . . .	102
5.1.1	<i>Caulerpa taxifolia</i> und <i>Caulerpa prolifera</i> . . . . .	102
5.1.2	<i>Fucus vesiculosus</i> und <i>Ulva</i> sp. . . . .	102
5.1.3	Herstellung des künstlichen Seewassers . . . . .	104
5.2	Geräte und Messmethoden . . . . .	104
5.2.1	Raman- und CARS-Spektroskopie . . . . .	104
5.2.2	Chromatographie . . . . .	106
5.3	Probenvorbereitung . . . . .	107
5.3.1	Fixierung der Algen für die Raman- und CARS-Spektroskopie	107
5.3.2	Extraktion von Oberflächenmetaboliten mit C <sub>18</sub> -Material . .	109
5.3.3	Extraktion von Oberflächenmetaboliten mit der Dipping-Methode	111
5.4	Überprüfung der Algen auf Verwundung . . . . .	111
5.4.1	Verwundung bei Raman- und CARS-Spektroskopie . . . . .	111
5.4.2	Verwundung der Algen bei Extraktion mit C <sub>18</sub> -Material und Dipping . . . . .	112
5.5	Herstellung der Standards . . . . .	113
5.5.1	Fucoxanthin und $\beta$ -Carotin . . . . .	113
5.5.2	Extraktion von Caulerpenin aus <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i>	113
5.6	Synthesen . . . . .	114
5.6.1	Produkte aus Caulerpenin, Protein und Esterase . . . . .	114
5.6.2	Caulerpenin-Amin-Reaktion nach Guerriero et al. . . . .	115
5.7	Auswertung . . . . .	116
5.7.1	Raman- und CARS-Ergebnisse . . . . .	116
5.7.2	MS-Spektren . . . . .	119
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>136</b>
6.1	Daten und Spektren . . . . .	136
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung</b>	<b>149</b>
8.1	Prozentueller Anteil an den Kooperationsarbeiten . . . . .	149
8.2	Selbstständigkeitserklärung . . . . .	151

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Thallus von <i>Fucus vesiculosus</i> und <i>Caulerpa prolifera</i> . . . . .	2
1.2	Schematische Darstellung der Algenoberfläche und möglichen Diffusionsprozessen . . . . .	4
1.3	Struktur Phlorotannine und Fucoxanthin . . . . .	6
1.4	Thallus von <i>Caulerpa taxifolia</i> und Detailausschnitt des Wundverschlusses . . . . .	7
1.5	Schematische Darstellung der Proteinquervernetzung . . . . .	8
1.6	Schematische Darstellung unterschiedlicher Extraktionsmethoden . .	10
1.7	Mikroskopische Ansicht von einer mit Hexan/Methanol behandelten Algen . . . . .	11
1.8	Energetisches Schema des Raman-Effektes, Resonanz-Raman-Effektes und Fluoreszenz . . . . .	15
1.9	Energetisches Schema des CARS-Effektes . . . . .	19
3.1	Behandlung von <i>C. taxifolia</i> mit C <sub>18</sub> -Material . . . . .	24
3.2	Chromatogramm und Massenspektren des Caulerpenins von einer mit C <sub>18</sub> -Material extrahierten Probe und des reinem Standards . . . . .	25
3.3	Bildaufnahme der behandelten Assimilatorspitzen von <i>C. taxifolia</i> .	26
3.4	Mikroskopische Bildaufnahmen behandelter Thallusspitzen von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	27
3.5	Rot/Grün-Verhältnis von mit Oberflächenextraktionsmethoden behandelter gegenüber unbehandelter Thallusspitzen . . . . .	29
3.6	UPLC-MS-Analyse der biologisch aktiven Fraktion des Oberflächenextraktes von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	31
3.7	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für die Extraktion von Oberflächenmetaboliten mittels Absorbermaterial . . . . .	32
3.8	Ermittlung der ausreichenden C <sub>18</sub> -Menge für die Beprobung von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	34
3.9	Chromatogramm und Massenspektrum des Fucoxanthins von einer mit C <sub>18</sub> -Material extrahierten Probe und des reinem Standards . . .	36
3.10	Extrahierte Menge Fucoxanthin pro Fläche für verschiedene Beprobungszeiträume . . . . .	37
3.11	Relative Messwerte des Extraktionsertrages von Fucoxanthin . . . . .	38

3.12	Schematische Darstellung des konfokalen RR-Aufbaus zur Messung der Carotinoide auf der Algenoberfläche . . . . .	41
3.13	RR-Spektrum von Fucoxanthin und $\beta$ -Carotin gelöst in Hexan . . . . .	42
3.14	Carotinoid-Gradient in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	43
3.15	Mikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von <i>F. vesiculosus</i> vor und nach der RR-Messung . . . . .	44
3.16	Verlaufsform von Carotinoid-Gradienten in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> bei unterschiedlichen Startmesspunkten . . . . .	45
3.17	Carotinoid-Gradient in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> und <i>Ulva</i> sp. . . . .	46
3.18	RR-Spektrum an der Oberfläche von <i>F. vesiculosus</i> und <i>Ulva</i> sp. . . . .	47
3.19	RR-Messungen in x-Richtung auf der Oberfläche von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	52
3.20	Karte der Carotinoidverteilung auf der Oberfläche von <i>F. vesiculosus</i> . . . . .	53
3.21	Vorher/Nachher-Aufnahme von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	56
3.22	FT-Raman-Spektrum von reinem Caulerpenin extrahiert aus <i>C. taxifolia</i> . . . . .	58
3.23	Zeitlicher Verlauf der Wundverschlussbildung . . . . .	59
3.24	Mittelwertspektren der verschiedenen Zonen des Wundverschlusses und des intakten Gewebes . . . . .	61
3.25	Detailausschnitt der Mittelwertspektren von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	63
3.26	Endprodukte der Reaktion von Caulerpenin mit Butylamin nach Guerriero . . . . .	63
3.27	Detailausschnitt des Spektrums von reinem Caulerpenin, Zone Ia und des Syntheseproduktes ( <b>6</b> ) für die Bande bei $2187\text{ cm}^{-1}$ . . . . .	64
3.28	Postulierter Mechanismus der Reaktion von Oxytoxin 2 mit Aminen nach Jung . . . . .	65
3.29	Gradient der Bande bei $1582\text{ cm}^{-1}$ und $2187\text{ cm}^{-1}$ (Caulerpenin) in den FT-Raman-Messungen von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	70
3.30	Raman Intensität charakteristischer Banden für die Zonen Ia-III von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	72
3.31	Aufnahme des Wundverschlusses von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	75
3.32	Mittelwertspektren des Wundverschlusses von <i>C. prolifera</i> . . . . .	76
3.33	Vergleich der Mittelwertspektren des Wundverschlusses von <i>C. prolifera</i> und <i>C. taxifolia</i> . . . . .	77
3.34	Detailausschnitt der Bande für die $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung des Caulerpenins aus dem Wundverschluss von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	78
3.35	Detailausschnitt der Mittelwertspektren des Wundverschlusses von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	79
3.36	Verlauf von für den Wundverschluss charakteristischen Banden <i>C. prolifera</i> und <i>C. taxifolia</i> . . . . .	80
3.37	Schematische Darstellung der Messbereiche inklusive Messgitter von <i>C. prolifera</i> . . . . .	83

3.38	Spektren aus 20 Messpunkten von <i>C. prolifera</i> . . . . .	84
3.39	Graustufenkarten zur Caulerpenin- und $\beta$ -Carotin-Verteilung über einen Messbereich von 20 Messpunkte in <i>C. prolifera</i> . . . . .	86
3.40	Graustufenkarten der Caulerpenin- und $\beta$ -Carotin-Verteilung im Stolon und Rhizoid von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	86
3.41	Graustufenkarte über 15 Messpunkte der Caulerpenin- und $\beta$ -Carotin-Verteilung in der Mitte eines Assimilators von <i>C. prolifera</i> . . . . .	87
3.42	Graustufenkarte über 49 Messpunkte der Caulerpenin- und $\beta$ -Carotin-Verteilung in der Mitte eines Assimilators von <i>C. prolifera</i> . . . . .	89
3.43	Zusätzliche Graustufenkarte über 36 Messpunkte der Caulerpenin- und $\beta$ -Carotin-Verteilung in der Mitte eines Assimilators von <i>C. prolifera</i> . . . . .	91
3.44	CARS-Aufnahme von reinem Caulerpenin . . . . .	93
3.45	Aufnahmen von <i>C. taxifolia</i> vor und nach einer längeren CARS-Messung . . . . .	94
3.46	CARS-Aufnahmen ohne resonantes Signal . . . . .	95
3.47	CARS-Aufnahme des Assimilators von <i>C. taxifolia</i> . . . . .	97
5.1	Probenvorbereitung für die Raman- und CARS-Messungen . . . . .	108
6.1	Verlaufsform von Carotenoid-Gradienten in der laminaren Grenzschicht von <i>Ulva spec</i> mit unterschiedlichen Startmesspunkten . . . . .	136
6.2	Resonanz-Raman-Spektrum von Fucoxanthin und $\beta$ -Carotin gelöst in Methanol . . . . .	137
6.3	Spektren aus den verschiedenen Caulerpenin, Protein und Esterase-Mischungen . . . . .	138
6.4	Spektrum aus der DFT-Berechnung von Caulerpenin . . . . .	139
6.5	Spektrum aus der DFT-Berechnung von Diimin . . . . .	139
6.6	Spektrum aus der DFT-Berechnung von Oxidiimin . . . . .	140
6.7	Spektrum aus der DFT-Berechnung von Metabolit <b>(6)</b> . . . . .	140
6.8	Spektrum aus der DFT-Berechnung von Metabolit <b>(7)</b> . . . . .	141
6.13	Chromatogramm und MS-Spektrum des Metaboliten <b>(6)</b> . . . . .	141
6.9	Spektren zu den Graustufenkarten aus Abbildung 3.40 (links) . . . . .	142
6.10	Spektren zu den Graustufenkarten aus Abbildung 3.40 . . . . .	143
6.11	Spektren zu den Graustufenkarten aus Abbildung 3.42 . . . . .	144
6.12	Spektren zu den Graustufenkarten aus Abbildung 3.43 . . . . .	145

# Tabellenverzeichnis

3.1	Berechnete Fucoxanthin-Konzentration in der laminaren Grenzschicht von <i>F. vesiculosus</i> in verschiedenen Entfernungen zur Algenoberfläche.	50
3.2	Charakteristische Raman-Banden der Mittelwertspektren von <i>C. taxifolia</i>	62
3.3	Charakteristische Raman-Banden der Mittelwertspektren von <i>C. taxifolia</i> und <i>C. prolifera</i> . . . . .	81
5.1	Auflistung der Bezugshändler für <i>Caulerpa</i> sp. . . . .	102
5.2	Verwendete UPLC-Gradienten für die Trennung Caulerpenin und Fucoxanthin haltigen Proben . . . . .	107
5.3	Verwendete ESI-Parameter . . . . .	108
5.4	Caulerpenin-,Protein-,Exterase- Mischungen für die FT-Raman-Messungen	115
6.1	Position für die C≡C-Schwingung der Dichtefunktionstheorie (DFT)-Rechnungen aus Abbildung 6.4 bis 6.8. . . . .	138

# Abkürzungsverzeichnis

**arb. Skala** arbiträre Skala

**CARS** Kohärente anti-Stokes Raman Streuung (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering)

**COSY** Korrelations Spektroskopie (Correlation Spectroscopy)

**DESI-MS** Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry

**DFT** Dichtefunktionstheorie

**EtOAc** Ethylacetat

**FT** Fourier Transformation

**HPLC** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography)

**IR** Infrarot

**MALDI-MS** Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie

**MeOH** Methanol

**MS** Massenspektrometrie

**NMR** Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)

**SPE** Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)

**RGB** Additiver Farbraum der Farben Rot, Grün, Blau

**RR** Resonanz-Raman

**UPLC-MS** Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie

**UV-VIS-PAD** UV-VIS-Photodiodenarray-Detektor

# 1 Einleitung

Sekundärmetabolite haben einen großen Einfluss auf die verschiedensten ökologischen Interaktionen, angefangen bei Änderungen der Morphologie von Individuen, induziert durch die Anwesenheit von Räubern (Kusch, 1993), bis hin zur Gestaltung ganzer Habitats (Muller, 1966). Ist der Lebensraum, wie das marine Benthos<sup>1</sup>, durch eine deutliche Dynamik in der Struktur sowie durch die starke Konkurrenz um Licht und Nährstoffe charakterisiert (Wahl, 2009), spielen die sogenannten Infochemikalien<sup>2</sup> und die zu den Allelochemikalien<sup>3</sup> gehörenden chemischen Abwehrsubstanzen eine entscheidende Rolle. Die Abwehrsubstanzen können gegen Fraßfeinde, wie z. B. Herbivoren und Räuber (Hay & Fenical, 1988; Haber *et al.*, 2011) wirken oder zur Bekämpfung des Bewuchses durch Mikro- oder Makroorganismen (Harder, 2009), dem sogenannten Biofouling<sup>4</sup>, dienen. Überdies kann den Metaboliten auch eine Funktion zur Abwehr von Nahrungs- und Standortskonkurrenten (Mulderij *et al.*, 2006) zugeschrieben werden. Infochemikalien können in dem, durch die Eindringtiefe des Lichtes und Trübung durch Schwebestoffe, optisch eingeschränkten marinen Lebensraum für die Kommunikation der Organismen untereinander, z. B. für das Auffinden von Beute (Kjellerup & Kiørboe, 2012), eine weitaus entscheidendere Rolle als im terrestrischen Bereich spielen.

Besonders wichtig sind Infochemikalien und chemische Abwehrstoffe für sessile marine Organismen, wie z. B. Algen des Benthos. Da es den marinen Makroalgen nicht möglich ist, sich verschlechternden Standortbedingungen (z. B. Beschattung durch Aufwuchs, Zunahme an Herbivoren) durch Fortbewegung zu entziehen, kompensieren viele von ihnen diesen Nachteil durch Infochemikalien und chemische Abwehrstoffe (Wahl, 1989). Um den Lebensraum Benthos besser zu verstehen, besteht ein großes Interesse diese Substanzen und ihre ökologische Rolle im Leben der Algen möglichst genau zu identifizieren und zu lokalisieren. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung neuer sowie der Anwendung bekannter Extraktions- und Lokalisationsmethoden für Sekundärmetabolite mariner Makroalgen.

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Modelorganismen, untersuchte Sekundärmetabolite sowie bisherige und neu verwendete Methoden.

---

<sup>1</sup>Benthos: Lebensraum auf und im Boden des marinen Systems (Ott, 1996)

<sup>2</sup>Eine Chemikalie, die innerhalb einer Interaktion zwischen zwei Individuen Informationen übermittelt, die sowohl auf beide als auch nur auf ein Individuum Einfluss hat (Dicke & Sabelis, 1988).

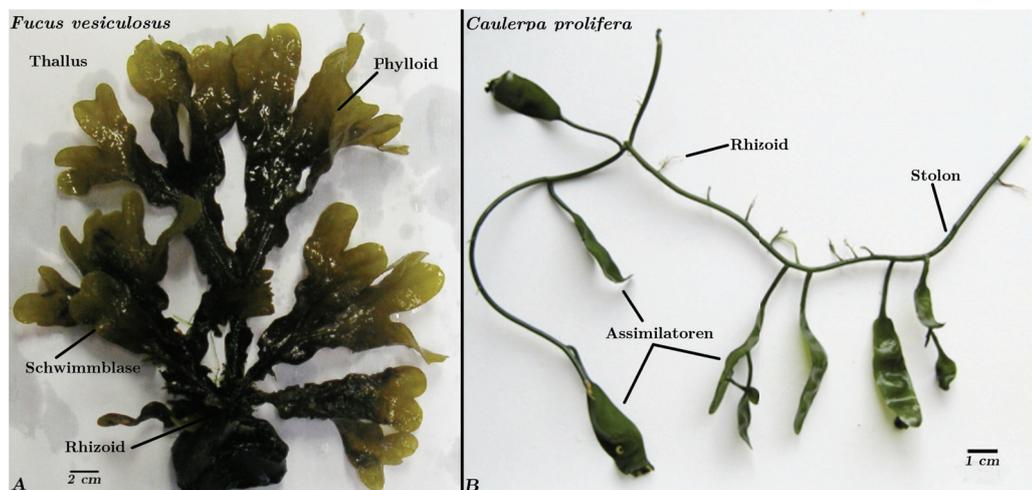
<sup>3</sup>Infochemikalie, die eine Interaktion zwischen zwei Individuen verschiedener Art vermittelt (Dicke & Sabelis, 1988)

<sup>4</sup>Biofouling: Bewuchs von benetzten Flächen mit Mikroorganismen, Algen, Pflanzen und Tieren

## 1.1 Ökologische Bedeutung sekundärer Metabolite im Leben von marinen Algen

Als Algen werden im Wasser lebende, pflanzenartige Organismen mit der Fähigkeit zur Photosynthese, allerdings ohne die sonst für höhere Pflanzen typischen Merkmale wie Blüten, Blätter, Wurzeln oder differenziertes Gewebe, bezeichnet (Graham & Wilcox, 1999). Allgemein werden Algen in die sogenannten Mikroalgen und Makroalgen eingeteilt. Mikroalgen sind ein bis vielzellige Algen ohne pflanzenartige Strukturen mit einer Größe von wenigen bis zu einigen hundert Mikrometern. Makroalgen dagegen sind meist mehrzellig und bis zu mehreren Metern groß. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Makroalgen untersucht, so dass sich der hier verwendete Begriff Alge auf Makroalgen bezieht. Manche Algen zeigen äußerlich ähnliche, oft zu Blättern, Sprossachse und Wurzeln vergleichbare Strukturen, die jedoch aufgrund des vereinfachten anatomischen Aufbaus je nach Algenart als Phylloid oder Assimilator (blattartig), Cauloid oder Stolon (sprossachsenartig) sowie als Rhizoid (wurzelnartig) bezeichnet werden (Braune, 2008) (siehe Abbildung 1.1).

Bilden Makroalgen diese Strukturen aus, wird der gesamte Vegetationskörper als Thallus bezeichnet (Schubert & Wagner, 2000). Ein viel diskutiertes Forschungsthema ist die verwandtschaftlich-evolutionäre Beziehung der Algen untereinander und zu anderen Phyla (Manhart & McCourt, 1992; McCourt, 1995; John & Maggs,



**Abb. 1.1:** A) Thallus der Braunalge *Fucus vesiculosus* mit dem blattartigen Phylloid inklusive Schwimmblasen und dem an einem Stein anhaftenden, wurzelartigen Rhizoid, auch Haftscheibe genannt. B) Thallus der Grünalge *Caulerpa prolifera* mit den blattartigen Assimilatoren, dem stielartigen Stolon und dem wurzelartigen Rhizoid. Der Kontrast der Bilder wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

1997; Wattier & Maggs, 2001). Daher werden die in dieser Arbeit erwähnten und verwendeten Algen in die klassisch botanische Klassifikation gegliedert, welche auf den farbgebenden Pigmenten beruht (Sitte *et al.*, 1998). Diese Einteilung unterteilt die Algen in Grünalgen (Chlorophyta, Chlorophyceae), Braunalgen (Heterokonta, Phaeophyceae) und Rotalgen (Rhodophyta, Rhodophyceae). Makroalgen sind typische Bewohner des littoralen<sup>5</sup> bis sublittoralen Bereiches des Benthals. Hier haften sie mit ihren Rhizoiden an Kies, Steinen und Felsbrocken und vergrößern so z. B. die potenzielle Besiedlungsfläche für Organismen jeglicher Art wie Mikro- und Makroorganismen (Ott, 1996). Daneben bilden die nährstoffreichen Makroalgen in diesem Habitat auch die Nahrungsgrundlage für viele andere Organismen (Ott, 1996). Die Kommunikation und Interaktion zwischen der Alge und den sie umgebenden Individuen erfolgt über Infochemikalien und Abwehrsubstanzen, die überwiegend den Sekundärmetaboliten<sup>6</sup> zugeordnet werden können. (Amsler, 2007). Bei genauerer Betrachtung muss zwischen der Oberfläche und dem Inneren der Alge als Bereich unterschieden werden, in denen wichtige Sekundärmetabolite und chemische Prozesse die ökologischen Interaktionen der Alge mit ihrer Umwelt bestimmen.

### 1.1.1 Metabolite der Algenoberfläche

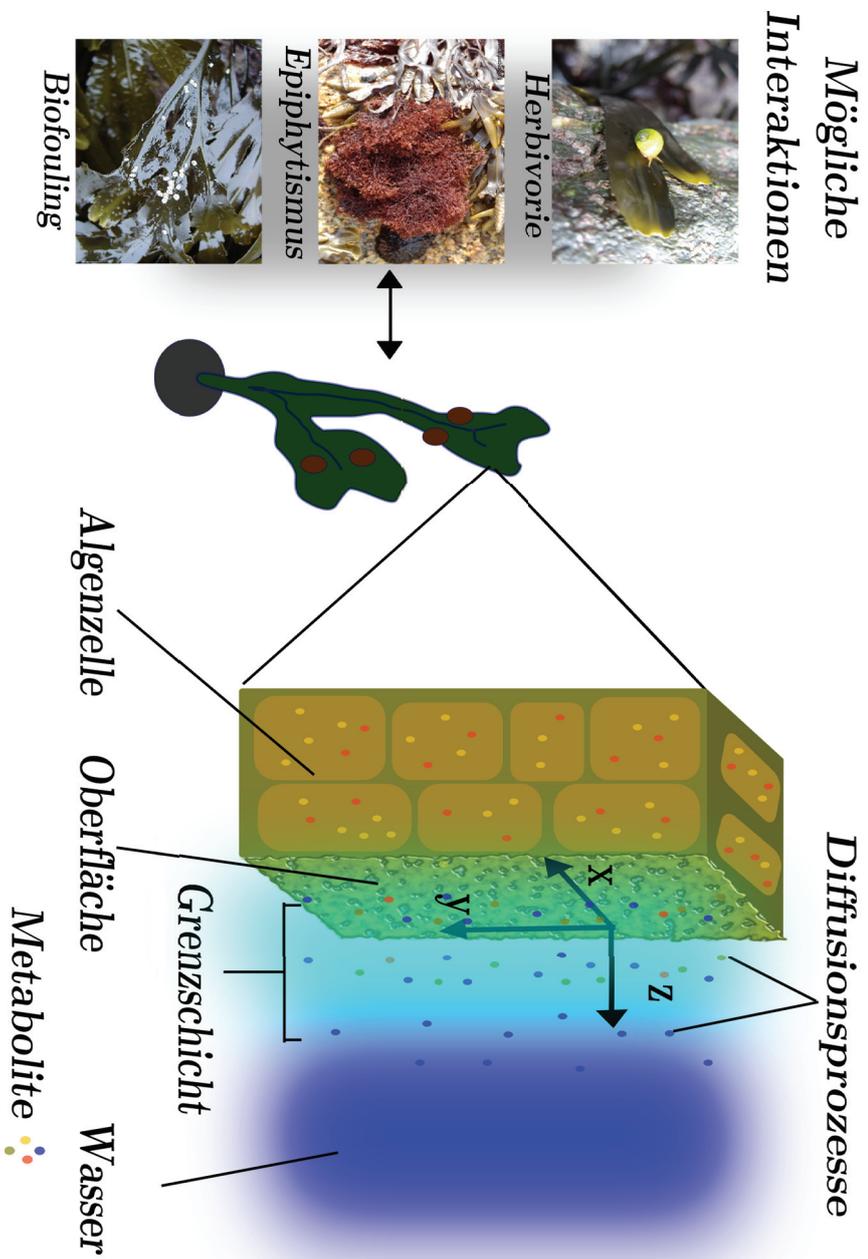
Metabolite der Algenoberfläche befinden sich entweder direkt auf der Oberfläche oder in der angrenzenden chemischen Sphäre, der sogenannten laminaren Grenzschicht oder Diffusionsschicht. Die räumliche Verteilung der Metabolite wird in dieser Arbeit in einem kartesischem Koordinatensystem dargestellt, in dem x und y die horizontale und z die vertikale Verteilung der Metaboliten relativ zur Oberfläche angibt. Im speziellen wird hier in dieser Arbeit die vertikale Verteilung ausgehend von der Algenoberfläche in das umgebende Medium oder ins Algeninnere betrachtet (siehe schematische Darstellung in Abbildung 1.2).

Diese dünne laminare Grenzschicht (0,1 mm–0,2 mm) bildet den Übergang zwischen der Algenoberfläche und dem angrenzenden Wasser (Hurd, 2000). Über die Zusammensetzung ist bisher wenig bekannt. Allerdings lässt die Betrachtung von einfachen hydrodynamischen Modellen (Stevens & Hurd, 1997; Schlichting & Gersten, 2000) die Vermutung zu, dass sowohl Metabolite der Alge als auch Metabolite anderer Organismen durch diese Grenzschicht diffundieren, einen Gradienten bilden und so die Interaktionen zwischen der Alge und ihrer Umwelt steuern.

Der Bewuchs der Oberfläche durch andere Organismen ist eine dieser Interaktionen, bei der die Alge durch Infochemikalien und Abwehrsubstanzen innerhalb der laminaren Grenzschicht aktiv die verschiedensten Organismen beeinflusst (Kubanek *et al.*, 2003). Festzuhalten ist aber, dass ein Bewuchs durch andere Organismen

<sup>5</sup>Littoral (lat. litus für Ufer, Küste) ist die Ufer- und Küstenregion des Meeres (Ott, 1996)

<sup>6</sup>Chemische Substanzen die von den Organismen synthetisiert werden, allerdings nicht für deren Wachstum und Überleben primär verantwortlich sind (Croteau *et al.*, 2000)



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der Algenoberfläche mit den möglichen Diffusionsprozessen von Metaboliten der Alge (grüne und braune Punkte) sowie der Umgebung (blaue Punkte) in die laminaire Grenzschicht zwischen Algenoberfläche und umgebenden Wasser. Die Verteilung der Metaboliten kann in einem kartesischen Koordinatensystem mit drei Achsen (x, y, z) erfasst werden. Mögliche Interaktionen wie Herbivorie, Epiphytismus und Biofouling (links) können durch Metabolite der Grenzschicht und der hier auch schematisch dargestellten Algenzelle beeinflusst werden. (Fotoquelle [www.algaebase.de](http://www.algaebase.de))

sowohl negative als auch positive Aspekte für die Alge beinhalten kann.

Beispielsweise kann ein übermäßiger Bewuchs von großen Teilen der photosynthetisch aktiven Bereiche einer Alge die Versorgung des Thallus stark beeinträchtigen (Oswald *et al.*, 1984; Wahl, 2009). Neben zahlreichen pathogenen Eigenschaften einiger siedelnder Mikroorganismen (Wahl, 2008) kann ein zusätzliches Gewicht durch den Bewuchs mit z. B. Seepocken (Balanidae) zu einem Absinken des betroffenen Thallus und dadurch zur reduzierten photosynthetischen Leistung führen (Dixon *et al.*, 1981; Oswald *et al.*, 1984). Die aufsitzenden Organismen können zudem Fraßfeinde anlocken, die entweder der Alge als Basibionten<sup>7</sup> selbst schaden, oder die Oberfläche durch den Fraß der Epibionten<sup>8</sup> verletzen (Bernstein & Jung, 1979; Wahl & Hay, 1995).

Der Bewuchs durch Mikro- und Makroorganismen kann allerdings auch von Vorteil sein. Es ist von einigen Epiphyten bekannt, dass die von ihnen produzierten Infochemikalien eine weitere Ansiedlung, das Wachstum oder die Fortpflanzung von potenziell schädlichen Fouling-Organismen inhibieren (Dobretsov *et al.*, 2006; Armstrong *et al.*, 2001). Zudem kann die Alge auch von Organismen, die mit der Algenoberfläche assoziiert sind, mit Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren versorgt werden (Chisholm *et al.*, 1996; Seyedsayamdost *et al.*, 2011).

Demnach ist es für die Alge von Vorteil den Bewuchs auf ihrer Oberfläche durch eine Mischung aus Infochemikalien und Abwehrsubstanzen zu regulieren.

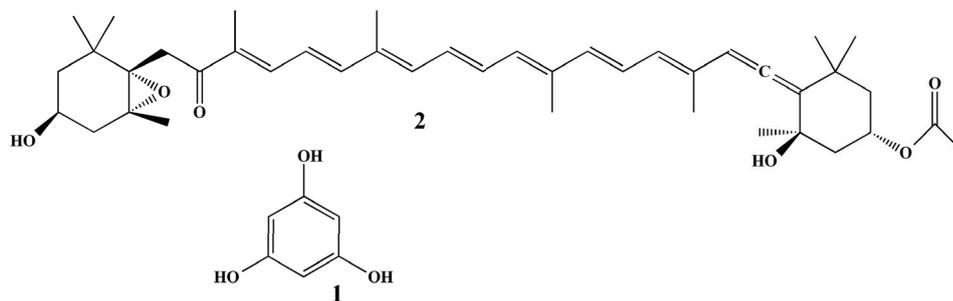
Die Regulation des Oberflächenbewuchses durch Sekundärmetabolite soll anhand der Braunalge *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae, Fucales, Fucaceae, LINNÉ 1753) im Folgenden näher vorgestellt werden. *F. vesiculosus*, umgangssprachlich auch Blasen-tang genannt, besitzt einen flachen, bandförmigen Thallus, der stellenweise glatt oder von Haargrübchen punktiert ist. Die namensgebenden Schwimmblasen sind paarig zu beiden Seite der Mittelrippe im oberen Bereich des Thallus vorhanden und dienen der bis zu 0,6 m langen Alge für einen aufrechten Stand in der Wassersäule (Braune, 2008) (siehe Abbildung 1.1 A). Auch aufgrund ihrer starken Verbreitung im Atlantik, der Ostsee und dem westlichen Mittelmeer ist *F. vesiculosus* eine gut erforschte Alge und eignet sich daher gut als Modellorganismus für die Anwendung neuer Extraktions- und Lokalisationsmethoden von Oberflächenmetaboliten im Rahmen dieser Arbeit.

So zeigte sich, dass die der Oberfläche assoziierte bakterielle Gemeinschaft von *F. vesiculosus* sich von der Gemeinschaft anderer Makroalgen des gleichen Habitats unterscheidet, es aber weniger Unterschiede in der bakteriellen Gemeinschaft zwischen Individuen einer Art von unterschiedlichen Standorten gibt (Lachnit *et al.*, 2009). Die bakterielle Gemeinschaft scheint daher durch die physischen oder chemischen Eigenschaften der Algenoberfläche beeinflusst zu werden. Ein regulierender Einfluss von Metaboliten der Algenoberfläche auf die assoziierte bakterielle Gemeinschaft war

---

<sup>7</sup>Basibionten sind Organismen, auf denen andere Organismen aufsitzen (Wahl, 1989)

<sup>8</sup>Epibionten sind Organismen, die auf anderen Organismen aufsitzen (Wahl, 1989)



**Abb. 1.3:** Struktur des Phloroglucinols (**1**), das die Grundeinheit der Phlorotannine bildet und des zu den Carotinoiden zählende Xanthophyll Fucoxanthin (**2**).

in Experimenten mit Oberflächenextrakten deutlich erkennbar. Eine Kombination aus polaren und unpolaren Oberflächenextrakten, aufgetragen auf eine künstliche Oberfläche, lieferte einen ähnlichen bakteriellen Bewuchs wie auf einer intakten Alge. Wurden nur die polaren oder unpolaren Extrakte auf eine künstliche Oberfläche aufgetragen, unterschied sich die Aufwuchsgemeinschaft deutlich von der einer intakten Alge (Lachnit *et al.*, 2010).

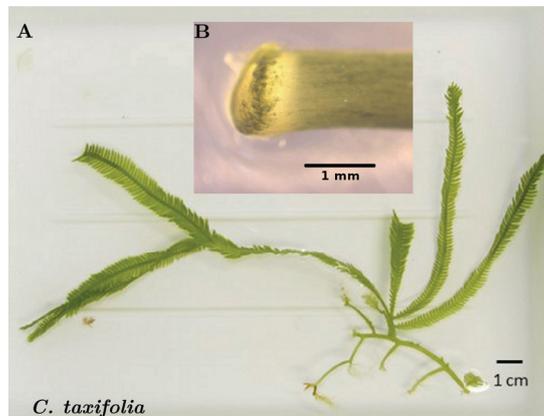
Mit zu den bekanntesten Abwehrsubstanzen gegenüber Fraßfeinden oder die Besiedlung von Aufwuchsgemeinschaften gehören die Oligomere des Phloroglucinols (**1**) die sogenannten Phlorotannine (Koivikko *et al.*, 2005; McLachlan & Craigie, 1964; Brock *et al.*, 2007), siehe Abbildung 1.3. Viele Metabolite wie die Phlorotannine dienen primär nicht nur der Abwehr sondern erfüllen noch weitere wichtige Funktionen in den Algen.

So sind z. B. von dem zu den Xanthophyllen zählenden Pigment Fucoxanthin (**2**) der Braunalgen verschiedenste Funktionen bekannt. Das Hauptcarotinoid von *F. vesiculosus* gibt den Braunalgen ihre charakteristische goldbraune Färbung und trägt als akzessorisches Pigment im Lichtsammelkomplex mit seiner Absorption zwischen 450 nm und 500 nm zum Schließen der sogenannten Grünücke der Photosynthese bei (Blinks, 1954). Zudem konnte in den Studien von von Viano *et al.* (2009) und Gerasimenko *et al.* (2010) auch eine antimikrobielle Wirkung des Fucoxanthins (**2**) gegenüber dem marinen Bakterium *Pseudoalteromonas* sp. D41 als weitere wichtige ökologische Funktion festgestellt werden. Da es sich in all diesen Studien aber um Experimente mit Gesamtzellextrakten handelt, blieb die ökologische Relevanz dieser Metabolite in Bezug auf die Algen und der auf ihren Oberflächen wachsenden Organismen unklar. Erst die Studie von Saha *et al.* (2011) zeigte eine deutliche Präsenz des sonst als intrazelluläre vermuteten Fucoxanthins (**2**) (Lichtlé *et al.*, 1992) auf der Oberfläche von *F. vesiculosus*. In Bioassays konnte in der Studie von Saha *et al.* auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration von Fucoxanthin (**2**) und dem Bewuchs durch Bakterien gezeigt werden.

### 1.1.2 Metabolite in der Algenzelle

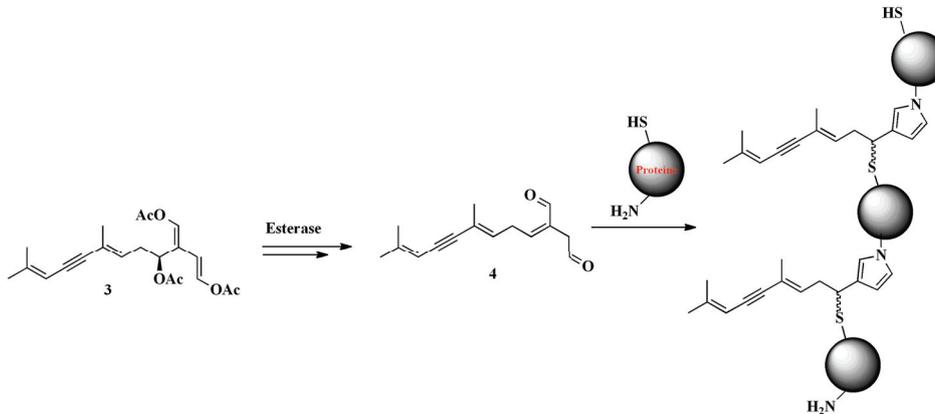
In erster Linie findet man die Sekundärmetabolite innerhalb der Algenzelle. Hier dienen sie als Abwehrsubstanzen gegenüber Herbivoren (Rempt *et al.*, 2012) und Epiphyten (Jennings & Steinberg, 1997) sowie der Zell-Zell-Kommunikation. Die Sekundärmetabolite können hierbei in bestimmten Kompartimenten, wie z. B. die Phlorotannine in den sogenannten Physoden, oder völlig frei vorliegen (Ramus, 1981). Wie schon anhand von Fucoxanthin (**2**) und den Phlorotanninen in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, können viele Sekundärmetabolite mehrere Funktionen übernehmen, die wichtig für das Überleben der Alge in ihrem jeweiligen Lebensraum sind.

Ein sehr prominentes Beispiel hierfür ist der Hauptsekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) (siehe Abbildung 1.5) der Grünalgen *Caulerpa prolifera* und *Caulerpa taxifolia* (siehe Abbildung 1.1 B und 1.4 A). Die Individuen der Gattung *Caulerpa* sind siphonale Algen, deren Thallus ein vielkerniges Plasma enthält, welches nicht durch Querwände aufgeteilt ist (Menzel, 1988). Rein äußerlich unterscheiden sich die bis zu einem Meter langen Grünalgen durch die Form ihrer Assimilatoren voneinander. *C. prolifera* weist einen eher blattartigen Assimilator auf, wogegen der von *C. taxifolia* ein federartiges Erscheinungsbild hat (siehe



**Abb. 1.4:** A) Thallus von *Caulerpa taxifolia*. B) Detailausschnitt des Wundverschlusses von *C. taxifolia* aufgenommen 5 min nach Verwundung. Der Kontrast der Bilder wurde mit dem Programm GIMP überarbeitet

Abbildung 1.1.B und 1.4.A) (Braune, 2008). Laut der Studie von Jung *et al.* (2002) unterschied sich die Caulerpenin-Konzentration zwischen den beiden *Caulerpa*-Arten nicht. In einer neueren Studie von Box *et al.* (2010) konnte allerdings ein durch Herbivore oder sesonal beeinflusster Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Algen festgestellt werden. Generell ist der Metabolit allerdings mit bis zu 1,3% am Gesamtfeuchtgewicht der Alge in *C. prolifera* und *C. taxifolia* am höchsten im Vergleich zu anderen Arten der Gattung *Caulerpa* vertreten (Amade & Lemée, 1998; Jung *et al.*, 2002; Dumay *et al.*, 2002; Box *et al.*, 2010). Bioassays zeigten eine toxische Wirkung des Caulerpenins (**3**) auf Seeigeleier, Larven und adulte Individuen (Paul & Fenical, 1986; Lemée *et al.*, 1993; Boudouresque *et al.*, 1996), eine antibakterielle und fungizide Wirkung (Paul & Fenical, 1986). Auch gibt es Indizien für eine Reduktion von Epiphyten auf der Oberfläche (Box *et al.*, 2008) von *C. taxifolia*



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung der Proteinquervernetzung nach der Esterase-katalysierten Transformation des Caulerpenins (**3**) zum Oxytoxin 2 (**4**).

durch Caulerpenin (**3**). Darüber hinaus wirkt Caulerpenin (**3**) antiproliferatorisch und wachstumshemmend auf menschliche Tumorzellen (Fischel *et al.*, 1995; Barbier *et al.*, 2001) und zeigte eine hemmende Wirkung gegenüber den im Zusammenhang mit den verschiedensten Krankheiten stehenden Lipoxygenasen (Cengiz *et al.*, 2010). Neben der Funktion als Abwehrmetabolit ist Caulerpenin (**3**) auch ein wichtiger Schlüssel in der Ausbildung eines Wundverschlusses nach Verletzung der Alge (Jung & Pohnert, 2001; Adolph *et al.*, 2005). Die Verletzung eines einzelligen Organismus wie z. B. *C. prolifera* und *C. taxifolia* durch Fraßfeinde oder starke Wasserbewegungen kann zu einem Ausfluss des Zellinhaltes führen, welcher letztendlich den Tod des Organismus bedeutet. Das Ausbilden eines Wundverschlusses (siehe Abbildung 1.4 B) innerhalb weniger Sekunden nach Verletzung der Alge verhindert so ein Auslaufen des Zellinhaltes (Welling *et al.*, 2009).

Studien über den Wundverschlussmechanismus von *C. taxifolia* zeigten einen Zusammenhang zwischen der Wundverschlussbildung und einer Abnahme an Caulerpenin (**3**) innerhalb der Alge (Jung & Pohnert, 2001; Adolph *et al.*, 2005). Kurz nach der Verletzung der Alge setzt der Wundverschlussmechanismus ein, indem das Caulerpenin (**3**) durch Esteraseaktivität zu einem 1,4-Dialdehyd (**4**) reduziert wird. Dieser 1,4-Dialdehyd (**4**) weist eine zur Carbonylfunktion in Konjugation stehende Doppelbindung auf und ist aus der *Caulerpa* verzehrenden Schnecke *Oxyoe olivacea* als Oxytoxin 2 (**4**) bekannt (Cimino *et al.*, 1990). Wie aus Studien über Dicarbonyl bekannt (Meade *et al.*, 2003), ist auch das Oxytoxin 2 (**4**) in der Lage mit nucleophilen Gruppen von Proteinen zu reagieren und diese zu vernetzen. Diese Reaktion zwischen dem deacetylierten Caulerpenin (**3**) und Proteinen konnte *in vitro* gezeigt werden (Adolph *et al.*, 2005) und bestätigt Befunde aus histologischen Untersuchungen über die Zusammensetzung des Wundverschlusses (Goddard & Dawes, 1983; Dreher *et al.*,

1982). Dagegen konnte *in vivo* ein Zusammenhang zwischen Caulerpenin (**3**) und dem gelatinösen Wundverschluss nur mit einer erheblichen Probenvorbereitung und mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Caulerpenin-Derivates wahrscheinlich gemacht werden (Weißflog, 2010).

Anhand der in den Abschnitten 1.1.1 und 1.1.2 vorgestellten Beispielen von Fucoxanthin (**2**) und Caulerpenin (**3**) wird deutlich, dass die Untersuchung von Sekundärmetaboliten helfen kann, ökologische problematische Sachverhalte besser zu verstehen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten viele verschiedene Methoden zur Extraktion und Lokalisation von Sekundärmetaboliten entwickelt, von denen einige in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

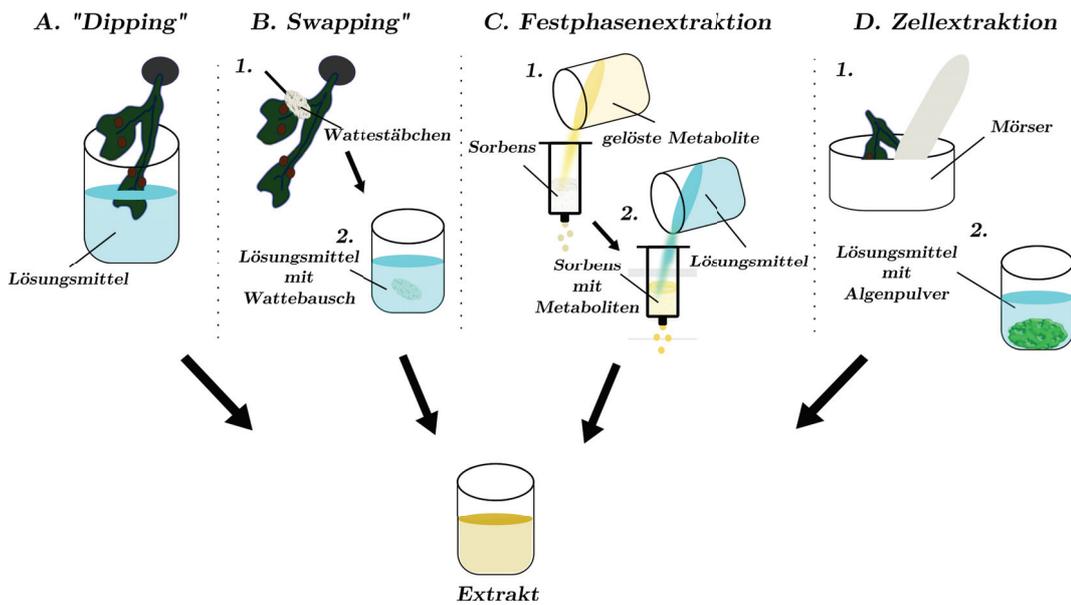
## 1.2 Etablierte Extraktions- und Lokalisationsmethoden von Algenmetaboliten

### 1.2.1 Extraktionsmethoden

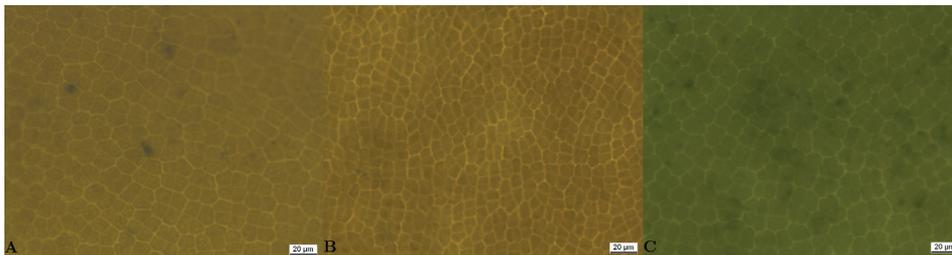
**Dipping-Methode** Die von de Nys 1998 (De Nys *et al.*, 1998) entwickelte, sogenannte Dipping-Methode ist die Standardmethode zur Extraktion von Sekundärmetaboliten der Algenoberfläche. Hierbei wird die Alge für einige Sekunden in ein Lösungsmittel getaucht, die Sekundärmetabolite der Oberfläche gehen dabei teilweise in das Lösungsmittel über und der erhaltene Extrakt wird weiter analysiert. Schematisch ist dieser Vorgang in Abbildung 1.6 A dargestellt.

Die Wahl des Lösungsmittels, in das die Alge getaucht wird, bestimmt je nach Polarität auch die Art der Metabolite, die von der Alge extrahiert werden können. So kann ein unpolares Lösungsmittel innerhalb weniger Sekunden nur schwer in die laminare, überwiegend polare Grenzschicht der Alge eindringen und die darin gelösten Metabolite aufnehmen. Eine starke Verlängerung der Eintauchzeit führt allerdings zu einem Verletzen/Anlösen der äußeren Algenzellwand und einem Austritt von Sekundärmetaboliten aus der Algenzelle. In Abbildung 1.7 ist die Oberfläche von *F. vesiculosus* zu sehen, sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach eintauchen in Hexan für 5 bzw. 60 Sekunden. Hierbei ist deutlich eine Farb- und Zellformveränderung bei längerer Verweilzeit der Alge im Lösungsmittel zu erkennen. Dies zeigt auch, dass eine mehrfache Beprobung derselben Alge nicht sinnvoll ist.

Da ein kombinierter Einfluss aus der Oberflächenbeschaffenheit, der Einwirkzeit und der Stärke des verwendeten Lösungsmittels auf den Extraktionserfolg beobachtet wird, sollte die Eintauchzeit für die verwendete Alge und die Auswahl des Lösungsmittels in Vorversuchen getestet werden (Nylund *et al.*, 2007). Hierbei ist eine mikroskopische Überprüfung der Algenoberfläche und ein Anfärben mit z. B. Evans Blue, um die Oberfläche auf eventuell beschädigte Zellen zu überprüfen, unabdingbar (Taylor & West, 1980; Weinberger *et al.*, 2005; Lachnit *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2011). Um



**Abb. 1.6:** Methoden zur Extraktion von Metaboliten. A) Dipping: Extraktion von Algenoberflächenmetaboliten mittels Eintauchen in ein Lösungsmittel B) Swapping: 1. Abwischen der Algenoberfläche mit einem Wattestäbchen. 2. Extraktion des Wattebausches C) Festphasenextraktion: 1. Anreichern der Metabolite auf dem Sorbens. 2. Extraktion der Metabolite vom Sorbens mit Lösungsmittel. D) Gesamtzellextraktion: 1. Mörsern von Algenmaterial zu feinem Pulver. 2. Extraktion der Metabolite aus dem Algenpulver mit Lösungsmittel.



**Abb. 1.7:** Mikroskopische Ansicht der Oberfläche von *F. vesiculosus* (jeweilige Breite des Bildausschnittes ca. 230 µm). A) Unbehandelte Oberfläche. B) Oberfläche nach 5 s Eintauchen in Hexan C) Oberfläche nach 60 s Eintauchen in Hexan und jeweils angefärbt mit Evans Blue. Der Kontrast der Aufnahmen wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

ein größeres Spektrum an Sekundärmetaboliten zu extrahieren, wurde die Methode in den letzten 20 Jahren stetig weiterentwickelt. Statt eines Lösungsmittels wurden z. B. Lösungsmittelgemische verwendet (Lachnit *et al.*, 2010; Kientz *et al.*, 2011). Dennoch besteht, besonders bei der Verwendung von sehr polaren Lösungsmitteln, ein erhöhtes Risiko, die Alge zu verletzen und die Ergebnisse durch das Austreten von zellinternen Sekundärmetaboliten zu beeinflussen.

**Swapping** Eine weitere Methode zur Extraktion der Oberfläche ist das sogenannte Swapping (Schmitt *et al.*, 1995). Hierbei wird die Alge mit einem Wattestäbchen abgetupft und aufgenommene Metabolite anschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln aus dem Wattebausch des Stäbchens extrahiert (siehe Abbildung 1.6 B). Eine zu große Reibung kann auch hier zu einer Verletzung der Oberfläche und damit zu einem Austritt von Zellinhaltsstoffen führen. Allerdings zeigte die Studie von Saha *et al.* (2011), in der die beiden hier vorgestellten Extraktionsmethoden angewendet wurden, einen deutlich verringerten Extraktionserfolg der Swapping- gegenüber der Dipping-Methode.

**Festphasenextraktion** Für eine generelle Extraktion von Metaboliten aus wässrigen Lösungen wird in der Analytik vorwiegend die sogenannte Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) angewendet (Cammann, 2001; Vidoudez *et al.*, 2011). Es handelt sich hierbei um einen physikalischen Extraktionsprozess zwischen einer flüssigen und einer festen Phase, dem sogenannten Sorbens. Bei dieser Methode werden die sich in Lösung befindenden Metabolite durch das Sorbens geleitet und durch die Wechselwirkungen mit dem Sorbens auf diesem angereichert (siehe Abbildung 1.6 C). Anschließend werden die angereicherten Metabolite mit Eluenten von dem Sorbens wieder gelöst und mit weiteren analytischen Methoden analysiert.

Da die Eigenschaften des Sorbens durch die verschiedensten Wechselwirkungen mit

den Analyten, wie z. B. polare und unpolare, ionische Wechselwirkungen, Wechselwirkungen oder über kovalente Bindungen, einen großen Einfluss auf die extrahierte Metabolitklassen haben, wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Sorbensmaterialien entwickelt (Hennion, 1999; Liška, 2000). Eines dieser Materialien ist das mit 18C langen Kohlenstoffketten modifizierte Kieselgel. Die auf der Oberfläche des unmodifizierten Kieselgels gebundenen Si-OH-Gruppen erhöhen die Polarität und ermöglichen so die Fixierung überwiegend polarer Moleküle. Durch die Umsetzung von Alkoxy- oder Chlorsilanen wird ein Teil der ursprünglichen Hydroxygruppen durch C<sub>18</sub>-Ketten ersetzt, wodurch die Polarität der Oberfläche herabgesetzt wird. So können auch unpolare Moleküle Wechselwirkungen mit dem modifizierten Kieselgel eingehen, folglich kann ein größeres Spektrum an Metaboliten extrahiert werden. Da für die Festphasenextraktion die Metabolite allerdings in Lösung vorliegen müssen und sich das Sorbens üblicherweise in einer Kartusche befindet, eignet sich diese Methode in dieser Form nicht für die Extraktion von Algenoberflächenmetaboliten.

**Gesamtzellextraktion** Die Herstellung eines Zellextraktes des gesamten Algenthalus erfolgt durch mechanische Zerkleinerung (Mörser, Mixer, etc.) der getrockneten (meist gefriergetrocknet) oder frischen Algen. Im Anschluss folgt die Extraktion der Sekundärmetabolite aus dem pulverisierten Algenmaterial durch verschiedene Lösungsmittel (siehe Abbildung 1.6 D). Hierbei erhält man im Vergleich zur Dipping-Methode hohe Konzentrationen an Sekundärmetaboliten pro Masse oder Fläche der Alge (Nylund *et al.*, 2007). Allerdings kann man nicht zwischen den Metaboliten des Algeninneren und der Oberfläche unterscheiden.

### 1.2.2 Lokalisationsmethoden

Mit einer räumlichen Auflösung im Bereich von wenigen Zentimetern bis Millimetern liefern die schon beschriebenen Dipping- und Swapping-Methoden einen guten ersten Überblick über einen Teil der auf der Oberfläche von marinen Makroalgen anwesenden Sekundärmetabolite (Schmitt *et al.*, 1995; De Nys *et al.*, 1998). Die für ökologische Fragestellungen, welche die Interaktionen der Alge mit assoziierten Mikroorganismen betreffen, notwendige genauere Auflösung von wenigen Mikrometern auf und an der Algenoberfläche sowohl in x, y als auch z-Richtung, wird von diesen Methoden allerdings nicht erreicht.

**DESI-MS** Eine Darstellung von Sekundärmetaboliten auf der Algenoberfläche mit einer Auflösung von 200 µm gelang erstmals Lane *et al.* (2009) und Nyadong *et al.* (2009) unter Anwendung der Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS). Es war ihnen möglich, die Verteilung von Bromophycoliden und deren Konzentration auf der Oberfläche der Rotalge *Callophycus serratus* zu ermitteln. Bei der Anwendung der DESI-Methode wird unter atmosphärischem Druck ein

fokussiertes Spray aus geladenen Mikrotropfen verschiedener Lösungsmittel oder wässriger Lösungen auf die dem Wasser entnommene Alge gerichtet und so die Oberflächenmetabolite ionisiert. Diese werden im Anschluss an die Ionisation in ein Massenspektrometer überführt und analysiert (Takáts *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2009). Die Verteilung der Sekundärmetabolite konnte so aufgrund der Fokussierung des Sprays mit einer Auflösung von bis zu 200  $\mu\text{m}$  in x,y-Richtung dargestellt werden. Allerdings erlaubte es auch diese Methode nicht, Metabolite in der z-Richtung von der Algenoberfläche in die laminare Grenzschicht, zu analysieren. Zudem zeigt die Anwendung der Methode, dass aufgrund der verwendeten Lösungsmittel die Gefahr einer Verletzung der Oberfläche durch ein zu langes Einwirken auch hier gegeben ist (pers. Gespräch mit Z. Takáts, Entwickler der DESI-Methode (Takáts *et al.*, 2005)). Darüber hinaus kann es zu einem verminderten Signal aufgrund von Ionensuppression durch die erhöhte Salzkonzentration auf der Oberfläche der marinen Algen kommen (Annesley, 2003; Mazzella *et al.*, 2009).

**Weitere Lokalisationsmethoden** Für die generelle Darstellung von Metaboliten innerhalb eines Organismus oder auch auf der Oberfläche wurden in den letzten Jahren z. B. eine Reihe von Methoden auf Basis der Massenspektrometrie (MS), wie die schon erwähnte DESI-MS (Nyadong *et al.*, 2009; Esquenazi *et al.*, 2009; Andras, 2012) sowie weitere unter atmosphärischen Druck durchführbare MS-Methoden (Wu *et al.*, 2012) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS) (Cha *et al.*, 2008) verwendet. Darüber hinaus wurden auch molekülspektroskopische Methoden gekoppelt mit mikroskopischen Geräten wie die Infrarot (IR)- und die Fluoreszenzspektroskopie zur Lokalisation von Metaboliten angewendet (Dworjanyn *et al.*, 1999; Naumann *et al.*, 2005) .

Die meisten der verwendeten Techniken sind wie z. B. die massenspektrometrischen Methoden nicht zerstörungsfrei, erfordern eine aufwändige Probenvorbereitung wie im Fall von MALDI-MS oder eine langwierige Optimierung der Messinstrument-Parameter (Esquenazi *et al.*, 2009). Die Durchführung einer Messung kann überdies zum Tod des Organismus führen oder auch nur an toten Organismen durchgeführt werden. Viele der Methoden sind wie die Fluoreszenz-Spektroskopie zwar sehr sensitiv, aber oft für die Detektion von bestimmten Metaboliten innerhalb biologischer Gewebe nicht spezifisch genug (Galler *et al.*, 2003). Besonders die Messung von wässrigen oder mit Wasser benetzten Proben ist für einige Methoden wie der IR-Spektroskopie nur schlecht durchführbar, da das Wasser in weiten Teilen des IR-Spektrums absorbiert und so die gesuchten Signale überdeckt (Parker, 1983).

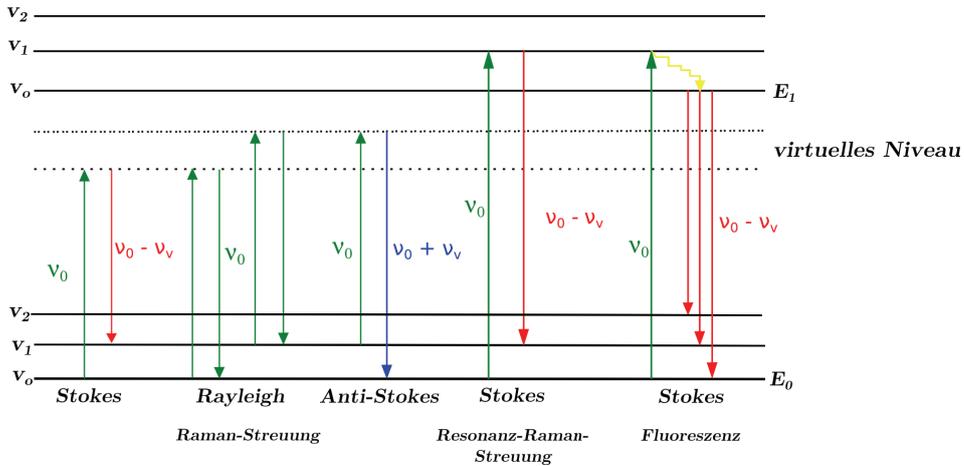
### 1.3 Raman- und CARS-Spektroskopie

Im Gegensatz zu vielen Lokalisationsmethoden wie z. B. der Fluoreszenz-Spektroskopie besitzt die Raman-Spektroskopie eine große Spezifität für die Detektion bestimmter Metabolite in biologischen Geweben und kann auch ohne große Probenvorbereitung angewendet werden. Im Vergleich zur IR-Spektroskopie zeichnet sich die Raman-Spektroskopie durch ihre geringe Sensitivität gegenüber Wasser aus, was sie sehr attraktiv für die Anwendung auf biologische Proben macht (Parker, 1983). Neue Entwicklungen im Bereich der Mikroskopie und der verwendeten Laser innerhalb der letzten Jahrzehnte erweiterten den Anwendungsbereich der Mikro-Raman-Spektroskopie deutlich und machen sie so zu einem neuen herausragenden Arbeitsmittel für die Detektion und Analyse von Metaboliten im biologischen Material (Petry *et al.*, 2003; Baena & Lendl, 2004; Krafft *et al.*, 2009; Wächtler *et al.*, 2012).

Die in dieser Arbeit verwendete Raman-Spektroskopie gehört mit der IR-Spektroskopie zu den Methoden der Schwingungsspektroskopie, welche sich mit der Anregung der Molekülschwingungen durch Licht und den daraus ableitbaren, spezifischen Molekülcharakteristika befassen. Molekülschwingungen können entweder direkt als Absorption im Infrarotspektrum oder indirekt als inelastische Streustrahlung im Raman-Spektrum gemessen werden.

Die Grundlage der hier verwendeten Raman-Spektroskopie ist der sogenannte Raman-Effekt, der schon 1923 von Smekal (Smekal, 1923) theoretisch vorhergesagt wurde und fünf Jahre später von C.V. Raman (Raman & Krishnan, 1928) experimentell nachgewiesen werden konnte. C.V. Raman konnte zum ersten Mal zeigen, dass es bei der Streuung von Licht an Molekülen neben einer elastischen Streuung (Rayleigh-Streuung) auch zu einer inelastischen Streuung (Stokes-/anti-Stokes-Streuung) kommt. Bei der inelastischen Streuung kommt es zu einer Energieübertragung zwischen dem anregendem Photon des Lichtes und den Molekülen der Probe bei der sich die Rotations-Schwingungsenergie des Moleküls ändert. Je nach Art der Energieübertragung besitzt das emittierte Streulicht gegenüber dem verwendeten Anregungslicht ( $\nu_0$ ) eine höhere (anti-Stokes-Streuung,  $\nu_0 + \nu_v$ ) bzw. niedrigere Frequenz (Stokes-Streuung,  $\nu_0 - \nu_v$ ) und stellt daher ein spezifisches Charakteristikum für die Schwingungen des streuenden Moleküls dar (schematisch dargestellt in Abbildung 1.8).

Allerdings sind nur Schwingungen im Raman-Spektrum zu erkennen bei denen sich die Polarisierbarkeit des Moleküls mit der Schwingung ändert (Demtröder, 2007). Insofern sind nicht alle möglichen Schwingungen innerhalb eines Moleküls mit der Raman-Spektroskopie sichtbar. Generell ist das Raman-Signal ein ziemlich schwaches Signal da von ca.  $10^6$  bis  $10^8$  gestreuten Photonen nur eins inelastisch gestreut wird (Smith & Dent, 2005). Die Intensität  $I$  des Raman-Effektes ist sowohl von der Intensität  $I_O$  als auch von der Frequenz  $\nu$  der anregenden Lichtquelle nach Gleichung 1.1 abhängig (Wedler, 1997). Wobei  $N$  die Anzahl der streuenden Moleküle und  $(\frac{\delta\alpha}{\delta\rho})$  die Polarisierbarkeitsänderung darstellt.



**Abb. 1.8:** Energetisches Schema der möglichen Effekte von Raman- und Resonanz-Raman-Streuung bei der Interaktion von Licht der Frequenz  $\nu_0$  mit einem Molekül. Mit  $E_0$  und  $E_1$  für die verschiedenen elektronischen Energieniveaus,  $v_1$  und  $v_2$  für die verschiedenen Molekülschwingungsniveaus und das virtuelle Schwingungsniveau des Moleküls. Die Farbe der jeweiligen Pfeile entsprechen verschiedenen Frequenzen, grün entspricht  $\nu_0$ , rot steht für die Frequenz  $\nu_0 - \nu_v$  und blau  $\nu_0 + \nu_v$  und der gelbe Pfeil stellt die Fluoreszenz dar (Abbildung nach Marcelli *et al.* (2012)).

$$I \sim \nu^4 I_0 N \left( \frac{\delta\alpha}{\delta\rho} \right) \tag{1.1}$$

War man am Anfang der Raman-Spektroskopie noch auf das Sonnenlicht oder Quecksilberdampf lampen als leistungsstarke Lichtquelle angewiesen (Raman & Krishnan, 1928), werden seit den 60 Jahren Laser verwendet (Kogelnik & Porto, 1963; Brandmüller *et al.*, 1966), die durch ihr leistungsstarkes, monochromatisches Licht die perfekte Anregungsquelle für die Raman-Streuung darstellen. Dennoch gilt, dass mit einer Zunahme der Intensität der Lichtquelle auch die Gefahr einer Probenzerstörung durch deren Erwärmung steigt.

Eine Steigerung des Raman-Signals ist auch durch eine Frequenzerhöhung des verwendeten Lasers möglich, da die Intensität der Raman-Bande proportional zur vierten Potenz der Frequenz ist (siehe Gleichung 1.1). Mit steigender Frequenz (kleinere Wellenlänge) des Lasers steigt auch die Gefahr der Photodissoziation der Probe. Überdies kann es durch die Verwendung eines Lasers mit einer erhöhten Frequenz auch zu einer Anregung des Moleküls in ein Schwingungsniveau höheren energetischen Zustandes kommen (siehe Abbildung 1.8). Bei dem anschließenden Übergang des elektronisch angeregten Systems in einen niedrigeren Energiezustand

kann es zu einer spontanen Emission von Licht, der sogenannten Fluoreszenz, kommen. Die Frequenz des hierbei emittierten Lichtes ist geringer als die des einstrahlenden und kann auf Grund hoher Intensität das schwache Raman-Stokes-Signal deutlich überlagern.

Um diese Problematik der geringen Raman-Intensität und der überlagernden Fluoreszenz zu umgehen, wurden in den letzten Jahren bestimmte Raman-Techniken entwickelt, von denen einige in dieser Arbeit verwendet worden sind und in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.

### 1.3.1 Fourier-Transformations-Raman-Spektroskopie (FT-Raman)

Das Auftreten von Fluoreszenz kann durch die Wahl der geeigneten Anregungswellenlänge des verwendeten Lasers unterdrückt werden. So reicht Laserlicht aus dem nahen Infrarotbereich – meist Nd-YAG-Laser mit  $\lambda = 1065 \text{ nm}$  – nicht aus, um die äußeren Elektronen eines Moleküls in einen angeregten Zustand zu überführen, was verhindert, dass Fluoreszenz emittiert wird. Mit Laserlicht aus dem nahen Infrarotbereich sind Raman-Schwingungen anregbar, jedoch ist die Raman-Intensität durch die Abhängigkeit von der Frequenz der verwendeten Lichtquelle (siehe Gleichung 1.1) nur schwach ausgeprägt. Das verwendete Spektrometer muss daher eine hohe Empfindlichkeit besitzen.

Gegenüber den auf Gittern und Filtern basierenden, klassischen, dispersiven Raman-Spektrometern kann eine erhöhte Empfindlichkeit z. B. durch einen höheren Strahlungsfluß mittels der Verwendung eines Interferometers erreicht werden (Levin & Lewis, 1990). Das Raman-Spektrum wird hierbei mittels einer Fourier Transformation (FT) aus dem aufgenommenen Interferogramm berechnet. Der höhere Strahlenfluss und die dadurch erreichte höhere Empfindlichkeit in Form eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses, wird durch die Verwendung von kreisrunden Lochblenden anstelle von, den in dispersiven Systemen verwendeten, schmalen Spalten erreicht. Man spricht hier auch vom Nutzen des sogenannten Jacquinet- oder auch Lichtwertvorteils (Levin & Lewis, 1990; Gremlich, 2000). Ein weitere Vorteil des FT-Gerätes gegenüber der klassischen Raman-Spektroskopie ist die hohe Wellenzahlgenauigkeit und Stabilität die durch einen mitlaufenden Referenz-Laser erreicht wird (Connes-Vorteil, Levin & Lewis, 1990). Entscheidend für die Verwendung eines FT-Raman-Spektrometers gegenüber einem dispersiven Gerät ist vielmehr die deutliche Zeitersparnis in den Messungen, durch das gleichzeitige erfassen eines großen Spektralbereiches (Felgett- oder auch Multiplex-Vorteile, Gremlich, 2000).

### 1.3.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie (RR-Spektroskopie)

Wie schon in Abschnitt 1.3 dargestellt, kann die Raman-Intensität durch die Wahl der Frequenz des verwendeten Lasers erhöht werden. In der Resonanz-Raman-

Spektroskopie wird als Anregungswellenlänge der Lichtquelle eine Wellenlänge der Frequenz gewählt, die entweder gleich (Resonanz-Raman-Effekt) oder nahe (Preresonanz-Raman-Effekt) der Wellenlänge eines elektronischen Überganges des bestrahlten Moleküls ist (Albrecht, 1961). Hierdurch wird der Streueffekt der Lichtquanten durch die absorbierte, zusätzliche Energie um einen Faktor von  $10^2$  bis  $10^6$  verstärkt. Das generelle Schema und der Unterschied des RR-Effektes im Vergleich zum Nicht-RR-Effekt ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

Aufgrund der Verstärkung des Streueffektes bietet die RR-Spektroskopie die Möglichkeit, eine wässrige Lösung mit den Konzentrationen von  $10^{-5}$  M bis  $10^{-7}$  M, wie sie in biologischen Proben häufig vorkommen, zu detektieren (Robert, 2009). Besonders chromophore Systeme, die im sichtbaren bis nahen Infrarotbereich einen elektronischen Übergang besitzen, sind mit der RR-Spektroskopie leicht zu detektieren. Zu beachten ist hier, dass nicht alle Schwingungen verstärkt werden, sondern nur diejenigen, die zum chromophoren System gehören oder sich in dessen Nähe befinden (Albrecht, 1961). Die RR-Spektroskopie bietet so auch die Möglichkeit einer selektiven Anregung und Detektion eines chromophoren Systems unter der Voraussetzung, dass die benötigte Anregungswellenlänge für den Übergang in ein energetisch höheres Niveau bekannt ist. Somit kann man gezielt die Interaktion oder Konformation eines chromophoren Systems studieren, auch wenn dieses noch in einer biologischen Matrix eingebettet ist oder nicht als Reinsubstanz vorliegt (Robert, 2009). Daher findet die RR-Spektroskopie häufige Anwendung in der Erforschung von biologischen, chromophoren Systemen, wie z. B. bei Carotinoiden oder Häm-Molekülen *in vivo* (Robert, 1999; Ermakov *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2008).

Trotz einer Intensitätserhöhung sind auch einige Nachteile bei der Anwendung der Methode zu nennen. Zum einen führt die Anregung mit einer Wellenlänge nahe eines elektronischen Überganges auch zur Absorption der erhöhten Energie, das wiederum die photolytische Zersetzung oder Verbrennung der Probe bewirken kann (Smith & Dent, 2005). Eine kontinuierliche Kühlung der Probe oder der Einsatz einer Drehkuvette bei flüssigen Proben können diesem negativen Aspekt entgegenwirken (Demtröder, 2007). Dennoch sollte durch Testmessungen die Möglichkeit eines photolytischen/verbrennenden Effektes auf die Probe überprüft werden (Smith & Dent, 2005).

Eine Anregung in der Nähe eines elektronischen Überganges birgt auch die Gefahr einer Überlagerung des Signals durch auftretende Fluoreszenz, deutlich dargestellt in Abbildung 1.8. Mittlerweile werden allerdings Detektionstechniken verwendet, die sich zu Nutze machen, dass die Fluoreszenz um 100 ps verzögert zu den Resonanz-Raman (RR)-Spektrallinien erscheint (Matousek *et al.*, 1999, 2001; Efremov *et al.*, 2007).

In dieser Studie wird die RR-Spektroskopie mit einem konfokalen Mikroskop gekoppelt, dies wird oft auch als konfokale RR-Spektroskopie bezeichnet. Durch die Verwendung eines Mikroskops wird eine deutlich höhere Auflösung erreicht, wodurch

diese Technik für die Analyse und das chemische Abbilden von Oberflächen oder Proben von geringer Schichtdicke geeignet ist. Das Mikroskopobjektiv fokussiert den Laserstrahl auf die Probe und sammelt die RR-Streuung aus diesem Bereich. Durch die Verwendung eines konfokalen Mikroskops wird Streulicht von außerhalb der Fokusebene, welches das Raman-Signal überdecken könnte, unterdrückt (Semwogerere & Weeks, 2005).

### 1.3.3 Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS)

Die bisher vorgestellten Techniken basieren alle auf einem linearen Zusammenhang zwischen der Energiedifferenz des gestreuten Photons und der Raman-Frequenzverschiebung. Allerdings ist dieser lineare Zusammenhang bei der Verwendung von leistungsstarken Lasern die eine höhere Intensität als die Strahlung der kontinuierlichen Laser aufweisen nicht mehr gegeben und nichtlineare Effekte sind zu erkennen (Demtröder, 2007).

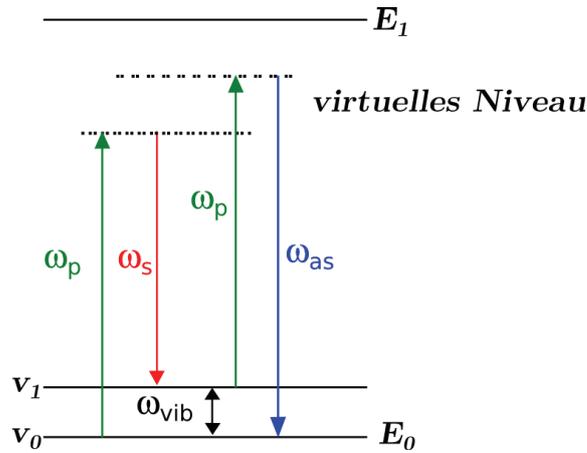
Eine der bedeutendsten, nichtlinearen Raman spektroskopischen Techniken ist die Kohärente anti-Stokes Raman Streuung (Coherent anti-Stokes Raman Scattering, CARS). Maker und Terhune war es 1965 zum ersten Mal möglich, den der Kohärente anti-Stokes Raman Streuung (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) (CARS) zugrunde liegenden Effekt zu zeigen (Maker & Terhune, 1965). Allerdings wurde die Bezeichnung CARS-Effekt erst 1974 von Begley eingeführt (Begley *et al.*, 1974).

Zwei verschiedene Laser mit unterschiedlicher Frequenz dienen als Anregungsquelle. Der erste Laser ist ein sogenannter Pumplaser mit der Frequenz  $\omega_p$ . Der zweite Laser ist der sogenannte Stokes-Laser ( $\omega_s$ ). Es gilt  $\omega_s < \omega_p$ .

Der allgemeine CARS-Prozess, der auch als 4-Photonen- oder auch 4-Wellenprozess bezeichnet wird, ist in Form eines einfachen Energieschemas nach Evans & Xie (2008) in Abbildung 1.9 gezeigt.

Hier werden die Moleküle von einem Photon des Pumplasers mit der Frequenz  $\omega_p$  und einem Photon des Stokes-Lasers mit der Frequenz  $\omega_s$  über einen virtuellen Zustand in einen angeregten Schwingungszustand überführt. Entspricht die Differenz der beiden eingesetzten Laserfrequenzen ( $\omega_p - \omega_s$ ) genau der Frequenz einer Raman-aktiven Molekülschwingung, wird diese Schwingung kohärent angeregt (Demtröder, 2007). Die so angeregten Moleküle wechselwirken daraufhin mit einem weiteren Photon des Pumplasers ( $\omega_p$ ) und werden so erneut in einen virtuellen Zustand überführt. Beim letztendlichen Übergang in den Schwingungsgrundzustand emittieren die Moleküle Photonen mit der Frequenz  $\omega_{as}$ . Da die Frequenz der gestreuten Photonen bei einer höheren Frequenz  $\omega_{as}$  als die Frequenz der anregenden Strahlung  $\omega_p$  liegt, handelt es sich bei dem erhaltene CARS-Signal um die schon beschriebene anti-Stokes-Streuung (Vergl. Abschnitt 1.3 und Abbildung 1.8).

Im Gegensatz zur linearen Raman-Spektroskopie bei der die Intensität der Anti-Stokes-Streuung, bedingt durch die geringe Besetzung der angeregten Schwingungs-



**Abb. 1.9:** Energetisches Schema des CARS-Effektes. Mit  $\omega_p$  und  $\omega_s$  für die Frequenz des Pump- und des Stokes-Lasers, sowie  $\omega_{as}$  für das anti-Stokes-CARS-Signal.  $E_0$  und  $E_1$  für die unterschiedlichen elektronischen Energieniveaus der Moleküle sowie  $\nu_0$  und  $\nu_1$  für die verschiedenen Molekülschwingungsniveaus. (Abbildung nach Evans & Xie (2008))

niveaus unter den vorherrschenden thermischen Bedingungen, sehr klein ist, ist die Intensität der Anti-Stokes-Streuung in der nicht-linearen-Spektroskopie erhöht. Die Ursache hierfür ist die Verwendung eines Pumplasers mit dem eine große Anzahl an Molekülen in den angeregten Schwingungszustand überführt werden kann was somit die Intensitätssteigerung der Anti-Stokes-Streuung erklärt (Demtröder, 2007).

Die anti-Stokes-Streuung hat den Vorteil, dass sie – im Gegensatz zur Stokes-Streuung – des Moleküls nicht in einem Bereich liegt, der durch das Auftreten einer möglichen linearen Fluoreszenz (angeregt durch 1-Photon) (Vergleich Abbildung 1.8 mit 1.9) überlagert wird (Evans & Xie, 2008).

Allerdings kann unter Umständen das CARS-Signal auch in der CARS-Spektroskopie von der Fluoreszenz chromophorer Systeme, angeregt durch zwei Photonen, überlagert werden. Auf dieses Phänomen wird anhand eines Beispiel der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse in Abschnitt 3.4 noch ausführlich eingegangen.

Wie aus Abbildung 1.9 ersichtlich, befinden sich die Moleküle sowohl am Anfang als auch am Ende des CARS-Prozesses im gleichen Zustand. Der Energieerhaltungssatz für den CARS-Effekt lautet demnach wie folgt:

$$\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s \quad (1.2)$$

Allerdings folgt der CARS-Effekt nicht nur dem Energieerhaltungssatz, sondern auch dem Impulserhaltungssatz (Demtröder, 2007):

$$2\vec{k} = \vec{k}_s + k_{as}. \quad (1.3)$$

Die an dem CARS-Effekt beteiligten vier elektromagnetischen Wellen (4-Wellen-, 4-Photonenprozess), stehen somit in einer festen Phasenbeziehung zueinander. Das CARS-Signal ist daher als gerichtetes Signal gegenüber der Raman-Streuung um eine- bis achtfache Größenordnung höher. Die für das CARS-Signal nötige Leistung wird durch die Verwendung von gepulsten Lasern und die Überlagerung der Pulse (Phasenanpassung) erreicht. Damit überhaupt ein gerichtetes CARS-Signal auftritt, müssen die Phasen der elektromagnetischen Wellen denen des Pump- und des Stokes-Lasers angepasst sein (Cheng *et al.*, 2002). Für die Phasenanpassung in nicht-dispersiven Medien muss Gleichung 1.3 erfüllt sein (Demtröder, 2007). Diese gilt allerdings auch bei der Verwendung eines Mikroskops, wenn ein stark fokussierendes Objektiv mit einer hohen numerischen Apparatur (NA) verwendet wird (Evans & Xie, 2008). Die parallel geführten Laserstrahlen werden in einem Objektiv mit einer hohen NA stark fokussiert und führen zu einer großen Verteilung der Wellenvektoren, die wiederum die Phasenanpassungskriterien erfüllen.

Aufgrund der starken Nichtlinearität des CARS-Prozesses wird das Signal invers nur in einem begrenzten Bereich der Probe generiert. Nur in dem Bereich/Volumen, in dem der Fokus der verwendeten Laserstrahlung zusammenfällt, sind die Feldstärken groß genug, damit ein CARS-Signal entstehen kann (Cheng & Xie, 2004). In der CARS-Mikroskopie liegt die räumliche Auflösung unter der des Abbe-Limits für die konventionell verwendete, lineare Lichtmikroskopie (Beeker *et al.*, 2009). Daher ist es mit der CARS-Mikroskopie möglich hoch aufgelöste 3D-Aufnahmen von chemischen Verteilungen zu erstellen (Zumbusch *et al.*, 1999). Einer der wesentlichen Vorteile bei der Anwendung der CARS-Mikroskopie gegenüber der Raman-Mikroskopie auf biologische Proben ist das schnellere Aufnehmen von Bildern durch den kohärenten CARS-Prozess mit dem Fokus auf nur einer spezifischen Raman-Schwingung (Potma *et al.*, 2001). Die oft empfindlichen Proben können so in kürzerer Zeit analysiert werden, was das Risiko einer Verbrennung oder Verletzung der Probe reduziert. Allerdings geht durch den Fokus, auf nur eine spezifische Raman-Schwingung auch viele chemische Information verloren, die in der klassischen Raman-Spektroskopie erhalten bleibt (Potma *et al.*, 2001).

## 2 Aufgabenstellung

Sekundärmetabolite spielen in Form von Infochemikalien und Abwehrsubstanzen auf der Algenoberfläche eine entscheidende Rolle für ökologische Interaktionen der Alge mit ihrer Umgebung. Die Identifikation und die genaue Lokalisation der Metabolite auf der Algenoberfläche kann viel zum Verständnis der Funktion der Metabolite beitragen. Die für die Extraktion von Algenoberflächenmetaboliten bisher vornehmlich angewendete Standardmethode in Form von Eintauchen der Alge in Lösungsmittel (Dipping, (De Nys *et al.*, 1998)) birgt ein hohes Risiko, die Alge durch das Lösungsmittel zu verletzen und so auch Metabolite des Zellinneren zu extrahieren. Überdies kann auch die Mehrfachbeprobung desselben Algenhaltus durch verschiedene Lösungsmittel, mit Hinblick auf ein größeres Spektrum an Sekundärmetaboliten, das Risiko einer Verletzung des Organismus zusätzlich erhöhen.

- In dieser Arbeit sollten daher nicht destruktive Methoden entwickelt und getestet werden, um die Metabolite der Oberfläche mariner Makroalgen zu extrahieren und zu lokalisieren.

Generell ist eine Extraktion bei der die den Metaboliten umgebende Matrix nicht mit einem Lösungsmittel in Berührung kommt in Form einer Festphasenextraktion mit einem Absorbiermaterial möglich. Hierbei wird der Metabolit zuerst auf dem Sorbens angereichert und anschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln von diesem gelöst. Die Anwendbarkeit dieser Form der Extraktion auf Oberflächenmetabolite von Makroalgen wurde allerdings bisher nicht getestet. Unter den marinen Algen stellt die gut erforschte und leicht zu sammelnde Braunalge *Fucus vesiculosus* einen idealen Modellorganismus für diese Arbeit dar.

- Ausgehend von diesen Erkenntnissen soll hier eine Extraktionsmethode für die Metabolite der Oberfläche von *F. vesiculosus* auf der Basis von absorbierenden Materialien, wie modifiziertes Kieselgel (C<sub>18</sub>), entwickelt, getestet und mit bisherigen Standardmethoden verglichen werden.
- Weiterhin soll mittels Mehrfachbeprobung desselben Individuums untersucht werden, ob die Metabolite bei einfacher Anwendung komplett extrahiert werden oder die Methode mehrfach angewendet werden muss.

Die Anwesenheit und die ökologische Funktion des Metaboliten Fucoxanthin (2) auf der Oberfläche der Braunalge *Fucus vesiculosus* konnte in Kooperation mit

Wissenschaftlern des Geomars (Kiel) nachgewiesen werden (Saha *et al.*, 2011). Die hier verwendete Dipping-Methode konnte die Sekundärmetabolite direkt auf der Oberfläche nur in x-, y-Richtung mit einer Auflösung von 1 cm<sup>2</sup> darstellen. Die für eine Interaktion mit der Umwelt wichtige von der Algenoberfläche in z-Richtung ausgehende laminare Grenzschicht (0,1 mm–0,2 mm), kann so nicht detailliert erforscht werden.

Die für die Lokalisation von Sekundärmetaboliten innerhalb einer Grenzschicht oder im biologischen Geweben etablierten, meist spektroskopischen Methoden (Schmitt *et al.*, 2003), wurden bisher nicht für die Erforschung der Algen-nahen, laminaren Grenzschicht angewendet.

- Die Anwendbarkeit von spektroskopischen Methoden zur nicht-destruktiven Untersuchung von Algenmaterial und der angrenzenden laminaren Grenzschicht soll überprüft werden und darüber hinaus sollen für die Anwendung geeignete Messparameter festgelegt werden.
- Durch die Anwendung von den zuvor überprüften nicht destruktiven Techniken wie der Mikro-RR-Spektroskopie soll die Lokalisation und der Gradient der Carotinoide innerhalb der laminaren Grenzschicht und auf der Algenoberfläche aufgeklärt werden.

Bildgebende Darstellungen können auch eingesetzt werden, um schon Vermutungen über Funktionen bestimmter Sekundärmetabolite zu stützen. Eine Reihe von Studien über den Entstehungsmechanismus des Wundverschlusses der Grünalgen *Caulerpa taxifolia* und *Caulerpa prolifera* konnte die Beteiligung des Hauptsekundärmetaboliten Caulerpenin (**3**) als Proteinquervernetzer *in vitro* oder in Modellreaktionen zeigen (Guerriero *et al.*, 1995; Jung & Pohnert, 2001; Adolph *et al.*, 2005). Bisher konnte sowohl diese Quervernetzung als auch die chemische Zusammensetzung des Wundverschlusses nicht ohne destruktive Methoden direkt *in vivo* gezeigt werden.

- Mittels der FT-Raman-Spektroskopie soll der Mechanismus der Proteinquervernetzung durch Caulerpenin (**3**) sowie die chemische Zusammensetzung des Wundverschlusses in *C. taxifolia* und *C. prolifera* untersucht werden.
- Ausgehend von den FT-Raman-Ergebnissen soll unter Verwendung der CARS-Mikroskopie die Verteilung des Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**3**) in der intakten Alge dargestellt werden. Ein besonderes Interesse gilt hier dem Nachweis einer möglichen Kompartimentierung des Metaboliten in der Alge.

Die hier neu entwickelten oder modifizierten Methoden sowie die durch deren Anwendung erhaltenen Ergebnisse sollen im ökologischen und physiologischen Kontext diskutiert werden.

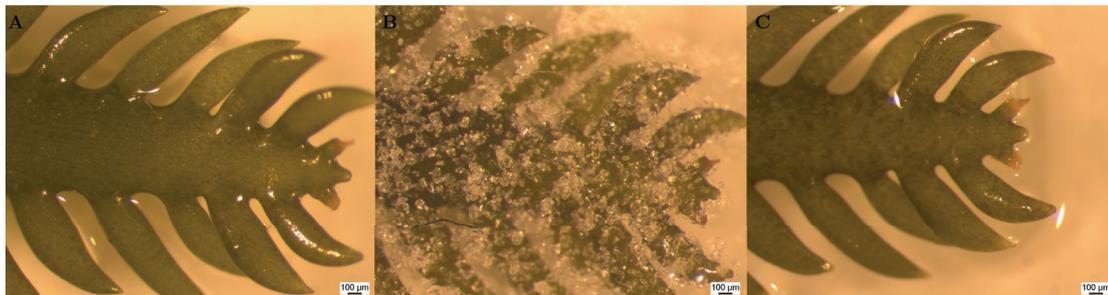
## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Extraktion von Makroalgen-Oberflächenmetaboliten mittels absorbierendem Material

Die Extraktion von Oberflächenmetaboliten von der Algenoberfläche erfolgte in den letzten zwanzig Jahren auf Grundlage der von De Nys *et al.* (1998) entwickelten Dipping-Methode (siehe Abschnitt 1.2). Neben flüssigen Extraktionsmethoden findet in der Analytik auch die Extraktion durch feste Absorbermaterialien in Form der Festphasenextraktion Anwendung (Cammann, 2001). Allerdings eignet sich diese Methode in ihrer herkömmlichen Form, mit den aus einer flüssigen Phase absorbierten Metaboliten, nicht zur Extraktion von Algenoberflächenmetaboliten (Abschnitt 1.2). Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass sich die Metabolite der Algenoberfläche und der an diese angrenzenden dünnen, laminaren Schicht ebenfalls in einer zumeist flüssigen, überwiegend wässrigen Phase befinden (vergl. 1.1.1). Liegt das Sorbens also frei vor, kann es auf die Algenoberfläche aufgetragen werden, dort Wechselwirkungen mit Metaboliten auf der Algenoberfläche und in der laminaren Grenzschicht eingehen und diese binden. Die im Absorbermaterial gebundenen Metabolite können im Anschluss mit diesem herunter gespült und mittels verschiedener Lösungsmittel vom Absorbermaterial eluiert werden. Die Algenoberfläche kommt daher bei dieser Methode, im Gegensatz zur sonst verwendeten Dipping-Methode (De Nys *et al.*, 1998), nicht in Kontakt mit dem für die Algenzelle schädlichen Lösungsmittel.

#### 3.1.1 Überprüfung der theoretischen Grundlage der C<sub>18</sub>-Methode

Zur Methodenentwicklung, wurde herkömmliches C<sub>18</sub>-Material als Sorbens auf die Grünalge *C. taxifolia* aufgetragen (siehe Abbildung 3.1) und anschließend mit Wasser (Instant Ocean) von der Alge herunter gewaschen. Danach wurden von dem aufgefangenen C<sub>18</sub>-Material die gebundenen Metabolite mit Methanol eluiert. Das erhaltene Extrakt wurde mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie (UPLC-MS) mit einer für den Hauptsekundärmetaboliten der Alge, das Caulerpenin (**3**), optimierten Methode analysiert. Hierbei wurde das Caulerpenin (**3**) anhand seiner typischen Fragmentionen (Jung, 2003) bei 255 *m/z* und 213 *m/z*, nach der Abspaltung zweier Essigsäurereste und einem anschließendem Verlust von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, identifiziert (siehe Abbildung 3.2). Ein Vergleich mit UPLC-MS-Messungen eines reinen Caulerpenin-Standards (**3**) zeigte für das Chromatogramm und das



**Abb. 3.1:** Behandlung von *C. taxifolia* mit C<sub>18</sub>-Material (Breite des Bildausschnittes ca. 27 mm). A) Aufsicht auf die Alge vor der Behandlung. B) Aufsicht auf die Alge während der 1-minütigen Behandlung mit C<sub>18</sub>-Material. C) Aufsicht auf die Alge nach der Behandlung.

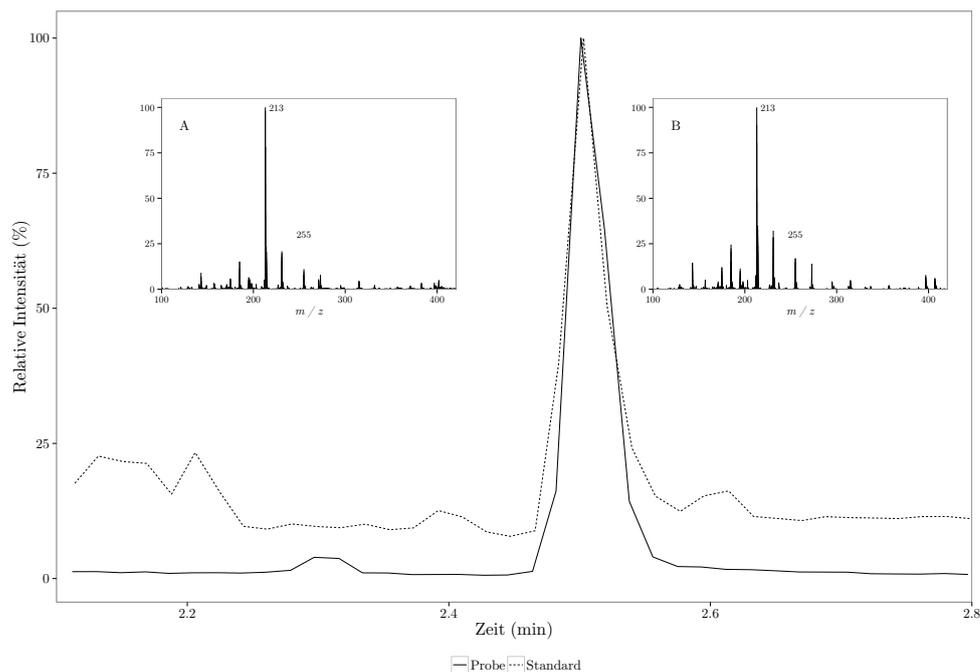
Massenspektrum des Extraktes eindeutige Übereinstimmung mit dem Standard im Bezug auf die Retentionszeit bei 2,50 min, die Fragmentationen 213  $m/z$  und 255  $m/z$  sowie deren Intensitätsverhältnis (vergleiche Abbildung 3.2).

Die Alge wurde nach der Behandlung mikroskopisch untersucht. Hierbei konnte visuell weder eine Verletzung noch eine starke Verfärbung beobachtet werden. Die Ergebnisse dieses ersten Versuchs legen nahe, dass es mit der hier beschriebenen C<sub>18</sub>-Methode möglich ist, Metabolite der Algenoberfläche zu extrahieren, ohne die Alge zu verletzen.

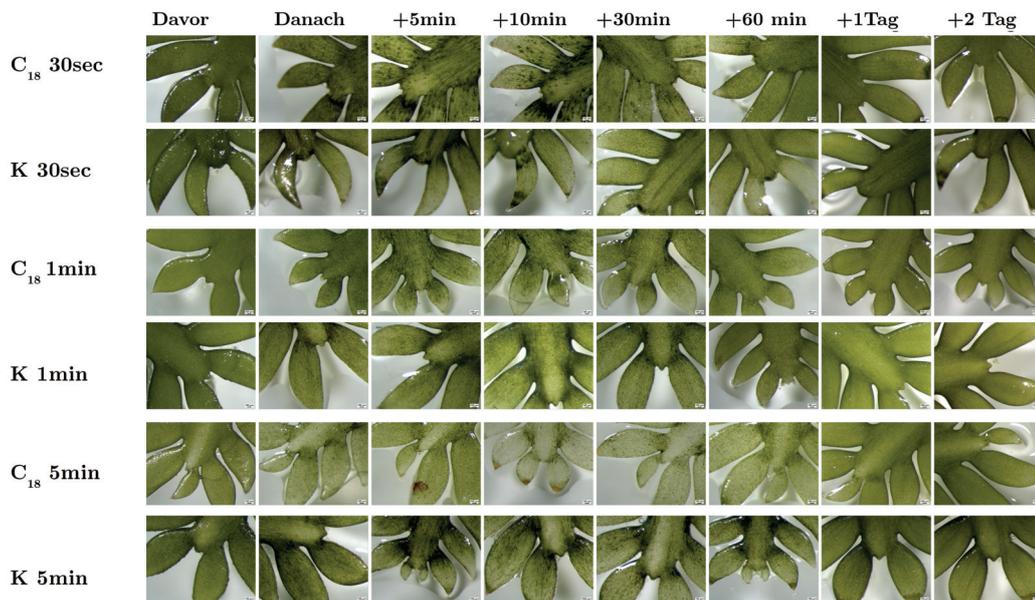
### 3.1.2 Überprüfung der Algenoberflächen auf Verletzung durch die Extraktion mittels C<sub>18</sub>-Material

Aufgrund der ersten positiven Ergebnisse mit der C<sub>18</sub>-Methode wurde die Zellintegrität nach Extraktion in Bezug auf die Einwirkzeit untersucht.

So wurde in ersten Versuchen die Oberfläche von *C. taxifolia* für 30 s sowie für 1 und 5 min mit C<sub>18</sub>-Material behandelt und anschließend optisch auf Veränderungen hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Fotos der Assimilatorspitzen mit einem Binokular direkt vor und nach der Behandlung, sowie zu späteren Zeitpunkten (5, 10, 30, 60 min, sowie 24 und 48 h) aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden mit denen von unbehandelten Kontrollindividuen verglichen (siehe Abbildung 3.3). Optisch konnte kein Einfluss zwischen den Aufnahmen vor und direkt nach der Behandlung für den Behandlungszeitraum von 30 s und 1 min in Bezug auf die Verfärbung oder Struktur des Beobachteten Assimilatorbereiches festgestellt werden. Erst bei einem Kontakt von 5 min war eine deutliche Veränderung der Farbe zu erkennen. Die behandelten Bereiche waren hier deutlich blasser als die der Kontrollalgen. Allerdings konnte keine Verwundung oder Austritt von Zellmaterial beobachtet werden. Daher scheint es sich hierbei um die typische Stress-Schutzreaktion von *Caulerpa* zu handeln, bei der die Chloroplasten ins Algeninnere transportiert werden (Dostal, 1932). Die bei den



**Abb. 3.2:** Chromatogramm des Standards (durchgezogene Linie) und einer mit C<sub>18</sub>-Material extrahierten Probe der Algenoberfläche (gestrichelte Linie) für das Fragmention 213 *m/z* des Metaboliten Caulerpenin (**3**), gemessen im positiven Modus. A) Massenspektrum des Caulerpenin-Standards (**3**) mit den für den Metaboliten typischen Fragmentionen 213 *m/z* und 255 *m/z*. B) Massenspektrum des mit C<sub>18</sub>-Material extrahierten Caulerpenins (**3**) von der Oberfläche der Alge mit den den für den Metaboliten typischen Fragmentionen 213 *m/z* und 255 *m/z*.



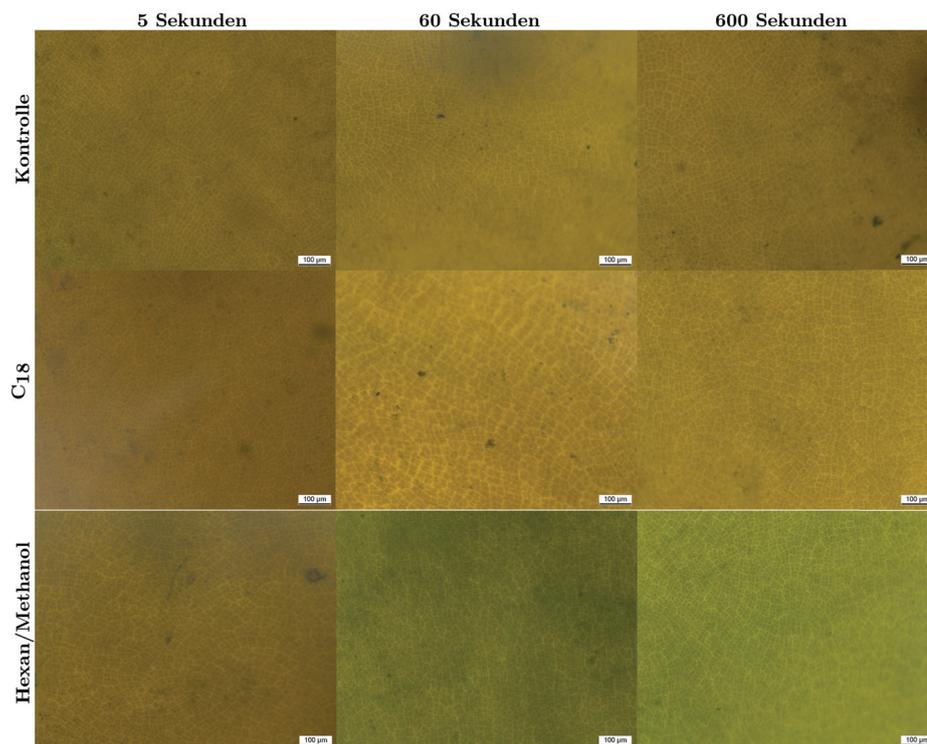
**Abb. 3.3:** Bildaufnahme der behandelten Assimilatorspitzen von *C. taxifolia* bei unterschiedlichen Einwirkzeiten des C<sub>18</sub>- Materials (30 s, 1 und 5 min) sowie unbehandelte Kontrollen (K) aufgenommen 5, 10, 30, 60 min und 24 sowie 48 Stunden nach der Behandlung.

späteren Aufnahmen beobachtete Entfärbung der Algenspitzen, von Kontrollalgen und den behandelten Algen, lässt sich vermutlich auf Stress, hervorgerufen durch das mehrfache Entnehmen der Algen für die Aufnahmen zurückführen.

Somit scheint eine eher kurze Beprobungszeit (1 min) für die Grünalge *C. taxifolia* von Vorteil zu sein. Zudem führt die mehrfach aufeinander folgende Entnahme der Alge aus dem Aquarium, wie sie z. B. bei einer Mehrfachbeprobung auftritt, zu einer Stressreaktion, die sich auf die Ergebnisse auswirken könnte.

Im Vergleich zur im vorherigen Versuch verwendeten Grünalge *C. taxifolia* ist die Braunalge *F. vesiculosus* weitaus robuster. Zudem stand sie in den letzten Jahren im Fokus zahlreicher Studien zur Extraktion und Identifikation von Oberflächenmetaboliten (Lachnit *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2011, 2012). Daher wurde ebenfalls die Zellintegrität von *F. vesiculosus* nach Extraktion mit der hier vorgestellten C<sub>18</sub>-Methode und der bisher verwendeten Dipping-Methode verglichen.

Thallusspitzen von unterschiedlichen *F. vesiculosus*-Organismen wurden für 5, 30, 60, 120, 300 und 600 Sekunden mit der C<sub>18</sub>- und der Dipping-Methode nach Lachnit *et al.* (2010) behandelt (siehe Abschnitt 5.3.2 und 5.3.3). Zusätzlich zu den beiden Behandlungsgruppen gab es eine Gruppe von Kontrollalgen, die für den jeweils gleichen Zeitraum aus den Aquarien entnommen wurden, ansonsten aber



**Abb. 3.4:** Farbunterschiede der Fucusoberfläche für die unbehandelten (Kontrolle) als auch mit C<sub>18</sub>-Material und mit Hexan/Methanol behandelte Algen. Der Behandlungszeitraum war bei 5, 60 und 600 Sekunden, Skala der Bilder 100 µm

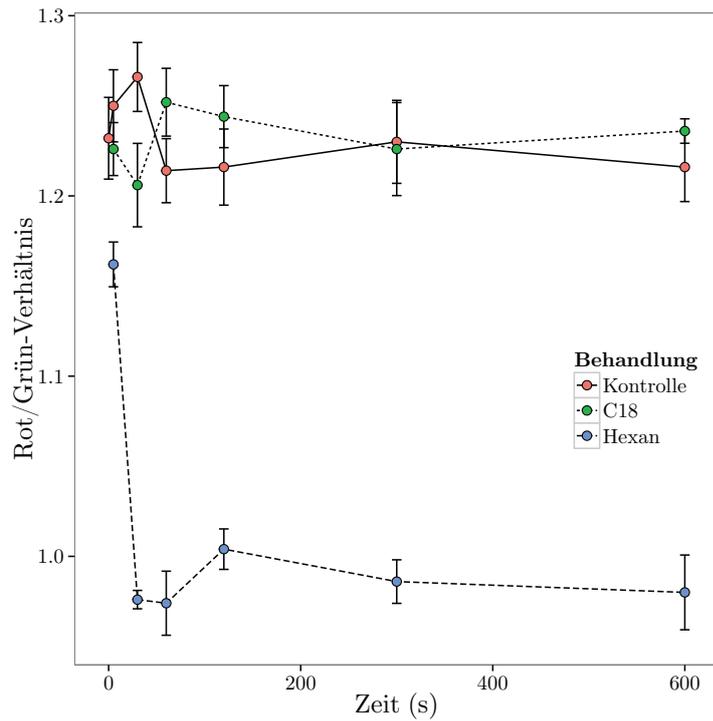
keinerlei Behandlung ausgesetzt waren. Anschließend wurden alle Thallusspitzen zur Visualisierung von toten Zellen mit Evans Blue (Weinberger *et al.*, 2005) angefärbt und mikroskopische Bilder von Präparaten der Spitzen aufgenommen.

In den mikroskopischen Aufnahmen zeigte sich, bei der Behandlung mit der Dipping-Methode für einen Zeitraum von mehr als 5 Sekunden eine deutliche Verfärbung der sonst goldgelb bis bräunlichen Thallusspitzen ins grünliche. Diese konnte bei den mit der C<sub>18</sub>-Methode behandelten Algen oder denen der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 3.4). Zu erklären ist diese Verfärbung durch eine Verletzung der Algenoberflächenzellen und die dadurch resultierende Freisetzung von sonst gebundenen Pigmenten, die somit nicht mehr zur Farbgebung beitragen. Auch ein Einfluss des Evans Blue auf die Farbgebung und die Intensität der Oberflächenzellen ist nicht auszuschließen. Allerdings war keine flächendeckende deutliche Blaufärbung von zerstörten Oberflächenzellen durch die Verwendung von Evans Blue, wie sie z. B. in der Arbeit von Lachnit *et al.* (2010) beschrieben wurde, zu erkennen. Vereinzelt blau angefärbte Zellen waren jedoch in allen drei Gruppen deutlich sichtbar und sprechen für die richtige Dosierung und Anwendung von Evans Blue. Somit kann Evans Blue nicht für die Unterschiede in der Farbgebung zwischen den Gruppen verantwortlich sein. Für alle mikroskopischen Aufnahmen wurde auf gleiche Kamera- und Mikroskopieeinstellung geachtet.

Neben den Instrumenteneinstellungen und der Anfärbung ist die Farbintensität der Aufnahmen auch deutlich von der Dicke der angefertigten Präparate abhängig. Aufgrund eines persönlichen Gespräches mit Tim Lachnit (Autor der Studie über die Anpassung, der hier verwendeten Dipping-Methode an *F. vesiculosus*, Lachnit *et al.* 2010) wurden für die Herstellung der Präparate dünne Stellen des oberen Randbereiches der Thallusspitzen ausgesucht, um möglichst ausreichend viele Präparate in gleicher Stärke zu erhalten. Darüber hinaus wurden, die Schnitte in Agar eingebettet um ein gleichmäßiges Aufliegen des Objektgläschens zu gewährleisten.

Als Basis für die statistische Auswertung des Verletzungspotentials der Methode diente eine Analyse des additiven Farbraums der Farben Rot, Grün, Blau (RGB) der mikroskopischen Aufnahmen von den zuvor hergestellten Thalluspräparaten (siehe Abschnitt 5.4.2). Der Rotanteil der mikroskopischen Aufnahmen ist in intakten Algen deutlich höher als der Grünanteil. Durch die bei einer Verletzung der Algenoberflächenzellen freigesetzten Pigmente, wird das bis zur Verletzung konstante Rot/Grün-Verhältnis verändert.

In Abbildung 3.5 sind aus der Bildanalyse erhaltene Werte für das Rot/Grün-Verhältnis der jeweiligen Behandlung (C<sub>18</sub>-Material (grün), Hexan/Methanol (blau), Kontrolle (rot)) der Thallusspitzen zu den verschiedenen Behandlungszeiten (5, 30, 60, 120, 300 und 600 Sekunden) dargestellt. Deutlich ist über den gesamten Zeitraum ein Unterschied im Rot/Grün-Verhältnis der mit der Dipping-Methode behandelten Thallusspitzen gegenüber den mit der C<sub>18</sub>-Methode behandelten Spitzen sowie der Kontrolle zu erkennen. Dabei trat bei einem Behandlungszeitraum von 5 s



**Abb. 3.5:** Rot/Grün-Verhältnis von mit Oberflächenextraktionsmethoden behandelten Thalusspitzen gegenüber unbehandelten Spitzen. RGB-Auswertung der Spitzen nach 5, 30, 60, 120, 300 und 600 Sekunden Einwirkzeit von C<sub>18</sub>-Material (grün) oder Hexan/Methanol-Dipping (blau) gegenüber den unbehandelten Algen (rot), 5 Replikate, angegeben mit Standardabweichung.

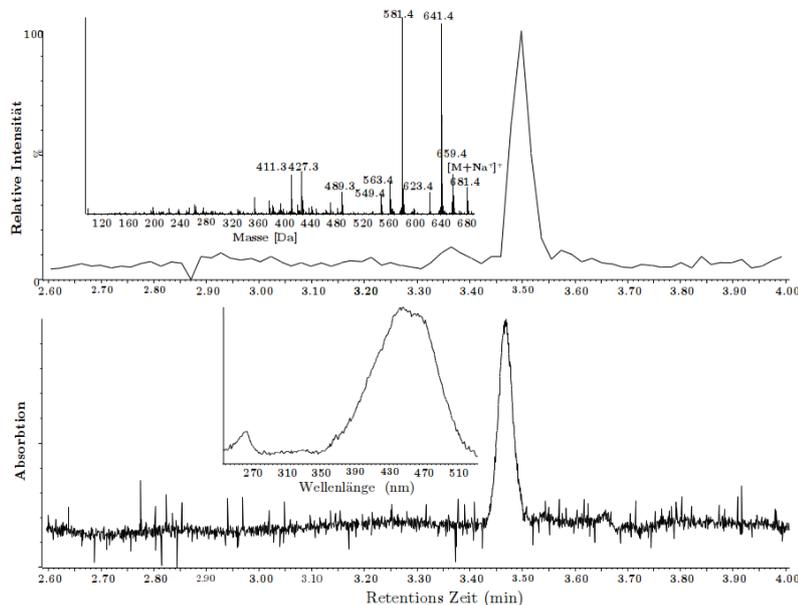
noch ein relativ geringer Unterschied zu den beiden anderen Gruppen auf, während bei längerem Dipping das Rot/Grün-Verhältnis deutlich niedriger war, als bei der Kontrolle und der C<sub>18</sub>-Methode. Sowohl das Rot/Grün-Verhältnis der Kontrolle als auch das der C<sub>18</sub>-Methode blieb über den Behandlungszeitraum konstant.

Auch wenn die Mikroskopiebilder, der für 5 s in Hexan/ Methanol gedippten Thallusspitzen, sich visuell nicht deutlich in ihrer Farbgebung von denen der Kontrolle oder der C<sub>18</sub>-Behandlung unterscheiden (siehe Abbildung 3.4), so zeigt die Analyse des Rot/Grün-Verhältnisses doch, dass schon ein sehr kurzer Behandlungszeitraum mit der Dipping-Methode zu Veränderungen an der Oberfläche führt und es bei längerer Anwendung zu signifikanter Verletzung der Oberflächenzellen kommt. Die hier erhaltenen Ergebnisse für die mit Methanol/Hexan behandelten Thallusspitzen stehen im Einklang mit der Studie von Lachnit *et al.* (2010), in der eine Behandlung der Thallusspitzen mit einem Methanol/Hexan-Gemisch über einen Zeitraum von weniger als 10 s zu keinen deutlichen Verletzungen der Oberfläche führte.

Generell ist kein zeitlicher Einfluss auf das Rot/Grün-Verhältnis für die mit C<sub>18</sub>-Material behandelten Thallusspitzen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.5 rot und grün) zu erkennen. Allerdings wird bei Betrachtung der Mikroskopieaufnahmen der Kontrolle in Abbildung 3.4 auch die natürliche, farbliche Variation der Thalli erkennbar. Deutlich wird dies auch in den zum Teil hohen Standardabweichungen für das Rot/Grün-Verhältnis der Kontrolle über die verschiedenen Zeiträume in Abbildung 3.5. Durch die weiter oben beschriebenen Optimierungen, ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Behandlungen auf Einflüsse der Probenvorbereitung (Mikroskopie) und Geräteeinstellungen zurückzuführen sind.

Ein zusätzliches Indiz für einen weitaus geringeren Einfluss der C<sub>18</sub>-Methode gegenüber der Dipping-Methode zeigte die Studie über den Einfluss beider Methoden auf die bakterielle Gemeinschaft auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* (Eick, 2011). Die Arbeit zeigte eine tendenziell stärkere Veränderung der Bakteriengemeinschaft nach der Behandlung mit der Dipping-Methode im Vergleich zu der Behandlung mit der C<sub>18</sub>-Methode. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich auf eine höhere Mortalität von Bakterien bei der Dipping-Methode zurückführen. Effekte auf die Bakteriengemeinschaft durch eine mutmaßlich höhere mechanische Belastung der Bakteriengemeinschaft durch die C<sub>18</sub>-Methode gegenüber der Dipping-Methode konnten nicht gefunden werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass sich die C<sub>18</sub>-Methode zur Absorption von Metaboliten von Algenoberflächen eignet (Abschnitt 3.1.1) und, bei richtiger Anwendung, die Algenoberfläche nicht verletzt. Allerdings, ist der Behandlungszeitraum für fragile Algen wie *C. taxifolia* kurz zu halten, während bei robusteren Algen wie *F. vesiculosus* auch längere Behandlungszeiträumen möglich sind, ohne die Oberfläche zu verletzen.

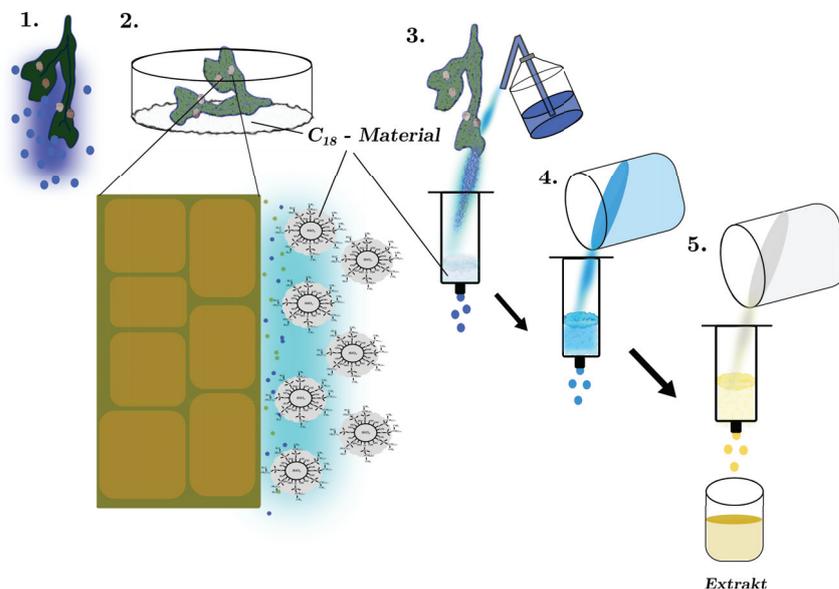


**Abb. 3.6:** UPLC-Analyse der biologisch aktiven Fraktion des Oberflächenextraktes von *F. vesiculosus* aus der Kooperation mit M. Saha (Saha *et al.*, 2011). Der untere Teil der Grafik zeigt die Messung mit dem UV-VIS-PAD. Der obere Teil zeigt die ESI-MS Messung (positiver Modus) inklusive dem dazugehörigen Spektrum. Aufgrund der Retentionszeit-Massenübereinstimmung mit dem reinen Standard konnte der aktive Metabolit der Fraktion eindeutig als Fucoxanthin (**2**) identifiziert werden.

### 3.1.3 Wie effizient ist die C<sub>18</sub>-Methode?

Um die Effizienz einer neuen Oberflächenextraktionsmethode zu überprüfen, ist es sinnvoll diese in Bezug auf einen schon bekannten Metaboliten der Algenoberfläche anzuwenden. In Kooperation mit Wissenschaftlern des GEOMAR, Helmholtz Zentrum für Ozeanforschung in Kiel, war es uns durch Anwendung der Dipping-Methode möglich, einen biologisch aktiven Metaboliten von der Oberfläche des Blasentangs *F. vesiculosus* zu extrahieren und mittels UPLC-MS als Fucoxanthin (**2**) zu identifizieren (Saha *et al.*, 2011) (UPLC-MS siehe Abbildung 3.6). Auch die hemmende Aktivität des Fucoxanthins (**2**) gegenüber Ansiedlung mariner Bakterien konnte in dieser Studie gezeigt werden. Für die Überprüfung der Extraktionseffizienz der C<sub>18</sub>-Methode, wurde daher der Metabolit Fucoxanthin (**2**) und die Alge *F. vesiculosus* verwendet.

Die in dieser Arbeit entwickelte und getestete Extraktion mit C<sub>18</sub>-Material erfolgte generell in fünf Schritten und ist schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung der Arbeitsschritte für die Extraktion von Oberflächenmetaboliten mittels Absorbermaterial. 1. Abtropfen der Alge nach der entnahme aus dem wässrigen Medium 2. Aufbringen des Absorbermaterials auf die Alge in einer Petrischale durch leichtes schwenken. Zu sehen ist auch ein Detailausschnitt der Algenoberfläche sowie der laminaren Grenzschicht mit dem Absorbermaterial. 3. Herunterspülen des Absorbermaterials mit Seewasser und auffangen des Materials in einer Kartusche. 4. Spülen des Absorbermaterials mit reinem Wasser. 5. Eluieren der Metabolite vom Absorbermaterial mit Lösungsmittel.

1. Abtropfen der Alge für max. 1 min nach Entnahme aus der wässrigen Umgebung.
2. Aufbringen des Absorbermaterials auf die Alge.
3. Herunterspülen des Absorbermaterials mit Seewasser von der Alge und Auffangen des Materials in einer Kartusche.
4. Spülen des aufgefangenen Materials (mit reinem Wasser gespült um möglichst viel Salz aus dem Seewasser und am Absorbermaterial zu entfernen).
5. Eluieren der sich auf dem Absorbermaterial befindenden Metabolite mit Lösungsmittel.

### Benötigte Menge an C<sub>18</sub>-Material

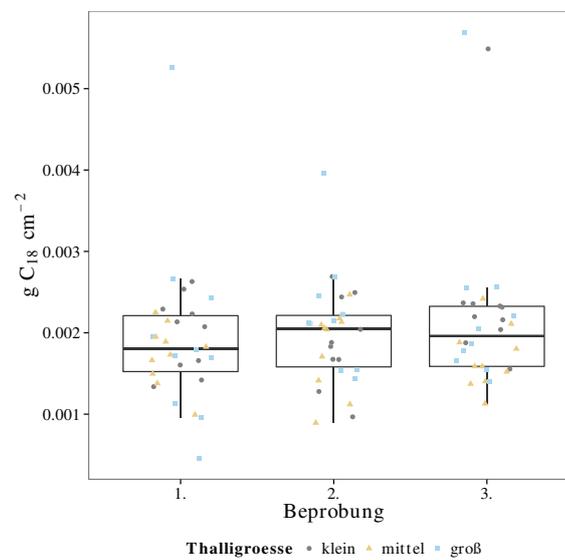
Schon die Art des Auftragens von C<sub>18</sub>-Material auf die Algenoberfläche im ersten Arbeitsschritt kann einen Einfluss auf die letztendlich erhaltene Menge an Metabolit

haben. Durch die variable Wuchsform der Alge können z. B. durch reines Aufstreuen des Materials nicht alle Stellen der Alge bedeckt werden. Ein gleichmässiges Auftragen des Materials auf die Alge erfolgte am effektivsten in Form von vorsichtigem Wälzen der Alge in dem C<sub>18</sub>-Material. Hierbei muss allerdings darauf geachtet werden, dass die Schnittkante der Thallusstücke nicht mit dem C<sub>18</sub>-Material in Berührung kommt. Bei der Beprobung von ganzen Individuen konnte eine gleichmäßige Verteilung des C<sub>18</sub>-Materials auf der Oberfläche der Alge durch leichtes Schütteln einer mit dem Thalli und C<sub>18</sub>-Material befüllten Petrischale gewährleistet werden.

In den Versuchen konnte eine durchschnittliche Menge an C<sub>18</sub>-Material von 0,003 g/cm<sup>2</sup> Algenoberfläche für eine vollständige und gleichmässige Bedeckung ermittelt werden. Für die Ermittlung dieses Wertes wurden drei verschiedene Thallusgrößen (Größe I 20 cm<sup>2</sup>–40 cm<sup>2</sup>, Größe II 40 cm<sup>2</sup>–100 cm<sup>2</sup>, Größe III 100 cm<sup>2</sup>–200 cm<sup>2</sup>) mit C<sub>18</sub>-Material vollständig bedeckt und die Menge des von der Alge heruntergewaschenen C<sub>18</sub>-Materials ermittelt. Nach dem Herunterwaschen wurde die Algenoberfläche sorgfältig auf anhaftendes C<sub>18</sub>-Material optisch überprüft. Zudem wurden die Algen mehrfach hintereinander beprobt, um zu überprüfen ob immer die gleiche Menge an C<sub>18</sub>-Material von dem jeweils beprobten Thallusstück heruntergewaschen wurde und die folgenden Elutionsschritte nicht durch die C<sub>18</sub>-Menge beeinflusst wurden. In Abbildung 3.8 ist die Menge an von der Alge heruntergespültem C<sub>18</sub>-Material in Gramm pro Algenfläche für die drei verschiedenen Thallusgrößen bei drei aufeinander folgenden Beprobungen dargestellt. Bis auf fünf Ausnahmen liegen die Werte für die Menge an heruntergewaschenem C<sub>18</sub>-Material zwischen 0,001 g/cm<sup>2</sup>–0,003 g/cm<sup>2</sup> für die verschiedenen Thallusgrößen. Es ist kein Unterschied zwischen der relativen aufgefängenen Menge an C<sub>18</sub>-Material und der Algengröße zu erkennen. Beim Auftragen des C<sub>18</sub>-Materials auf die Algenoberfläche verblieb auch immer eine geringe Menge C<sub>18</sub>-Material in der verwendeten Petrischale. Um eine gleichmässige Bedeckung der Alge mit C<sub>18</sub>-Material zu gewährleisten, wurde für die weiteren Experimente eine Menge von 0,003 g/cm<sup>2</sup> C<sub>18</sub>-Material pro Algenfläche verwendet.

Wie schon erwähnt blieb ein kleiner Teil des verwendeten C<sub>18</sub>-Materials auch an der Petrischale zurück. Um möglichst die gesamte Menge an C<sub>18</sub>-Material, welches mit der Algenoberfläche in Berührung gekommen ist, für die weiteren Schritte zu extrahieren, wurde das Material nicht nur von der Alge, sondern auch aus der Petrischale herausgespült. Durch das Wiegen der verwendeten C<sub>18</sub>-Menge vor dem Auftragen und nach dem Herunterspülen konnte gezeigt werden, dass es möglich war 80%–90% des zu Anfang eingesetzten C<sub>18</sub>-Materials für die weiteren Extraktionsschritte herunterzuspülen.

In der Vorbereitung zu den Versuchen zeigte eine sorgfältige visuelle Überprüfung auf verbleibendes C<sub>18</sub>-Material nach dem Abspülen der Alge, dass kleine Partikel mit einer Größe von 15 µm–25 µm mehr Spülschritte und demnach eine größere Menge an Wasser erfordern, um von der Algenoberfläche heruntergespült zu werden. Das Spülen birgt jedoch die Gefahr der frühzeitigen Elution einiger Metabolite von dem



**Abb. 3.8:** Herruntergewaschene Menge an C<sub>18</sub>-Material pro Algenoberfläche (g/cm<sup>2</sup>) für drei verschiedene Thallusgrößen (Größe I (20 cm<sup>2</sup>–40 cm<sup>2</sup>) ○, Größe II (40 cm<sup>2</sup>–100 cm<sup>2</sup>) △ und Größe III (100 cm<sup>2</sup>–200 cm<sup>2</sup>) □) bei drei aufeinanderfolgenden Beprobungen (1, 2, 3) von *C. taxifolia*.

C<sub>18</sub>-Material. Daher sollten so wenig Spülschritte wie möglich durchgeführt werden. Hierfür eignet sich C<sub>18</sub>-Material mit einer Partikelgröße von 40 µm–63 µm, welches in den nachfolgend beschriebenen Versuchen eingesetzt wurde.

### Extraktionserfolg pro Extraktionszeit

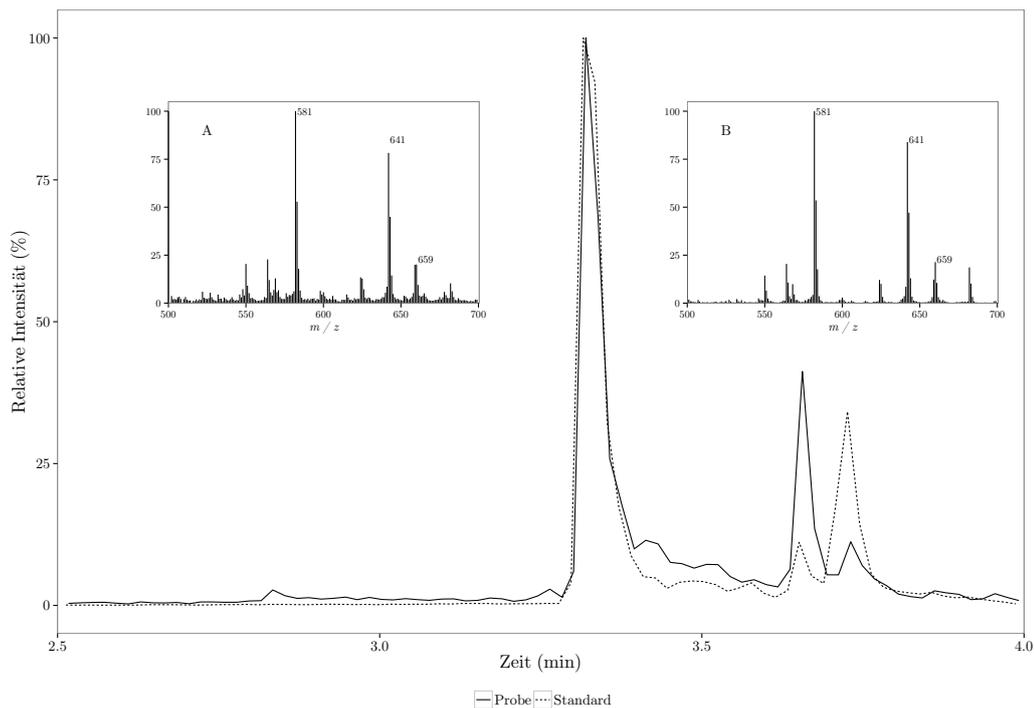
Neben der Menge an benötigten C<sub>18</sub>-Material ist auch die Kenntnis über den Extraktionserfolg pro Extraktionszeit von Bedeutung. Um die Zeit mit dem größten Extraktionsertrag zu bestimmen, wurden Individuen der Gattung *F. vesiculosus* mit unterschiedlichen Beprobungszeiträumen (5, 30, 60, 120, 300 und 600 s, je 3 Replikate) getestet und die Menge an extrahierten Fucoxanthin (**2**) in den erhaltenen Extrakten mittels UPLC-MS-Messung ermittelt.

Die Identifikation des Fucoxanthins (**2**) im Extrakt mittels UPLC-MS erfolgte zum einen über den Vergleich mit der Retentionszeit (bei 2,56 min) des reinen Standards und zum anderen über die typischen Fragmentionen bei 641 *m/z* und 581 *m/z* (siehe Abbildung 3.9). Diese Fragmentionen entstehen durch die Abspaltung von Wasser und eines Essigsäurerestes von dem ebenfalls im Spektrum sichtbaren Pseudomolekülion bei 659 *m/z* sowie dem Natriumaddukt bei 681 *m/z*. Peakintegration der Messwerte erfolgte mit dem Programm “QuanLynx”. Die hierbei erhaltenen Flächenangaben der Peaks wurden mit dem Programm R weiter analysiert.

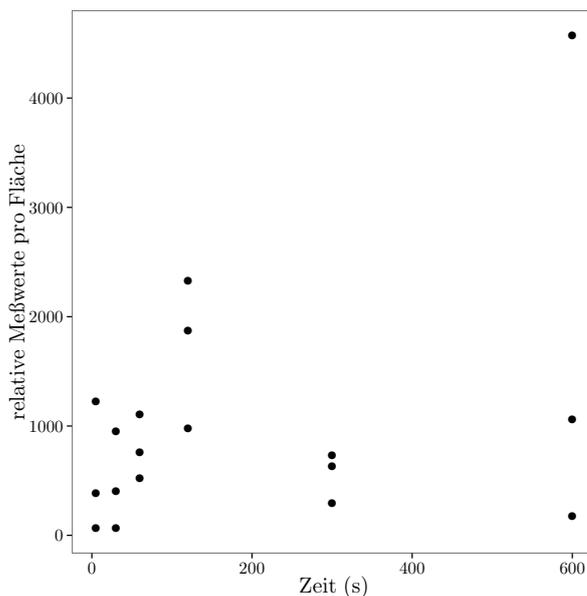
Da in den folgenden vorgestellten Messreihen die Kalibration der Messungen verworfen werden musste, werden als Ergebniss die relative Flächen der Peakintegration pro Gesamtfläche der Alge verwendet. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse für die Experimente zur ausreichende Beprobungszeit sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Es zeigt sich weder ein eindeutiger Trend über den gesamten Beprobungszeitraum, noch gab es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Beprobungszeiträumen (nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test  $p = 0.3$ ). Bei längeren Beprobungszeiten haftete das C<sub>18</sub>-Material stärker an der Alge an, was mehr Spülschritte nötig machte, um das C<sub>18</sub>-Material von der Alge zu lösen. Um dies zu vermeiden wurde für die folgenden Experimente ein Beprobungszeitraum von 60 s gewählt.

Im Gegensatz zur Dipping-Methode bietet die C<sub>18</sub>-Methode die Möglichkeit, ein Algenindividuum auch längere Zeit oder sogar mehrfach hintereinander zu beproben ohne dass die Thallusoberfläche beschädigt wird (siehe Abschnitt 3.1.2). Daher war es möglich, durch die schnell aufeinander folgende Beprobung eines Algenindividuums herauszufinden, wieviel von dem gesuchten Sekundärmetaboliten beim ersten, zweiten und dritten Beprobungen von der Alge extrahiert wurde. Für dieses Experiment wurden je zehn Individuen aus drei Größenklassen (Klasse I 20 cm<sup>2</sup>–40 cm<sup>2</sup>, Klasse II 40 cm<sup>2</sup>–100 cm<sup>2</sup>, Klasse III 100 cm<sup>2</sup>–200 cm<sup>2</sup>) jeweils dreimal nacheinander mit C<sub>18</sub>-Material beprobt und der Gehalt an Fucoxanthin (**2**) in den erhaltenen Extrakten mittels UPLC-MS-Messungen ermittelt (Siehe Abschnitte 5.2.2 und 5.7.2).

Abbildung 3.11 zeigt den Extraktionsertrag durch das C<sub>18</sub>-Material in Prozent der



**Abb. 3.9:** Chromatogramm von Fucoxanthin (**2**) (durchgezogene Linie) und einer mit C<sub>18</sub>-Material extrahierten Probe von der Fucusoberfläche (gestrichelte Linie) für das Fragmentation 581  $m/z$ , gemessen im Positiven Modus. A) Massenspektrum des reinen Fucoxanthin-Standards (**2**) mit den für den Metaboliten typischen Fragmentationen 581  $m/z$  und 641  $m/z$  und dem  $[M+H]^+$  bei 659  $m/z$  B) Massenspektrum von einer mit C<sub>18</sub>-Material extrahierten Probe mit den für den Metaboliten Fucoxanthin (**2**) typischen Fragmentationen 581  $m/z$  und 641  $m/z$  und dem  $[M+H]^+$  bei 659  $m/z$ .

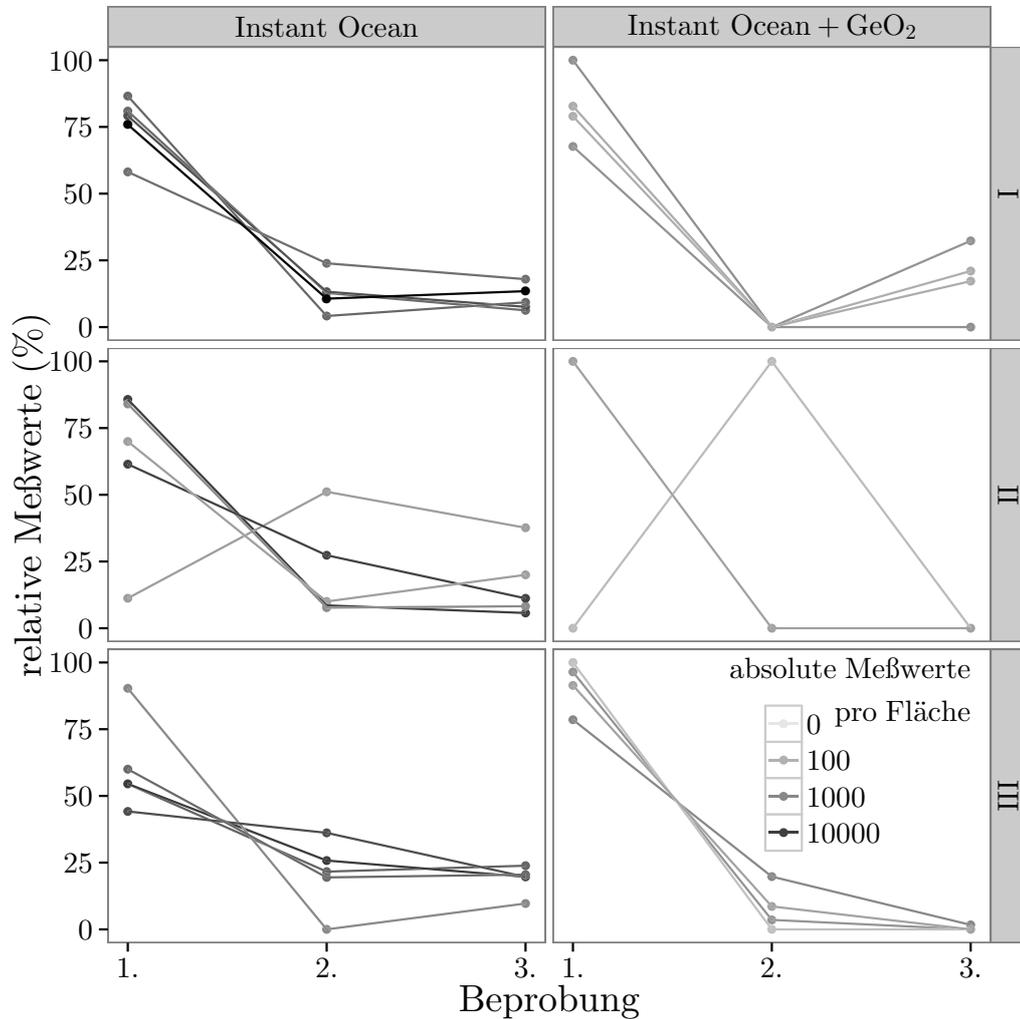


**Abb. 3.10:** Extrahierte Menge Fucoxanthin (**2**) pro Fläche von *F. vesiculosus* mit C<sub>18</sub>-Material für verschiedene Beprobungszeiträume (5, 30, 60, 120, 300 und 600 s).

relativen Messwerte von Fucoxanthin (**2**) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten (1., 2., 3.) der Algen. Die Algen wurden in zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils in einem anderen Medium (Instant Ocean, sowie Instant Ocean mit GeO<sub>2</sub>) kultiviert wurden.

Wird *F. vesiculosus* ohne GeO<sub>2</sub> kultiviert, sind an der Oberfläche häufig assoziierte Diatomeen zu finden, die ebenfalls Fucoxanthin (**2**) produzieren. GeO<sub>2</sub> reduziert den Diatomeenbewuchs deutlich. Unabhängig von der Größenklasse und dem Kulturmedium wurde bei 26 von 29 Thalli (eine Probe ging verloren) mit der ersten Beprobung der größte Teil (Median 81 %) des Metaboliten von der Alge extrahiert. Die drei Ausnahmen wiesen alle geringe absolute Messwerte pro Fläche auf. Auch wurde kein genereller Unterschied zwischen der 2. (Median 8,6 %) und 3. Beprobung (Median 8,2 %) festgestellt. Im Vergleich zu den restlichen Algen war der Extraktionsertrag bei den größten Algen ohne GeO<sub>2</sub> im Kulturmedium gleichmässiger über die drei Beprobungen verteilt.

Die absoluten Messwerte pro Fläche sind ohne GeO<sub>2</sub> im Kulturmedium deutlich höher, was aufgrund des zusätzlichen Fucoxanthins (**2**), der mit *F. vesiculosus* assoziierten Diatomeen, zu erwarten war. Allerdings überraschen die Ausmaße des Unterschieds (Median der Summe der absoluten Meßwerte aus den drei Beprobungen ohne GeO<sub>2</sub> 3115, mit GeO<sub>2</sub> 282). Die großen Unterschiede in den absoluten Messwerten pro Fläche zwischen den Kulturmediengruppen deuten in Anbetracht



**Abb. 3.11:** Prozentuale relative Messwerte des Extraktionsertrages von Fucoxanthin (**2**) von der Oberfläche von *F. vesiculosus* für drei aufeinander folgende Beprobungen. Die vertikale Unterteilung gibt das Kulturmedium an, die horizontale stellt die Größenklassen dar (siehe Text). Die Intensität der Linienfärbung entspricht dem absoluten Messwert pro Fläche. Pro Teilgraph sind je fünf Algenhalli dargestellt, ausgenommen Teilgraph für Größe I GeO<sub>2</sub>, dort fehlt ein Replikat. Im Teilgraph für Größe II GeO<sub>2</sub> liegen die Messpunkte der Replikate sehr dicht zusammen, so dass vier der fünf Replikate in der Graphik aufeinander fallen (dunklere Linie).

von Literaturwerten, die bei der Anwendung der Dipping-Methode eine ungefähre Verdoppelung der Fucoxanthinmenge mit assoziierten Diatomeen beschreiben (Saha *et al.*, 2011), daraufhin, das auch physiologische Zusammenhänge wie z.B die Jahreszeitlich abhängige Besiedlung von Diatomeen eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine einfache Beprobung in den meisten Fällen ausreichend ist. Zwar verändern assoziierte Diatomeen die Menge an extrahiertem Fucoxanthin (**2**) deutlich, solange der beprobte Thallus aber keine besonders große Fläche aufweist, ist der Einfluss auf die relative Extraktionsmenge gering. Für große Thalli sollten mehrere C<sub>18</sub>-Extraktionen in Erwägung gezogen werden.

Abschließend ist zu sagen, dass die hier vorgestellte C<sub>18</sub>-Methode generell für die nicht-destruktive Extraktion von Metaboliten der Algenoberfläche geeignet ist. Zukünftige Experimente zur Validierung dieser Ergebnisse als auch die Verwendung unterschiedlicher Absorber-Materialien und verschiedene Lösungsmittel können das hier gezeigte Potential der Methode noch weiter unterstützen.

## 3.2 Lokalisation von Makroalgen-Oberflächenmetaboliten mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie

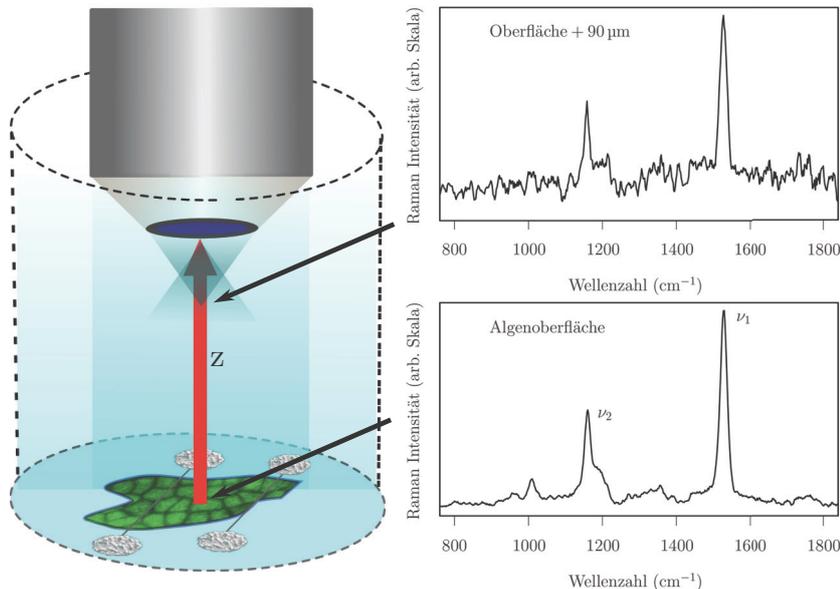
Wie schon im vorherigen Abschnitt 3.1 beschrieben, konnte sowohl mittels der Dipping- (Saha *et al.*, 2011) als auch der  $C_{18}$ -Methode der Sekundärmetabolit Fucoxanthin (**2**) von der Oberfläche der Braunalge *F. vesiculosus* extrahiert und identifiziert werden. So konnte z. B. mit der Dipping-Methode eine durchschnittliche Konzentration von  $5,7 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$  des Fucoxanthins (**2**) im Bezug auf die beprobte Fläche ermittelt werden (Saha *et al.*, 2011). Allerdings war die Lokalisation durch die verwendete Methode nur in x, y-Richtung auf der Algenoberfläche mit einer Auflösung in Quadratzentimetern möglich. Die ermittelte Konzentration zeigte daher nur eine Gesamtverteilung des Metaboliten auf der Algenoberfläche und in der laminaren Grenzschicht. Lokale Konzentrationsunterschiede und mögliche Gradienten in x, y sowie z-Richtung, mit einem Maßstab von wenigen Millimetern oder gar Mikrometern konnten mit diesen Methoden nicht detektiert werden. Um ein möglichst genaues Bild über die Aktivität eines Sekundärmetaboliten auf die oft nur wenige Mikrometer großen, aufwachsenden Foulingorganismen (z. B. Diatomeen, Bakterien) zu erhalten, ist eine hohe Auflösung und die Möglichkeit, Metabolite in z-Richtung zu detektieren, von entscheidender Bedeutung.

Die Mikro-RR-Spektroskopie ist eine Methode, die es erlaubt selbst kleinste Mengen eines chromophoren Systems, wie zum Beispiel die in eine biologische Matrix eingebetteten Carotinoide (Robert, 2009), mit einer Auflösung von bis zu  $1 \mu\text{m}$ , zu detektieren (siehe Einleitung 1.3.2).

Daher wurde diese Methode in dieser Arbeit zur Lokalisation der Carotinoide in der laminaren Grenzschicht verschiedener Algen angewendet (Grosser *et al.*, 2012). Die Messungen und deren Auswertung erfolgten in gleichberechtigter Kooperation mit Dipl.-Chem. Linda Zedler vom Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und dem Institut für Photonische Technologie in Jena.

### 3.2.1 Carotinoide in der laminaren Grenzschicht von *F. vesiculosus* und *Ulva* sp.

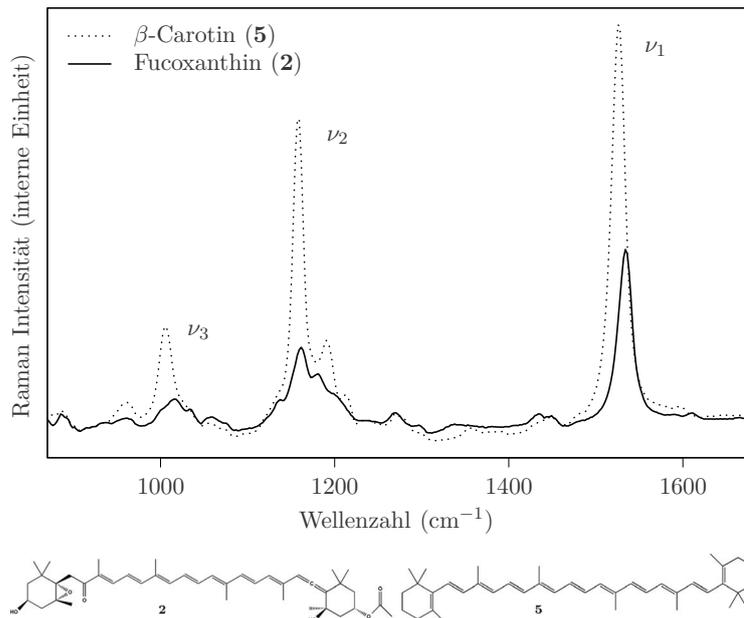
Für die RR-Messung an der Algenoberfläche war es aufgrund des experimentellen Aufbaus unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops erforderlich, die Algenindividuen (Thallusgröße  $< 35 \text{ cm}$ ) in kleinere Stücke ( $4 \text{ cm}$ ) zu unterteilen (siehe 5.3.1). Diese Stücke wurde unter einer Wasserschicht mit einem Rahmen aus Glaskapillaren fest in einer Petrischale fixiert. Somit konnten mögliche Effekte auf den eingestellten Fokus oder die gewählte Messposition durch Bewegung der Alge während der Messungen verhindert werden (siehe Abschnitt 5.3.1, Abbildung 5.1). Um eine Detektion der an den Schnittkanten austretenden Algenmetabolite, z. B. der Carotinoide, zu verhindern, wurden die Messpunkte in einer Entfernung von mindestens  $1,5 \text{ cm}$  zur nächsten



**Abb. 3.12:** Links: Schematische Darstellung des konfokalen RR-Aufbaus zur Messung der Carotinoide auf der Algenoberfläche und in der laminaren Grenzschicht (z-Richtung von der Oberfläche). Die mit Wasser bedeckte Alge befindet sich, fixiert in einer Petrischale, unter dem Objektiv durch die die schwingungsanregende Laserstrahlung auf die Algenoberfläche fokussiert wird. Rechts oben: Typisches Raman-Spektrum aufgenommen in 90 µm Entfernung zur Algenoberfläche. Rechts unten: Raman-Spektrum aufgenommen auf der Algenoberfläche mit den für die Carotinoide charakteristischen Schwingungsbanden der C=C-Streckschwingung ( $\nu_1$ ) und der C-C-Streckschwingung ( $\nu_2$ ).

Schnittkante gewählt. Die Messungen erfolgten sowohl an der Algenoberfläche als auch in 5 µm–10 µm Schritten von dieser in die angrenzende, laminare Grenzschicht der Alge in z-Richtung. Abbildung 3.12 zeigt den prinzipiellen Versuchsaufbau sowie zwei charakteristische Spektren, aufgenommen an der Algenoberfläche und 90 µm von dieser entfernt. Die Einheit für die Raman-Intensität der gemessenen Spektren wird aufgrund der internen Messparameter der verwendeten Geräte als arbiträre Skala (arb. Skala) angegeben.

Generell zeigen die RR-Spektren von Carotinoiden drei zumeist sehr deutlich ausgeprägte, charakteristische Banden (Britton *et al.*, 1994). Die zwei am stärksten ausgeprägten Schwingungsbanden sind die C=C-Streckschwingung ( $\nu_1$ ) der konjugierten Doppelbindungen bei 1525 cm<sup>-1</sup> und die C-C-Streckschwingung ( $\nu_2$ ) der Carotinoide bei 1155 cm<sup>-1</sup>. Darüber hinaus zeigt sich auch noch eine schwächere Bande im Bereich von 1005 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_3$ ), die charakteristisch für die Kohlenstoff-Methyl-Schwingungen zwischen der Hauptkette und den Nebengruppen ist. Dieses Muster ist auch deutlich in den Spektren der von uns gemessenen Standards der Caroti-

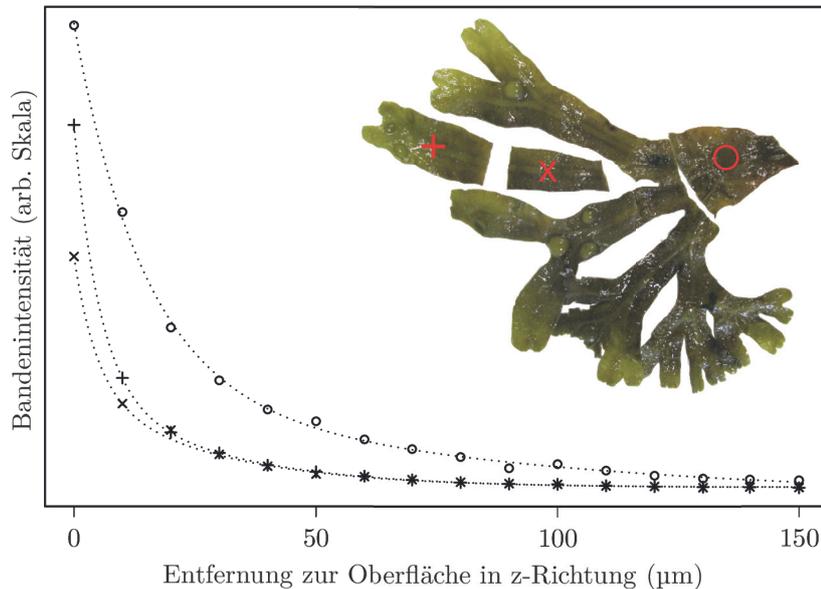


**Abb. 3.13:** RR-Spektrum von Fucoxanthin (**2**) (durchgezogene Linie,  $10^{-6}$  M) und  $\beta$ -Carotin (**5**) (gestrichelte Linie,  $10^{-6}$  M) gelöst in Hexan. Die verschiedenen Banden  $\nu_i$  stellen die Schwingungsbanden für die C=C-Streckschwingung bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ), der C-C-Streckschwingung bei  $1155\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) und der Methyl-Schwingungen bei  $1005\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) der Carotinoide dar.

noide Fucoxanthin (**2**) und  $\beta$ -Carotin (**5**), beide gelöst in Hexan, zu erkennen (siehe Abbildung 3.13).

Die erhaltenen Raman-Spektren der Thallusstücke zeigen das gleiche Bandenmuster wie die ebenfalls vermessenen Fucoxanthin- und  $\beta$ -Carotin-Standards (siehe Abbildung 3.13 und 3.12). Zudem zeigte sich mit zunehmender Entfernung der Messpunkte von der Algenoberfläche eine Verringerung der Intensität der charakteristischen Carotinoid-Banden. Eine Abnahme der Bandenintensität zeigt eine Abnahme der Carotinoid-Konzentration mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche. Folglich ist schon auf den ersten Blick ein Gradient in der Carotinoid-Konzentration in Abhängigkeit von der Entfernung zur Algenoberfläche zu erkennen (siehe Abbildung 3.12).

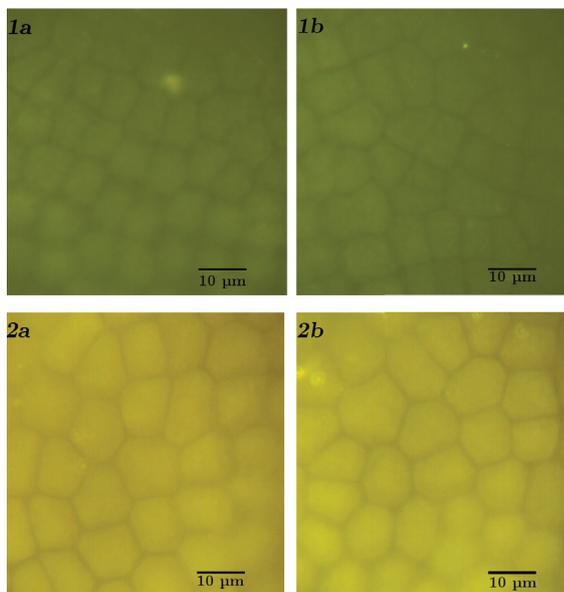
Deutlich wurde dies auch bei der Auswertung der Raman-Spektren. Für die weitere, semiquantitative Bestimmung der Carotinoid-Konzentration auf der Algenoberfläche wurde die Bande der C=C-Schwingung (um  $1525\text{ cm}^{-1}$ ) ausgewählt. Nachdem die Spektren mittels der Software R untergrundkorrigiert worden waren (siehe Abschnitt 5.7.1), zeigte die Flächenbestimmung dieser Bande einen deutlichen, exponentiellen



**Abb. 3.14:** Abnahme der C=C-Streckschwingungsintensität ( $1528\text{ cm}^{-1}$ ) mit zunehmender Entfernung von der Algenoberfläche, dargestellt für drei verschiedene Thallusabschnitte (+ oberer Thallusabschnitt/Spitze, × mittlerer Thallusabschnitt, ○ unterer Thallusabschnitt). Die gestrichelte Linie spiegelt die Anpassung der Daten an eine doppelt exponentielle Funktion wieder. Die Abbildung der Alge wurde mit GIMP bearbeitet.

Abfall in der Intensität mit zunehmender Entfernung zur Algenoberfläche an drei verschiedenen Thallusabschnitten der Braunalge *F. vesiculosus* (siehe Abbildung 3.14).

Entscheidend für die Lokalisation von Oberflächenmetaboliten pflanzlicher Organismen ist die Unversehrtheit der vermessenen Oberfläche. Verletzungsbedingt aus der Alge austretende Metabolite können die Messergebnisse beeinträchtigen. Zum einen können diese die tatsächliche, auf der Oberfläche vorhandene Konzentration des zu analysierenden Metaboliten erhöhen. Noch schwerwiegender können austretende Metabolite fälschlicherweise als Oberflächensubstanzen identifiziert werden, obwohl sie erst durch die Verletzung auf die Oberfläche gelangt sind. In diesem Versuch gewährleistete die verwendete Messzeit von 2 s mit einer Laserleistung von weniger als 1 mW auf den Probenbereich, dass es zu keinerlei Verwundung der Algenoberfläche kam. Darüber hinaus bietet im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie die Verwendung eines Konfokalen Mikroskops die Möglichkeit die genaue Position der Oberfläche zu ermitteln (Semwogerere & Weeks, 2005). So wurde an einer der Messposition nahen Stelle die Position der Oberfläche bestimmt und mit Berücksichtigung der Laserauflösung in z-Richtung ( $1\text{ }\mu\text{m}$ ) der Start bzw. Endpunkt der Messung auf

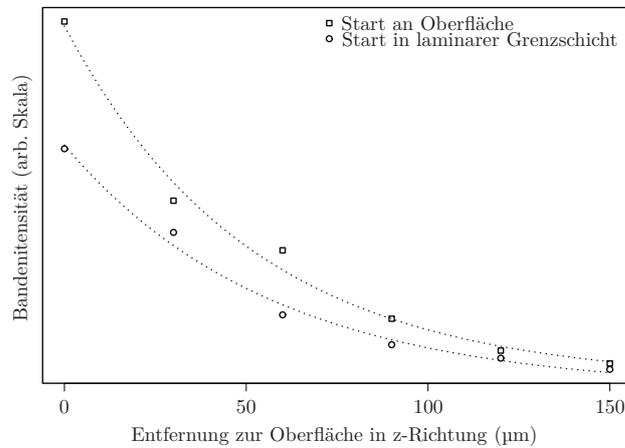


**Abb. 3.15:** Mikroskopische Aufnahmen der Oberfläche zweier *F. vesiculosus* Individuen (1, 2) vor (a) und nach (b) der RR-Messung. Der Kontrast der Bilder wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

der Oberfläche bestimmt.

Der Vergleich mikroskopischer Aufnahmen der gemessenen Bereiche vor und nach der Messung zeigte keine sichtbaren Verletzungen der Algenoberfläche (Beispielaufnahmen Abbildung 3.15). Darüber hinaus wurden die verwendeten Algen mit Evans Blue angefärbt (Weinberger *et al.*, 2005) und auf mögliche verletzte, angefärbte Zellen der Algenoberfläche hin mikroskopisch untersucht. Es fanden sich keine verletzten Oberflächenzellen nach den Raman-Messungen.

Neben der generellen Oberflächenbeschädigung können die zu untersuchenden Moleküle auch durch die Messungen zerstört werden (Koyama, 1995). Eintreffende Photonen können die Molekülschwingung so stark anregen, dass es zur photochemischen Dissoziation der Moleküle kommt. Dieser Prozess ist in der FT-Raman-Spektroskopie deutlich an einem Verlust der Signalintensität für die gemessenen Carotenoide während einer zu langen Messung zu erkennen. Auch in unserem Aufbau führte eine verlängerte Messzeit von 10 s zu einem deutlichen Verlust an Signalintensität um bis zu 41 %. Daher wurde die Messzeit auf 2 s angepasst, um ein Bleichen der Carotinoid-Moleküle zu minimieren. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass der Laser Metabolite von der Algenoberfläche freisetzt, da sowohl Messreihen von der Algenoberfläche fort, als auch auf diese hin ähnliche Gradienten zeigten (siehe Abbildung 3.16 und Anhang Abbildung 6.1).



**Abb. 3.16:** Abnahme der C=C-Streckschwingung ( $1528\text{ cm}^{-1}$ ) mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche von *F. vesiculosus*. Der Startpunkt der Messungen war auf der Oberfläche oder in der laminaren Grenzschicht. Die gestrichelte Linie spiegelt die Anpassung der Daten an eine exponentielle Funktion wieder.

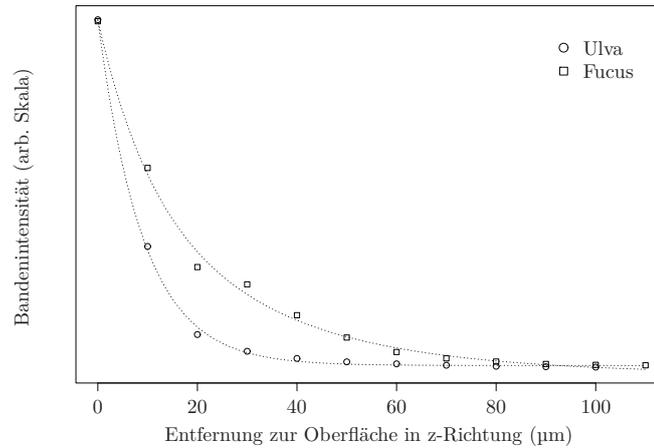
Weiterhin konnte kein Einfluss des Probenvorbereitungszeitpunktes auf die Form des Gradienten gefunden werden. So liegen zwischen der Probenvorbereitung und der Messung von verschiedenen Thallusabschnitten der Alge *F. vesiculosus* in Abbildung 3.14 5 min–90 min. Die Gradienten sind unabhängig von diesem Zeitraum in den verschiedenen Thallusabschnitten deutlich ausgeprägt und zeigen keinerlei Veränderung in Form oder Weite.

Zusammenfassend lies sich kein Einfluss der Probenvorbereitung, Messparameter oder der Messrichtung auf die Algen und den ermittelten Gradienten feststellen. Allein die Messzeit sollte in Vorversuchen bestimmt werden und generell kurz gehalten werden, um ein Verletzen der Alge oder eine photochemische Zersetzung der Carotinoide zu verhindern.

### 3.2.2 Identifikation der lokalisierten Carotinoide

Neben den für die Braunalge *F. vesiculosus* erhaltenen Carotinoid-Gradienten konnte auch in der laminaren Grenzschicht der Grünalge *Ulva* sp. (syn. *Enteromorpha*) ein Verlust in der Signalintensität für die Bande der C=C-Streckschwingung ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) mit zunehmender Entfernung zur Oberfläche ermittelt werden (siehe Abbildung 3.17).

Zudem konnten im RR-Spektrum der Oberfläche von *Ulva* sp. zusätzliche Banden ermittelt werden (siehe Abbildung 3.18). Die zusätzlichen Banden liegen im Bereich zwischen  $1250\text{ cm}^{-1}$ – $1450\text{ cm}^{-1}$  und deuten auf eine unterschiedliche Metabolitzusammensetzung innerhalb der laminaren Grenzschicht von *Ulva* sp. im Vergleich zu *F. vesiculosus* hin. Ein Vergleich der Literatur über die RR-Spektroskopie von

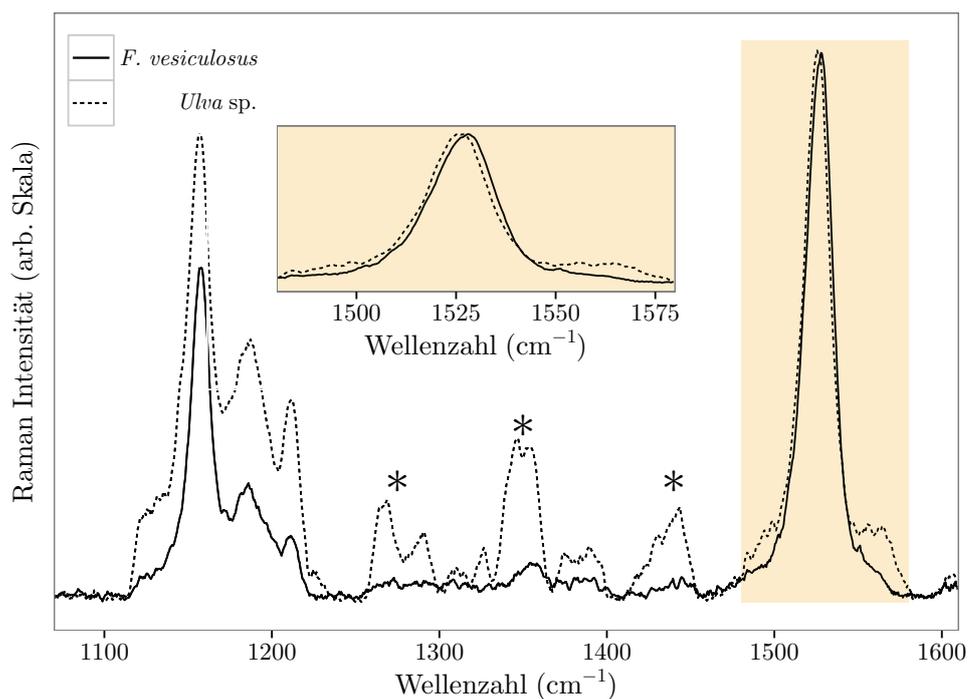


**Abb. 3.17:** Abfall der Bandenintensität für die C=C-Streckschwingung der Algen *F. vesiculosus* ( $1528\text{ cm}^{-1}$ ) und *Ulva* sp. ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) gemessen von der Algenoberfläche bis  $120\text{ }\mu\text{m}$  in den die Algen umgebenden laminaren Grenzbereich hinein. Die gestrichelte Linie zeigt die Anpassung der Daten an eine doppelt exponentielle Funktion.

Mikroalgen oder Algenextrakten deutet auf eine Vielzahl möglicher Metabolite, wie sulfatierter Polysaccharide der Zellwand, Proteine oder andere Pigmente hin (Parab & Tomar, 2012; Brahma *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 2010). Zu welchen Metaboliten die Banden im Spektrum von *Ulva* sp. letztendlich gehören, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Der im Vergleich zur *F. vesiculosus*-Grenzschicht stärkere Abfall der Signalintensität innerhalb der *Ulva*-Umgebung legt einen generellen Unterschied in der Zusammensetzung und auch im chemischen Verhalten der hier detektierten Metabolite nahe. Neben den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Metabolite kann auch die generelle Oberflächentextur der hier verwendeten Algen als weiterer beeinflussender Faktor eine Rolle spielen. Die Braunalge *F. vesiculosus* hat eine eher raue Oberfläche mit Mikrostrukturen. Diese bestehen aus mit für die Phaophycean typischen Haarbüscheln besetzten Vertiefungen. Zudem gibt die Oberfläche von *F. vesiculosus* Polysaccharide an die Umgebung ab (Van de Hoek *et al.*, 1996). Diese Faktoren können zu einem reduzierten Diffusionsprozess der Metabolite in der laminaren Grenzschicht bei *F. vesiculosus* im Vergleich zur Grünalge *Ulva* sp., die eine relativ glatte Oberfläche besitzt (Van de Hoek *et al.*, 1996; Lobban, 1994), führen.

Mit der Raman-Spektroskopie ist es generell möglich zwischen verschiedenen Carotinoiden, gelöst im selben Lösungsmittel, auf Basis ihrer Bandenpositionen zu unterscheiden (Merlin, 1985; Withnall *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wird besonders die Bande für die C=C-Streckschwingung zur Identifizierung der Carotinoide herangezogen. Die Position dieser Schwingung wird sowohl durch die Konfiguration als



**Abb. 3.18:** RR-Spektrum an der Oberfläche von *F. vesiculosus* (durchgezogene Linie) und *Ulva sp.* (gestrichelte Linie). Zusätzliche Banden zwischen  $1250 \text{ cm}^{-1}$  und  $1450 \text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von *Ulva sp.* sind mit \* gekennzeichnet. Einfügung: Detailausschnitt der Bandenpositionsverschiebung der C=C-Streckschwingung in den RR-Spektren von *F. vesiculosus* (durchgezogene Linie) und *Ulva sp.* (gestrichelte Linie) um  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

auch durch die Länge des konjugierten Systems bestimmt (Rimai *et al.*, 1973, 1970).

Das sich die chemische Zusammensetzung der laminaren Grenzschicht von *Ulva* sp. und *F. vesiculosus* unterscheidet, wurde zuvor bereits an der Anzahl der Banden in den Raman-Spektren gezeigt (siehe Abbildung 3.18). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal findet sich in der Verschiebung der Bandenposition der C=C Streckschwingung um  $2\text{ cm}^{-1}$  (*Ulva* sp.:  $1526\text{ cm}^{-1}$ , *F. vesiculosus*:  $1528\text{ cm}^{-1}$ , siehe Einfügung Abbildung 3.18). Diese Verschiebung ist aufgrund der spektralen Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  zwar nicht signifikant, konnte aber über mehrere Messungen ( $n=10$ ) wiederholt dargestellt werden und weist so deutlich auf einen Unterschied in der Carotinoidkomposition der beiden Algenoberflächen hin. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch Studien zur generellen Carotinoidkomposition der beiden Makroalgen. Bei Braunalgen wie *F. vesiculosus* stellt das Fucoxanthin (**2**) mit  $\approx 70\%$  den größten Anteil an der Gesamtcarotinoidkomposition, gefolgt von  $\beta$ -Carotin (**5**) und Violaxanthin mit max.  $12\%$  (Haugan & Liaaen-Jensen, 1994). Neben den Braunalgen ist Fucoxanthin (**2**) auch in einigen Rotalgen zu finden (Bjornland & Aguilar-Martinez, 1976), allerdings ist es völlig abwesend in Grünalgen, die wiederum eine hohe Konzentration an  $\beta$ -Carotin (**5**) aufweisen (Bianchi *et al.*, 1997; Gantt & Cunningham Jr, 2001).

Da die beschriebenen Carotinoide aufgrund ihres chromophoren Systems sehr gut für die RR-Spektroskopie geeignet sind (siehe 1.3.2), wurden sowohl zu  $\beta$ -Carotin (**5**) als auch zu Fucoxanthin (**2**) schon einige RR-Studien durchgeführt (Ballard *et al.*, 1989; Koyama, 1995). Besonders die Arbeit von Ballard *et al.* (1989) zieht einen Vergleich zwischen dem RR-Spektrum von Fucoxanthin (**2**) und dem von  $\beta$ -Carotin (**5**). Der Vergleich beschreibt ein unterschiedliches Verhältnis der Intensitäten von C-C-Streckschwingung zu C=C-Streckschwingung zwischen den beiden Carotinoiden. Die Intensität der C-C-Streckschwingung bei  $1150\text{ cm}^{-1}$  ist im Fucoxanthin-Spektrum deutlich geringer ausgeprägt als die Intensität der C=C-Streckschwingung bei  $1528\text{ cm}^{-1}$ . Dagegen zeigen die Banden dieser beiden Schwingungen im  $\beta$ -Carotin-Spektrum eine ähnlich hohe Intensität. Dieser Unterschied konnte auch bei den von uns aufgenommenen Spektren der Algenoberfläche von *F. vesiculosus* und *Ulva* sp. gezeigt werden (siehe Abbildung 3.18 A). Überdies sind die Schwingungsbanden im  $\beta$ -Carotinspektrum generell breiter ausgeprägt als im Fucoxanthin-Spektrum. Von uns aufgenommene RR-Spektren von Fucoxanthin (**2**) und  $\beta$ -Carotin (**5**) gelöst in Hexan zeigten ebenfalls diese von Ballard *et al.* (1989) beschriebenen Unterschiede (siehe Abbildung 3.13). Vergleicht man nun die hier aufgenommenen Oberflächen-Spektren der Braunalge *F. vesiculosus* mit dem Spektrum des Fucoxanthin-Standards, fallen die für das Fucoxanthin (**2**) typischen Unterschiede in der Bandenintensität für die  $\nu_1$  und  $\nu_2$  Schwingung auch im Spektrum der Alge auf. Ein weiterer Vergleich zwischen den Spektren der Algenindividuen zeigt eine Bandenverbreiterung im Spektrum der Grünalge ähnlich wie die im aufgenommenen  $\beta$ -Carotin-Spektrum. Zusammenfassend scheint das Spektrum der Braunalge *F. vesiculosus* im Banden-

Muster dem des Fucoxanthins (**2**) und das Spektrum der Grünalge *Ulva* sp. dem des  $\beta$ -Carotins (**5**) zu ähneln. Im Zusammenhang mit den schon erwähnten Studien über die Carotinoid-Zusammensetzung der Braun-, Rot- und Grünalgen (Haugan & Liaaen-Jensen, 1994; Bjornland & Aguilar-Martinez, 1976; Bianchi *et al.*, 1997) kann das gemessene Carotinoid-Spektrum auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* dem Fucoxanthin (**2**) und das Spektrum gemessen an der Oberfläche von *Ulva* sp. dem  $\beta$ -Carotin (**5**), trotz Unterschiede in den Bandenpositionen zwischen Standard- und Algenspektren, zugeordnet werden.

Derartige Unterschiede in den Bandenpositionen zwischen Carotinoid-Standards und pflanzlichem Zellgewebe wurde auch schon in Studien von Withnall *et al.* (2003) beobachtet. Die Studie erklärt diese Verschiebung der Bandenposition für Metabolite innerhalb des Zellgewebes im Vergleich zu den Standardspektren mit einer molekularen Interaktion des Metaboliten mit dem umgebenden, pflanzlichen Gewebe. Gleichfalls kann man aufgrund der spektralen Parameter (Bandenbreite, Bandenposition, Intensitätsverhältnis der Banden bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  /  $1526\text{ cm}^{-1}$  und  $1156\text{ cm}^{-1}$  zueinander) in den von uns gemessenen Braun- und Grünalgen von einem Unterschied in der Carotinoid-Zusammensetzung ausgehen. Darüber hinaus kann das Vorhandensein von Fucoxanthin (**2**) als ein Hauptmetabolit auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* mit den Ergebnissen aus der Studie von Saha *et al.* (2012) (Saha *et al.*, 2011) bestätigt werden. Bei der Analyse der Fucus-Oberflächen-Extrakte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography) (HPLC) fand sich ein dominanter Carotinoid-Peak, der die gleichen chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften aufwies wie eine reine Fucoxanthin-Standardlösung.

### 3.2.3 Ermittlung der Fucoxanthin-Konzentration in der laminaren Grenzsicht von *F. vesiculosus*

Die Messungen der verschiedenen Thallusabschnitte von *F. vesiculosus* zeigten einen deutlichen Gradienten des Carotinoids Fucoxanthin (**2**) innerhalb der an die Algenoberfläche angrenzenden, laminaren Schicht (siehe Abschnitt 3.2.1, Abbildung 3.14). Mit großer Wahrscheinlichkeit entsteht dieser Gradient durch die kontinuierliche Abgabe des Metaboliten von der Alge in das umgebende Medium. Einflüsse, wie die Probenvorbereitung, Messparameter und Messrichtung auf den Gradienten, konnten als Ursache für die Entstehung dieses Effektes bei den Messungen ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Allerdings ist eine quantitative Bestimmung der absoluten Konzentrationen hier nicht möglich. Kalibrationskurven von Lösungen der Carotinoide,  $\beta$ -Carotin (**5**) und Fucoxanthin (**2**) in verschiedenen Molaritäten, sind für die quantitative Analyse der Raman-Messungen notwendig (Schut *et al.*, 1997). Die hier beobachtete Verstärkung der RR-Signale ist abhängig von der Elektronenabsorption des Moleküls. Diese wird wiederum durch das umgebende Medium beeinflusst (Wächtler *et al.*, 2012). Daher sollten Kalibrationskurven in dem Lö-

**Tab. 3.1:** Berechnete Fucoxanthin-Konzentration in der laminaren Grenzschicht von *F. vesiculosus* in verschiedenen Entfernungen zur Algenoberfläche.

Entfernung ( $\mu\text{m}$ )	Konzentration ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
0–10	4,00
10–20	1,44
20–30	0,82
30–40	0,55
40–50	0,39
50–60	0,30
60–80	0,20
80–100	0,14
100–150	0,09

sungsmittel erstellt werden, in dem auch die Raman-Spektren der im Experiment untersuchten Probe aufgenommen wurden. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Carotinoiden in Wasser und der teilweise unbekanntem Zusammensetzung der laminaren Grenzschicht, war es nicht möglich, dieses wässrige Medium für die Versuche zu simulieren. Dennoch kann die hier verwendete spektroskopische Methode lokale Minima und Maxima sowie die laterale Verteilung von Metaboliten auf der Algenoberfläche und in der laminaren Grenzschicht zeigen. Semiquantitative Aussagen sind mit anderen quantitativen Methoden kombiniert möglich.

Mit Hilfe der in der Studie von Saha *et al.* (2011) ermittelten Oberflächenkonzentration von Fucoxanthin (**2**) ( $5,7 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ ) und der in Abbildung 3.14 gezeigten Ausdehnung des laminaren Diffusionsbereichs ( $150 \mu\text{m}$ ), war es möglich die durchschnittliche Konzentration von Fucoxanthin (**2**) auf der Oberfläche und in der umgebenden laminaren Grenzschicht der Alge *F. vesiculosus* zu berechnen ( $580 \mu\text{mol l}^{-1}$ ).

Setzt man diesen Wert mit der Gesamtfläche unter der Funktion des ermittelten Fucoxanthin-Gradienten von *F. vesiculosus* gleich, kann die lokale Konzentration von Teilbereichen der laminaren Grenzschicht integriert werden. Berechnete lokale Konzentrationen für verschiedene Teilbereiche sind in Tabelle 3.1 zu finden.

Die Ergebnisse geben einen vollkommen neuen Einblick in die chemische Interaktion der Makroalge mit ihrer Umgebung. So sind Organismen, die eine Größe im Mikrometerbereich besitzen, einer millimolaren Konzentration des Metaboliten Fucoxanthin (**2**) in der direkten Umgebung der Algenoberfläche ausgesetzt. Dies liefert eine völlig neue Sichtweise auf die Ergebnisse bisheriger Bioassays zum Einfluss von Algenoberflächenmetaboliten auf umgebende Organismen.

Die Grundlage bisheriger Bioassays waren die mittels Dipping-Methode extrahierten Metabolit-Konzentrationen der laminaren Grenzschicht (Dworjanyn *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2011, 2012). Dabei wurde das Volumen der laminaren Grenzschicht

mit Hilfe der perobten Fläche und Literaturwerten für die dicke dieser Grenzschicht bestimmt. In den Studien wurden dies erhaltene Metabolit-Konzentration als natürliche Konzentration des Metaboliten auf der Algenoberfläche betrachtet. In den anschließenden Bioassays wurden, abweichend von dieser “natürlichen Konzentration”, weitere ökologisch relevanten (Antifouling, Antiherbivorie) höhere oder niedriger Konzentrationen der Metaboliten ermittelt. Hierbei wurden Verbindungen die erst bei einer weitaus höheren als der “natürlichen Konzentration” einen Effekt gegenüber bestimmten Organismen hervorriefen als “uneffektiv“ gegenüber diesen Organismen beschrieben (Saha *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass eine im Vergleich zur “ vorhandenen ” weitaus höhere Konzentration an Metaboliten in direkter Nähe der Algenoberfläche ist. Viele oft schädliche Mikroorganismen werden so schon in einigem Abstand zur Oberfläche davon abgehalten mit der Algenzelle in Kontakt zu kommen.

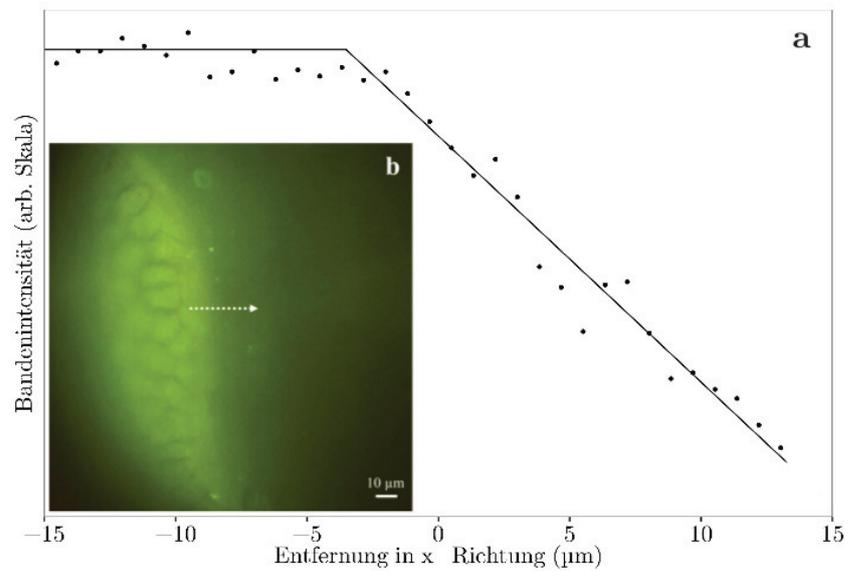
### 3.2.4 Laterale Verteilung von Carotinoiden auf *F. vesiculosus*

Eine Carotinoid-Verteilung konnte nicht nur innerhalb der laminaren Grenzschicht von *F. vesiculosus* und *Ulva* sp. ermittelt werden (Abschnitt 3.2.1), sondern auch in lateraler Richtung auf der Oberfläche von *F. vesiculosus*.

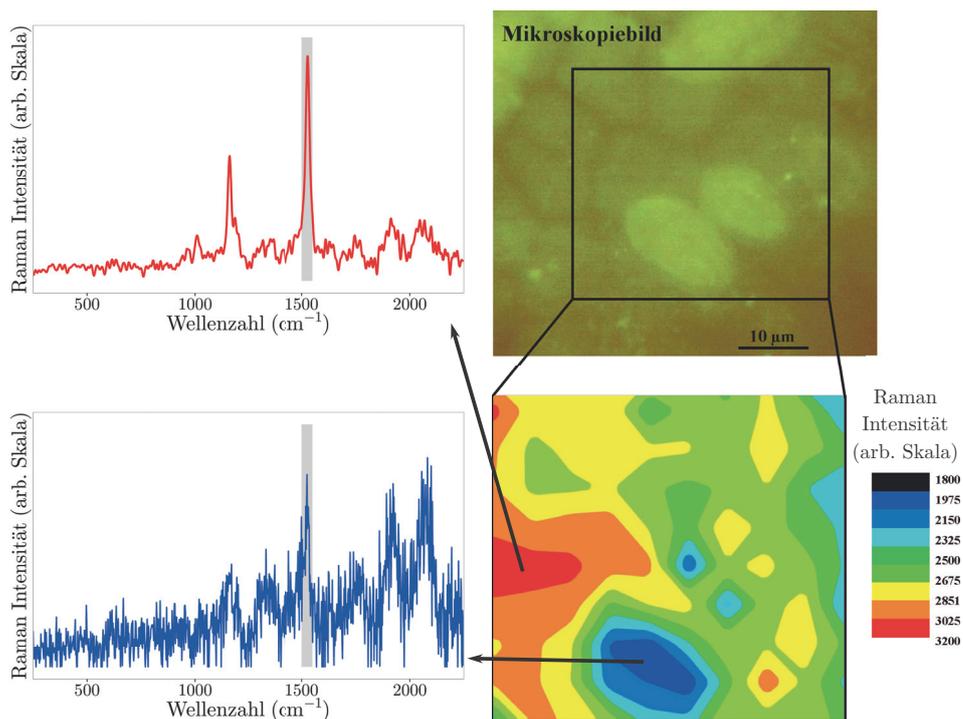
Hierfür wurde eine Reihe von Messpunkten beginnend von der Thallusmitte in Richtung des ungeschnittenen Algenrandes und darüber hinaus gemessen. Die Auswertung der Messungen bezog sich wie zuvor auf die Bandenintensität der C=C-Streckschwingung der Carotinoide, in diesem Fall des Fucoxanthins (**2**) bei  $1528\text{ cm}^{-1}$ .

Direkt auf der Algenoberfläche zeigte sich zwischen den Messpunkten nur ein geringer Unterschied in der Bandenintensität. Mit Erreichen des Algenrandes nahm die Intensität zwischen den Messpunkten mit zunehmender Entfernung vom Algenrand in den ersten  $15\text{ }\mu\text{m}$  linear ab (siehe Abbildung 3.19). In diesem Bereich war auch der Verlauf von zuvor aufgenommenen Carotinoid-Gradienten in der laminaren Grenzschicht von *F. vesiculosus* annähernd linear (vergl. Abbildung 3.14 und 3.17).

Eine detaillierte Darstellung der Carotinoidverteilung auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* konnte mit dem Erstellen einer Oberflächenkarte (siehe Abbildung 3.20) über eine Fläche von  $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$  gezeigt werden. Generell konnte in diesem kleinen Ausschnitt der Algenoberfläche eine ungleichmäßige Verteilung der Carotinoide ermittelt werden. In einem relativ großen, zusammenhängenden Bereich ist die Intensität für die Carotinoid-Bande bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  gleichmässig verteilt, dargestellt in der Farbkarte als grüner und gelber Bereich. Einzelne Bereiche weisen jedoch ein deutliches Maximum (rot) oder Minimum (blau) in der Bandenintensität auf. Der Vergleich der Farbkarte mit der mikroskopischen Aufnahme des Messbereiches zeigt, Bereiche mit anhaftenden Organismen, wie z. B. Diatomeen, weisen eine deutlich geringere Intensität der C=C-Streckschwingung auf, als solche in denen die Algenoberfläche direkt vermessen wurde. Demnach war der Gehalt an Carotinoiden auf der



**Abb. 3.19:** a: Bandenintensität der C=C-Streckschwingung bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* ( $-15\ \mu\text{m}$ – $-2,5\ \mu\text{m}$  und nach Überqueren des Algenrandes in die umliegende laminare Grenzschicht ( $-2,5\ \mu\text{m}$ – $15\ \mu\text{m}$ ). b: Mikroskopische Aufnahme des gemessenen Bereiches auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* und der angrenzenden laminaren Grenzschicht. Die Kontraste der Abbildung B wurden mit dem Programm GIMP bearbeitet.



**Abb. 3.20:** Karte der Carotinoidverteilung auf der Oberfläche von *F. vesiculosus* sowie zwei assoziierter Diatomeen (erkennbar als hellgrüne Objekte in der mikroskopischen Aufnahme). Die dargestellten Spektren entsprechen je einem Spektrum aus dem in der Farbkarte als blau oder rot markierten Bereich der Algenoberfläche. Die Falschfarbkarte basiert auf den Intensitäten der C=C-Schwingungsbande bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  in den Spektren grau hervorgehoben. Der Kontrast des Mikroskopischen Bildes wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

Algenoberfläche deutlich höher als auf der Oberfläche der Diatomeen.

Da Diatomeen neben weiteren Carotinoiden auch Fucoxanthin (**2**) produzieren (Stauber & Jeffrey, 1988) könnten die Diatomeen auch ein unterschiedliches Fucoxanthin-Abgabeverhalten im Vergleich zu der untersuchten Makroalge *F. vesiculosus* aufweisen. So kann z. B. Licht die Abgabe von verschiedensten Sekundärmetaboliten in Mikroalgen wie den Diatomeen (Vanellander *et al.*, 2012) steuern. Über den Abgabemechanismus von Fucoxanthin (**2**) an die Umwelt durch *F. vesiculosus* oder Diatomeen ist bisher nichts bekannt. Generell ist die Abgabe eines nicht polaren Pigmentes, wie einem Carotinoid, in eine polare Umgebung überraschend. Carotinoide, wie das Fucoxanthin (**2**), sind normalerweise Teile des Lichtsammelkomplexes und befinden sich im Zellinneren (Blinks, 1954). Bis jetzt ist noch vollkommen unbekannt, welche Stoffwechselprozesse an der Freisetzung der Carotinoide an die Oberfläche beteiligt sind. Eine Möglichkeit für eine Freisetzung von Carotinoiden und der Ausbildung der hier ermittelten Gradienten stellt die Zersetzung von Oberflächenzellen dar. Diese Möglichkeit konnte aber in mikroskopischen Untersuchungen durch die Beobachtung der Zelloberfläche und der Abwesenheit von toten Zellen ausgeschlossen werden (Siehe Abbildung 3.13). Daher ist eine kontrollierte Abgabe des Metaboliten wahrscheinlich.

### 3.3 Lokalisation und Ermittlung der Verteilung von Sekundärmetaboliten innerhalb von *C. taxifolia* und *C. prolifera* mittels FT-Raman-Spektroskopie

Die verletzungsfreie Detektion von ökologisch relevanten Algenoberflächenmetaboliten mittels Raman-Spektroskopie konnte im vorherigen Abschnitt (3.2) erfolgreich gezeigt werden. Viele interessante Metabolite befinden sich allerdings nicht nur auf der Oberfläche sondern auch innerhalb eines Organismus. Besonders hier ist eine verletzungsfreie Detektion und Lokalisation im lebenden Organismus für das Verständnis von biochemischen Prozessen und Mechanismen relevant. Im nachfolgenden Abschnitt wird die verletzungsfreie Detektion von Metaboliten innerhalb von Grünalgen der Gattung *Caulerpa* beschrieben.

Zu den einzelligen Algen der Gattung *Caulerpa* gehört auch die sich im Mittelmeer rasant ausbreitende, invasive *C. taxifolia* (Meinesz *et al.*, 2001; Occhipinti-Ambrogi & Savini, 2003).

Die ursprünglich im Pazifik beheimatete, siphonale Alge verdankt ihren Erfolg im Mittelmeer neben einer großen Temperatur Toleranz (Meinesz & Hesse, 1991; Meinesz *et al.*, 1995; Williams, 2007), (Williams, 2007) und chemischen Abwehrmetaboliten (Amade & Lemée, 1998) auch ihrem schnellen Wachstum (Ceccherelli *et al.*, 2002; Varela-Álvarez *et al.*, 2012). Aber besonders die für eine einzellige Alge ungewöhnlichen, asexuellen Vermehrung durch Fragmentierung (Smith & Walters, 1999) ist ein Schlüssel zum Erfolg. Hierbei spielt der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) bei der Bildung eines proteinquervernetzten Wundverschlusses der abgetrennten Fragmente eine entscheidende Rolle (siehe Einleitung 1.1.2).

Bis jetzt konnten die bereits durch *in vitro*-Experimente postulierten Mechanismen der Proteinquervernetzung (Jung & Pohnert, 2001) und die Verteilung der bekannten Metabolite des Wundverschlusses (Dreher *et al.*, 1978, 1982; Hawthorne *et al.*, 1981; Goddard & Dawes, 1983) oder der intakten Alge nicht *in vivo* nachgewiesen werden.

Der Nachweis wird dadurch erschwert, dass der zu detektierende Sekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) bei einer Verletzung der Alge enzymatisch umgewandelt wird. Darüber hinaus ist die Grünalge *C. taxifolia* im Gegensatz zu der, in dieser Arbeit schon vorgestellten, mehrzelligen Braunalge *F. vesiculosus* leichter zu verletzen. Daher ist es von entscheidender Bedeutung den Wundverschlussmechanismus der Alge, für die *in vivo* Lokalisation von Caulerpenin (**3**), nicht durch eine Verletzung während der Messung auszulösen.

Die Raman-spektroskopische-Analyse innerhalb der Alge mittels der in Abschnitt 3.2 beschriebenen RR-Spektroskopie ist durch die Anregungswellenlänge nahe eines elektronischen Überganges des bestrahlten Moleküls und der dadurch erhöhten Gefahr die Probe zu verbrennen, problematisch. Aus diesem Grund wurde stattdessen in dieser Studie die FT-Raman-Spektroskopie mit einer höheren Anregungswellenlänge

verwendet (Vergl. Einleitung 1.3.1), die eine Messung ohne Verletzung der Probe und ohne das Auftreten von Fluoreszenz der fluorophoren Systeme von *C. taxifolia*, möglich macht. Ziel dieser Arbeit war es daher, ausgewählte Metabolite der Alge *C. taxifolia* innerhalb des Wundverschlusses und des intakten Individuums mittels der nicht destruktiven FT-Raman-Spektroskopie zu lokalisieren. Alle hier dargestellten Experimente erfolgten in einer gleichberechtigten Kooperation mit Dipl. chem. Ina Weißflog aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Jena und dem Institut für Photonische Technologie Jena.

### 3.3.1 Chemische Zusammensetzung des Wundverschlusses von *C. taxifolia*

Für die FT-Raman-spektroskopischen Untersuchungen wurde das mit Medium bedeckte Stolon von *C. taxifolia* durchgeschnitten und so die Bildung eines Wundverschlusses induziert (Dreher *et al.*, 1982). Ähnlich wie bei den RR-Messungen von *F. vesiculosus* (siehe Abschnitt 3.2) war es auch bei diesen Messungen notwendig, die Algenprobe mittels eines Glasrahmens auf einem Quarzobjekträger zu fixieren, um eine Veränderung des Fokus durch Bewegung der Alge während der Messung zu verhindern. Im Gegensatz zu den RR-Messungen wurde hier nicht mit einem Mikroskop gearbeitet, sondern mit dem zum Gerät gehörenden, motorisierten Probentisch mit Videofunktion.



**Abb. 3.21:** A) *C. taxifolia* vor der FT-Raman-Messung. B) Dasselbe Individuum nach der Messung mehrerer Messpunkte. Kontrast der Aufnahmen wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

Die für die Messung wichtige Einstellung des Fokus auf die Probe erfolgte durch die manuelle Bewegung des Tisches in z-Richtung. Die mit diesem Aufbau, laut Hersteller, erreichte maximale Auflösung des Laserspots in x, y-Richtung beträgt 100  $\mu\text{m}$ . Um ein Austrocknen der Alge und dadurch möglicherweise auftretende Verletzungen zu verhindern, wurde, wie zuvor bei den RR-Messungen, eine ausreichende Versorgung des Organismus mit Medium sicher gestellt. Hierzu wurde die Alge vor der Messung mit ausreichend Medium bedeckt. Die ausgeprägte Bande der O-H-Streckschwingung des Wassers ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ) ermöglichte eine objektive Kontrolle des Wassergehalts der Probe. Bei drastischer Veränderung

dieser Bande wurde die Raman-Messung frühzeitig abgebrochen.

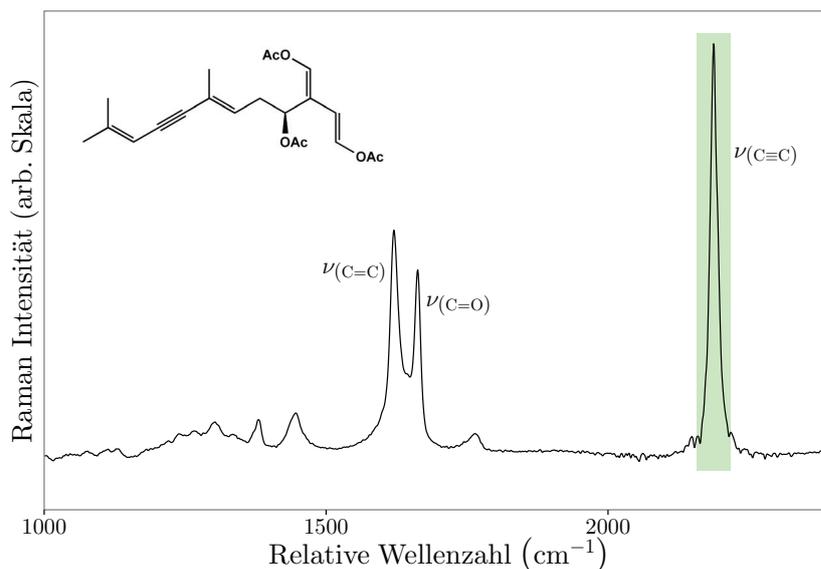
Darüber hinaus wurde die Alge nach jeder Messung visuell auf neu auftretende Verletzungen überprüft und eventuelle Zustandsveränderungen mit Vorher-/Nachher-Aufnahmen (Canon PowerShot SX200 IS, Super Makro Modus) dokumentiert (siehe Abbildung 3.21).

Im Fokus der hier durchgeführten Analyse des Wundverschlusses und des angrenzenden intakten Gewebes von *C. taxifolia* stehen die zwei Metabolite Caulerpenin (**3**) und  $\beta$ -Carotin (**5**), die aufgrund vorheriger Studien (Adolph *et al.*, 2005; Dreher *et al.*, 1978; Hegazi *et al.*, 1998) charakteristisch für die im Fokus stehenden Bereiche der Alge sind. Außerdem weisen diese Metabolite auch Strukturelemente auf, die mit der FT-Raman-Spektroskopie leicht nachzuweisen sind.

So besitzt der Hauptsekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) eine in der Natur selten vorkommende C $\equiv$ C-Dreifachbindung. Solche Bindungen sind Raman-aktiv und weisen eine intensive, charakteristische Bande in einem Bereich zwischen 2260 cm<sup>-1</sup>–2150 cm<sup>-1</sup> auf, in dem wenig andere Schwingungen beobachtet werden. Neben der charakteristischen Bande für die C $\equiv$ C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) bei 2187 cm<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 3.22, grün hervorgehoben) können zusätzlich auch die Banden für die C=O-Streckschwingung (1660 cm<sup>-1</sup>) und die der C=C-Streckschwingung (1620 cm<sup>-1</sup>) für die Identifikation des Caulerpenins (**3**) hinzugezogen werden. Allerdings liegen diese Banden in einem Bereich des Spektrums, in dem in biologischen Proben auch zahlreiche andere Banden beobachtet werden. Daher ist die Position der C $\equiv$ C-Streckschwingung für die Identifizierung von Caulerpenin (**3**) in der Alge den anderen beiden Bandenpositionen vorzuziehen. Zusätzlich bleibt die Dreifachbindung des Caulerpenins (**3**) auch bei der enzymatischen Transformation zum Oxytoxin 2 (**4**) während der Bildung des Wundverschlusses erhalten und ist nicht an der Reaktion mit den Proteinen beteiligt (Adolph *et al.*, 2005; Jung & Pohnert, 2001). Daher können auch die aus dem Caulerpenin (**3**) entstandenen Derivate, sowohl in Lösung als auch in der intakten Alge und dem Wundverschluss, anhand der charakteristischen Dreifachbindung, mittels der Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Das schon in Abschnitt 3.2.1 mittels RR-Spektroskopie in der laminaren Schicht der Grünalge *Ulva* sp. untersuchte Carotinoid  $\beta$ -Carotin (**5**) stellt auch in den hier untersuchten Algen eines der Hauptcarotinoide des Lichtsammelkomplexes dar (Hegazi *et al.*, 1998). Die für das  $\beta$ -Carotin (**5**) charakteristischen drei Raman-Banden liegen bei der Messung in *C. prolifera* oder *C. taxifolia* bei 1526 cm<sup>-1</sup> für die C=C-Streckschwingung ( $\nu_1$ ) des durchkonjugierten Systems, bei 1156 cm<sup>-1</sup> für die C-C-Streckschwingungen ( $\nu_2$ ) des Systems und bei 1000 cm<sup>-1</sup> für die Methyl-Schwingungen ( $\nu_3$ ) (vergl. Abschnitt 3.2.1 und Abbildung 3.13). Mikroskopische Studien über den Wundverschluss (Dreher *et al.*, 1978) zeigten einen Abbau der Chloroplasten und der darin enthaltenen Pigmente innerhalb einiger Stunden. Daher eignet sich das  $\beta$ -Carotin (**5**) als idealer charakteristischer Metabolit zur Identifikation von intaktem Algengewebe.

Für die FT-Raman-Messungen des Wundverschlusses wurden verschiedene Individuen von *C. taxifolia* verwundet und wie oben beschrieben fixiert. Anschließend wurde ein Bereich des Stolons, der an der Verletzung beginnend sich bis maximal 3 mm–4 mm von dieser entfernt erstreckte, vermessen. Die aufgenommenen Spektren ermöglichten aufgrund der unterschiedlichen Bandenstruktur (Anzahl und Position

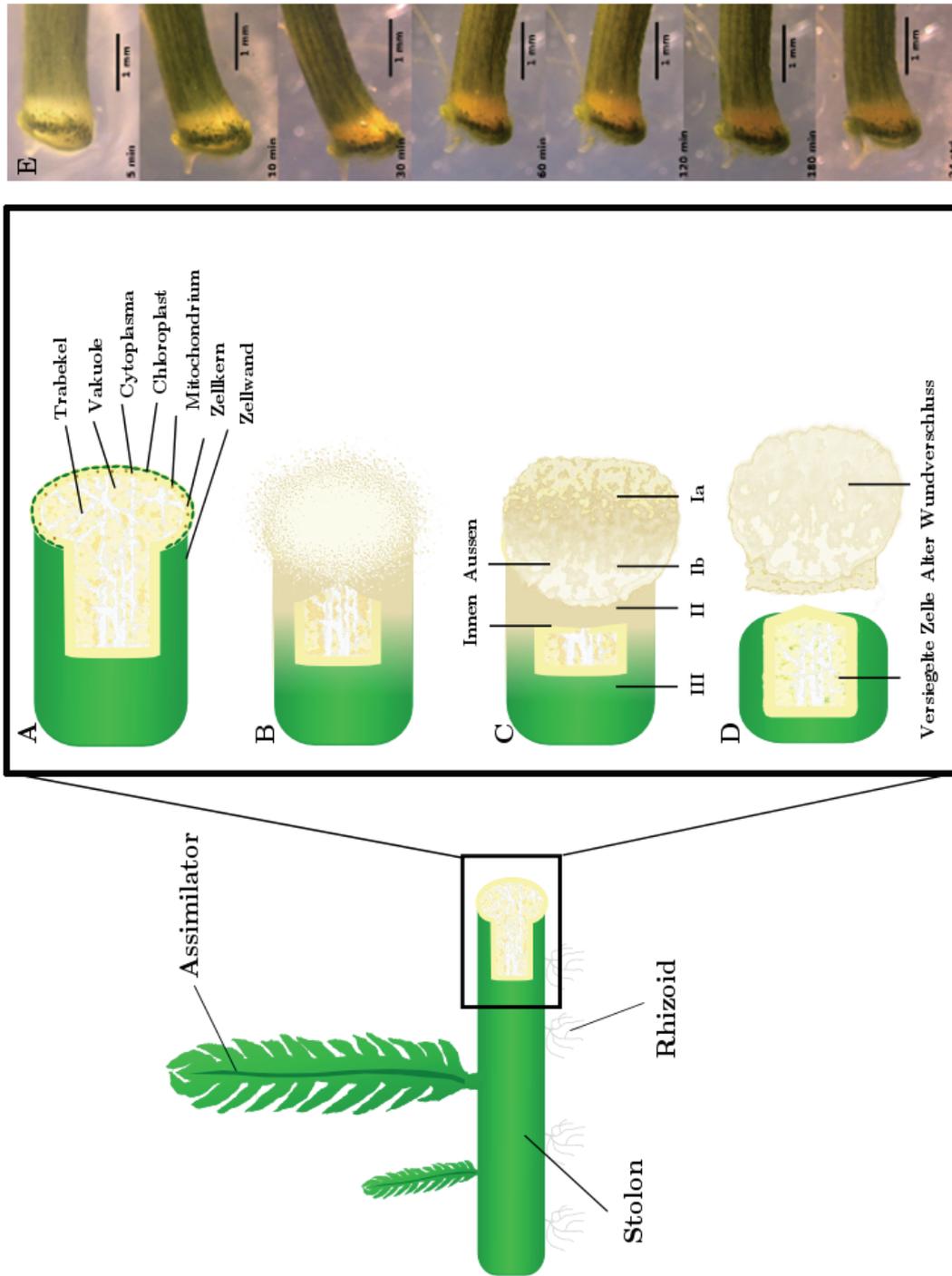


**Abb. 3.22:** FT-Raman-Spektrum und Struktur von Caulerpenin (**3**) extrahiert aus *C. taxifolia* und *C. prolifera*. Der grüne Bereich hebt die Bande für die zur Identifikation des Caulerpenins (**3**) und seiner Derivate verwendete C≡C-Streckschwingung ( $2187\text{ cm}^{-1}$ ) hervor.

der Banden in den verschiedenen Spektren) eine Einteilung des vermessenen Bereichs in vier verschiedene Zonen (Ia, Ib, II, III).

Pro Zone wurden aus jeweils 50 bis 180 Spektren sogenannte Mittelwertspektren gebildet, indem zuvor die untergrundkorrigierten und normierten Werte für die Raman-Intensität (siehe Abschnitt 5.7.1) aller Spektren für eine Bandenposition ( $\text{cm}^{-1}$ ) erst aufsummiert und anschließend durch die Anzahl der aufsummierten Raman-Intensitäten dividiert wurden. Die so erhaltenen Mittelwertspektren der einzelnen Wundverschlusszonen von *C. taxifolia* sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

Die auf der Bandenstruktur beruhende Einteilung in vier verschiedene Zonen ist in Übereinstimmung mit früheren mikroskopischen Studien des Wundverschlusses (Dreher *et al.*, 1978) in der die Bereiche als äußerer, innerer Wundverschluss, Übergangszone und intaktes Algengewebe bezeichnet worden sind (schematisch dargestellt in Abbildung 3.23 C). Die Studie von Dreher *et al.* (1978) zeigte auch einen zeitlichen Verlauf in der Bildung des Wundverschlusses bis hin zur vollständigen Versiegelung des verletzten Thallussückes. Demnach bildet sich direkt nach der Verwundung (siehe Abbildung 3.23 A) der externe Wundverschluss durch das Ausstoßen einer viskosen Flüssigkeit die bei Berührung mit Seewasser zu einem gelatinösen Pfropfen erstarrt (siehe Abbildung 3.23 B nach Dreher *et al.* (1978)). Innerhalb der nächsten Minute zieht sich das verletzte Cytoplasma der Alge 1 mm–2 mm von der verwundeten Stelle



**Abb. 3.23:** A bis D Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Wundverschlussbildung von *C. taziifolia* nach (Dreher *et al.*, 1978). A) Nach der Verwundung des Thallus B) Austritt von Cytoplasma und Entstehung des äußeren Wundverschlusses, C) Innerer und äußerer Wundverschluss sowie die Einteilung in vier Zonen (Ia = äußerer Wundverschluss, Ib = innerer Wundverschluss, II = Übergangszone, III = intaktes Algengewebe) D) Abstoßen des alten Wundverschlusses nach Versiegelung der Zelle und Bildung einer neuen Zellwand E) Binokulare Aufnahmen des Wundverschlusses von *C. taziifolia* zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min – 24 h) nach Verwundung der Alge. Der Kontrast der Bilder wurde mit dem Programm Gimp bearbeitet.

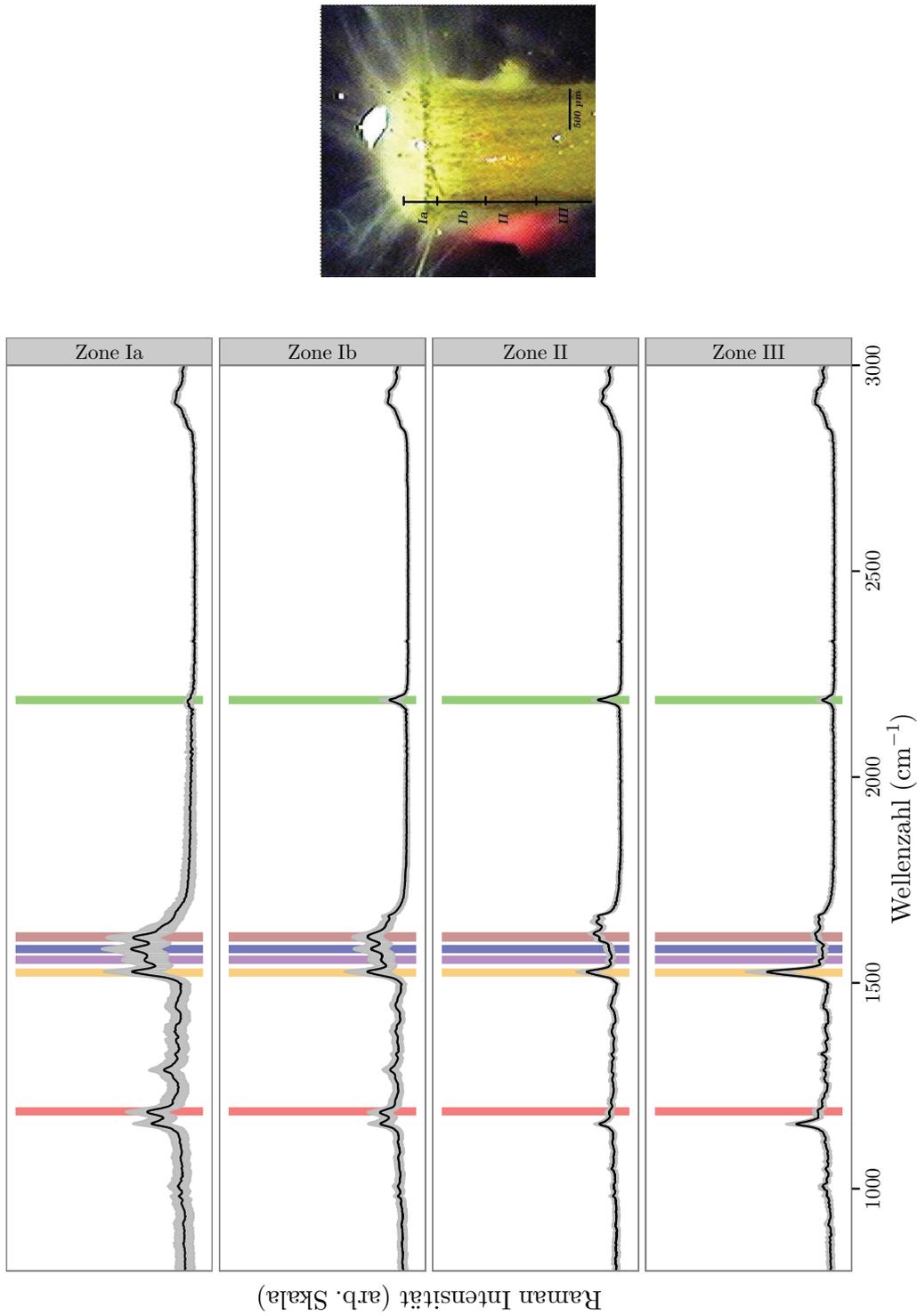
zurück und es bildet sich ein zweiter, sogenannter interner Wundverschluss (siehe Abbildung 3.23 B und C). Zwei Stunden nach Verwundung der Alge fängt das zurückgezogene Cytoplasma an, sich wieder in Richtung Wundverschluss zu bewegen (siehe Abbildung 3.23 E). Die Bildung einer neuen Zellwand startet ca. 11 Stunden nach Verwundung der Alge und endet nach insgesamt sechs Tagen mit dem Beginn der Degeneration des Wundverschlusses (3.23 (Dreher *et al.*, 1978)).

Eine Größenangabe für die einzelnen Zonen konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht genau ermittelt werden, da die Größe der ausgebildeten Zonen sich zwischen den einzelnen Individuen stark unterschied und auch von der Form der Verletzung, in diesem Fall durch den angesetzten Schnittwinkel, abhängig ist.

Die Bereiche der für Caulerpenin (**3**) und  $\beta$ -Carotin (**5**) spezifischen Banden sowie weiterer auffälliger Banden, die allerdings noch keiner Substanz sicher zuzuordnen sind, werden in Abbildung 3.24 und im weiteren Verlauf dieser Arbeit farblich hinterlegt. Die erste nicht zugeordnete Bande bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  ist rot hinterlegt, die C=C-Streckschwingung von  $\beta$ -Carotin (**5**) bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  orange, die zweite nicht zugeordnete Bande bei  $1556\text{ cm}^{-1}$  lila, die dritte nicht zugeordnete Bande bei  $1582\text{ cm}^{-1}$  blau, die vierte nicht eindeutig zuzuordnende Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  braun und schließlich die C $\equiv$ C-Streckschwingung von Caulerpenin (**3**) und der Caulerpenin-Derivate bei  $2187\text{ cm}^{-1}$  mit grün. Die noch nicht zugeordneten Banden werden im folgenden Text als Wellenzahl angegeben. Eine Übersicht über alle beschriebenen Banden ist auch Tabelle 3.2 zu entnehmen. Hier sind die in Klammern gesetzten Zonen diejenigen in denen die entsprechende Bande nur schwach ausgeprägt ist. Im Detail werden die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der vier verschiedenen Zonen sowie ihre Bedeutung für das Verständnis des Wundverschlusses nachfolgend diskutiert.

### Zone Ia (Äußerer Wundverschluss)

Die erste klar definierbare Zone hat ihren Anfang am äußeren Rand des externen Wundverschlusses und endet dann nach einigen Mikrometern im Wundverschlussgewebe (siehe Abbildung 3.24 Zone Ia). Im dazugehörigen Mittelwertspektrum ist deutlich eine dominante Bande zwischen  $1500\text{ cm}^{-1}$ – $1650\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. In diesem spektralen Bereich liegen Amid-Banden, die zur Identifikation von Proteinen verwendet werden. Allerdings sind diese Banden in der Raman-Spektroskopie nur schwach ausgeprägt und können nicht von dem in den Spektren der Algen hier vorkommenden dominanten Banden anderer Metabolite zwischen  $1500\text{ cm}^{-1}$ – $1650\text{ cm}^{-1}$  unterschieden werden. Daher konnten die schon in früheren Studien als Bestandteil des Wundverschlusses identifizierten (quervernetzten) Proteine (Dreher *et al.*, 1978; Goddard & Dawes, 1983; Adolph *et al.*, 2005) nicht direkt anhand ihrer Amid-Banden, mittels der FT-Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden. Allerdings kann das Caulerpenin-Derivat, welches die Proteine im Wundverschluss vernetzt und so



Raman Intensität (arb. Skala)

**Abb. 3.24:** Mittelwertspektren für die Zonen Ia ( $n_{ZoneIa} = 58$ ), Ib ( $n_{ZoneIb} = 174$ ), II ( $n_{ZoneII} = 102$ ) und III ( $n_{ZoneIII} = 50$ ) des Wundverschlusses und des intakten Gewebes von *C. taxifolia*. Die verschiedene Farben markieren charakteristische Banden bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  (rot),  $1526\text{ cm}^{-1}$  (orange), für die C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotin (**5**),  $1556\text{ cm}^{-1}$  (lila),  $1582\text{ cm}^{-1}$  (blau),  $1610\text{ cm}^{-1}$  (braun) sowie  $2187\text{ cm}^{-1}$  (grün), für die  $\equiv\text{C}$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) und der Caulerpenin-Derivate). Der graue Bereich um die Banden ist die Standardabweichung der Mittelwertspektren. Rechts: Abbildung des vermessenen Bereiches mit Einzeichnung der verschiedenen Zonen. Der Kontrast der Aufnahme wurde mit dem Programm Gimp bearbeitet.

**Tab. 3.2:** Charakteristische Raman-Banden der Mittelwertspektren von *C. taxifolia*

Relative Wellenzahl cm <sup>-1</sup>	Schwingung	Metabolit Struktur	Zone
2187	C≡C	<b>3</b>	(Ib) II III
2183	C≡C	Quervernetztes Material	Ia
2172	C≡C	<b>6</b>	Ia
1662	C=C Acetyl	<b>3</b>	II III
1620	C=C	<b>3</b>	II III
1613	–	Quervernetztes Material	Ia
1610	–	Quervernetztes Material	Ib
1582	–	–	Ia Ib (II III)
1556	–	–	Ia Ib (II III)
1526	C=C	<b>5</b>	Ia Ib II III
1361	–	–	Ia
1286	–	–	Ia Ib II III
1186	–	–	Ia Ib (II) III
1156	C-C	<b>5</b>	Ia Ib II III
1142	C=C-H	–	Ia

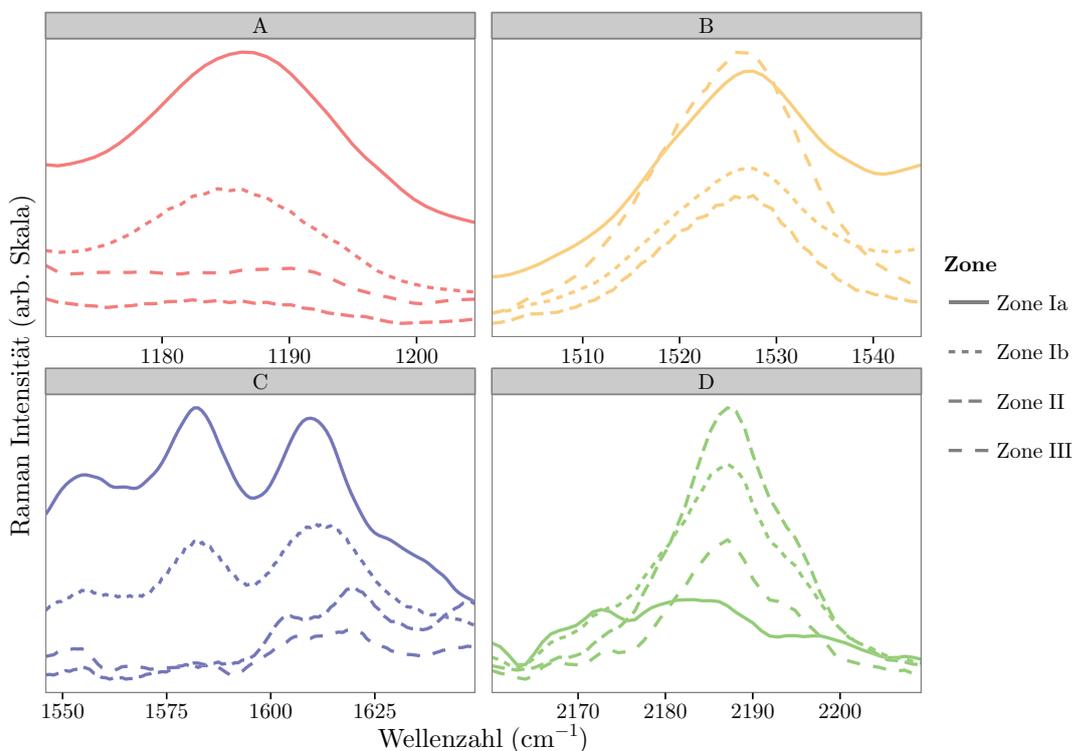
In diesen Zonen sind die jeweiligen Banden nur schwach ausgeprägt.

dessen Grundstruktur mit bildet (Adolph *et al.*, 2005; Jung & Pohnert, 2001; Weißflog, 2010), anhand der Bande seiner charakteristischen Dreifachbindung identifiziert werden.

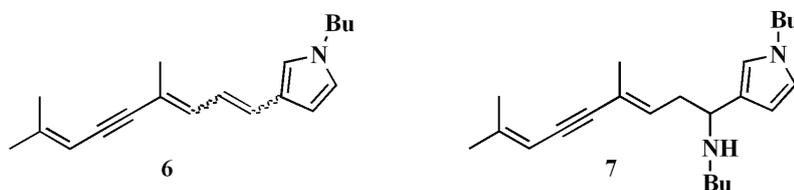
Generell ist die Bande in Zone Ia für die Dreifachbindung des Protein quervernetzenden Caulerpenin-Derivates als eine schmale Bande bei 2183 cm<sup>-1</sup> mit einer Schulter bei 2172 cm<sup>-1</sup> zu sehen (siehe Abbildung 3.24 grüner Bereich sowie Detailausschnitt in Abbildung 3.27 und Abbildung 3.25 D). Im Vergleich mit der Position der C≡C-Streckschwingung von reinem Caulerpenin (**3**) bei 2187 cm<sup>-1</sup> ist die Bande im Wundverschluss um 3 cm<sup>-1</sup>–4 cm<sup>-1</sup> und die der Schulter um bis zu 15 cm<sup>-1</sup> zu kleineren Wellenzahlen hin verschoben (siehe Abbildung 3.27). Eine ähnliche Verschiebung der Bande ist auch bei dem von uns hergestellten Syntheseprodukt nach Caulerpenin (**3**) Quervernetzung durch Esterase und Protein (Lösung 1) mit einer Position bei 2173 cm<sup>-1</sup> zu erkennen (vergl. Abbildung 1.5 und Anhang Seite 138).

Diese Verschiebung spricht für eine Veränderung der chemischen Umgebung der Dreifachbindung.

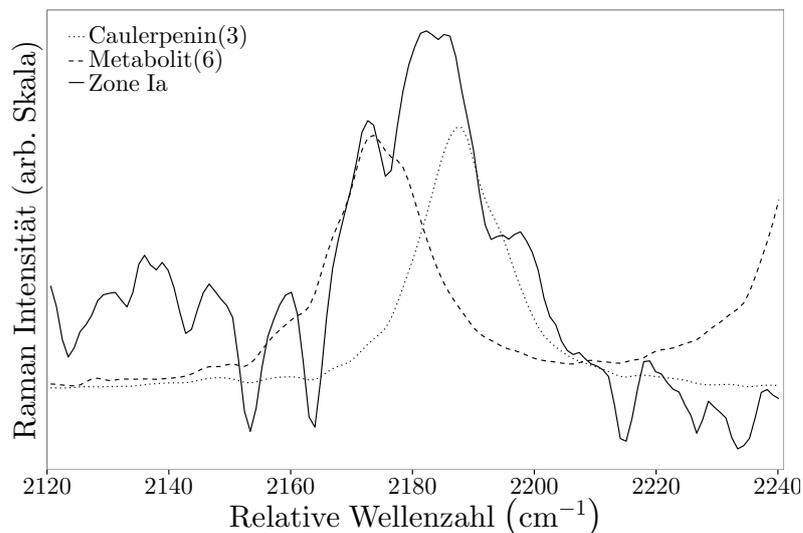
Entscheidend hierfür ist die Art wie die Caulerpenin-Derivate die Proteine quervernetzen. Allerdings konnte bis heute weder die genaue Struktur des Protein quervernetzenden Moleküls noch der daraus resultierende Mechanismus der Vernetzung *in vivo* nachgewiesen werden. Einer der beiden diskutierten Mechanismen wurde 1995 von Guerriero *et. al.* in *in vitro*-Versuchen etabliert.



**Abb. 3.25:** Detailausschnitte der Mittelwertspektren der Zonen Ia (durchgezogen), Ib (gestrichelt), II (gepunktet) und III (gestrichelt und gepunktet) von *C. taxifolia* A) Bereich für die Bande bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  (rot) B) Bereich für die Bande der C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  (orange). C) Bereich für die Banden bei  $1556\text{ cm}^{-1}$  (lila) und  $1582\text{ cm}^{-1}$  (blau). D) Bereich für die Bande der C $\equiv$ C-Streckschwingung des Caulepenins (**3**) und dessen Derivate bei  $2172\text{ cm}^{-1}$  und  $2187\text{ cm}^{-1}$  (grün).



**Abb. 3.26:** Endprodukte der Reaktion von Caulepenin (**3**) mit Butylamin (Bu) nach Guerriero *et al.* (1995).

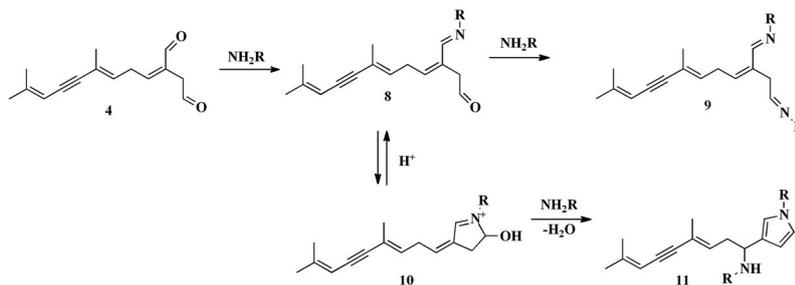


**Abb. 3.27:** Detailausschnitte des Mittelwertspektrums von Zone Ia im Vergleich mit den Spektren von reinem Caulerpenin (**3**) und des Synthesproduktes (**6**) im Bereich der C≡C-Streckschwingung bei 2187 cm<sup>-1</sup>.

Hierbei wird bei der Umsetzung des Caulerpenins (**3**) mit Butylamin in Methanol, durch eine basisch katalysierte Deacetylierung Oxytoxin 2 (**4**) freigesetzt. Das Oxytoxin 2 (**4**) kann wiederum durch die Addition eines Amins an die Michaelakzeptorposition und die Ausbildung eines Pyrrolsystems zu dem Oxytoxin 2-Derivat (**7**) reagieren. Neben einem System mit zwei Proteinbindungsstellen (**7**) konnte Guerriero *et al.* (1995) auch ein Oxytoxin 2-Derivat (**6**) mit nur einer möglichen Protein Bindungsstelle identifizieren (siehe Abbildung 3.26).

Dagegen basiert der von Jung & Pohnert (2001) postulierte Mechanismus auf der Annahme, dass es nach der Deacetylierung zu einer Kondensation eines Amin an die C13- Aldehydfunktion des Oxytoxin 2 (**4**) kommt und im Anschluss durch eine weitere Kondensationsreaktion ein Diimin (**9**) ausgebildet wird (siehe Abbildung 3.28).

Um die in den Wundverschlusspektren vermuteten Banden einem der hier beschriebenen möglichen Metaboliten zuzuordnen wurden der Metabolit (**6**) nach Guerriero *et al.* (1995) synthetisiert (siehe Abschnitt 5.6.1) und das aufgereinigte Synthesprodukte mittels FT-Raman-Spektroskop vermessen. Anschließend wurden die aufgenommenen Spektren der Wundverschlusszone Ia mit den Spektrum des aufgereinigten Synthesproduktes (**6**) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass das von uns als (**6**) identifizierte Molekül der Synthese nach Guerriero *et al.* (1995) die beste Übereinstimmung für die verschobene Bande der C≡C-Streckschwingung (2172 cm<sup>-1</sup>) in Zone Ia des Wundverschlusses (siehe Abbildung 3.27) aufwies.



**Abb. 3.28:** Postulierter Mechanismus der Reaktion von Oxytoxin 2 (**4**) mit Aminen nach Jung & Pohnert (2001).

Zusätzlich konnte einzig in dem Spektrum zur Struktur (**6**) auch die Deformations-schwingung der C=C-H-Bindung entlang des konjugierten Doppelbindungssystems bei  $1143\text{ cm}^{-1}$  identifiziert werden, welche wiederum auch im Spektrum der Zone Ia bei  $1142\text{ cm}^{-1}$  zu sehen ist. Darüber hinaus zeigten die von Maximilian Bräutigam durchgeführten DFT Berechnungen von Caulerpenin (**3**), Metabolit (**6**) und (**7**), Diimin (**9**) und einem möglichen Oxidiimin (**10**), nur für den Metaboliten (**6**) eine vergleichbare Verschiebung der spektralen Position der C≡C-Streckschwingung (siehe Anhang Abbildung 6.4 bis 6.8 und Tabelle 6.1).

Diese Verschiebung der Wellenzahlen lässt sich bei Betrachtung des Pyrrolysystems von Metabolit (**6**) anhand der Schwächung der C≡C-Bindung durch die verlängerte  $\pi$ -Konjugation erklären. Daher können wir davon ausgehen, dass in Zone Ia (dem äußeren Wundverschluss) ein Oxytoxin 2-Derivat mit den Proteinen bindet, welches eine strukturell hohe Ähnlichkeit mit dem von Guerriero *et al.* (1995) postulierten Metaboliten (**6**) aufweist.

Zudem wurde auch versucht Metabolit (**7**) nach Guerriero *et al.* (1995) zu synthetisieren. Allerdings war in den erhaltenen Fraktionen der HPLC-Aufreinigung nicht eindeutig Metabolit (**7**) mittels UPLC-MS oder NMR-Messungen zu identifizieren. Dennoch wurden die Fraktionen mit einem FT-Raman-Spektroskop vermessen und zeigten für die C≡C-Streckschwingung eine Bandenposition bei  $2184\text{ cm}^{-1}$ . Auch in der Wundverschluss Zone Ia war eine Bande an einer sehr ähnlichen Position bei  $2183\text{ cm}^{-1}$  zu finden (siehe Abbildung 3.27). Eine vergleichbare Verschiebung der Position der C≡C-Streckschwingung um  $3\text{ cm}^{-1}$  waren in Hinblick auf die zusätzlich durchgeführten DFT-Berechnungen nur für das Diimin (**9**) und Metabolit (**7**) zu finden siehe Anhang Abbildung 6.4 bis 6.8 und Tabelle 6.1. Dennoch kann aufgrund der fehlenden eindeutigen Identifikation der Metabolite in den Extrakten keine Aussage über die Anwesenheit von Diimin (**9**) oder Metabolit (**7**) in Zone Ia des Wundverschlusses gemacht werden. Die schon erwähnten DFT-Berechnungen liefern aber ein weiteres Indiz für das Vorhandensein eines Proteinquervernetzlers in Zone Ia.

In jedem der berechneten Spektren konnte die Bande für eine C=C-Streckschwingung um  $1610\text{ cm}^{-1}$  und somit an der gleichen Position gefunden werden, wie im Spektrum der Zone Ia. Dies spricht trotz scheinbarer Abwesenheit von charakteristischen Amid-Banden der Proteine in Zone Ia für das generelle Vorhandensein eines weiteren Proteinquervernetzers.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass der in Zone Ia identifizierte Metabolit (**6**) nur eine mögliche Bindungsstelle für die Proteine aufweist und es mit dem Metaboliten daher nicht zu einer quervernetzung der Proteine kommen kann. Mikroskopische Studien über den Wundverschluss zeigten eine eher lockere, nicht sehr kompakte Struktur des äußeren Wundverschlusses (Dreher *et al.*, 1978; Goddard & Dawes, 1983) als Abgrenzung zum umgebenden Wasser. Diese Struktur scheint auf den ersten Blick für ein Verhindern des Austritts von Zellinhalt nicht sehr effektiv zu sein. Was wiederum für die anscheinend nicht so effektive Verbindung eines Caulerpenin-Derivates in Form von Metabolit (**6**) mit einem Protein spricht und weitere Metabolite oder Mechanismen für einen schnellen, ersten Verschluss des verletzten Algengewebes nicht auszuschließen lässt.

Neben der Beteiligung von Proteinen und Caulerpenin stehen die sich im Wundverschluss auch akkumulierenden Polysaccharide und deren sulfatierten Formen durch ihrer Gel bildenden Fähigkeit (Rees, 1970) schon lange im Verdacht, an der Bildung des Wundverschlusses in Algen der Gattung *Caulerpa* beteiligt zu sein (Dreher *et al.*, 1978; Goddard & Dawes, 1983; Hawthorne *et al.*, 1981; Menzel, 1988; Dawes & Goddard, 1978). Ein indirekter Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Biosynthese von sulfatierten Polysacchariden und der Verwundung von *Caulerpa simpliciuscula* konnte mit  $\text{C}^{14}$ -Markierungsexperimenten von Hawthorne *et al.* (1981) nachgewiesen werden. Allerdings konnte in diesem Versuch, aufgrund der gewählten Extraktionsbedingungen, kein Unterschied zwischen dem extrahierten, sulfatierten Polysaccharid Glucoxylomannogalactan und der Wundverschluss bildenden Vorstufe gefunden werden. Darüber hinaus war es nicht möglich, den gelatinösen Wundpfropf mittels dem extrahierten Glucoxylomannogalactan *in vitro* nachzubilden (Dreher *et al.*, 1982; Hawthorne *et al.*, 1981). Dennoch ist eine mögliche zusätzliche Stabilisierung des Co-Polymers aus dem Caulerpenin Folgeprodukt mit den Proteinen durch die gelbildenden sulfatierten Polysaccharide nicht auszuschließen und wäre eine Erklärung für die in Zone Ia noch unbekannt Metabolite, welche die verletzte Zelle in wenigen Sekunden verschließen.

Eine solche stabilisierende Wirkung von Gel formenden, sulfatierten Polysacchariden ist von den Alginaten und Carrageenen der Rot- und Braunalgen bekannt. Diese sulfatierten Polysaccharide sind in die Zellwand der Algen integriert und verleihen ihnen ein hohes Maß an Feuchtigkeit, Stabilität und Flexibilität in ihrem durch Meereswellen stark dynamischen Lebensraum (Graham & Wilcox, 1999). Da die sulfatierten Polysaccharide in vielen marinen Algen (Percival, 1979) und Pflanzen (Aquino *et al.*, 2005) aber nicht Phototrophen Organismen des Süßwasser- und

terrestrischen Bereiches (Ramus, 1981) gefunden worden sind, kann vermutet werden, dass ihre Funktion neben der schon erwähnten Stabilisierung der Zellwand auch eng an weitere abiotische Eigenschaften des marinen Lebensraums gekoppelt ist. Studien über die Grünalge *Lamprothamnium papulosum* schrieben den sulfatierten Polysacchariden eine Funktion als negativ geladene Barriere zu, welche bei einem hypotonischen Schock die Fähigkeit zum Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Zellwand reduziert und so für einen konstanten Turgordruck sorgt (Shepherd *et al.*, 1999). Demnach könnte eine hohe Konzentration an sulfatierten Polysacchariden im äußeren Wundverschluss von *C. taxifolia*, neben einer Stütz- und Schließfunktion auch eine weitere Schutzbarriere für die verwundete Algenzelle darstellen.

Allerdings konnten ebendfalls, wie die charakteristischen Amid Banden der Proteine, auch die typischen Banden für sulfatierte Polysaccharide bei  $1200\text{ cm}^{-1}$  und  $1400\text{ cm}^{-1}$  in den Mittelwertspektren der Zone Ia nicht gefunden werden. Jedoch könnte die Bande an Position  $1186\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.30 A und B, rot) ein Indiz für die symmetrische Streckschwingung der O=S=O-Gruppe der sulfatierten Polysaccharide sein. In einigen Studien wurde diese Position der Streckschwingung der O=S=O-Gruppe sulfatierter Salze von Polymeren zugeordnet (Eysel & Eckert, 1976; Bertram & Bodmeier, 2006). Da es bei der Bildung des Wundverschlusses auch zu einer Vermischung des ionischen Mediums (Instant Ocean) und des Zellinhaltes kommt, wäre folglich die Bildung von Polysaccharidsalzen im Wundverschluss auch möglich. Um diese Vermutung zu verifizieren, ist es notwendig, Vergleichsspektren von Salzen sulfatierter Polysaccharide oder von sulfatierten Polysacchariden in Anwesenheit von Instant Ocean unter den gleichen Versuchsbedingungen mittels FT-Raman-Spektroskopie aufzunehmen. Die hierfür notwendigen Synthesen und Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Interessanterweise ist auch die charakteristische Bande für die C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**), die charakteristische Bande für die intakte Alge, im äußeren Wundverschluss zu erkennen (siehe Abbildung 3.24, oranger Bereich und 3.25 B). Die einzelnen Spektren des Mittelwertspektrums von Zone Ia zeigten allerdings unterschiedliche Anteile an  $\beta$ -Carotin (**5**), was sich deutlich durch eine hohe Standardabweichung (grauer Bereich um die Mittelwertspektren in Abbildung 3.24) für diese Bande widerspiegelt. Zu erklären ist dies durch die bei dem rapiden Wundverschlussmechanismus teilweise eingeschlossenen, noch intakten Plastiden, welche ein starkes Signal für die typische  $\beta$ -Carotin-Bande liefern. Auch optisch sind die eingeschlossenen Plastiden am Beispiel der Chloroplasten als wahllos verteilte, kleine grüne Punkte im sonst weißen Wundverschluss zu erkennen (siehe Abbildung 3.24, rechtes Bild Aufnahme des Wundverschlusses).

Weitere typische Banden des externen Wundverschlusses bei  $1556\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$ , die schon erwähnte Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  sowie die nur in Zone Ia schwach ausgeprägte Bande bei  $1361\text{ cm}^{-1}$  könnten aufgrund von Literaturquellen teilweise dem Chlorophyll der eingeschlossenen Chloroplasten zugeordnet werden (Koyama, 1995;

Lutz, 1974). Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass die für das Chlorophyll dominanten und charakteristischen Banden bei  $306\text{ cm}^{-1}$  und im Bereich zwischen  $700\text{ cm}^{-1}$ – $900\text{ cm}^{-1}$  nicht im Spektrum der Zone Ia detektiert worden sind. Darüber hinaus variiert die Intensität, der hier vermuteten Chlorophyll-Banden, zwischen den einzelnen gemessenen Spektren der Zone Ia nicht so stark wie im Falle der C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**). Da beide Metabolite innerhalb der Chloroplasten vorhanden sind, ist die getroffenen Zuordnung der Banden zum Chlorophyll, basierend auf Literaturdaten, mit Vorbehalt zu betrachten. Die Schwingungen des Chlorophylls werden mit der hier verwendeten Anregungswellenlänge von  $1064\text{ nm}$  auch deutlich schwächer als im sonst oft verwendeten resonanten Bereich ( $450\text{ nm}$  und  $650\text{ nm}$ ) angeregt. Eine teilweise Zugehörigkeit der Banden zum Chlorophyllmolekül ist daher nicht komplett auszuschließen, kann allerdings keine vollständige Erklärung für die hier ermittelten Bandenintensitäten geben.

### Zone Ib (Innerer Wundverschluss)

Direkt an die Zone Ia in Richtung Algeninneres angrenzend, konnte ein weiterer Bereich des Wundverschlusses detektiert werden. Zone Ib ist aufgrund ihrer Lokalisation im Wundverschluss dem von Dreher *et al.* (1978) beschriebenen internen Wundverschluss zuzuordnen. Bei genauerer Betrachtung konnten die gleichen Banden und Bandenpositionen, unter anderem für das  $\beta$ -Carotin (**5**), in den Spektren von Zone Ia und Ib gefunden werden. Allerdings ist die Intensität dieser Banden im inneren Wundverschluss (Zone Ib) im Vergleich zu Zone Ia deutlich geringer. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Zonen zeigt sich in der Bandenposition und Signalintensität der typischen Dreifachbindung des Caulerpenins (**3**) und seiner Derivate (siehe Abbildung 3.25 D). In Zone Ib liegt die Bandenposition der Dreifachbindung mit  $2186\text{ cm}^{-1}$  ziemlich nahe an der des gelösten, reinen Caulerpenins (**3**) mit einer Position bei  $2187\text{ cm}^{-1}$ . Dagegen befindet sich die Bande der C $\equiv$ C-Streckschwingung in Zone Ia bei  $2183\text{ cm}^{-1}$  und weist dort auch eine geringere Intensität auf. Vollkommen abwesend in Zone Ib ist dagegen die in Zone Ia vorhandene Bandenschulter bei  $2171\text{ cm}^{-1}$  sowie die Deformationsschwingung der Wasserstoffatome des in Zone Ia identifizierten Metaboliten (**6**) bei  $1143\text{ cm}^{-1}$ . Auch die in Zone Ia dem Protein quervernetzten Molekül zugeordnete Bande der C=C-Streckschwingung bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  ist im Spektrum von Zone Ib um  $3\text{ cm}^{-1}$  auf  $1613\text{ cm}^{-1}$  verschoben. Diese Unterschiede in der Bandenposition und in der Anwesenheit der Banden zwischen den Spektren der Zone Ia und Ib kann auf mehrere Faktoren hindeuten. Zum einen kann es sich bei dem Protein quervernetzenden Molekül in Zone Ib um ein anderes als das in Zone Ia vorgeschlagene Oxytoxin 2- Derivat (**6**) handeln. Zum anderen kann das Oxytoxin 2- Derivat (**6**) in Zone Ib auch vollständig fehlen und zudem mehrere unterschiedliche quervernetzungs Metabolite vorhanden sein. Ein Vergleich zwischen dem Spektrum der Zone Ib und den berechneten als auch gemessenen Synthseprodukten der pos-

tulierten Wundverschlussmetaboliten nach Guerriero *et al.* (1995) und Jung *et al.* (2002) konnte die genaue Struktur des Protein quervernetzten Moleküls in Zone Ib nicht klären.

Bei einer genaueren Betrachtung der einzelnen Messreihen, welche die Grundlage für die Mittelwertspektren der jeweiligen Zone bilden, zeigte sich ein Gradient für die Intensität der Bande der C≡C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) innerhalb der Zone Ib an. Abbildung 3.29 zeigt diese Zunahme der Intensität für die Bande  $2187\text{ cm}^{-1}$  und die gleichzeitige Intensitätsabnahme der für den Wundverschluss typischen Bande bei  $1582\text{ cm}^{-1}$  exemplarisch für zwei Messreihen eines Wundverschlusses.

Frühere Studien (Goddard & Dawes, 1983; Dreher *et al.*, 1978; Menzel, 1988) zeigten, dass zuerst der äußere und dann der innere Wundverschluss ausgebildet wird. Zudem wird der äußere Wundverschluss unabhängig von dem umgebenden Medium gebildet. Dagegen wird der innere Wundverschluss nur ausgebildet, wenn der äußere Wundverschluss bereits besteht und das umgebende Medium Seewasser ist (Dreher *et al.*, 1982). Möglicherweise können die, in unserer Studie gefundenen Unterschiede der chemischen Zusammensetzung zwischen Zone Ia und Zone Ib, Ansätze zur Klärung der Rolle von Seewasser bei der Ausbildung des inneren Wundverschlusses liefern. Allerdings ging dies über den Umfang dieser Arbeit hinaus.

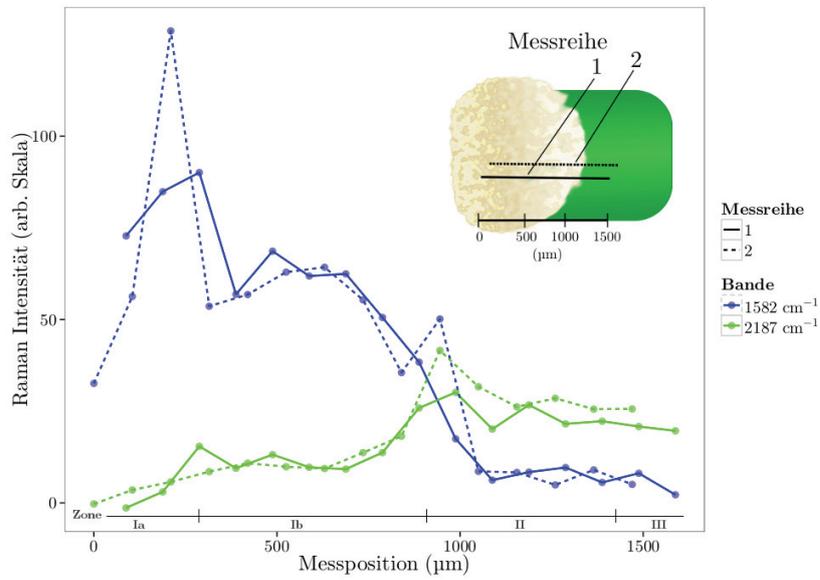
Im Gegensatz zum Spektrum der Zone Ia ist im Spektrum der Zone Ib auch eine schwache Bande bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.24) zu erkennen. Hierbei könnte es sich laut Literatur um die Amid I -Bande von Proteinen handeln (Copeland & Spiro, 1986). Dagegen spricht die Abwesenheit der im Raman-Spektrum von Proteinen stark ausgeprägten Bande des Phenylalanins bei  $1002\text{ cm}^{-1}$ . Überdies stimmt die Position der Bande bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  mit der C=O-Streckschwingung des reinen Caulerpenins (**3**) überein. Daher liegt eine Zugehörigkeit der Bande zum Caulerpenin (**3**) nahe. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die Bande bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  eindeutig einem Metaboliten zuordnen zu können.

## Zone II (Zwischenzone)

Zone II stellt den Bereich zwischen internem Wundverschluss und intakter Alge dar. Rein optisch ist diese Zone nicht wie die Wundverschlusszone (Ia und Ib) weiß, sondern geht immer mehr ins grünliche wie bei einer intakten Alge über.

Die dem Wundverschluss (Zone Ia und Ib) zuzuordnenden Banden bei  $1556\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$  sind hier nur noch schwach ausgeprägt (3.25 C). Dagegen sind die zwei typischen Banden der C=C-Streckschwingung ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) und C-C-Streckschwingung ( $1156\text{ cm}^{-1}$ ) für das  $\beta$ -Carotin (**5**) deutlich zu erkennen.

Das Mittelwertspektrum der Zone II zeigt auch die drei charakteristischen Banden, die dem Caulerpenin (**3**) zugeordnet werden können. Sowohl die Bande für die C=O-Streckschwingung ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ), die für die C=C-Streckschwingung ( $1620\text{ cm}^{-1}$ )



**Abb. 3.29:** Gradient der integrierten Intensität der Bande für die C≡C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) ( $2187\text{ cm}^{-1}$  grün) und der Bande bei  $1582\text{ cm}^{-1}$ , blau über die Messreihen 1 (durchgezogen) und 2 (gestrichelt) der Zone Ib von *C. taxifolia*. Zusätzlich wurden die identifizierten Zonen markiert. Oben rechts: Schematische Darstellung der Position der Messreihen 1 und 2 eines Stolons von *C. taxifolia*

als auch die für die C≡C-Streckschwingung ( $2186\text{ cm}^{-1}$ ) sind hier zu erkennen und stimmen mit den Bandenpositionen des reinen Caulerpenin-Spektrums gut überein (3.25 C und D). Aufgrund dieser Übereinstimmung gehen wir davon aus, dass sich in Zone II freies, nicht umgesetztes Caulerpenin (**3**) befindet.

### Zone III (intakte Alge)

Die dritte Zone stellt den an den Wundverschluss (Zone Ia und Ib) und die Übergangzone (Zone II) angrenzenden intakten Teil des Stolons dar. Dieser ist stark grün gefärbt und unterscheidet sich deutlich in den Spektren vom Wundverschluss der Zone Ia und Ib.

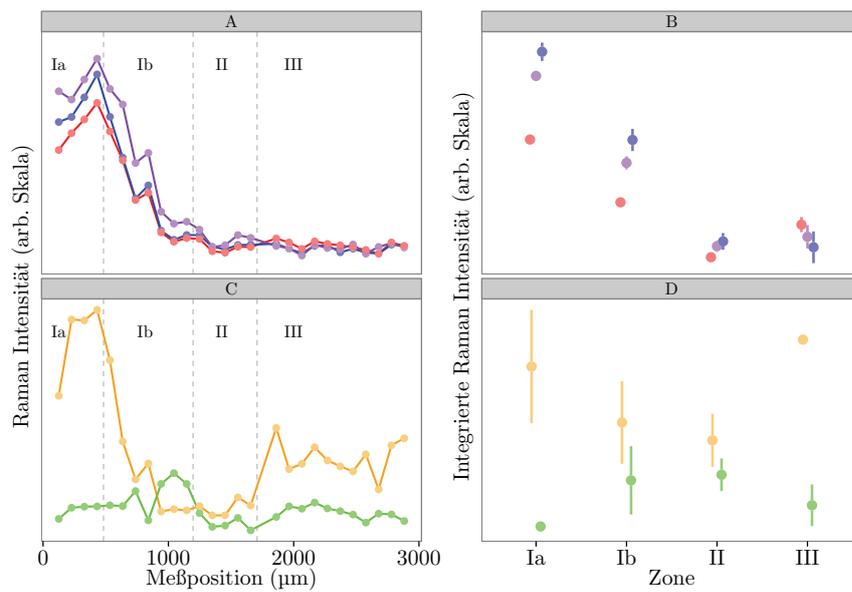
Es sind keinerlei Banden für die Quervernetzungs-metabolite wie in Zone Ia in Form des Verschiebens der Position der Bande für die Dreifachbindung vorhanden (siehe Abbildung 3.25 D). Auch die Intensität für die im Wundverschluss typischen Banden bei  $1556\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$  ist sehr gering, fast nicht zu erkennen (siehe Abbildung 3.25 C). Dagegen sind die typischen Banden der C=C-Streckschwingung ( $1525\text{ cm}^{-1}$ ) und der C-C-Streckschwingung ( $1156\text{ cm}^{-1}$ ) des  $\beta$ -Carotins (**5**) besonders deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 3.24 und 3.25 B). Auch die Bande der C≡C-Streckschwingung ist im Spektrum der Zone III an der gleichen Position wie die der C≡C-Streckschwingung im reinen Caulerpenin (**3**) zu erkennen, jedoch mit einer deutlich geringeren Intensität als in Zone II (siehe Abbildung 3.25 D).

### Übersicht über die Verteilung der Metabolite über alle Zonen

Der unterschiedliche Verlauf der ausgesuchten Banden über die zuvor charakterisierten Zonen wird schon bei Betrachtung der Einzelmessungen sehr deutlich (siehe Abbildung 3.30 A und C). Die Resultate der Einzelmessungen lassen sich zudem anhand der integrierten Intensität ausgewählter Banden der Mittelwertspektren zusammenfassen und vergleichen. Verglichen wurden hierbei die Intensitäten für die schon in Abbildung 3.24 farbig, hervorgehobenen charakteristischen Banden des  $\beta$ -Carotins (**5**) ( $1526\text{ cm}^{-1}$ , orange), Caulerpenins (**3**) ( $2187\text{ cm}^{-1}$ , grün) und die für den Wundverschluss typischen, noch keinem Metaboliten zugeordneten Banden bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  (rot),  $1556\text{ cm}^{-1}$  (lila) und  $1582\text{ cm}^{-1}$  (blau) (siehe Abbildung 3.30 B und D).

Die Ergebnisse zeigen, dass die noch nicht einem Metaboliten zugeordneten Banden bei den Positionen  $1186\text{ cm}^{-1}$ ,  $1556\text{ cm}^{-1}$  und  $1582\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.30 A und B) in Zone Ia und Ib am stärksten vertreten sind und in Richtung der Zone II und III hin abnehmen. Die noch unbekanntes Metabolite scheinen sich im Wundverschluss zu akkumulieren, wobei die höchste Intensität der jeweiligen Bande im äußeren Wundverschluss (Zone Ia) zu finden ist.

Die zuvor vermutete Zuordnung der zwei unbekanntes Banden bei  $1556\text{ cm}^{-1}$



**Abb. 3.30:** Raman Intensität charakteristischer Banden. Exemplarische Einzelmessungen (A und C), sowie integrierte Raman Intensität der Mittelwertspektren (B und D) mit Standardabweichung. Die Farben geben die verschiedenen Banden an: rot  $1186\text{ cm}^{-1}$ , orange  $1526\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -Carotin), blau  $1556\text{ cm}^{-1}$ , lila  $1582\text{ cm}^{-1}$  und grün  $2187\text{ cm}^{-1}$  (Caulerpenin (**3**) und Caulerpenin-Derivate).

und  $1582\text{ cm}^{-1}$  zum Chlorophyll über Literaturrecherche (siehe Seite 60) kann bei Betrachtung des Verlaufes der Bandenintensitäten über alle Zonen fast ausgeschlossen werden. Die Intensität der Banden ist in Zone Ia am höchsten und nicht - wie zu erwarten - in der nahezu intakten Algenzone III mit einer hohen Anzahl an Chloroplasten (Vergl. Abbildung 3.30 A und B, blau und lila). Obwohl ein Beitrag des in der Alge vorhandenen Chlorophylls zu den Banden nicht ausgeschlossen werden kann, ist daher der erhaltene Gradient über die verschiedenen Zonen nicht ausschließlich mit dem Metaboliten Chlorophyll zu erklären.

Für die schon eindeutig identifizierten Metabolite  $\beta$ -Carotin (**5**) sowie den proteinquervernetzter Caulerpenin (**3**) und seine Derivate konnte ebenfalls ein Gradient über die verschiedenen Zonen gezeigt werden (vergl. Abbildung 3.30 C und D, orange und grün).

Die typische Bande der C=C-Schwingung für das  $\beta$ -Carotin (**5**) bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.30 C und D, orange) konnte in allen Bereichen des Wundverschlusses und der intakten Alge nachgewiesen werden. Zone Ia zeigt eine deutlich höhere Intensität als Zone Ib, wogegen die Intensität kontinuierlich in Zone II und III zunimmt. Wie schon in der Beschreibung der Zone Ib angedeutet, kann die hohe Intensität und Standardabweichung für die Bande in Zone Ia mit dem Einschluss von  $\beta$ -Carotin (**5**) beinhaltenden Plastiden erklärt werden.

Dagegen kann die im Gradienten deutliche geringere Intensität der Bande in Zone Ib, vergleichen mit Zone Ia auch durch den zeitlichen Verlauf der Wundverschlussbildung erklärt werden. Direkt nach der Verletzung der Alge und dem Ausbilden des äußeren Wundverschlusses zieht sich das verletzte Cytoplasma mit den  $\beta$ -Carotin (**5**) beinhaltenden Plastiden um  $1\text{ mm}$ – $2\text{ mm}$  von der verwundeten Stelle zurück (Goddard & Dawes, 1983; Dreher *et al.*, 1978). Da sich die Rückzugbewegung des Cytoplasmas vom äußeren Wundverschluss schneller abspielt als die bis zu  $60\text{ s}$  dauernde Ausbildung des internen Wundverschlusses (Zone Ib) (Goddard & Dawes, 1983) werden hier nur wenige Plastiden eingeschlossen und folglich ist die Intensität der typischen  $\beta$ -Carotin-Bande auch geringer als in Zone Ia. In den nachfolgenden Zonen (II, III) nimmt die Intensität für die C=C-Streckschwingung wieder zu bis sie in der Zone III dem Bereich der intakten Alge und der vermutlich höchsten Menge an Plastiden erreicht.

Generell konnte auch die für das Caulerpenin (**3**) und seine Derivate typische C $\equiv$ C-Streckschwingung in allen vier Zonen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.30 C und D, grün). In der Intensität der Bande zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg von Zone Ia bis Zone II (vergl. Abbildung 3.29 grün) gefolgt von einem Abfall in Zone III. Hierbei ist zu beachten, dass die Bandenposition der C $\equiv$ C-Streckschwingung in Zone Ia im Vergleich zu den Zonen Ib, II und III um einige Wellenzahlen verschoben ist und mittels Referenzspektren und DFT-Kalkulationen dem Caulerpenin-Derivat (**6**) nach Guerriero *et al.* (1995) zugeordnet werden konnte. Dagegen scheint aufgrund der Bandenposition in den restlichen Zonen überwiegend das underivatisierte Caulerpenin

(**3**) vorzuliegen und sich in Zone II der Übergangszone zwischen Wundverschluss und intaktem Gewebe zu akkumulieren (vergl. Abbildung 3.29 grün). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Caulerpenin (**3**) zum Übergangsbereich zwischen verwundeter Alge und intaktem Gewebe transportiert wird. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass die Akkumulation von Caulerpenin (**3**) in Zone II durch die schon erwähnte cytoplasmatische Rückzugbewegung vom Wundverschluss entsteht. Dort könnte das Caulerpenin (**3**) neben seiner Funktion als Quervernetzer auch toxisch auf eindringende Mikroorganismen wirken.

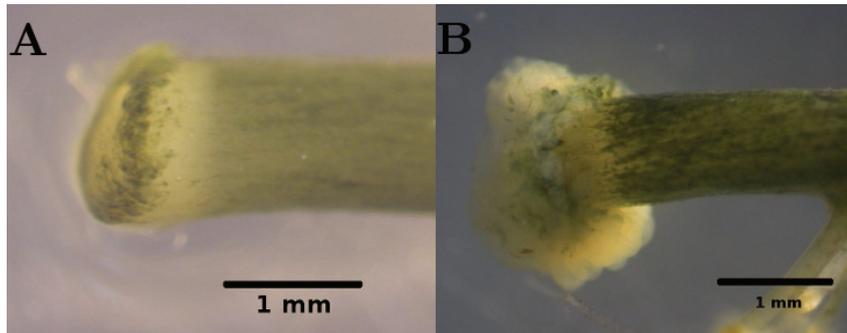
Generell war es uns in der hier durchgeführten Studie des Wundverschlusses zum ersten Mal möglich, das Vorhandensein von Caulerpenin-Derivaten *in vivo* zu zeigen (Weissflog *et al.*, 2013). Bisherige Studien konnten nur indirekte Schlüsse auf die Präsenz von Caulerpenin (**3**) und seinem Derivat im Wundverschluss, durch die Verwendung von markierten Histonen (Adolph *et al.*, 2005) oder Caulerpenin-Derivaten (Weißflog, 2010) ziehen. Darüber hinaus konnten die FT-Raman-Messungen auch die in früheren Studien gezeigte histologische Unterteilung des Wundverschlussgewebes in vier verschiedene Bereiche chemisch belegen. Allerdings konnten nicht alle charakteristischen Banden der Wundverschlusszonen bisher einem Metaboliten zugeordnet werden. Daher sind für die Erforschung des Wundverschlussmechanismus und dessen ökologischen Bedeutung die Identifikation der für den Wundverschluss von *C. taxifolia* charakteristischen, noch unbekannt Banden, weitere Studien nötig.

Daher sind für die Erforschung des Wundverschlussmechanismus und dessen ökologischen Bedeutung die Identifikation der für den Wundverschluss von *C. taxifolia* charakteristischen, noch unbekannt Banden, weiterführende Studien nötig.

### 3.3.2 Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Wundverschlüsse von *C. taxifolia* und *C. prolifera*

Die rasante Verbreitung der invasiven Grünalge *C. taxifolia* im Mittelmeer wird in einigen Studien mit der Form der asexuellen Vermehrung (Smith & Walters, 1999; Meinesz *et al.*, 2001; West *et al.*, 2007) und somit auch mit dem Wundverschluss in Zusammenhang gebracht. Generell ist die Ausbildung eines Wundverschlusses bei Verletzung als Teil der asexuellen Vermehrung in Algen der Gattung *Caulerpa* und insbesondere auch bei der im Mittelmeer heimischen Art *C. prolifera* zu beobachten (Dawes & Goddard, 1978). Es stellt sich also die Frage, wieso *C. taxifolia* *C. prolifera* zu großen Teilen im Mittelmeer verdrängen konnte.

So unterschiedlich wie die Form der Assimilatoren zwischen den beiden Algenarten, ist auch ihr jeweils ausgebildeter Wundverschluss (siehe Abbildung 3.31). Die Menge des aus der Zelle ausgeflossenen Zellinhaltes ist bei *C. taxifolia* wesentlich geringer als bei *C. prolifera*, deutlich sichtbar an der Bildung eines äußerlich unstrukturierten, großen Wundpfropfs am verletzten Stolon von *C. prolifera* (Vergl. Abbildung 3.31 B und 3.31 A). Rein optisch scheint daher der Wundverschluss von *C. taxifolia* deutlich



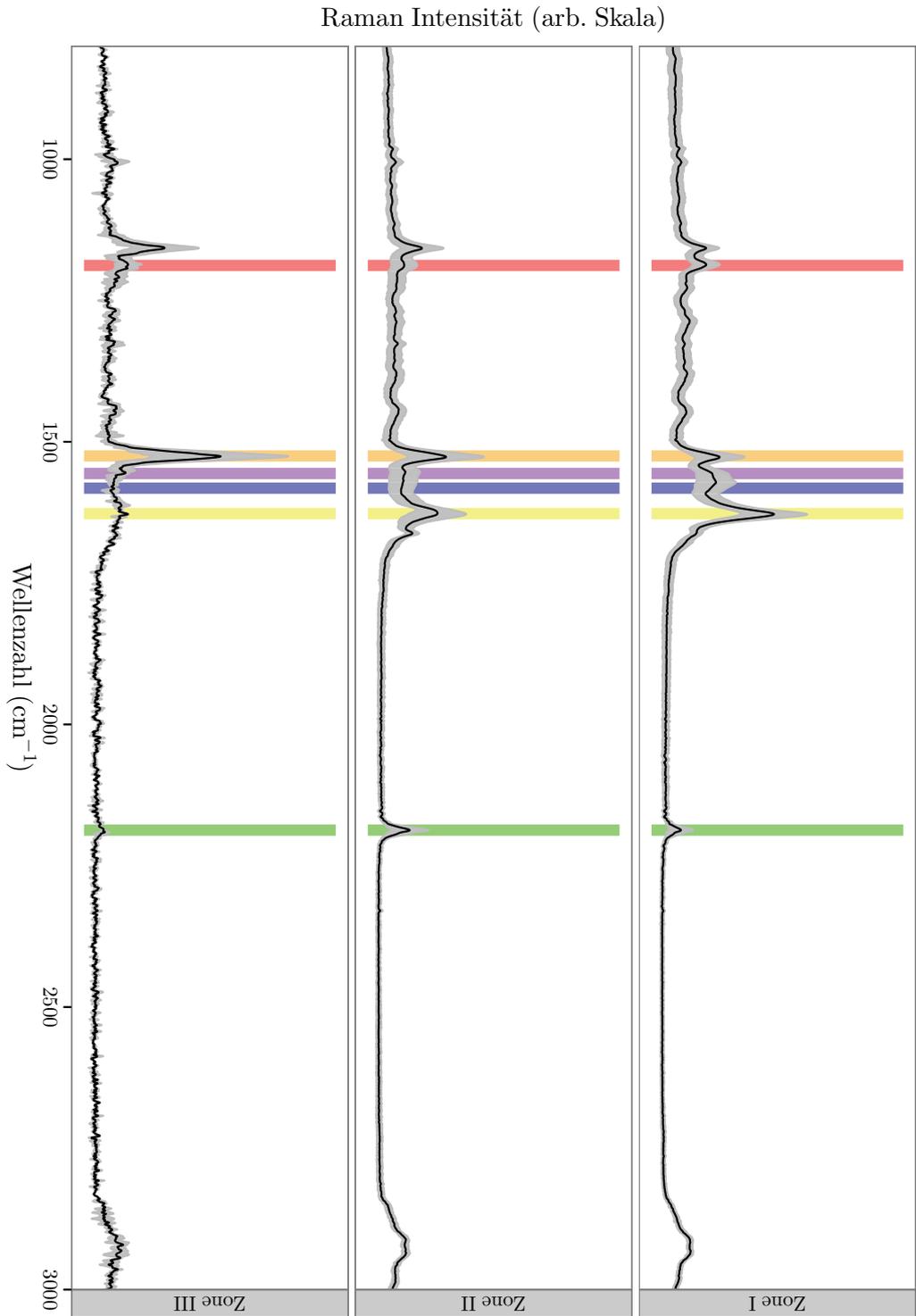
**Abb. 3.31:** Aufnahme des Wundverschlusses von *C. taxifolia* (A) und *C. prolifera*(B) 5 min nach Verwundung. Kontrast der Bilder wurde mit dem Program GIMP bearbeitet.

effektiver zu sein als der von *C. prolifera*.

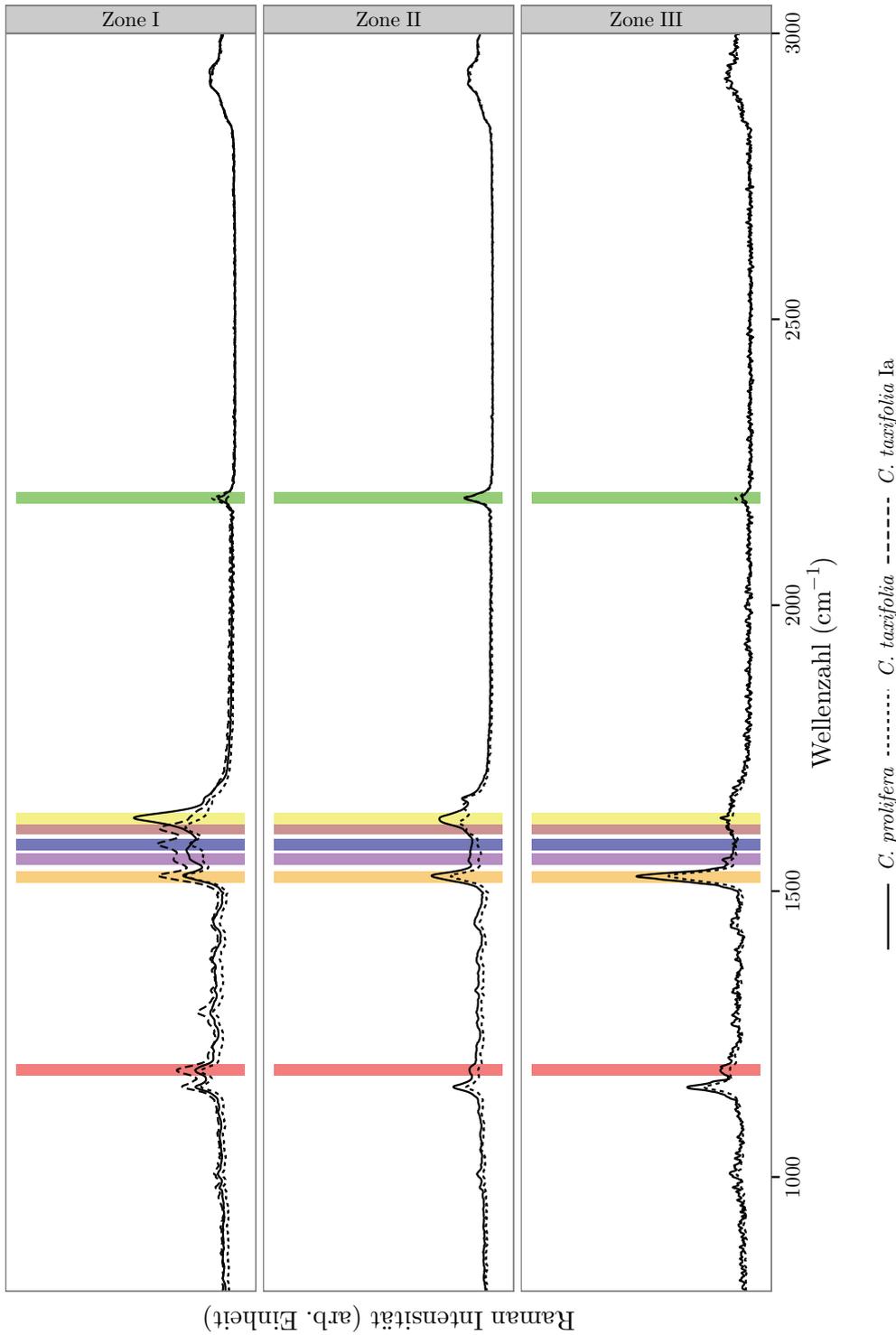
Die chemische Grundlage dieser Unterschiede ist bisher noch nicht bekannt. Zwar wurden von Dawes & Goddard (1978) Unterschiede in der Metabolitzusammensetzung (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide) des Wundverschlusses von *C. prolifera* und weiteren *Caulerpa*-Arten gefunden, diese Studie beinhaltete jedoch nicht Untersuchungen von *C. taxifolia*. In Abschnitt 3.3.1 wurde gezeigt, dass sich die FT-Raman-Spektroskopie für die Lokalisation von verschiedenen Metaboliten im Wundverschluss von *C. taxifolia* eignet. Daher wurde für einen Vergleich zwischen den beiden Algen auch der Wundverschluss von *C. prolifera* mittels FT-Raman-Spektroskopie untersucht. Wie schon bei *C. taxifolia* waren in *C. prolifera* die Bandenstrukturen zwischen dem Wundverschluss und dem angrenzenden Algengewebe unterschiedlich. Es zeigte sich, dass sich der Messbereich, aufgrund der Bandenstruktur der Spektren, chemisch in drei Zonen unterteilen lässt. Analog zu den Messungen des Wundverschlusses von *C. taxifolia* (Abschnitt 3.3.1), wurden auch für *C. prolifera* aus mehreren Einzelspektren Mittelwertspektren gebildet (siehe Abbildung 3.32). Im Gegensatz zu den Mittelwertspektren der Zone I und II, die jeweils aus über 100 Spektren berechnet wurden, basiert Zone III hier nur auf 3 Einzelspektren. Natürlich sind für eine genauere Aussage zu Zone III mehr Messungen nötig. Allerdings steht Zone III nicht im Fokus dieses Abschnitts, der sich mit dem Vergleich der Wundverschlusszonen (I, Ia, Ib) der beiden Caulerpacean beschäftigt.

Im Vergleich zu den in Abschnitt 3.3.1 ermittelten Spektren von *C. taxifolia* zeigt die Bandenstruktur von *C. prolifera* einen Unterschied in der chemischen Zusammensetzung des Wundverschlusses schon alleine dadurch, dass bei *C. prolifera* keinerlei Unterscheidung in Zone Ia und Ib möglich war. Deutlich wird dies bei dem direkten Vergleich der einzelnen Zonen zwischen *C. prolifera* und *C. taxifolia* in Abbildung 3.33.

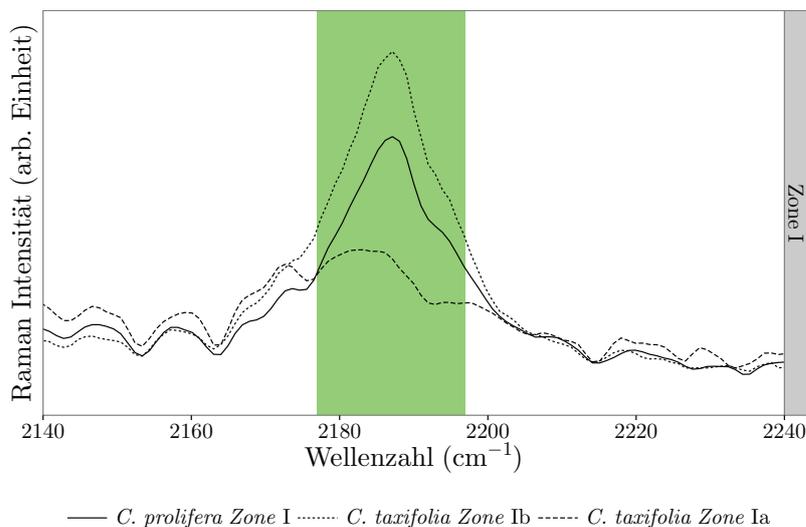
In dem für die Unterteilung in Zone Ia und Zone Ib maßgeblichen Bereich der



**Abb. 3.32:** Mittelwertspektren für die Zonen I ( $n_{ZoneI} = 132$ ), II ( $n_{ZoneII} = 117$ ) und III ( $n_{ZoneIII} = 3$ ) für den Wundverschluss von *C. prolifera*. Farbige Bereiche entsprechen den aus den Spektren von *C. tarifolia* auffällige Banden bei  $1186 \text{ cm}^{-1}$  (rot),  $1526 \text{ cm}^{-1}$  (orange),  $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**6**)),  $1556 \text{ cm}^{-1}$  (lila),  $1588 \text{ cm}^{-1}$  (blau),  $1610 \text{ cm}^{-1}$  (gelb) und  $2187 \text{ cm}^{-1}$  (grün,  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) und seiner Derivate).



**Abb. 3.33:** Mittelwertspektren von *C. prolifera* und *C. taxifolia* zusammengefasst als Zone I mit Zone Ia (punkt-strich), Ib (strich) von *C. taxifolia* und I (durchgezogen) von *C. prolifera* sowie Zone II und III von *C. taxifolia* (strich) und *C. prolifera* (durchgezogen). Farbige Bereiche entsprechen den aus den Spektren von *C. taxifolia* auffälligen Banden bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  (rot),  $1526\text{ cm}^{-1}$  (orange), C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**6**),  $1556\text{ cm}^{-1}$  (lila),  $1588\text{ cm}^{-1}$  (blau),  $1610\text{ cm}^{-1}$  (braun) und  $2187\text{ cm}^{-1}$  (grün, C $\equiv$ C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) und seiner Derivate). Die dominante Bande bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  aus dem Spektrum von *C. prolifera* ist gelb hervorgehoben.

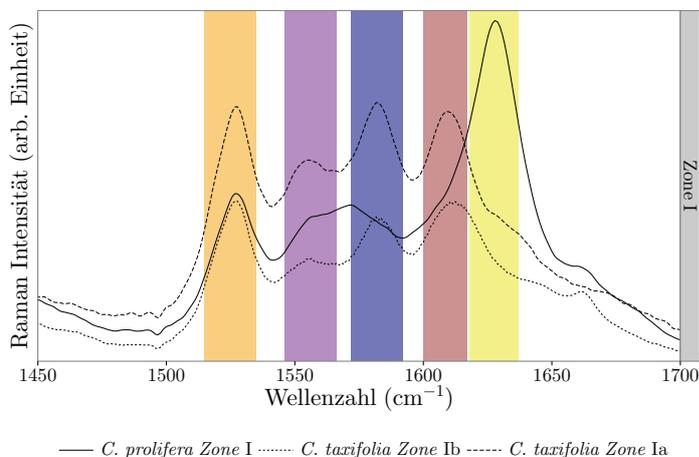


**Abb. 3.34:** Detailausschnitt der Bande für die  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpinens (**3**) bei  $2187\text{ cm}^{-1}$  (grün hervorgehoben) der für *C. prolifera* und *C. taxifolia* zusammengefassten Zone I. Hierbei sind die Spektren der Zone Ia und Ib von *C. taxifolia* als punkt-strich (Zone Ia) sowie strich (Zone Ib) sowie die Zone I von *C. prolifera* als durchgezogene Linie dargestellt.

$C\equiv C$ -Streckschwingung zwischen  $2170\text{ cm}^{-1}$ – $2190\text{ cm}^{-1}$  ähnelt das Spektrum von *C. prolifera* dem von *C. taxifolia* in Zone Ib (siehe Abbildung 3.34) stark. So ist diese Bande des Caulerpinens (**3**) oder seiner Derivate im Spektrum des Wundverschlusses von *C. prolifera* bei  $2186\text{ cm}^{-1}$  zu finden, was vergleichbar mit der Position für diese Schwingung im reinen Caulerpin (**3**) und identisch mit der in der Wundverschlusszone Ib von *C. taxifolia* ist. Dagegen ist die Bande der  $C\equiv C$ -Schwingung in Zone Ia von *C. taxifolia* bei  $2183\text{ cm}^{-1}$  zu finden. Zudem konnte die für Zone Ia von *C. taxifolia* charakteristische Schulter der Bande bei  $2173\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von *C. prolifera* nicht gefunden werden. Das spricht gegen die Anwesenheit von Metabolit (**6**) im Wundverschluss von *C. prolifera*.

Auch weitere, für den Wundverschluss von *C. taxifolia* charakteristische Banden der Zone Ib ( $1186\text{ cm}^{-1}$  und  $1556\text{ cm}^{-1}$ ) konnten im Wundverschlusspektrum von *C. prolifera* identifiziert werden (siehe Abbildung 3.33). Allerdings ist bei *C. prolifera* eine weitere Bande bei  $1571\text{ cm}^{-1}$  vorhanden, wodurch die Bande bei  $1556\text{ cm}^{-1}$  nur als Schulter in Erscheinung tritt (siehe Abbildung 3.35). Zudem ist die Bande bei  $1571\text{ cm}^{-1}$  relativ breit, wodurch zu einer Überlagerung mit der von *C. taxifolia* bekannten Bande bei  $1588\text{ cm}^{-1}$  kommen kann sofern diese schwach ausgeprägt ist.

Die Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$ , die im Abschnitt 3.3.1 den Protein quervernetzenden Molekülen in Zone Ia und Ib von *C. taxifolia* zugeordnet wird, ist abwesend im Wundverschlusspektrum von *C. prolifera* (siehe Abbildung 3.35). Dagegen tritt hier

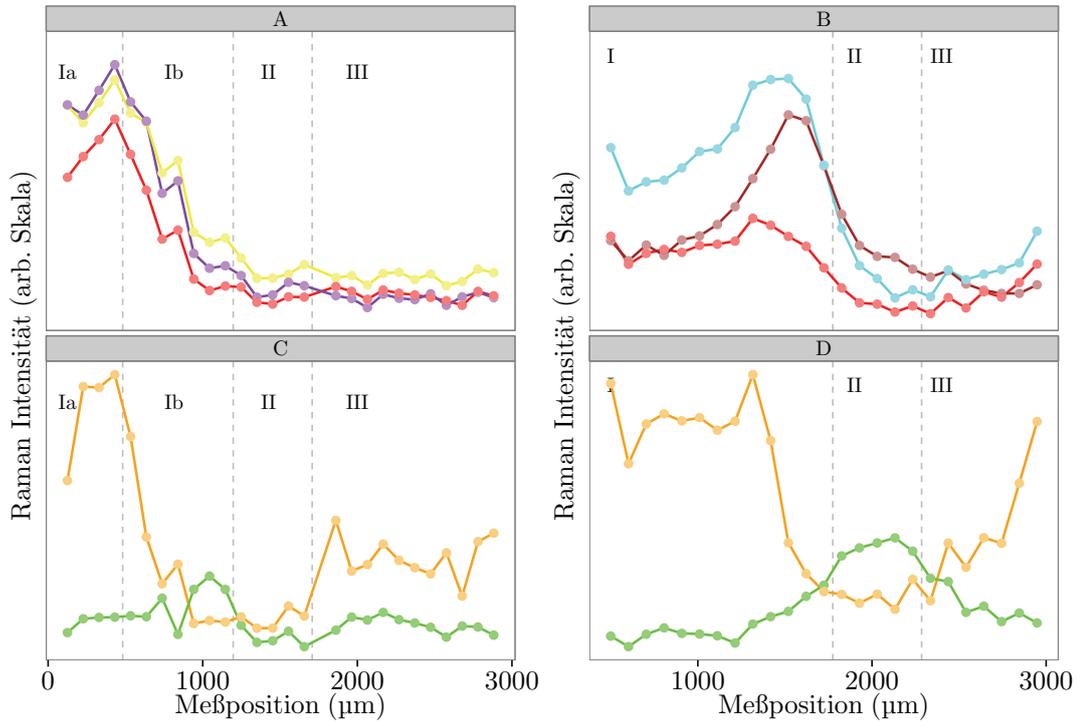


**Abb. 3.35:** Detailausschnitt der Mittelwertspektren von *C. prolifera* und *C. taxifolia* zusammengefasst als Zone I mit Zone Ia (punkt-strich), Ib (strich) von *C. taxifolia* und I (durchgezogen) von *C. prolifera* über einen Bereich von  $1450\text{ cm}^{-1}$ – $1700\text{ cm}^{-1}$ . Farbige Bereiche entsprechen überwiegend den aus den Spektren von *C. taxifolia* mit den auffälligen Banden bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  (orange),  $1556\text{ cm}^{-1}$  (lila),  $1588\text{ cm}^{-1}$  (blau),  $1610\text{ cm}^{-1}$  (braun). Zusätzlich wurde die im Spektrum von *C. prolifera* deutliche Bande bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  gelb hervorgehoben.

eine neue Bande bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  auf. Die Position dieser Bande nahe der Position für die C=C-Schwingung des Caulerpenins (**3**) ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) und die Abwesenheit der Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  sind ein Indiz dafür, dass es sich hierbei um ein weiteres, noch nicht identifiziertes Caulerpenin-Derivat handelt.

Auch die in Abschnitt 3.3.1 für *C. taxifolia* beschriebene Bande bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  der C=C-Schwingung, die als Schwingung des Caulerpenins (**3**) oder als Indiz für die Anwesenheit von Proteinen interpretiert werden kann, ist hier deutlich zu sehen (siehe Abbildung 3.33). Aufgrund der teilweisen Übereinstimmung an Bandenpositionen zwischen den Spektren Ia und Ib von *C. taxifolia* und *C. prolifera* scheint daher der chemische Aufbau des Wundverschlusses (Zone I) von *C. prolifera* dem des inneren Wundverschlusses (Zone Ib) von *C. taxifolia* zu ähneln.

Der generelle Verlauf einiger charakteristischer Banden ist bei beiden Algen ähnlich (siehe Abbildung 3.36). Die Intensität der für den Wundverschluss charakteristischen Banden ist bei beiden Arten in Zone Ia und Ib bzw. Zone I maximal und nimmt danach stark ab. Dies ist auch für das  $\beta$ -Carotin zu sehen, allerdings steigt dies in Zone III wieder auf Intensitäten, wie sie auch im intakten Algengewebe zu finden sind, an. Bei beiden Spezies ist die Intensität der Bande für Caulerpenin in Zone Ia bzw. Zone I schwach, und steigt in Richtung Zone II an, wobei *C. taxifolia* die maximale Intensität schon zum Ende von Zone Ib erreicht, während dies bei *C. prolifera* erst



**Abb. 3.36:** Verlauf der Raman Intensität von Einzelmessungen von für den Wundverschluss charakteristischen Banden bei *C. prolifera* und *C. taxifolia*. A und C *C. prolifera*, B und D *C. taxifolia*. Die Farben geben die verschiedenen Banden an: rot  $1186\text{ cm}^{-1}$ , orange  $1526\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -Carotin), lila  $1582\text{ cm}^{-1}$ , turkis  $1572\text{ cm}^{-1}$ , gelb  $1610\text{ cm}^{-1}$ , braun  $1627\text{ cm}^{-1}$  und grün  $2187\text{ cm}^{-1}$  (Caulerpenin (**3**) und Caulerpenin-Derivate).

in Zone II erreicht wird.

Obwohl nicht alle Banden bisher identifiziert werden konnten, kann man dennoch schon einige Unterschiede im chemischen Aufbau des Wundverschlusses von *C. prolifera* und *C. taxifolia* mittels FT-Raman-Spektroskopie erkennen. Die unterschiedlichen charakteristischen Positionen für die typischen Wundverschlussbanden beider Algen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Generell konnte ein chemischer Unterschied zwischen dem intakten und verwundeten Gewebe dieser beiden Algen nach Verwundung schon in der Studie von Jung *et al.* (2002) ermittelt werden. Hier lag der Fokus auf die Veränderung der Caulerpenin-Konzentration durch die Esterase induzierte Transformation des Caulerpenins (**3**) nach Verwundung der Alge. Die Studie zeigte, dass in der im Mittelmeer heimischen *C. prolifera* die Caulerpenin-Konzentration der gesamten Alge nach Verwundung deutlich schneller abnahm, als in der invasiven Spezies *C. taxifolia*. Schon innerhalb der ersten Minute nach Verwundung ist der Caulerpenin-Gehalt von *C. prolifera*

**Tab. 3.3:** Charakteristische Raman-Banden der Mittelwertspektren von *C. taxifolia* und *C. prolifera*

<i>C. taxifolia</i>	<i>C. prolifera</i>		
Rel. Wellenzahl cm <sup>-1</sup>	Rel. Wellenzahl cm <sup>-1</sup>	Schwingung	Metabolit Struktur
2187	2187	C≡C	<b>3</b>
2183	–	C≡C	Quervernetztes Material
2172	–	C≡C	<b>6</b>
1610	1627	–	Quervernetztes Material
1582	1571	–	–
1556	1556	–	–
1526	1527	C=C	<b>5</b>
1186	1186	–	–
1156	1156	C-C	<b>5</b>

auf 11 % der ursprünglichen Konzentration in der unverwundeten Alge gesunken. Dagegen sank der Gehalt an Caulerpenin (**3**) in *C. taxifolia* innerhalb der ersten Minute nur auf 50 % und erst nach drei Minuten waren die Konzentrationen sowohl von *C. taxifolia* als auch von *C. prolifera* bei einem vergleichbaren Wert unter 10 %. Dies kann im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und Beobachtungen in einem neuen Licht betrachtet werden. Wir konnten beobachten, dass der Ausfluss des Cytoplasmas aus der verwundeten Alge von *C. taxifolia* schneller zum Erliegen kam als nach der Verwundung von *C. prolifera*.

Zudem ist von Algen der Gattung *Caulerpa* bekannt, dass der äußere Wundverschluss direkt nach Verletzung und zeitlich vor dem inneren Wundverschluss ausgebildet wird (Dreher *et al.*, 1978; Goddard & Dawes, 1983). Betrachtet man den relativ großen, externen Wundpfropfen von *C. prolifera* im Vergleich zum relativ kompakten, externen Pfropfen von *C. taxifolia*, so wird deutlich, dass sich im voluminöseren Pfropfen vermutlich mehr transformiertes Caulerpenin (**3**) befindet.

Die weitere Abnahme der Caulerpenin-Konzentration aus Jung *et al.* (2002) kann mit der anschließenden Bildung von Zone Ib in *C. taxifolia* erklärt werden.

Ob die hier gefundenen Unterschiede im Wundverschluss eine Rolle bei der effektiveren Verbreitung der invasiven *C. taxifolia* gegenüber der einheimischen *C. prolifera* im Mittelmeer spielt, können diese Versuche natürlich nicht klären. Allerdings wurde von Weissflog *et al.* (2008) gezeigt, dass das Proteinnetzwerk des Wundverschlusses auch die Attraktivität von *C. taxifolia* gegenüber Herbivoren reduziert. Herbivore zeigten in der Studie eine deutliche Präferenz für Futterpellets, hergestellt aus unverwundeter *C. taxifolia* im Gegensatz zu Futterpellets, die aus verwundeter *C. taxifolia* bestanden. Ebenfalls ist aus Laborversuchen eine deutliche Präferenz von im Mittelmeer heimischen Herbivoren für die indigene Alge *C. prolifera* gegenüber

den invasiven Algen *C. taxifolia* und *C. racemosa* bekannt (Gianguzza *et al.*, 2002). Ähnliche Versuche, wie die von Weissflog *et al.* (2008), mit *C. prolifera* und *C. taxifolia* könnten mit Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Hinweise zur Aufklärung des Erfolges von *C. taxifolia* gegenüber *C. prolifera* im Mittelmeer liefern.

Um den Mechanismus des Wundverschlusses besser zu verstehen und somit ökologische Fragestellungen besser beantworten zu können, ist es notwendig, die in dieser Studie detektierten, allerdings noch unbekannt Metabolite zu identifizieren und auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchen. Im Hinblick auf die Verbreitung von Individuen der Gattung *Caulerpa* im Mittelmeer könnte vor allem die Bestimmung der unbekannt Metabolite von *C. taxifolia* in Zone Ia ein wichtiger Schritt sein.

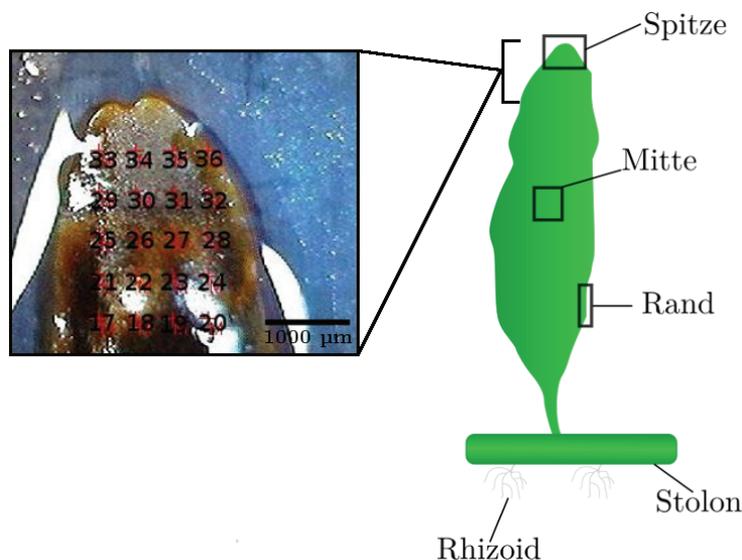
### 3.3.3 Verteilung von Caulerpenin innerhalb von *C. taxifolia* und *C. prolifera*

Wie in den vorherigen Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, ist es mit FT-Raman-Spektroskopie möglich, die Verteilung von Metaboliten innerhalb verschiedener Bereiche des Wundverschlusses von *C. taxifolia* und *C. prolifera* zu erfassen. Mit Fokus auf den für die Wundverschlussausbildung wichtigen Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**3**), konnte eine Anreicherung des anscheinend untransformierten Caulerpenins (**3**) in der Übergangszone (Zone II) zwischen Wundverschluss und annähernd intaktem Gewebe von *C. taxifolia* gezeigt werden. Dies führte zu der Vermutung, dass der Metabolit während der Wundverschlussausbildung aus dem intakten Gewebe zur verwundeten Stelle hin transportiert wird.

Da die Bildung der äußeren Wundverschlusses innerhalb von Sekunden und unabhängig von der Größe oder Ort der Verwundung abläuft (Janse, 1906), liegt die Vermutung nahe, dass der Metabolit homogen in der Alge verteilt ist. Von Amade & Lemée (1998) und Box *et al.* (2010) wurden Konzentrationsunterschiede des Metaboliten zwischen Assimilatoren, Rhizoiden und Stolon festgestellt. Zudem ist bekannt, dass die Biosynthese des Caulerpenins (**3**) kompartimentiert stattfindet (Pohnert & Jung, 2003). Die Studien geben aber keinen Aufschluss darüber, ob der Metabolit in der Zelle lokalisiert vorliegt. Dies liegt jedoch nahe, da Caulerpenin (**3**) in Anwesenheit von Esterasen zum hoch reaktivem Oxytoxin 2 (**4**) transformiert wird, welches zu einer unselektiven Vernetzung von Proteinen und so zu erheblichen Störungen der Zellprozesse führen würde.

Die Möglichkeit, die für Caulerpenin (**3**) typische  $C\equiv C$ -Streckschwingung bei  $2187\text{ cm}^{-1}$ , auch in der intakten Alge mit der FT-Raman-Spektroskopie detektieren zu können (Abschnitt 3.3.1), bietet daher einen guten Ansatz, um die Fragestellung nach der genauen Verteilung und eventuellen Kompartimentierung des Caulerpenins (**3**) innerhalb der Alge zu beantworten.

Die Messungen zur Analyse der Caulerpenin-Verteilung erfolgten sowohl in *C. taxifolia* als auch in *C. prolifera* in Form einer Rastermessung (Linie oder Messgitter)

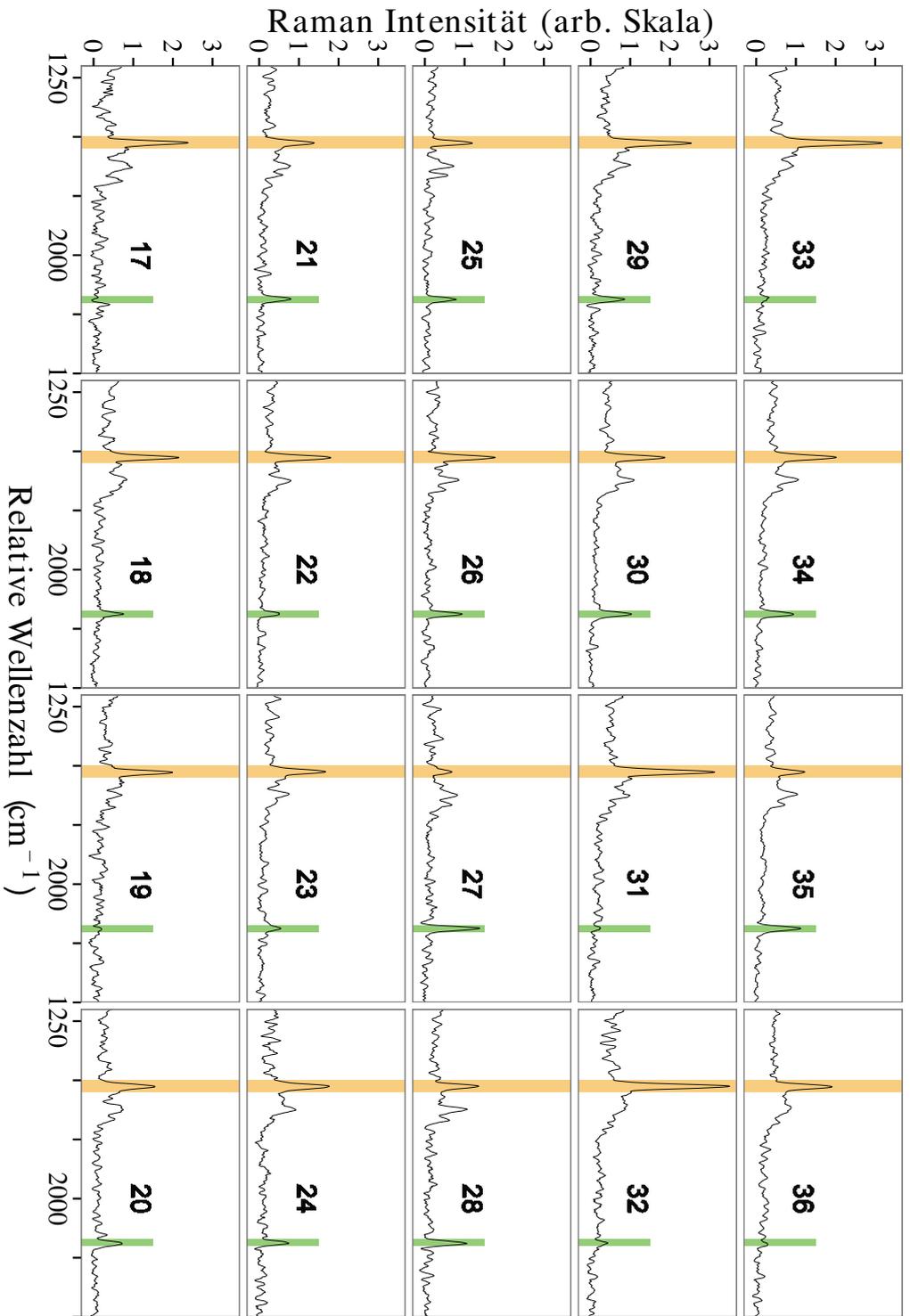


**Abb. 3.37:** Links: Messgitter aus 20 Messpunkten auf der Oberfläche von *C. prolifera*. Der Abstand zwischen den Messpunkten betrug  $600\ \mu\text{m}$  in x-Richtung und  $650\ \mu\text{m}$  in y-Richtung. Rechts: Schematische Darstellung möglicher Messbereiche am Beispiel von *C. prolifera*.

von verschiedenen Bereichen der Algen, mit einem Abstand von mindestens  $100\ \mu\text{m}$  zwischen den Messpunkten. Ein Beispiel von einem Messgitter aus 20 Messpunkten mit  $600\ \mu\text{m}$  (x-Richtung) und  $650\ \mu\text{m}$  (y-Richtung) Abstand zwischen den Messpunkten, verteilt über den oberen Teil eines Assimilators von *C. prolifera*, ist Abbildung 3.37 zu entnehmen. Ebenso sind dieser Abbildung die verschiedenen Messbereiche der Alge schematisch am Beispiel von *C. prolifera* dargestellt.

Die dazugehörigen untergrundkorrigierten, normierten und geglätteten Spektren (Abschnitt 5.7.1) sind für den Bereich  $1200\ \text{cm}^{-1}$ – $2500\ \text{cm}^{-1}$  in Abbildung 3.38 dargestellt. In den meisten Spektren ist eine deutliche Bande für die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) zu sehen (Messpunkte 18, 20 – 27, 29, 30, 34 und 35). Im Spektrum 27 ist die Bande der  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung sogar die intensivste für den angegebenen Bereich. Dagegen findet sich in den Spektren zu den Messpunkten 17, 19, 31 – 33 und 36 keine Bande für das Caulerpenin (**3**) bei  $2187\ \text{cm}^{-1}$ . Nur die Bande des  $\beta$ -Carotins (**5**) bei  $1526\ \text{cm}^{-1}$  (orange hervorgehoben) ist in diesem Bereich deutlich zu erkennen.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurde für jedes Messgitter eine Graustufenkarte für das Caulerpenin (**3**) angefertigt, in der die integrierten Peakflächen der Intensität der Graufärbung an der Messposition entspricht. Die Fläche für eine Messposition zeigt nur eine Graufüllung, wenn das Spektrum ein deutliches Signal an der Bandenposition im Vergleich zum Rauschen in einem defi-



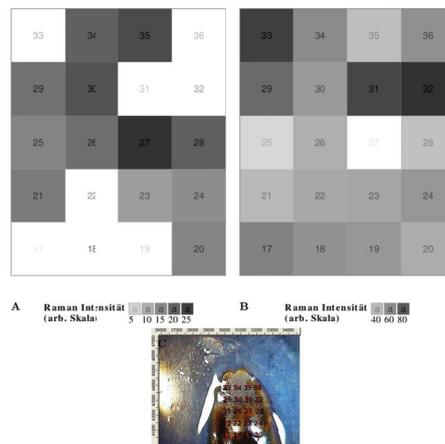
**Abb. 3.38:** Untergrundkorrigierte und normierte Spektren des 20-Messpunkte-Gitters aus Abbildung 3.37 in *C. prolifera*. Die grüne Bande stellt den Bereich dar, der zur Flächenberechnung unter der  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung von *Caulerpenin* (3) verwendet worden ist. 30 Scans aufgenommen bei 700 mW mit einer Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$

nierten x-Achsenabschnitt zeigte. Um dies zu objektivieren wurde ein mathematischer Filter entwickelt der Abschnitt 5.7.1 zu entnehmen ist. Spektren die aufgrund dieses Filters aussortiert worden sind, werden als weisses Feld mit entsprechender Nummerierung der Spektren in den Karten dargestellt. Vollständige weisse Flächen in den Graustufenkarten repräsentieren fehlende Daten aufgrund eines Softwareproblems der Messsoftware Opus oder nicht vom Messgitter erfassten Bereichen der Alge. Die in dieser Arbeit gezeigten Grafiken basieren auf denjenigen Messungen bei denen der Anteil an fehlenden Daten gering genug und die Qualität der Spektren in Form eines Signal zu Rausch-Verhältnisses ausreichend waren, um die aufgenommenen Messgitter auszuwerten zu können.

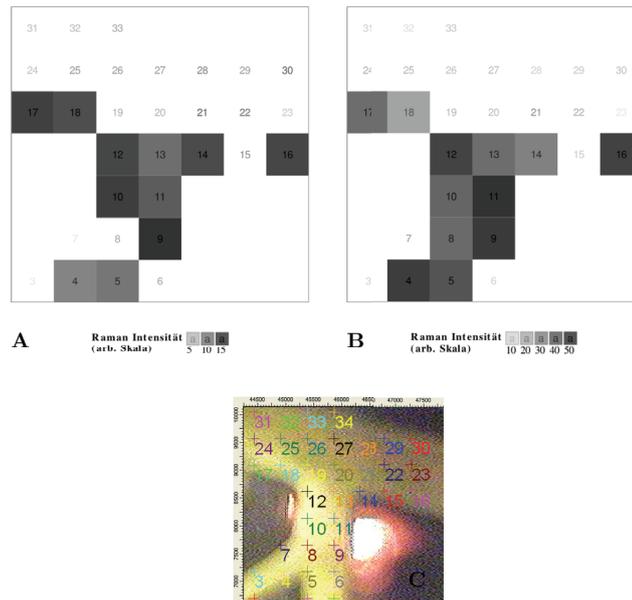
Die Graustufenkarte (siehe Abbildung 3.39 A), für die in Abbildung 3.38 gezeigten Spektren, zeigt eine ungleichmäßige Verteilung des Caulerpenins (**3**) in der Alge. Im Bezug auf spezielle Bereiche wie die Spitze, Mitte, Stolonansatz oder dem Rand der Alge sind keinerlei Muster zu erkennen. So weist z. B. das Caulerpenin (**3**) keine erhöhte Anreicherung für die Messpunkte im Randbereich der Alge (Messpunkte 17, 20, 21, 23, 24, 27, 28, 31 und 33) auf. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Graustufenkarte für die Verteilung des Caulerpenins (**3**) in anderen Teilen von Caulerpa, hier exemplarisch dargestellt in der Graustufenkarte eines Rhizoiden und Stolons von *C. taxifolia* (siehe Abbildung 3.40 A). So scheint zwar die Konzentration des Caulerpenins (**3**) am Ansatz des Rhizoiden größer als im Stolon, allerdings ist hier anzumerken, dass der Fokus des Lasers stark durch die Morphologie des Stolons beeinflusst wurde (unterschiedliche dicke und Wuchsform der gemessenen Bereiche). So wurden die Spektren ab Messpunkt 19 stark von Rauschen dominiert, was auch in den glätteten Spektren deutlich sichtbar war (siehe Anhang Abbildung 6.9).

Eine etwas bessere Einstellung des Fokus gelang dagegen bei einem Messgitter, welches anhand anderer auffälliger Charakteristika von *C. prolifera* ausgewählt wurde. Hierzu zählen die optisch als schwarze Längslinien deutlich sichtbaren Bereiche des cytoplasmatischen Transportes innerhalb der Alge (Sabnis & Jacobs, 1967; Dawes & Barilotti, 1969). In der erstellten Graustufenkarte (siehe Abbildung 3.41) zur Verteilung des Caulerpenins (**3**) scheint der Caulerpenin-Gehalt für Messpunkte auf oder nahe einer deutlich sichtbaren Linie des cytoplasmatischen Transportes (Messpunkt 0–2 und 5–9) höher zu sein als in Regionen, die von dieser entfernt sind (Messpunkt 13 und 14). Allerdings zeigten 14% der in diesem Messgitter aufgenommen Spektren keine eindeutige Bande für das Caulerpenin (**3**) (Messpunkt 4 und 11). Die Abwesenheit des Caulerpenins (**3**) in diesen Messpunkten, lies sich auch nicht durch die Qualität der Spektren erklären (siehe Anhang Abbildung 6.10).

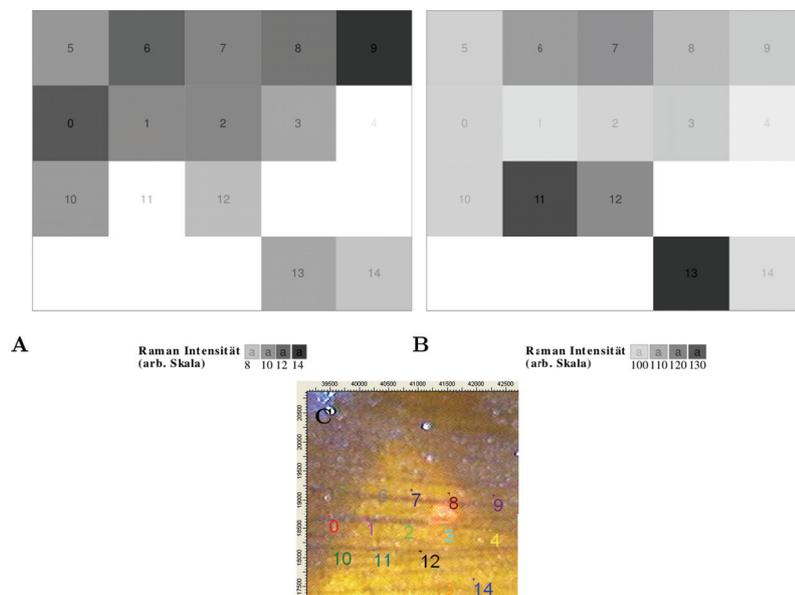
Generell zeigte die Bande der C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) ein intensiveres Signal, als die C $\equiv$ C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**). Nur in wenigen Ausnahmen war das Caulerpenin-Signal gleich intensiv oder intensiver, als das der  $\beta$ -Carotin-Bande. So ist die Intensität der Caulerpenin Bande in 20% der gemessenen Spektren aus Abbildung 3.38 gleich intensiv oder intensiver als die  $\beta$ -Carotin-Bande



**Abb. 3.39:** A) Graustufenkarte für die Fläche unter der Bande der  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) dargestellt für 20 Messpunkte in Form von verschiedenen Graustufen. B) Graustufenkarte für die Bande der  $C=C$ -Schwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) dargestellt in verschiedenen Grautönen für 20 Messpositionen auf *C. prolifera*. C) Messgitter der 20 Messpunkte mit einem Abstand von 600  $\mu\text{m}$  in x-Richtung und 650  $\mu\text{m}$  in y-Richtung, auf der Oberfläche von *C. prolifera*.



**Abb. 3.40:** A) Graustufenkarte für die Verteilung des Caulerpenins (**3**) und  $\beta$ -Carotins (**5**) (B) innerhalb eines Rhizoid und Stolons von *C. taxifolia*. C) Gewählte Messpositionen in der Alge für die Graustufenkarten aus A und B.



**Abb. 3.41:** A) Graustufenkarte für die Intensität der  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpinins (**3**) in einem Bereich von *C. prolifera* mit viel cytoplasmatischem Transport B)  $\beta$ -Carotin-Verteilung in Form einer Graustufenkarte für die Fläche unter der Bande bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  C) Gewählte Messpositionen für die Graustufenkarten aus A und B.

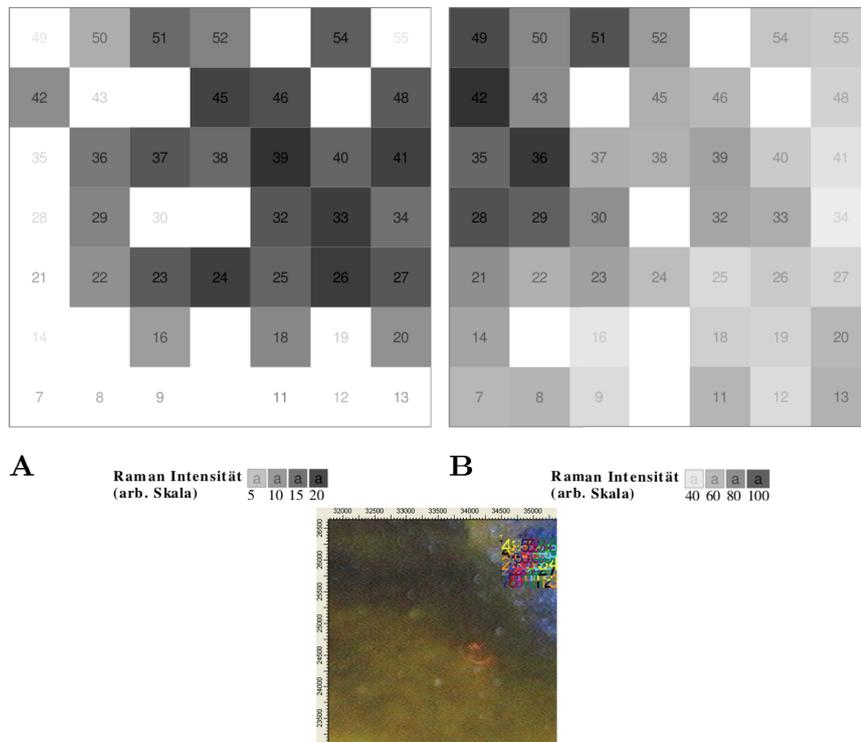
des selben Spektrums. Vergleiche der relativen Intensität der Signale der  $\beta$ -Carotin-Bande mit denen der Caulerpenin-Bande legten nahe, dass das Caulerpenin-Signal meist an Messpositionen mit schwachem  $\beta$ -Carotin-Signal am ausgeprägtesten ist. Zur Visualisierung wurde analog zur Graustufenkarte der Caulerpenin-Verteilung eine Karte der Verteilung des  $\beta$ -Carotins (**5**) für die verschiedenen Messgitter erstellt. Es zeigte sich ein gegenläufiges Muster innerhalb des jeweiligen Paares von Graustufenkarten (siehe Abbildung 3.39 A und B, 3.40 A und B, 3.41 A und B).

Ein Zusammenhang dieses gegenläufigen Musters mit der Biosynthese der beiden Metabolite oder ihres Speicherortes kann hier nur eine Vermutung sein und bedarf wenn möglich höher aufgelöster Messungen oder Biosynthesestudien.

Der hier verwendete experimentelle Aufbau lieferte die Möglichkeit die Auflösung der Messung zu erhöhen indem mehr Messpunkte angeordnet in einem engeren Gitter vermessen werden. Einschränkend hierfür ist die räumliche Auflösung des Laserspots (Herstellerangabe annähernd 100  $\mu\text{m}$ ), die den kleinstmöglichen Abstand zwischen den Messpunkten bestimmt. Ein kleinerer Abstand zwischen den Messpunkten würde zu einem mehrmaligen Messen desselben Messbereiches führen. Mit der Wahl von 100  $\mu\text{m}$  Abstand zwischen den Messpunkten für die folgenden Messungen wurde ein mehrmaliges Messen desselben Punktes und dadurch eventuell entstehende Verletzungen und Photobleaching verhindert.

Überdies erhöht ein kleinerer Messbereich auch die Wahrscheinlichkeit eines gleichbleibenden Fokuses über den Messort. Der zu beginn eingestellte und während der Messung nicht nachjustierbare Fokus ist ein wichtiger Parameter der die Qualität der aufgenommenen Spektren (Signal/Rausch-Verhältnis) beeinflusst. Besonders bei Messungen über größere Bereiche der Alge mit vielen morphologischen Unterschieden innerhalb des Messbereiches ist es es schwierig einen Fokus in gleicher Ebene für alle Messpunkte einzustellen. Daher kann die unterschiedliche Verteilung des Caulerpenins (**3**) in Abbildung 3.39 A und 3.40 A auch mit den Unterschieden in der Fokusebene zwischen den Messpunkten durch die morphologisch, unterschiedlichen Beschaffenheit der Alge erklärt werden.

In den folgenden Messungen wurden daher kleinere Bereiche mit einem engeren Messgitter (Abstand zwischen den Punkten 100  $\mu\text{m}$ ) von *C. prolifera* und *C. taxifolia* untersucht, um einen möglichst gleichbleibenden Fokus über den gesamten Messbereich zu gewährleisten. Generell zeigte sich doch, dass das Fokussieren des Lasers deutlich schwieriger für Messungen der fiederartigen, ovalen Assimilatoren von *C. taxifolia* als für Messungen der eher flachen, gleichmäßig dicken Assimilatoren von *C. prolifera* war. Der Fokus wurde anhand der Qualität des Signals für die  $\beta$ -Carotin-Bande und dem Signal zu Rausch/Verhältnis für das Spektrum durch Einzelmessungen ermittelt. Für viele *C. taxifolia* Assimilatoren konnte kein passender Fokus gefunden werden oder dieser war nur, ähnlich wie in den Spektren der Abbildung 6.9, für einige wenige Messpunkte stabil. Trotz des vorherigen Fokussierens zeigten einige Messungen überwiegend stark verrauschte Spektren oder keinen



**Abb. 3.42:** A) Graustufenkarte für die Fläche unter der Bande der  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) in der Mitte eines Assimilators von *C. prolifera*. B)  $\beta$ -Carotin-Verteilung in Form einer Graustufenkarte für die Fläche unter der Bande bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  C) Gewählte Messpositionen für die Graustufenkarten aus A und B. Der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten betrug  $100\text{ }\mu\text{m}$ .

Hinweis auf die Bande der  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpenins (**3**), obwohl die Alge nach Verletzung einen deutlichen Wundverschluss ausbildete. Für die weiteren Messungen wurde daher der Fokus auf Individuen von *C. prolifera* gelegt.

Besonders die vom Assimilatorrand aus gesehenen mittleren Bereiche der Alge, in denen eine große Menge des cytoplasmatischen Transportes erfolgt standen im Fokus der folgenden Messungen. Zudem sind diese Bereiche der Alge auch durch eine, vor allem die optisch betrachtet, gleichmässige Wuchsform ideal für die FT-Raman-Messungen. Abbildung 3.42 A zeigt die Graustufenkarte für die Verteilung des Caulerpenins (**3**) in einem vom Rand in die Mitte der Alge ausgehenden, mittleren Bereich eines Assimilators von *C. prolifera* (Vergl. Schema Abbildung 3.37).

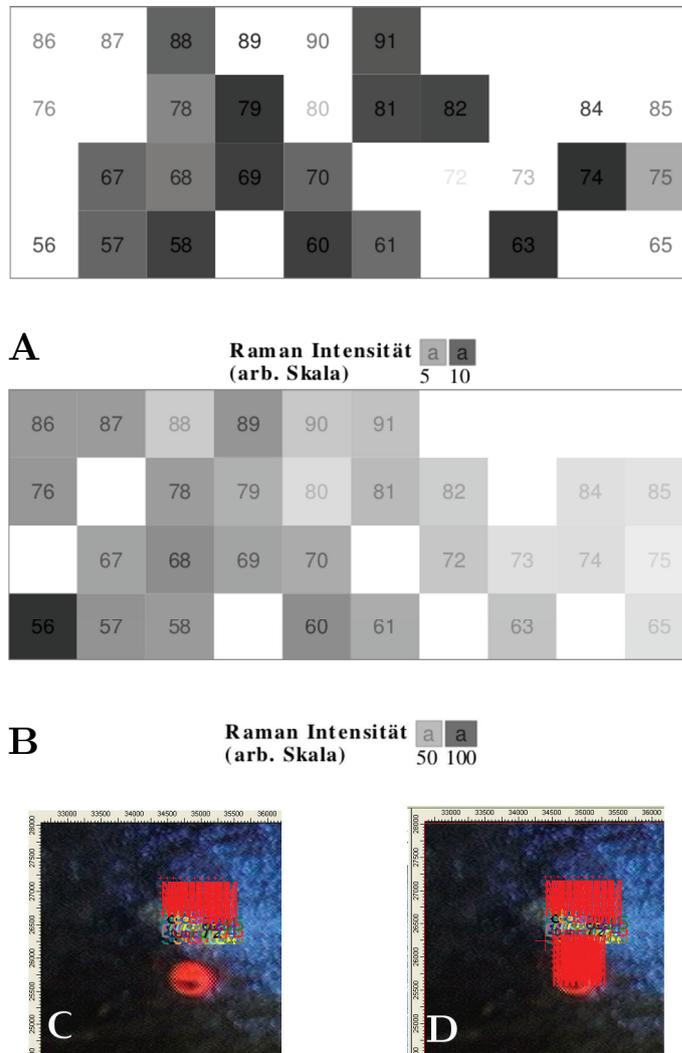
Der Großteil der Spektren zeigte klare  $\beta$ -Carotin- und Caulerpenin-Banden. Dennoch zeigten sich, trotz vorheriger Bestimmung des Fokuses anhand des Rauschens im Bereich der  $C=C$ -Schwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**), innerhalb des relativ kleinen

Messbereiches leichte Unterschiede in der Qualität der Spektren durch eine Zunahme des Rauschens. Besonders am Rand (Messpunktspalte 48 -7 und Messpunktreihe 7-13) waren einzelne Spektren stärker verrauscht (siehe Anhang Abbildung 6.11). Da in den Spektren des Randbereiches die Bande des  $\beta$ -Carotins (**5**) aber immer noch deutlich zu erkennen ist, könnte hier auch die Konzentration an Caulerpenin (**3**) unter dem Detektionslimit dieser Methode gelegen haben. Generell lässt diese Aufnahme darauf schließen, dass das Caulerpenin (**3**) nicht gleichmäßig in der Alge verteilt ist.

Um zu sehen, ob sich dieses Muster auch in den angrenzenden Bereichen fortsetzt, wurde ein weiteres Messgitter (Messpunkte 56–91) etwas versetzt an die oberste Messreihe des vorherigen Messgitters gelegt (siehe Abbildung 3.43 D, Messpunkte 49–55). Vor der weiteren Messung wurde die Alge mit ausreichend Medium versorgt und optisch auf eventuelle Verletzungen oder Trocknungsspuren hin untersucht. Auch in dieser Messreihe war keine gleichmäßige Verteilung des Caulerpenins (**3**) zu erkennen. Vielmehr deutet die Messungen mit dem hier verwendeten Messgitter darauf hin, dass Caulerpenin (**3**) geclustert ins *C. prolifera* vorliegt.

Allerdings kann mit den Messungen keine Aussage über die Verteilung der Metabolite in z-Richtung innerhalb der Alge von der Oberfläche getroffen werden. Grund hierfür ist der verwendete experimentelle Aufbau, der zwar die Einstellung des Fokus durch Bewegen des Probenstisches in z-Richtung erlaubte, allerdings durch die fehlende Skalierung des Bewegungsrades und die mindere Bildqualität des optischen Ausgabebildes keinen Rückschluss auf die genaue z-Position des Fokus innerhalb der Alge zuließ.

Zusammenfassend zeigte sich das auch in den Messungen mit einem kleineren Messabstand von 100  $\mu\text{m}$  relativ hohe  $\text{C}\equiv\text{C}$  Intensitäten bei niedrigen  $\text{C}=\text{C}$  Intensitäten auftreten. Da bei dem Vergleich der erstellten Graustufenkarten für die Verteilung des Caulerpenins (**3**) und des  $\beta$ -Carotins (**5**) das inverse Verteilungsmuster nicht für alle Messpunkte konsistent war und die Anzahl der hier durchgeführten Messungen gering war, sind mehr und vor allen Dingen detaillierte Messungen – auch in z-Richtung – von Nöten, um das hier gefundene Muster zu bestätigen. Der in dieser Studie verwendete FT-Raman-Aufbau mit dem motorisierten Probenstisch erlaubt jedoch keine Messungen in z-Richtung. Somit kann hier auch keine Aussage gemacht werden, ob Caulerpenin (**3**) in der Vakuole oder in dem umgebenden Cytoplasma vorliegt. Da Organelle, wie Lysozomen, Chloroplasten und Mitochondrien typischerweise weniger als 10  $\mu\text{m}$  groß sind (Nultsch, 1996), ist auch die Auflösung des hier verwendeten FT-Raman-Lasers nicht geeignet, um eine Kompartimentierung des Caulerpenins (**3**) in Organellen zu untersuchen. Die Verwendung von zusätzlichen optischen Geräten, um die Auflösung zu erhöhen und mit der Möglichkeit zur Messung in z-Richtung ist daher für weitere Studien zu empfehlen.



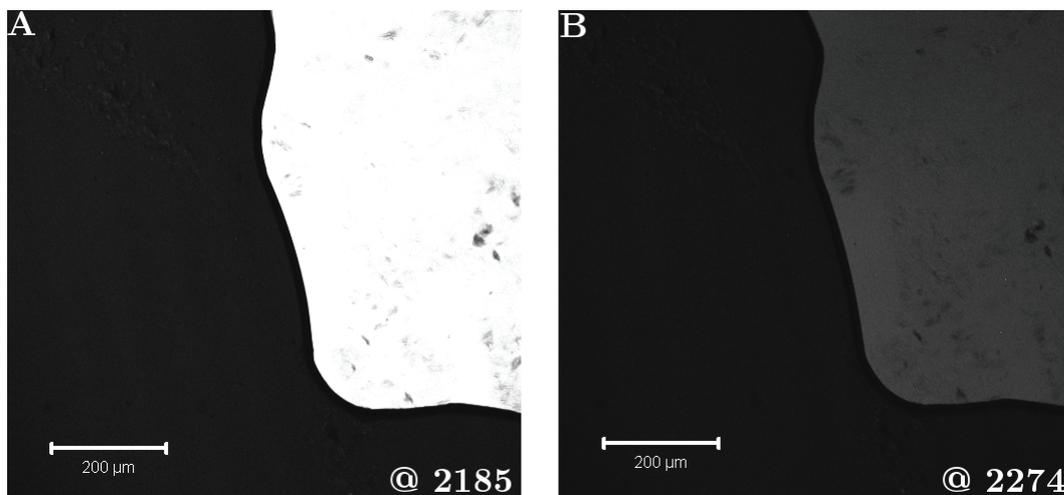
**Abb. 3.43:** A) Graustufenkarte für die Fläche unter der Bande der  $C\equiv C$ -Streckschwingung des Caulerpenis (**3**) oberhalb des Messgitters aus Abbildung 3.42. B) Verteilung der  $C=C$ -Schwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) an den selben Messpositionen wie für A. C) Verwendetes Gitter für die Messpositionen aus A und B. D) Übersicht über die Messpositionen zur Erstellung der Graustufenkarten aus A und B sowie aus Abbildung 3.42 für die Mitte eines Assimilators von *C. prolifera*. Der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten betrug  $100\ \mu\text{m}$ .

### 3.4 Lokalisation und Verteilung von Caulerpenin innerhalb von *C. taxifolia* mittels CARS-Mikroskopie

Wie im vorherigen Abschnitt 3.3.3 angesprochen, ist die FT-Raman-Spektroskopie zur Ermittlung der Caulerpeninverteilung in Algen nur bedingt geeignet. Allerdings lieferte diese Methode mit der ermittelten Wellenzahl des gesuchten Metaboliten auch die nötigen Informationen, die für die Anwendung der CARS-Mikroskopie (siehe Einleitung 1.3.3) zur Detektion des Metaboliten in der Alge von Nöten waren.

Im Gegensatz zur FT-Raman-Spektroskopie liegt die räumliche Auflösung in der CARS-Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits für die lineare Lichtmikroskopie (Becker *et al.*, 2009), das in Zahlen hier einem Wert von unter 1  $\mu\text{m}$  entspricht. Zudem erlaubt der hier verwendete CARS-Aufbau (siehe Abschnitt 5.2.1) eine automatisierte, schrittweise Veränderung des Fokusses in z-Richtung (Schrittweite 15  $\mu\text{m}$ ), wodurch nicht nur dreidimensionale Gradienten erfasst werden können (Meyer *et al.*, 2008), sondern auch das Problem des Fokussierens der Ebene stark abgemildert wird. Diese Eigenschaften der Methode sind gute Voraussetzungen zur Untersuchung der Verteilung des Caulerpenins (**3**) sowohl innerhalb der Alge als auch auf der Algenoberfläche. Zusätzlich erlaubt die nicht-lineare Methode die Trennung vom gesuchten Signal und auftretender, linearer Fluoreszenz (siehe Abschnitt 1.3.3). Dies und die hohe Geschwindigkeit, mit der einzelne Raman-Schwingungen aufgenommen werden, qualifiziert diese Methode für die Anwendung bei biologischen Proben (Potma *et al.*, 2001). Beispiele der Anwendung von CARS-Mikroskopie für biologische Fragestellungen waren in den letzten Jahren die Erforschung von epicuticularen Wachsen terrestrischer Pflanzen (Weissflog *et al.*, 2010) oder die Lokalisation von Lipiden in lebenden Mäusen (Evans *et al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Experimente erfolgten in einer gleichberechtigten Kooperation mit Dipl. chem. Ina Weißflog aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Jena und dem Institut für Photonische Technologie Jena.

Wie schon in der Einleitung beschrieben (vergl. Seite 18), ist es mit dem hier verwendeten 4-Photonenprozess möglich, gezielt eine bestimmte Schwingung anzuregen, die letztendlich ein zur Anregungswellenlänge verschobenes CARS-Signal (anti-Stokes-Streuung) aussendet. Dieses Signal wird resonant verstärkt, wenn die Frequenzdifferenz zwischen dem sogenannten Pump- und Stokes-Laser mit der Raman-Resonanz dieser Schwingung übereinstimmt. Bei Kopplung dieses Prinzips mit der Mikroskopie erhält man ein chemisches Abbild der Probe für diese spezifische Schwingung. In den in dieser Arbeit durchgeführten CARS-Versuchsreihen diente, wie auch schon in den FT-Raman-Messungen, die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung mit einer Wellenzahl von  $2185\text{ cm}^{-1}$  zur Identifikation des Caulerpenins (**3**). Für die Abbildung wird der Probenbereich mit dem Laserstrahl abgerastert. Das letztendliche Gesamtbild des Probenbereiches wird aus den einzeln aufgenommenen Punkten Pixelweise wieder auf-



**Abb. 3.44:** CARS-Aufnahme von reinem Caulerpenin (**3**) auf einem Objektträger. A) Aufnahme in Resonanz der  $C\equiv C$ -Streckschwingung ( $2185\text{ cm}^{-1}$ ). Schwingung ist hier als strahlend weißer Bereich deutlich sichtbar B) Aufnahme außerhalb der Resonanz der  $C\equiv C$ -Streckschwingung ( $2274\text{ cm}^{-1}$ ).

gebaut. Hierbei erscheinen die Bereiche, in denen die Schwingung resonant verstärkt worden ist, heller als die umgebenden Bereiche.

Besonders deutlich wird dies in der Aufnahme von reinem Caulerpenin (**3**), die sowohl in der Resonanz der  $C\equiv C$ -Streckschwingung bei  $2185\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.44 A) als auch außerhalb bei  $2274\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.44 B) gemessen wurde. Das resonant verstärkte Signal strahlt deutlich heller und das Bild ist dadurch wesentlich kontrastreicher als die Aufnahme im nicht-resonanten Bereich des Signals. Für die spätere Bildauswertung wurde je eine Aufnahme in der Resonanz der  $C\equiv C$ -Schwingung gemessen und anschließend außerhalb dieser. Mit den Aufnahmen war es möglich, auftretende nicht-resonante Störsignale vom dem resonanten Signal abzuziehen. Darüber hinaus wurde überprüft, ob das resonante Signal zeitabhängig ist, d.h. ob das Signal immer noch vorhanden ist, wenn die zeitliche Überlappung der Laserpulse zur Generierung des CARS-Signals nicht mehr gegeben ist. War dies der Fall, konnte man von einem eindeutigen CARS-Signal ausgehen.

Aufgrund der hohen Energie des Lasers besteht bei der CARS-Mikroskopie die Gefahr einer Verbrennung der Probe. Daher wurde die Messzeit möglichst gering gehalten und die Laserstrahlung zwischen den Messungen vor Erreichen der Probe geblockt. Vor jeder Messung wurde der Zustand der Alge visuell überprüft und für eine ausreichende Benetzung dieser mit Medium gesorgt. Vorher/Nacher-Aufnahmen dokumentierten den Zustand der Alge (siehe Abbildung 3.45). Hierbei zeigte sich das bei zu langer Messdauer ( $> 3\text{ min}$ ) die Algen auf den auf sie ausgeübten



**Abb. 3.45:** Aufnahme eines Assimulators von *C. taxifolia* vor der CARS-Messung (A) und nach einer längeren Messung (B). Deutlich ist zu sehen dass die Alge aufgrund des Stresses angefangen hat die Chloroplasten aus den Fiedern des Assimulators in den Mittelere Bereich zurückzuziehen. Der Kontrast der Bilder wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

Stress mit dem Rückzug der Chloroplasten aus den Fiederspitzen den mittleren Assimilatorteil der Alge reagieren. Dieser Rückzug kann als Stressreaktion auf nicht optimale Lichtbedingungen gesehen werden (Dostal, 1932) und konnte auch bei Algen beobachtet werden die nicht mit dem CARS-Aufbau gemessen worden sind, sich aber ebenfalls in dem vollkommen abgedunkelten Messraum befanden.

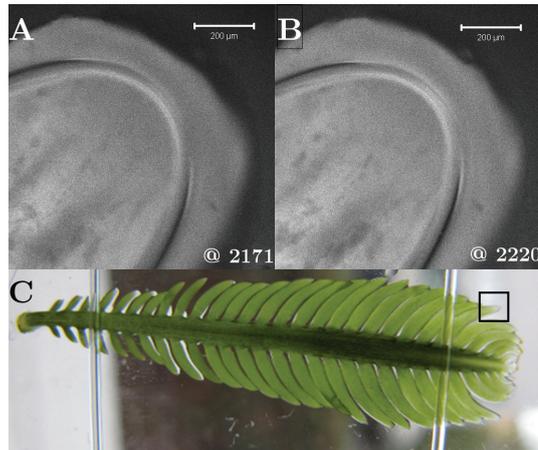
Für die Messungen wurde die Alge auf ein mit Medium benetztes Deckgläschen, welches an eine Objektträgerhalterung fixiert war, gelegt. Die Messungen erfolgten in 15  $\mu\text{m}$ -Schritten von der Oberfläche in die Alge hinein. Es wurde pro Schnittebene ein Bild in Resonanz und eins außerhalb der Resonanz aufgenommen.

Bei dem Großteil der hier aufgenommenen Messungen von *C. prolifera* und *C. taxifolia* (ca. 70 Messungen) konnte kein resonantes Signal für die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung des Caulerpenins (**3**) identifiziert werden. Die hier in der Resonanz aufgenommenen Bilder weisen keinen Unterschied zu denjenigen auf, die nicht in der Resonanz aufgenommen worden sind (siehe Abbildung 3.46).

Die Ursache für die hohe Anzahl an Aufnahmen, in denen es nicht möglich war das Signal der  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung zu detektieren, lässt sich nicht auf einen Faktor zurückzuführen. Vielmehr erschweren verschiedenen Faktoren die Detektion des Signals.

Bei den nun nachfolgend beschriebenen, möglichen Ursachen ist nicht zu vergessen, dass der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) in früheren Studien zwar generell als einer der Hauptsekundärmetaboliten von *C. prolifera* und *C. taxifolia* identifiziert werden konnte (Jung *et al.*, 2002; Amade & Lemée, 1998), eine gleichmäßig verteilte Konzentration aber aufgrund der Nichtlinearität der CARS-Mikroskopie nur schwierig zu detektieren wäre.

Zu den möglichen Faktoren, die das CARS-Signal beeinflussen können, kann



**Abb. 3.46:** A) CARS-Aufnahme in Resonanz der Caulerpenin (**3**)  $C\equiv C$ -Streckschwingung ( $2171\text{ cm}^{-1}$ ) einer der Spitzen eines Assimilators von *C. taxifolia*. B) Aufnahme derselben Spitze, nicht Resonanz der  $C\equiv C$ -Streckschwingung ( $2220\text{ cm}^{-1}$ ) des Caulerpenins (**3**). C) Beispiel für die Messpositionen von A und B. Der Kontrast der Aufnahme C wurde mit dem Programm GIMP bearbeitet.

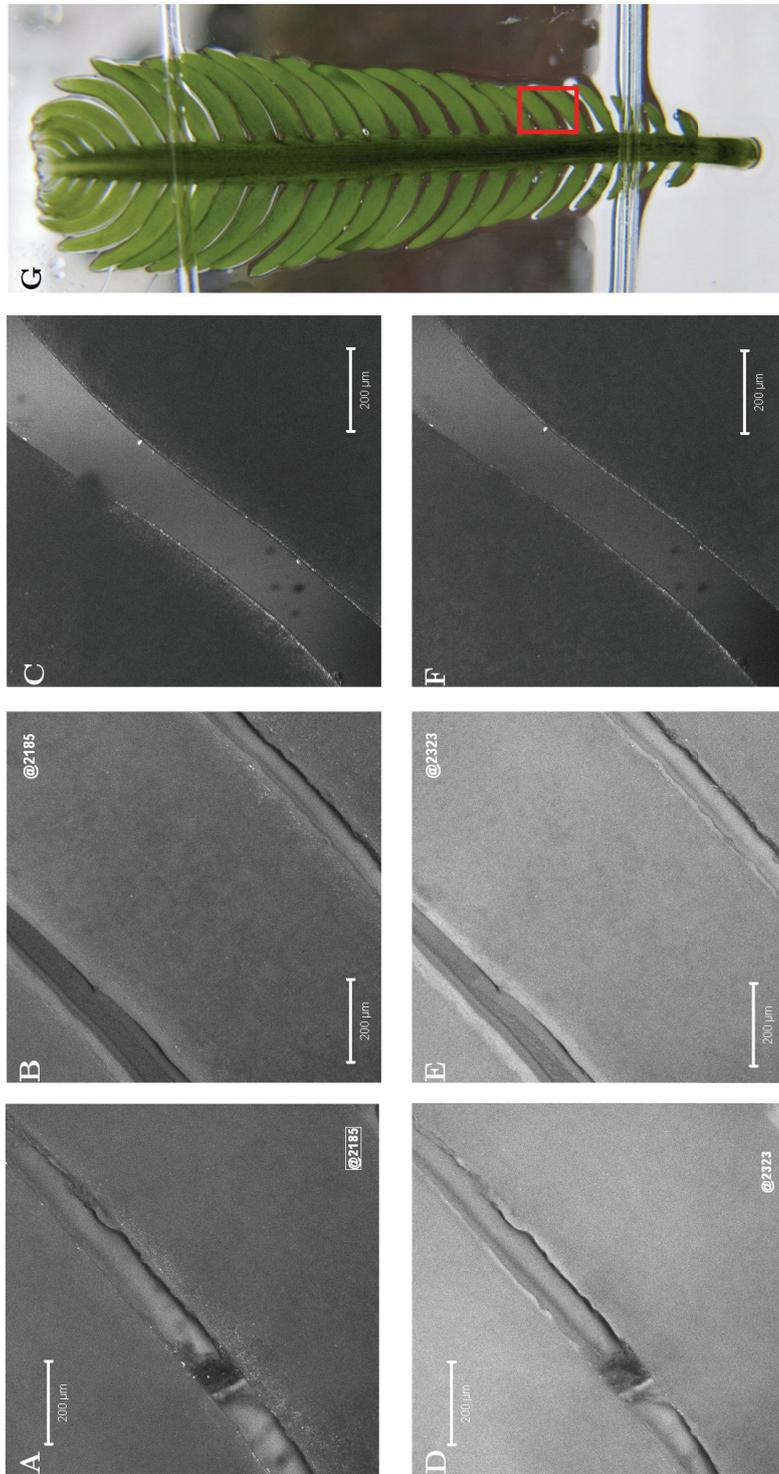
generell der hier verwendete CARS-Aufbau mit einem inversen Mikroskop gezählt werden. Da das CARS-Signal nur in dem Bereich generiert wird, in dem der Fokus der beiden in Phase stehenden Laserstrahlen zusammenfällt (Cheng & Xie, 2004), können mögliche Verschiebungen der Laserstrahlen beim Passieren der verschiedenen optischen Grenzschichten zwischen Objektiv und Probe (Luft, Glas, Probe) einen Einfluss auf das Zusammentreffen der Fokusebenen der Laserstrahlen haben. Bei dem hier verwendeten inversen Aufbau kann das Objektiv nicht in das die Alge umgebende Medium Wasser eintauchen. Daher kann es bei dem Übergang der Laserstrahlung zwischen den verschiedenen optischen Medien Luft, Quarzglas, Wasser und Alge zu einer Verschiebung der Pulse kommen die so nicht mehr zeitlich übereinander liegen, was sich wiederum auf die für das CARS-Signal wichtige Fokusebene der beiden Laser auswirken kann. Das CARS-Signal kann sehr abgeschwächt oder auch gar nicht vorhanden sein. Um möglichst wenig verschiedene optische Medien zwischen dem Objektiv und der Probe zu bekommen, bedarf es daher bei einer Probe in einem wässrigen Milieu, eines anderen nicht inversen mikroskopischen Aufbaus. Als Lösungsvorschlag auszuschließen ist zudem auch das Entfernen des umgebenden Wassers vor der Messung, was einens weiterer Stressfaktor für den aquatischen Organismus bedeuten.

Ein weiterer Faktor, der sich auf das erhaltene CARS-Signal auswirken kann, ist das Auftreten eines nicht-resonanten Hintergrundes. Zu dem nicht-resonanten Hintergrund werden elektronische Beiträge der Probe oder des Lösungsmittels zum

CARS-Signal gezählt, die dieses vollständig überdecken können (Cheng & Xie, 2004). Besonders für wässrige Proben oder das Lösungsmittel Wasser ist als starkes nicht-resonantes Hintergrundsignal, die starke Verbreiterung der für das Wasser typischen Bande bei  $3300\text{ cm}^{-1}$  zu nennen (Duncan *et al.*, 1982).

Zu den überlagernden Hintergrundsignalen kann auch auftretende Fluoreszenz gezählt werden. In diesem Fall wird die Fluoreszenz eines fluorophoren Systems allerdings im Gegensatz zur linearen Fluoreszenz von zwei Photonen angeregt und kann das CARS-Signal deutlich überlagern. Da die Energie eines Photons umgekehrt proportional zu seiner Wellenlänge ist, müssen die für die Anregung der zwei Photonen-Fluoreszenz benötigten zwei Photonen eine doppelt so große Wellenlänge besitzen wie die, die zur Anregung der linearen Fluoreszenz durch einzelne Photonen benötigt wird. So kann z. B. ein Fluorophor wie das in den Algen vorkommende Chlorophyll, das ein Absorptionsmaximum von Licht sowohl bei 400 nm als auch in einem Bereich von 600 nm–800 nm besitzt, auch von zwei Photonen mit einer Wellenlänge von 830 nm angeregt werden, wenn beide das fluorophore System zur selben Zeit erreichen. In dieser Arbeit wurde die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung des Caulerpenins (**3**) mit einem Stoke-Laser bei 830 nm und einem Pump-Laser bei 706 nm angeregt. Hierbei fällt auf, dass die Wellenlänge des Stokes-Lasers genau der Wellenlänge entspricht, die für die Anregung der Zwei-Photonen-Fluoreszenz des Chlorophylls benötigt wird. Die hierbei entstandene Fluoreszenz liegt demnach dicht bei dem gesuchten CARS-Signal und kann dieses deutlich überlagern. In dem hier durchgeführten Experimenten wurde versucht, die Fluoreszenz durch verschiedene Filter vom gesuchten Signal zu trennen. Die Verwendung zahlreicher Filter birgt jedoch die Gefahr neben der Reduktion der Störsignale auch das gesuchte CARS-Signal deutlich abzuschwächen. Eine weitere Möglichkeit, um die durch 2-Photonen angeregte Fluoreszenz zu unterbinden, ist die Anwendung von zeitaufgelösten CARS-Messungen, die die Tatsache ausnutzen, dass das CARS-Signal direkt nach der Anregung erscheint wohingegen das Fluoreszenzsignal erst mit einiger Zeitverzögerung (Volkmer *et al.*, 2002). Des weiteren wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Methoden entwickelt mit denen der auftretende nicht-resonante Hintergrund deutlich reduziert werden kann. Hierzu zählen Epi-CARS (Cheng *et al.*, 2001b) und Polarisations-Sensitives-CARS (Cheng *et al.*, 2001a). Zudem würde eine Messung mit zeitlich dicht hintereinander folgenden Pulsen den Hintergrund reduzieren.

Nichtsdestotrotz war es uns möglich in drei verschiedenen Assimilatoren von *C. taxifolia* eindeutig das Signal für die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung des Caulerpenins (**3**) zu detektieren. Abbildung 3.47 zeigt die CARS-Messungen, jeweils einmal in der Resonanz ( $2185\text{ cm}^{-1}$ , A, B, C) und außerhalb ( $2323\text{ cm}^{-1}$ , D, E, F) dieser. Das Signal der  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung war in diesem Fall zudem eindeutig zeitabhängig, so dass es sich hierbei um ein eindeutiges CARS-Signal der gesuchten Schwingung handelt. Die Bilder A, B, D und E der Abbildung 3.47 wurden am selben Tag aufgenommen und stammen von unterschiedlichen Bereichen desselben Individuums.



**Abb. 3.47:** CARS-Aufnahme des Assimilators von *C. taxifolia* (A, B, C) in Resonanz und außerhalb (D, E, F) des resonanten Signales gemessen. G) Assimilator von *C. taxifolia* mit Markierung des Messbereiches. Der Kontrast des Bildes G wurde mit dem Programm Gimp bearbeitet.

In den in der Resonanz gemessenen Bildern ist, im Vergleich zu den nicht-resonanten Aufnahmen, deutlich ein hellerer Bereich am Rand der fiederartigen Assimilatoren zu erkennen. Diese helleren Bereiche stellen, wie schon eingangs erwähnt, Bereiche mit der für Caulerpenin (**3**) typischen  $C\equiv C$ -Streckschwingung dar. Eine gleichmäßige Verteilung des Caulerpenins (**3**) ist in diesem Randbereich nicht zu erkennen, da die hellen Bereiche teilweise unterbrochen oder verschieden hell sind. Auch in den FT-Raman-Messungen zur Verteilung des Metaboliten in *C. prolifera* (Abschnitt 3.3.3) konnte bei einer deutlich niedrigeren Auflösung keine eindeutig, gleichmäßige Verteilung des Caulerpenins (**3**) in der Alge gefunden werden.

Aufgrund der sonst hohen Anzahl an Messungen, in denen es nicht möglich war das Signal der  $C\equiv C$ -Schwingung zu detektieren, ist bei den drei erfolgreichen Messungen in Abbildung 3.47 nicht auszuschließen, dass eine ungewöhnlich hohe Konzentration in den Assimilatoren vorlag. Zudem scheint der die Messung beeinflussende Anteil des experimentellen Aufbaus, die Fluoreszenz der Probe und weiteren auftretenden Hintergrundsignalen gleichstark ausgeprägt zu sein und auf die hier durchgeführten Messungen einen stärkeren Einfluss als die anderen Faktoren zu haben.

So zeigten Stellen, an denen optisch kein Chlorophyll vorhanden war (rein weiße Stellen), auch weiterhin einen großen Anteil am nicht-resonanten 4-Wellen-Mischprozess, vermuten lässt, dass die durch zwei Photonen angeregte Fluoreszenz nicht den Hauptanteil des nicht resonanten-Störsignals ausmacht. Vielmehr können die manuell durchgeführten Arbeitsschritte der Messung, wie die Probenvorbereitung, Aufbringen auf den Probenstisch, Bewegung des Objektivs und der Filter, einen Einfluss auf die Fokusebene der Laserstrahlung und dem daraus resultierenden CARS-Signal haben. So kann erklärt werden, dass es uns nur dreimal gelungen ist, das CARS-Signal der  $C\equiv C$ -Schwingung eindeutig in *C. taxifolia* zu detektieren.

Abschließend ist zu sagen, dass sich die CARS-Mikroskopie generell für die Detektion der  $C\equiv C$ -Schwingung des Caulerpenins (**3**) eignet, allerdings der uns hier zur Verfügung stehende experimentelle Aufbau und die Methode einen deutlich negativen Einfluss auf die Messergebnisse hatten. Daher wäre es von Vorteil, die Messungen an einem Aufbau mit einem nicht-inversen Mikroskop und zur Minderung der Fluoreszenz mit zeitaufgelösten CARS-Messungen durchzuführen.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Makroalgen spielen durch ihre vielfältigen Funktionen im marinen Lebensraum eine entscheidende Rolle, z. B. als Nahrungsquelle, Brutstätte oder Fouling-Substrat. Viele Sekundärmetabolite sowohl auf der Algenoberfläche als auch in der Zelle steuern diese Interaktionen zwischen den Organismen und ihrer Umwelt. Für ein besseres Verständnis dieser Metabolite und ihrer ökologischen Bedeutung ist ihre Extraktion und Lokalisation von entscheidender Bedeutung.

Viele der gängigen Methoden zur Extraktion und Lokalisation von Metaboliten sind jedoch aufgrund des wässrigen Lebensraums und der Oberflächentextur nicht auf Makroalgen anwendbar. Von den wenigen unter diesen Bedingungen einsetzbaren Methoden, sind die meisten destruktiv.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Extraktionsmethode für Algenoberflächenmetabolite entwickelt und verschiedene Raman-Methoden auf ihre Anwendbarkeit in Bezug auf die Lokalisation von Metaboliten in und auf der Alge getestet.

Die in dieser Arbeit entwickelte neue Extraktionsmethode von Algenoberflächenmetaboliten basiert auf dem Grundprinzip der Festphasenextraktion. Sekundärmetabolite der Algenoberfläche gehen, mit auf die Alge aufgetragenem absorbierendem C<sub>18</sub>-Material, chemische Interaktionen ein und können so gebunden an dem Material von der Alge heruntergespült werden. Im Anschluss werden die Metabolite mit Lösungsmittel von dem C<sub>18</sub>-Material eluiert und das erhaltene Extrakt kann mit weiteren Methoden analysiert werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es mit der hier vorgestellten C<sub>18</sub>-Methode möglich ist Metabolite von der Algenoberfläche zu extrahieren. Im Gegensatz zu den herkömmlich verwendeten Methoden, wie der Dipping- und Swapping-Methode, steht die Algenoberfläche bei der C<sub>18</sub>-Methode in keinem direkten Kontakt zu Lösungsmitteln und unter keinem starken mechanischen Druck. Bei Anwendung der C<sub>18</sub>-Methode zeigte sich weder für *C. taxifolia* noch auch für *F. vesiculosus* ein destruktiver Einfluss des C<sub>18</sub>-Materials auf die beprobten Algenoberflächen. Im Vergleich mit der herkömmlich verwendeten Dipping-Methode schadet die C<sub>18</sub>-Methode auch bei einem längeren Beprobungszeitraum der Algenoberfläche nicht. Der Beprobungszeitraum der C<sub>18</sub>-Methode hatte auf den Extraktionserfolg keine eindeutigen Auswirkungen. Zudem wurde die für eine vollständige Bedeckung benötigte Menge an C<sub>18</sub>-Material ermittelt. Auch die Möglichkeit einer nicht destruktiven Mehrfachbeprobung desselben Algenhaltungs ist im Gegensatz zur Dipping-Methode mit der C<sub>18</sub>-Methode möglich und konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Daher stellt die C<sub>18</sub>-Methode ein neues wichtiges

Hilfsmittel in der Erforschung der Algenoberflächenmetabolite und ihrer ökologischen Relevanz dar. Es empfiehlt sich daher das Potential, des hier an der der C<sub>18</sub>-Methode dargestellten Prinzips, auf die Verwendung weiterer Absorbermaterialien und Lösungsmittel zur Metabolitelution zu erforschen. Die quantitative Validierung der Methode sollte sich dem in Zukunft anschließen. Neben der Entwicklung eines neuen Verfahrens zur nicht-destruktiven Extraktion von Oberflächenmetaboliten, war es unter Anwendung der Resonanz-Raman-Spektroskopie möglich, einen dieser Metabolite auf der Oberfläche und vor allem in dem die Alge umgebenden laminaren Grenzbereich zu lokalisieren und mittels eines Methodenabgleichs auch zu quantifizieren. Für die Lokalisation des Metaboliten war weder ein neuer experimenteller Aufbau noch eine zeitaufwändige oder umständliche Probenvorbereitung nötig. Ein basierend auf hydrodynamischen Berechnungen lange vermuteter Gradient von Sekundärmetaboliten in der laminaren Grenzschicht der Alge, konnte anhand des Carotinoids Fucoxanthin (**2**) auf der Alge *F. vesiculosus* zum ersten Mal nachgewiesen werden. In Abgleich mit einer herkömmlichen Studie war es möglich, die Konzentration dieses Gradienten zu bestimmen. Zudem konnte mit der Methode die laminare Grenzschicht von zwei Algen mit unterschiedlicher Textur analysiert werden. In beiden Fällen war die relative Konzentration von Carotinoiden in direkter Nähe zur Oberfläche am höchsten und verringerte sich mit steigender Entfernung innerhalb der laminaren Grenzschicht exponentiell. Ebenfalls war es möglich eine ungleichmäßige, räumliche Verteilung des Metaboliten auf der Oberfläche von Algen und anhaftenden Organismen darzustellen. So kann mit Hilfe dieser Ergebnisse die ökologische Funktion des schon als Antifouling-Metaboliten identifizierten Fucoxanthins (**2**) oder auch anderer Carotinoide neu bewertet werden.

Eine weiterer, schon bekannter Raman-aktiver Metabolit, mit viel diskutierter ökologischer Bedeutung, ist das Caulerpenin (**3**) der einzelligen Grünalgen *C. prolifera* und *C. taxifolia*. Dieser Metabolit hat neben seiner Funktion als toxischer Abwehrstoff, in deacetylierter Form auch eine entscheidende Rolle in der Bildung eines Wundverschlusses basierend auf der Quervernetzung von Proteinen nach Verletzung der Alge. Bisher war es weder möglich Caulerpenin (**3**) in der intakten Alge noch in ihrem Wundverschluss *in vivo* zu lokalisieren. Zudem ist bis heute nicht vollständig geklärt, welches der auf Basis von *in vitro*-Versuchen postulierte Caulerpenin-Derivate für die Bildung des Wundverschlusses verantwortlich ist. Die Lokalisation, der durch Verwendung aktivierten Metabolite, macht eine zerstörungsfreie Messung am biologischen Gewebe notwendig. Dieses wird durch ein Raman-System mit einem Anregungslaser im infraroten Spektralbereich (FT-Raman-Spektroskopie) ermöglicht.

Die in dieser Arbeit aufgenommenen FT-Raman-Spektren des Wundverschlusses und des angrenzenden intakten Gewebes von *C. taxifolia* erlaubten aufgrund ihrer unterschiedlichen Banden-Struktur eine Unterteilung des gemessenen Gewebes in vier chemisch unterschiedliche Zonen (Ia, Ib, II, III) und konnten somit frühere histologische Studien zum Wundverschluss erweitern.

Der für den Wundverschluss wichtige Sekundärmetabolit Caulerpenin (**3**) konnte

anhand seiner charakteristischen C≡C-Streckschwingung sowohl im Wundverschluss als auch im intakten Bereich der Alge zum ersten Mal *in vivo* nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es möglich, das von Guerriero *et al.* (1995) postulierte Caulerpenin-Derivat (**6**), als Bestandteil des äußeren Wundverschlusses von *C. taxifolia* zu identifizieren. Hierfür wurden die Raman-Spektren des synthetisierten Metaboliten (**6**) mit denen des Wundverschlusses verglichen. Diese Ergebnisse wurden durch DFT berechnete Spektren bestätigt.

Zusätzlich zu der dem Metaboliten (**6**) zugeordneten Bande konnten in der Wundverschlusszone von *C. taxifolia* noch weitere nur für diesen Bereich typische Banden ausgemacht werden. Bisher war es allerdings nicht möglich diese Banden einem Metaboliten zuzuordnen. Da sich der zuvor identifizierte Metabolit (**6**) aufgrund seiner Struktur allerdings nicht zum Quervernetzen von Proteinen eignet, können die noch unbekannt Metabolite die Funktion eines Proteinquervernetzlers oder eine noch unbekannt Rolle in einem anderen Wundverschlussmechanismus haben.

Neben dem Wundverschluss von *C. taxifolia* konnte mit der FT-Raman-Spektroskopie auch ein chemisches Profil des Wundverschlusses von *C. prolifera* erstellt werden, wodurch ein Vergleich der Zusammensetzung des Wundverschlusses zwischen der invasiven *C. taxifolia* und der indigenen *C. prolifera* ermöglicht wurde. Der Vergleich zeigte, dass sich die schon rein optisch unterschiedlichen Wundverschlüsse auch chemisch voneinander unterscheiden. Im Wundverschluss von *C. prolifera* konnten einige Banden wie z. B. die charakteristische Bande des Metaboliten (**6**) nicht gefunden werden. Andere Banden hatten gegenüber den Spektren von *C. taxifolia* eine verschoben Position oder kamen ausschließlich nur im Wundverschluss von *C. prolifera* vor. Dadurch ergab sich abweichend zu *C. taxifolia* eine Unterteilung der Wundverschlusszone in drei (I, II, III) statt vier (Ia, Ib, II, III) Zonen. Wie für *C. taxifolia* weisen auch die Spektren des Wundverschlusses von *C. prolifera* einige Banden auf, die auf unbekannte, eventuell quervernetzende Metabolite hinweisen. Bei den Banden handelt es sich zum Teil um solche, die schon bei *C. taxifolia* gefunden wurden, zum Teil aber auch um dort nicht vorhandene.

Die FT-Raman-Spektren der beiden Grünalgen zeigten somit zum ersten Mal einen detaillierten Unterschied zwischen dem Wundverschluss einer indigenen und einer invasiven Art. Ob der Unterschied in der chemischen Zusammensetzung des Wundverschlusses ursächlich für die erfolgreiche Ausbreitung der invasiven *C. taxifolia* gegenüber der indigenen *C. prolifera* im Mittelmeer ist, kann in dieser Studie nicht geklärt werden. Dieses wäre mit Hilfe von Bioassays möglich, wozu jedoch zuerst die in dieser Studie gefundenen Metabolite identifiziert werden müssten. Überdies wurden weitere Techniken, wie die FT-Raman und CARS, zur Lokalisation von Caulerpenin (**3**) in der intakten Alge erfolgreich getestet.

Abschließend ist zu sagen, dass die Ergebnisse der hier angefertigten Arbeit auf einem Zusammenspiel zwischen Chemie, Physik und Biologie beruhen und deutlich machen, wie wichtig die Kooperation dieser Fachbereiche im Hinblick auf ein tieferes Verständnis ökologischer Prozesse ist.

# 5 Experimenteller Teil

## 5.1 Organismen

### 5.1.1 *Caulerpa taxifolia* und *Caulerpa prolifera*

Die in den Experimenten verwendeten Algen *C. taxifolia* und *C. prolifera* stammen aus Aquarienhaltung und wurden von verschiedenen Händlern bezogen (siehe Tabelle 5.1). Die Haltung der Algen erfolgte in mit künstlichem Seewasser (je nach Aquarium 7 l–25 l) befüllten und konstant belüfteten Aquarien bei einer Raumtemperatur von 20 °C–25 °C. Für einen kürzeren Zeitraum war es ausreichend, die Algen unter natürlichen Lichtverhältnissen mit einem Aquariumsplatz nahe des Fensters zu halten. Es zeigte sich allerdings, dass die Algen für eine längere Haltung besser künstlichen Lichtbedingungen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12:12 h und einer Lichtintensität an der Wasseroberfläche von 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  gehalten wurden. Darüber hinaus wurde für eine längere Haltung der Algen auch der Boden der Aquarien mit einer maximal 1,5 cm hohen Schicht von grobem, mehrfach mit entionisiertem Wasser gewaschenen, Korallenbruch bedeckt. Der Korallenbruch diente hierbei der Alge als Verankerungshilfe auf dem Boden der Aquarien und unterstützte so ein besseres Wachstum.

Vor der Überführung in die Aquarien wurden die Algen gründlich mit künstlichem Seewasser gespült und sorgfältig von eventuellem Bewuchs, anhaftenden Organismen und abgestorbenen Algenteilen befreit. Diese Prozedur wurde alle 14 Tage beim Umsetzen der Algenkulturen in frisches, künstliches Seewasser wiederholt.

### 5.1.2 *Fucus vesiculosus* und *Ulva* sp.

**Tab. 5.1:** Auflistung der Bezugshändler für *Caulerpa* sp.

Algenart	Händler	Kontakt
<i>C. taxifolia</i> , <i>C. prolifera</i>	Murtzek Meeresaquaristik und Reptilien	<a href="http://www.shop-meeresaquaristik.de">www.shop-meeresaquaristik.de</a>
<i>C. taxifolia</i> , <i>C. prolifera</i>	Meeresaquaristik Schurna	<a href="http://www.meeresaquaristik-schurna.de">www.meeresaquaristik-schurna.de</a>
<i>C. taxifolia</i>	Aqua-Reptil-World	(0 36 41) 37 64 32
<i>C. prolifera</i>	Hausriff Meeresaquaristik	<a href="http://www.haus-riff.eu">www.haus-riff.eu</a>

Die hier verwendete Grünalge *Ulva* sp. sowie die Braunalge *F. vesiculosus* wurden an zwei verschiedenen Standorten in der Kieler Förde, einem Gebiet der Kieler Bucht in der westlichen Ostsee, gesammelt. Die meisten Individuen stammen von dem leicht zu erreichenden, abfallenden Kiessandstrand in unmittelbarer Nähe des Bülker Leuchtturms (54°27'18,9" Nord, 10°11'50,3" Ost). Ein weiterer Algensammelstandort für Individuen der Alge *F. vesiculosus* befand sich in Kitzeberg (54°21'37" Nord, 10°11'12" Ost), einem weiteren Gebiet mit Kiessandstrand sowie einigen Mole-Analgen auf der gegenüberliegenden Seite der Kieler Förde.

Das Sammeln der Algen erfolgte im Januar, März, Juni, August, September oder Oktober der Jahre 2009–2012. Von *F. vesiculosus* wurden keine einzelnen Algenthalusstücke gesammelt sondern ganze Individuen, die mit ihrer Haftscheibe an möglichst kleinen Steinen fest saßen. Besonders die Tatsache, dass die Algen mit ihrer Haftscheibe an kleinen Steinen festsaßen ist beeinflussend für die Qualität der Algen und zögert die Dekomposition der Alge unter künstlichen Haltungsbedingungen heraus. Dieser Einfluss konnte in Studien von (Hunter, 1976) mit abgetrennten *F. vesiculosus*-Thalli im Freiland in Form einer deutliche Verminderung des Trockengewichtes der abgetrennten Thalli um fast 50% innerhalb von 20 Tagen gezeigt werden. Für den 14 bis 20-tägigen Versuchszeitraum in Jena wurden daher bewusst Individuen mit Stein und von möglichst immer gleichbleibender Qualität im Bezug auf Bewuchs, Größe und Zelltextur der Algen gesammelt. Vor dem Transport nach Jena wurden die Algen und besonders die Steine an die die einzelnen Individuen anhafteten von Epibios wie der Miesmuschel (*Mytilus edulis*), der gemeinen Seepocke (*Balanus* sp.) und verschiedensten Epiphyten befreit. Anschließend wurde jedes Algenindividuum in mit Ostseewasser befeuchtetes Zellstoffpapier gewickelt und gekühlt bei maximal 18 °C nach Jena transportiert.

Die Haltung der Algen in Jena erfolgte in einer auf 15 °C temperierten Klimakammer unter einem konstanten Lichtregime (14:10) mit einer Lichtintensität von 65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Die Algenindividuen wurden entweder einzeln in 7l-Aquarien oder maximal zwei Individuen zusammen in 20l-Aquarien gesetzt. Das zur Haltung verwendete Medium Instant Ocean (Herstellung siehe 5.1.3) wurde dem Salzgehalt der Ostsee angepasst und kontinuierlich belüftet.

Um den Bewuchs der Algenthali mit Diatomeen zu reduzieren, wurden einige Individuen in Medium versetzt mit  $\text{GeO}_2$  gehalten (Markham & Hagmeier, 1982).

Das künstliche Seewasser wurde zu innerhalb der ersten Woche täglich und danach alle zwei Tage gewechselt. Hierbei wurden sowohl die Aquarien, als auch die Algen von eventuellem Bewuchs befreit und Algenindividuen, die Zersetzungsmerkmale zeigten, aussortiert. Sämtliche Experimente wurden möglichst innerhalb der ersten 14 Tage nach Sammlung und Transport der Algen durchgeführt, um einen Einfluss von auftretenden Zersetzungsprozessen (Hunter, 1976) auf die Qualität der Algen und die jeweilige experimentelle Methodik zu verhindern.

### 5.1.3 Herstellung des künstlichen Seewassers

Für die Herstellung von 30 l künstlichem Seewasser wurden 990 g Instant Ocean (Aquarium Systems) zu 30 l entionisiertem Wasser gegeben und 12 Stunden lang gerührt. Hierdurch sollte die vollständige Lösung des Instant Oceans sowie der Temperaturangleich an Raumtemperatur gewährleistet werden. Nach Zugabe von 6,6 ml einer  $K_2HPO_4$ -Lösung (1,79 g/200 ml, Sigma-Aldrich, Deutschland) und 17,7 ml einer  $NaNO_3$ -Lösung (17,99 g/200 ml, Sigma-Aldrich, Deutschland) zum gelösten Instant Ocean konnte das so hergestellte künstliche Seewasser zur Kultivierung der *Caulerpacean* verwendet werden.

Für die Kultivierung der aus der Ostsee stammenden *Fucales* und *Ulva* wurde der Salzgehalt des Instant Oceans (26 PSU) durch Verdünnen mit entionisiertem Wasser des am Standort vorherrschenden Salinität angepasst. Die vor der Probenahme vorherrschende Salinität an den Algensammelstellen um den Zeitpunkt der Probenahme, wurde dem Informationsdienst des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH, 2012) entnommen. Der Wert lag zwischen 12 und 16 PSU. Darüber hinaus wurde das so hergestellte Medium in einigen ausgewählten Kulturaquarien mit  $0,18 \text{ mg l}^{-1}$   $GeO_2$  versetzt, um den Bewuchs der Algenhalli mit Diatomeen zu reduzieren (Markham & Hagmeier, 1982).

## 5.2 Geräte und Messmethoden

### 5.2.1 Raman- und CARS-Spektroskopie

#### Resonanz-Raman-Spektroskopie

Die Mikro-Resonanz-Raman-Messungen wurden an einem LabRAM HR800 Raman-Spektrometer (Horiba-Jobin Yvon, Japan) ausgerüstet mit einer konfokalen Apparatur sowie einem Mikroskop (BX40, Olympus, Japan) mit der Möglichkeit zur Aufnahme von Fotos, durchgeführt. Alle Raman-Spektren wurden mit einem Zeiss C-Apochromat 63x/1.2 W Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung des Programms "Labspec" aufgenommen und für die weitere Auswertung als Text-Datei abgespeichert. Als Anregungsquelle diente ein Krypton-Ionen-Laser (Innova 302C, Coherent, USA) mit einer einfallenden Laserleistung von  $PL < 1 \text{ mW}$  und einer Anregungswellenlänge von 476 nm. Die Integrationszeit pro Messpunkt betrug 2 s. Für das Ermitteln der Integrationszeit wurde die Intensitätsschwächung des Raman-Signals für die C=C-Schwingung bei  $1528 \text{ cm}^{-1}$  über einen Zeitraum von 10 s ermittelt.

Die vorbereiteten Proben (siehe Abschnitt 5.3.1) wurden auf einem in x,y-Richtung motorisierten Probenstisch (Märzhäuser, Deutschland) unter dem Mikroskop positioniert. Bewegungen in z-Richtung erfolgten manuell in  $10 \mu\text{m}$  Abständen beginnend von der Algenoberfläche in den laminaren Wasserbereich oder umgekehrt mit Hilfe

des z-Fokus des verwendeten Mikroskops. Für alle Messungen betrug das konfokale Pinhole 1000  $\mu\text{m}$  und die Spaltbreite 100  $\mu\text{m}$ .

Um einen Einfluss der an der Thallusschnittstelle austretenden, intrazellulären Metabolite auf die Messungen zu verhindern, war jeder Messpunkt mit einem Mindestabstand von 1,5 cm von der Schnittkante der Algenhallusstücke entfernt.

Für die verwendete Raman-Anregungswellenlänge von  $\lambda = 476 \text{ nm}$  und die numerischen Apparatur des Wasserimmersionsobjektivs von  $NA = 1,2$  konnte eine laterale Auflösung  $R(x, y)$  von ungefähr 250 nm und die axiale Auflösung  $R(z)$  von 900 nm berechnet werden.

Für die Messung des käuflich erworbenen reinen,  $\beta$ -Carotins (**5**) und Fucoxanthins (**2**) (Sigma-Aldrich, Deutschland) als Standard, gelöst in verschiedenen Lösungsmitteln, wurde der beschriebene Aufbau durch eine rotierbare Rundküvette ergänzt.

### FT-Raman-Spektroskopie

Ein Multi-Ram FT-Raman-Spektrometer (Waters) mit einem Michelson-Interferometer, zusätzlich ausgerüstet mit einem in x,y-Richtung beweglichen, motorisierten Probenstisch (TLC-Tisch) sowie der Möglichkeit zur Aufnahme von Fotos, wurde für die FT-Raman-Messungen ins den Algen *C. prolifera* und *C. taxifolia*, Syntheseprodukten und Standards verwendet. Alle Spektren wurden unter Verwendung des Programms "Opus" aufgenommen und zur weiteren Verarbeitung als Text-Datei gespeichert. Als Anregungsquelle diente ein Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm. Die Messungen wurden mit einer Laserleistung von 800 mW, einer Auflösung von  $2 \text{ cm}^{-1}$  und 30 Scans aufgenommen. Laut Herstellerangaben betrug die laterale Auflösung in x,y-Richtung des Lasers 100  $\mu\text{m}$ . Vor den Messungen wurde 4-Acetamidophenol (im festen Zustand) oder Polystyrol als Standard zum Überprüfen der Gerätefunktion gemessen. Die vorbereiteten Algenproben (siehe Abschnitt 5.3.1) wurden auf dem Probenstisch positioniert und die Messpunkte einzeln oder in Form von Linien und Gittern mit einem Abstand zwischen den Punkten von mindestens 100  $\mu\text{m}$  gemessen. Flüssige Syntheseprodukte und Standards wurden in einem NMR-Röhrchen im normalen Probenaufbau vermessen.

### CARS-Spektroskopie

Die für die Erzeugung des CARS-Signals wichtigen kurzen Pulse wurden mit einem kohärenten MIRA HP Ti:saphir Laser gepumpt und durch einen kohärenten Verdi-V18 Nd:Vandat Laser mit einem Intervall von wenigen Picosekunden generiert. Somit wurde eine spektrale Auflösung von 20  $\text{cm}^{-1}$  erreicht. Die ausgehende Strahlung mit einer Wellenlänge von 831 nm wurde mit einem 50:50-Strahlungsteiler in zwei Teile unterteilt. Der eine Teil wurde direkt zur Generation des Stoke Pulses verwendet. Der andere Teil diente dem Pumpen des zweiten optischen Oszillators APE-OPO,

dessen ausgehende Strahlung zwischen 700 nm–710 nm gestimmt wurde, um die relative Wellenzahldifferenz zwischen  $2177\text{ cm}^{-1}$  und  $2208\text{ cm}^{-1}$  zu erhalten. Die beiden erzeugten Laserstrahlen wurden mit Hilfe eines motorisierten Probenstisches in Kombination mit einem Retroreflektor und einem dichromatischen Spiegel zur Rekombination sowie der Überlappung in Zeit und Raum gebracht. Der Strahl wurde in ein inverses Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Deutschland) geleitet. Hier wurde die Strahlung mit einem Objektiv (NA 10) auf die Probe fokussiert. Das erhaltene CARS-Signal wurde mit einem Kondensator (NA 0.55) gesammelt, mit verschiedenen Filtern (BL 650SP, BL629/56 BP, 600/40 BP, OC14) vom restlichen Pump- und Stokes-Licht separiert und mittels eines Photomultipliers detektiert. Zur Steuerung des Mikroskops und zur Aufnahme der CARS-Bilder wurde das Programm "LSM" von Zeiss verwendet. Das Programm LSM erlaubte die gleichzeitige Aufnahme von mehreren Signalen, den sogenannten Kanälen gleichzeitig.

Die vorbereitete Probe wurde auf den zum Mikroskop gehörenden Objektstisch gelegt und der Fokus sowie die Messschritte manuell eingestellt. Pro Messung wurde ein Bereich von  $900\text{ }\mu\text{m} \times 900\text{ }\mu\text{m}$  und eine Pixelgröße von  $1,8\text{ }\mu\text{m}$  gemessen. An jeder Stelle wurde erst sowohl das resonante Signal als auch das nicht-resonante Signal gemessen. Die Messung erfolgte in  $15\text{ }\mu\text{m}$ -Schnitten von der oberen bis zur unteren Algenoberfläche.

Vor der Messung wurde das Vierwellenmischsignal zu dem das CARS-Signal gehört mittels des hohen nicht-resonanten Vierwellenmischprozesses von Glas optimiert indem mittels Variation des räumlichen Überlapps der Pulse das Signal auf einem Objektträger zentriert, die optimale Ausleuchtung eingestellt und die Intensität maximiert worden ist. Zudem wurde das Vorhandensein des CARS-Signals mit einer Probe reinem Caulerpenins (**3**) überprüft.

## 5.2.2 Chromatographie

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Trennung der Syntheseprodukte wurde mit Hilfe eines LC-8A Flüssigchromatographen (Shimadzu, Deutschland), unter der Verwendung eines SPD-10AV UV-Vis-Detektors durchgeführt. Es wurde eine LiChro CART® 250-10 Purospher RP-18, endcapped (Partikelgröße  $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $\varnothing 10\text{ mm}$ ,  $250\text{ mm}$ ) als präparative Säule mit den Eluenten Methanol (Optigrade), versetzt mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) und Wasser (HPLC rein), versetzt mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch (90 MeOH/10 H<sub>2</sub>O) bei einer Flussrate von  $4\text{ ml min}^{-1}$ .

**Tab. 5.2:** Verwendete UPLC-Gradienten für die Trennung Caulerpenin (**3**) und Fucoxanthin (**2**) haltigen Proben

Caulerpenin und Syntheseprodukte			Fucoxanthin		
Zeit min	% Wasser	% Acetonitril <sup>10</sup>	Zeit min	% Wasser <sup>10</sup>	% Acetonitril <sup>10</sup>
0	90	10	0,1	100	0
0,2	90	10	0,5	50	50
3,0	0	100	5	0	100
4,0	0	100	5,5	0	100
4,5	90	10	6	100	0
5	90	10			

<sup>j</sup>+ 0,1% H<sub>2</sub>OOH

### Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (UPLC-MS)

Die UPLC-MS Messungen erfolgten an einem Waters Acquity UPLC/MS-System und Micromass® Q-ToF micro ESI-TOF-Massenspektrometer. Bei einigen Messungen wurde auch der eingebaute 2996 PDA-Detektor verwendet.

Für die Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden zur Trennung von Caulerpenin (**3**) und Fucoxanthin (**2**) aus den C<sub>18</sub>-Experimenten eine BEH C18 Säule 2,1 mm × 50 mm, Partikelgröße 1,7 µm von Waters verwendet.

Als Eluenten wurden Acetonitril (UPLC/MS-grade) von Biosolv mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) sowie Wasser (UPLC/MS-grade) von Biosolv mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) (Roth) verwendet. Die eingestellte Flussrate betrug 0,6 ml min<sup>-1</sup> bei unterschiedlichen Gradienten für Identifikation von Caulerpenin (**3**) und Fucoxanthin (**2**) welche Tabelle 5.2 zu entnehmen sind. Zwischen 5 µl und 10 µl der Proben gelöst in Methanol wurden auf die Säule mittels eines Autosamplers aufgetragen. Die verwendeten ESI-Parameter für verschiedene Messungen sind der Tabelle auf Seite 5.3 zu entnehmen.

## 5.3 Probenvorbereitung

### 5.3.1 Fixierung der Algen für die Raman- und CARS-Spektroskopie

#### Resonanz-Raman-Spektroskopie

Für die Probenvorbereitung der RR-Messungen wurden Individuen der Braunalge *F. vesiculosus* den Kulturaquarien entnommen und mit einem Skalpell in 4 cm–5 cm lange Stücke zerteilt. Die einzelnen Algenstücke wurden in je eine mit 20 ml Instant

**Tab. 5.3:** Verwendete ESI-Parameter

	Fucoxanthin	Caulerpenin
Capillary Voltage	3000 V (positiver Modus)	3000 V (positiver Modus)
Sample Cone	50 V	30 V
Source Temperature	120 °C	120 °C
Desolvation Temperature	300 °C	300 °C
Cone Gas Flow	25 l h <sup>-1</sup>	35 l h <sup>-1</sup>
Desolvation Gas Flow	750 l h <sup>-1</sup>	750 l h <sup>-1</sup>
Collision Energy	5 V	5 V



**Abb. 5.1:** A) Für die RR-Messungen fixierte Thallusspitze von *F. vesiculosus* in einer Petrischale. B) Auf einem Quarzobjektträger mit zwei Glaskapillaren fixierter Assimilator von *C. taxifolia*, vorbereitet für die FT-Raman-Messungen. C) Eine für die CARS-Messung vorbereitete Probe eines Stolonabschnitts von *C. taxifolia*.

Ocean gefüllte Petrischalen (Ø 8,5 cm) überführt und mit Hilfe eines Glasrahmens bestehend aus zwei Glaskapillaren und Heißkleber fixiert (siehe Abbildung 5.1 A). Es wurde bei der Vorbereitung darauf geachtet, dass es zu keinem Kontakt zwischen dem Heißkleber und dem Algenstück und keiner weiteren mechanischen Verletzung des Untersuchungsobjekts durch die Glaskapillaren kam. Auf die gleiche Weise, mit Ausnahme des Zerteilens des jeweiligen Algenindividuums, wurden auch die Proben für die RR-Messungen von *Ulva* sp. vorbereitet.

### FT-Raman-Spektroskopie

Als Vorbereitung für die FT-Raman-Messungen an Assimilatoren der Grünalgen *C. prolifera* und *C. taxifolia* wurden je ein Assimilator der frischen, gesunden Algen mit einem Schnitt durch die Mitte der angrenzenden Stolonabschnitte von dem restlichen Algenindividuum abgeteilt. Den jeweiligen Teilstücken wurde durch eintauchen im künstlichen Seewasser (Instant Ocean) für 5 min in die Möglichkeit gegeben, einen Wundverschluss auszubilden.

Anschließend wurden die abgetrennten Assimilatoren auf Objektträgern aus Quarzglas mit Hilfe von zwei Glaskapillaren und Heißkleber fixiert (siehe Abbildung

5.1 B). Es wurde hierbei darauf geachtet, dass es zu keinerlei Verletzung des verwendeten Algenindividuums durch den ausgeübten Druck der Glaskapillare oder Hitzeverletzungen aufgrund eines Kontaktes mit dem Heißkleber kam. Nachdem der Heißkleber ausgetrocknet war (40 s), wurde die Alge mit Instant Ocean beträufelt bis sie komplett von Instant Ocean bedeckt war. Da die Objektträger keinen erhöhten Rand besitzen, wurde vor jeder Messung stets darauf geachtet, dass die Alge mit genügend Flüssigkeit versorgt war. Die Vorbereitung zur Messung an Rhizoiden oder Stolonen erfolgte auf die gleiche Weise.

Für die Messungen des zeitlichen Verlaufes des Wundverschlusses wurde der Zeitpunkt der Abtrennung, des ersten, sowie weiterer und des letzten Messpunktes notiert. Darüber hinaus erfolgte hier bei einigen Präparaten auch die Verwundung an der bereits auf dem Objektträger fixierten und sich in ausreichend Kulturmedium befindenden Alge.

### CARS-Spektroskopie

Ähnlich wie die Probenvorbereitung zur FT-Raman-Spektroskopie (siehe Seite 105) wurde auch für die CARS-Spektroskopie je ein Assimilator der Grünalgen *C. proliferata* und *C. taxifolia* mit einem Schnitt durch die Mitte der angrenzenden Stolonabschnitte von dem restlichen Algenindividuum abgeteilt. Nach Ausbildung des Wundverschlusses im künstlichen Seewasser (Instant Ocean) konnte die Alge auf ein großes Deckgläschen (24 cm x 24 cm) mit einer Dicke von 0,13 mm–0,17 mm positioniert werden. Das Deckgläschen war im Vorfeld auf einer Objektträgerhalterung mit doppelseitigem Klebeband fixiert worden. Bei Bedarf wurde der abgetrennte Assimilator mit Hilfe von Glaskapillaren und Heißkleber auf dem Deckgläschen fixiert. Auch die Vorbereitung zur Messung an Rhizoiden oder Stolonen erfolgte auf die gleiche Weise (siehe Abbildung 5.1 C). Die Alge wurde vor der Messung und nach der Messung mit ausreichend Instant Ocean beträufelt.

### 5.3.2 Extraktion von Oberflächenmetaboliten mit C<sub>18</sub>-Material

Für die Extraktion von Oberflächenmetaboliten der Algen *F. vesiculosus* und *C. taxifolia* mittels C<sub>18</sub>-Material wurden zwei verschiedenen modifizierte und mit unterschiedlicher Partikelgröße kommerziell erhältliche C<sub>18</sub>-Materialien verwendet. Hauptsächlich wurde das nicht vollständig modifizierte (not endcapped) Silica Gel 100 C<sub>18</sub>-Material mit einer Porengröße von 40 µm–63 µm verwendet (Fluka, Sigma Aldrich, Deutschland). Darüber hinaus wurde auch getestet, ob sich das vollständig modifizierte (fully endcapped) Silica Gel 100 C<sub>18</sub>-Material mit einer Porengröße von 15 µm–25 µm als Absorber-Material für die C<sub>18</sub>-Methode eignet.

Die Extraktion von Oberflächenmetaboliten mittels C<sub>18</sub>-Material erfolgte in mehreren Schritten. Im ersten Schritt wurden die Algen den Aquarien entnommen und

für eine Minute so positioniert, dass überschüssiges, an der Oberfläche anhaftendes Wasser abtropfen konnte. Danach wurden die Algenhalli gleichmäßig beidseitig mit C<sub>18</sub>-Material bepudert bis sie vollständig bedeckt waren. Hierbei wurden im Laufe der Methodenentwicklung verschiedene Varianten für das Aufbringen des C<sub>18</sub>-Materials auf die Algenoberfläche ausprobiert. Neben einfachem Drauf streuen des Materials zeigte sich ein Schwenken der Alge in einer mit C<sub>18</sub>-Material gefüllten Petrischale oder Tüte als die Variante mit dem schnellstmöglichen gleichmäßigen Bedecken der Alge und einem geringeren C<sub>18</sub>-Materialverbrauch. Für die Beprobung von einer 20 cm<sup>2</sup> großen Fläche der Braunalge *F. vesiculosus* wurde 0,3 g C<sub>18</sub>-Material benötigt.

Nach dem Aufbringen des C<sub>18</sub>-Materials erfolgte ein Zeitraum in dem die Alge nicht bewegt wurde und den Metaboliten der Algenoberfläche die Möglichkeit gegeben, wurde mit dem C<sub>18</sub>-Material Bindungen einzugehen. In Versuchen mit verschiedenen "Einwirkzeiten" von 30 s–600 s stellten sich 60 s als der Zeitraum heraus, nach dem sich auf dem C<sub>18</sub>-Material ausreichend Metabolite gesammelt hatten und das Material leicht von der Alge herunter gewaschen werden konnte.

Anschließend wurde das C<sub>18</sub>-Material mit künstlichem Seewasser, dessen Salinität an die jeweilige Alge angepasst war, mit Hilfe einer Spritzflasche von der Alge herunter gespült und durch einen angelegten Unterdruck in einer Kartusche aufgefangen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das C<sub>18</sub>-Material in der Kartusche nicht austrocknete sondern immer mit Flüssigkeit umgeben war. Das sich im künstlichen Seewasser befindende C<sub>18</sub>-Material wurde mehrfach mit entionisiertem Wasser gespült, um anhaftendes Salz von der Probe zu waschen. Im letzten Schritt folgte die Elution der an das C<sub>18</sub>-Material gebundenen Oberflächenmetabolite der Alge durch die Zugabe von 10 ml Methanol (Sigma-Aldrich, Deutschland). Das methanolisch-wässrige Extrakt wurde aufgefangen und in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator bei 30 °C bis zur Trocknung eingeeengt, um anschließend in 200 µl Methanol resuspendiert zu werden. Erfolgt die weiteren Messungen nicht am selben Tag, wurden die Extrakte bei –20 °C tiefgefroren.

Zum Ermitteln der eingesetzten Fläche mit Hilfe des Bildanalyseprogramms "Image J" (Rasband, W.S, 1997) wurde die Alge nach der Behandlung unter einer Glasplatte flach fixiert und fotografiert. Untersuchungen der Algenoberfläche auf jegliche Verletzung durch das C<sub>18</sub>-Material erfolgten mittels Bildanalyse von Mikroskopieschnitten (siehe Abschnitt 5.4.2)

Um die Effizienz des Abspülvorganges bei einer bekannten Menge von C<sub>18</sub>-Material zu analysieren, wurde die zum Auffangen des C<sub>18</sub>-Materials benutzten Kartuschen vor und nach dem Auffangen und Trocknen des C<sub>18</sub>-Materials gewogen. Des weiteren wurden auch Versuche zur Effizienz der Extraktion mit C<sub>18</sub>-Material durchgeführt bei denen mehrere Thalli-Stücke mehrfach hintereinander mit C<sub>18</sub>-Material beprobt wurden.

### 5.3.3 Extraktion von Oberflächenmetaboliten mit der Dipping-Methode

Die Metaboliten der Algenoberfläche wurden mit der Dipping-Technik nach dem für *F. vesiculosus* von Lachnit *et al.* (2010) entwickelten Protokoll extrahiert.

Hierfür wurden die Thallusspitzen von *F. vesiculosus* für 5 s in 60 ml gerührtes Methanol/Hexan (beide Lösungsmittel von Sigma-Aldrich, Deutschland) im Verhältnis 1:1 gehalten. Es wurde darauf geachtet, dass die Thallusspitzen nicht den Rührvorgang beeinflussten. Ein Unterbrechen des Rührvorgangs führt zu einer Entmischung der Methanol/Hexan-Emulsion an der Algenoberfläche, was wiederum zu eventuellen Verletzung dieser durch den Einfluss des Methanols auf die Zelloberflächen führen kann. Das erhaltene Extrakt wurde im Anschluss mit einem Rotations-Vakuum-Konzentrator bei 30 °C bis zur Trocknung eingeengt, in 1 ml Methanol wieder aufgenommen und bis zu den weiteren Messungen bei -20 °C tiefgefroren.

Die beprobten Algenspitzen wurden nach der Behandlung mittels einer Glasscheibe flach fixiert und fotografiert. Mit diesen Fotos und dem Programm "Image J" (Rasband, W.S, 1997) konnte anschließend die Fläche in  $cm^2$  der beprobten Alge ermittelt werden.

## 5.4 Überprüfung der Algen auf Verwundung

### 5.4.1 Verwundung bei Raman- und CARS-Spektroskopie

#### Resonanz-Raman-Spektroskopie

Zum Überprüfen der Alge auf Verletzungen durch den in der RR-Spektroskopie verwendeten Laser, wurden vor und nach jeder Messung Bilder von den untersuchten Algenhalli-Bereichen mit dem zum Versuchsaufbau gehörenden Mikroskop-Kamerasystem (BX40, Olympus, Japan) aufgenommen. Darüber hinaus wurden die Algenstücke nach der Behandlung mittels des Anfärbens mit einer 0,05 % Evans Blue-Lösung (PSU 12) mikroskopisch auf verletzte Zellen an der Oberfläche hin untersucht (Weinberger *et al.*, 2005; Taylor & West, 1980). Hierbei dienten Algenstücke, die nicht mit dem Raman-Aufbau gemessen wurden, allerdings vom gleichen Individuum stammten und ebenfalls mit Evans Blue angefärbt wurden, als Kontrolle.

#### FT-Raman-Spektroskopie

Schon während der Messung war es Möglich den Gehalt an Wasser der vermessenen Probe durch die typische Bande für die O-H-Streckschwingung für Wasser bei  $3500\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Somit konnte indirekt auf den Zustand der Alge geschlossen werden, was bei bei einem deutlichen sinken der Signalintensität der typischen

Bande während der Messungen, zu einem frühzeitigen Abbruch Raman-Messung führte.

Die untersuchten Fragmente der Algen *C. prolifera* und *C. taxifolia* wurden vor und nach jeder Messung mit einer Canon PowerShot SX200 IS (Super Makro Modus) fotografiert. So konnte visuell sichergestellt werden, dass die gerade zuvor aufgenommenen Raman-Spektren die Algen-Fragmente nicht in Form von Verbrennungen verletzt haben. Nach der Behandlung wurden die Algen in ein belüftetes Aquarium überführt und in den folgenden sieben Tagen visuell auf Verwundungen überprüft, um einen lang anhaltenden Einfluss durch die Probenvorbereitung oder durch die Messmethode auszuschließen.

### CARS-Spektroskopie

Ähnlich wie bei der Untersuchung zur Schädigung bei der FT-Raman-Messung wurden Vorher/Nachher- Aufnahmen der untersuchten Algenteile von *C. prolifera* und *C. taxifolia* mittels einer Canon PowerShot SX200 IS (Super Makro Modus) erstellt. So konnte visuell sichergestellt werden, dass der verwendete Laser die Alge nicht in Form einer Verbrennung verletzt hatte. Darüber hinaus wurden die Algen nach der Behandlung in ein belüftetes Aquarium überführt und in den folgenden sieben Tagen visuell auf Folgeschäden hin überprüft. Zudem wurde der Laser zwischen den Messungen vor den Erreichen der Algenoberfläche blockiert, um der Alge möglichst wenig Stress zuzumuten.

### 5.4.2 Verwundung der Algen bei Extraktion mit C<sub>18</sub>-Material und Dipping

Die mit der C<sub>18</sub>- oder Dipping-Methode untersuchten Algen wurden mikroskopisch hinsichtlich verschiedener Verletzungen an den Oberflächenzellen untersucht.

Für Algen der Gattung *Caulerpa* wurden mikroskopische Aufnahmen der Spitze und mittlerer Thallus-Bereiche vor und nach der jeweiligen Behandlung aufgenommen und miteinander verglichen. Veränderungen konnten so visuell festgestellt werden. Für einen Einfluss der Dauer der Behandlung auf die Algen wurden die schon erwähnten Thallus-Bereiche während eines Zeitraums von bis zu 2 Tagen fotografiert (vor und nach der Behandlung nach 1 Stunde nach 2 Stunden nach 24 Stunden und nach 48 Stunden). Als Kontrolle dienten Algen, die bis auf die Behandlung mit C<sub>18</sub>-Material oder dem Dipping, gleich behandelt worden sind, d.h. dass sie sich für den gleichen Zeitraum wie für die jeweilige Behandlung nicht im Aquarium befanden.

Die Algen der Gattung *Fucus* wurden neben den visuellen Beobachtungen der Oberfläche auch noch auf verletzte Oberflächenzellen hin angefärbt. Hierzu wurden behandelte sowie unbehandelte Algenstücke des gleichen Individuums mit steril gefiltertem (2 µm) Instant Ocean abgespült und anschließend in einer 0,05 % Evans

Blue-Lösung (PSU 12) für 30 Minuten angefärbt (Weinberger *et al.*, 2005; Taylor & West, 1980; Lachnit *et al.*, 2010). Anschließend wurden die Algenstücke mit künstlichem Seewasser (Instant Ocean) abgespült und möglichst dünne ca. 1 cm<sup>2</sup> Mikroskopieschnitte angefertigt. Es zeigte sich, dass es das Mikroskopieren erleichterte, wenn die Algenstücke in Agar eingebettet waren. Zudem konnten die Proben, versiegelt mit Nagellack, auch noch nach einigen Tagen ausgewertet werden, ohne dass sich in der Zwischenzeit die Qualität der Proben verändert hatte. Fotografische Aufnahmen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (DM2000, Leica, Heerbrugg, Schweiz) ausgestattet mit einem Kamerasystem (DFC280, Leica, Heerbrugg, Schweiz) und der Software "Leica IM50" (Version 4.0) aufgenommen. Die Bildaufnahmeeinstellungen wurden während eines Experimentes nicht verändert. Allerdings kam es aufgrund von unterschiedlich stark pigmentierten Algenmaterial zu den verschiedenen Jahreszeiten zu einer Anpassung der Belichtungszeit auf das jeweilige Experiment. Die Bilder wurden sowohl mit einem Objektiv 10-facher als auch 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Im Anschluss erfolgte die weitere Auswertung anhand einer Rot/Grün/Blau-Analyse (Additiver Farbraum der Farben Rot, Grün, Blau (RGB)-Analyse) der mikroskopischen Aufnahmen mittels des Programms „GIMP“ (Spencer *et al.*, 2012). Durch eine Verletzung der Algenoberfläche treten die Pigmente aus der Zelle aus und die Alge verändert so ihre Farbe. Die so erhaltenen Werte bildeten die Grundlage weiterer Berechnungen wie Mittelwert, Standardabweichung und der grafischen Darstellung.

## 5.5 Herstellung der Standards

### 5.5.1 Fucoxanthin und $\beta$ -Carotin

Die für die RR-, FT-Raman- und UPLC-MS-Messungen benötigten Standards von Fucoxanthin (**2**) und  $\beta$ -Carotin (**5**) wurden auf Basis käuflich erworbener Extrakte der Metabolite (Sigma-Aldrich, Deutschland) hergestellt. Die benötigten Konzentrationen sind in den jeweiligen Abschnitten der Messungen in denen sie verwendet worden sind angegeben.

### 5.5.2 Extraktion von Caulerpenin aus *C. taxifolia* und *C. prolifera*

Der für diese Arbeit benötigte Standard des Caulerpenins (**3**) wurde aus frischem *C. taxifolia* und *C. prolifera*-Material nach dem Protokoll aus der Dissertation von Weißflog (2010) gewonnen. Das frische Algenmaterial stammte von den in Abschnitt 5.1.1 schon aufgeführten Händlern oder von unserem Kooperationspartner Levent Cavas von der Dokuz Eylul Universität, Izmir. Das frische Algenmaterial wurde wie im Protokoll von Weißflog (2010) beschrieben mit Zellstoff abgetupft,

gewogen und extrahiert. Bei kleinen Mengen an Algenmaterial kann durch das Mörsern bedingte Zerstören der Algenzelle die Ausbeute an Caulerpenin (**3**) durch die einsetzende Caulerpenin-Esterase-Reaktion stark vermindert werden. Das Inaktivieren der Esterasen durch das kurze (3 min) Kochen des Algenmaterials führt daher zu einer höheren Ausbeute an Caulerpenin (**3**). Da jedoch bei der Durchführung der Extraktion immer ausreichend Algenmaterial (bis zu 5 kg) vorhanden war, wurde auf das deaktivieren der Algenenzyme mittels Kochen zur Verbesserung der Ausbeute verzichtet.

Das abgetupfte Algenmaterial wurde im Anschluss mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem handelsüblichen Metallstabmixer zu einem groben Pulver verarbeitet. Dieses Pulver wurde im noch gefrorenen Zustand in Ethylacetat (ca. 2 ml EtOAc /g Alge, Sigma-Aldrich, Deutschland) suspendiert und unter Rühren mindestens 1 h bzw. bis zur vollständigen Erwärmung auf Raumtemperatur extrahiert. Im Anschluss an die Extraktion wird das feste Algenmaterial durch Filtration über Kieselgel abgetrennt und das Kieselgel mehrmals mit Ethylacetat gespült. Die organischen Phasen wurden vereinigt und zur Entfernung von Fettsäuren mit einer gesättigten Kaliumcarbonatlösung (2 x 1 ml pro ml Ethylacetat) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfung, wurde das so erhaltene Rohextrakt säulenchromatographisch an Silicagel mit einem Lösungsmittelgemisch aus Petrolether/Ethylacetat (7/3, v/v) aufgereinigt. Um die noch enthaltenen Sterole zu entfernen, wurde das erneut mittels Rotationsverdampfung eingeengte Rohextrakt aus der vorherigen säulenchromatographischen Trennung, nochmals an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (3/1, v/v) aufgetrennt. Nach einer weiteren Elution mit Petrolether/ Diethylether (5/5, v/v) auf der selben Säule konnte reines Caulerpenin (**3**) gewonnen werden.

Insgesamt wurde während des Zeitraums zur Anfertigung dieser Arbeit mehrfach in Zusammenarbeit mit dem Diplomchemiker Phillipp Richter und Dr. Jerrit Weißflog Caulerpenin (**3**) aus Individuen von *C. taxifolia* und *C. prolifera* extrahiert.

## 5.6 Synthesen

### 5.6.1 Produkte aus Caulerpenin, Protein und Esterase

Mögliche Produkte die bei der Reaktion von Caulerpenin (**3**) mit Esterasen und Proteinen entstehen wurden in Anlehnung an die Proteinquervernetzungsprodukte aus der Dissertation von Weißflog (2010) synthetisiert. Diese wurden mittels FT-Raman-Spektroskopie (siehe Abschnitt 5.2.1) vermessen und mit den Messungen des Wundverschlusses von *C. taxifolia* verglichen.

Es wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

**Tab. 5.4:** Caulerpenin-, Protein-, Esterase- Mischungen für die FT-Raman-Messungen

Lösung	Caulerpenin	Esterase	Ovalbumin	dest. H <sub>2</sub> O
1	40 µl	40 µl	60 µl	40 µl
2	40 µl	40 µl		100 µl
3	60 µl	-	40 µl	80 µl

### Hydrogencarbonatpuffer

Um eine 10-fache Stammlösung des Hydrogencarbonatpuffers herzustellen, wurden 21 g Natriumhydrogencarbonat und 1 g Natriumazid in 400 ml dest. Wasser gelöst und mit verdünnter Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Vor Nutzung der Lösung wurde diese 1:10 mit dest. Wasser verdünnt.

### Ovalbuminstammlösung

Hierfür wurden 25 mg Albumin aus Hühnereiweiß (Sigma-Aldrich, Deutschland) in 0,5 ml Hydrogencarbonatpuffer (pH = 8,3) gelöst.

### Schweineleberesterase

Es wurden 1 mg Schweineleberesterase (165 mg mg<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Deutschland) in 0,25 ml Hydrogencarbonatpuffer (pH = 8,3) gelöst

### Caulerpenin (3)

Für eine Caulerpeninstammlösung von 10 mg ml<sup>-1</sup> in reinem Wasser/Methanol wurden 100 µl einer methanolischen Lösung (100 mg ml<sup>-1</sup>) in 900 mg ml<sup>-1</sup> reinem Wasser suspendiert.

Die verschiedenen Stammlösungen wurden wie in Tabelle 5.4 zusammenpipettiert, wobei die Esterase immer zuletzt zugegeben wurde. Die Lösungen wurden für eine Stunde auf dem Vortexer kontinuierlich geschüttelt, anschließend in NMR-Röhrchen überführt und am Multi-Ram-Raman-Spektrometer vermessen.

### 5.6.2 Caulerpenin-Amin-Reaktion nach Guerriero et al.

Die von Guerriero *et al.* (1995) gezeigten Reaktionsprodukte von Caulerpenin (**3**) mit Butylamin wurden nach der Vorschrift von Guerriero *et al.* (1995) synthetisiert.

Für die Synthese wurden 50 mg Caulerpenin (**3**) in 25 ml Methanol (Sigma-Aldrich, Deutschland) unter Zugabe von Butylamin 0,91 mmol (Sigma-Aldrich, Deutschland), für 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels durch

Rotationsverdampfung wurde der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel, erst mit Diethylether gefolgt von Ethylacetat/Methanol (4:1, v/v) als Eluenten, getrennt. Die Diethylether-Fractionen wurden mittels RP-HPLC (siehe Abschnitt 5.2.2) weiter fraktioniert. Die erhaltenen Fractionen wurden mittels Rotationsverdampfung eingengt und in 450  $\mu$ l MeOH (Sigma-Aldrich, Deutschland) aufgenommen. Von den mehr polaren Ethylacetat/Methanol-Fractionen wurde diejenige Fraction eingengt und in MeOH aufgenommen, die bei der durchgeföhrteten Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat/Methanol/Butylamin (98:10:2, v/v/v) als Eluenten eine Substanz mit einem Rf-Wert von 0,5 aufwiesen.

Im Anschluss wurden die Strukturen der Produkte mittels UPLC-MS-Messungen (siehe Abschnitt 5.2.2) überprüft. Hierbei konnte das laut der Vorschrift von Guerriero *et al.* (1995) vermutete Caulerpenin-Amin-Derivat (Metabolit (**6**)) eindeutig aufgrund seines  $[M+H]^+$  bei 268 m/z in einem der Extrakte identifiziert werden (Chromatogramm und Spektrum siehe Anhang Seite 141). Die für die Identifizierung der Metabolite aufgenommenen NMR und COSY-Spektren wurden von Phillipp Richter ausgewertet. Besonders die Auswertung der aufgenommenen komplexen  $^1H$ -NMR-Spektren gestaltet sich hierbei als sehr schwierig, da ein Gemisch aus vier *E*- und *Z*-Isomeren vorlag. Allerdings lassen sich die Signale der drei aromatischen Protonen des Pyrrols erkennen. Leider ist die Aufspaltung der einzelnen aromatischen Protonen wegen Überlagerung mit anderen Signalen nicht erkennbar. Im ebenfalls vorhandenen H,H-COSY-Spektrum zeigte sich allerdings eine Kopplung zwischen diesen drei Signalen, was auf die Präsenz einer Pyrrolringstruktur schließen lässt. Abschließend wurden die erhaltenen Extrakte mittels FT-Raman-Spektroskopie (siehe Abschnitt 5.2.1) gemessen und die daraus resultierenden Spektren mit den Wundverschluss-Spektren von *C. taxifolia* verglichen.

## 5.7 Auswertung

### 5.7.1 Raman- und CARS-Ergebnisse

#### Auswertung der Resonanz-Raman-Spektren

**Untergrundkorrektur und Berechnung der Gradienten** Für die Auswertung der aufgenommenen RR-Spektren wurden die Messdaten in das Statistikprogramm R geladen und mit Hilfe des Paketes Peaks Morhac (2008) untergrundkorrigiert (4 Ordnung) und geglättet Team (2012). Im Anschluss daran wurde die Resonanz verstärkte Bande der C=C-Schwingung ( $\nu_1$ ) für die weiteren Auswertungen ausgewählt und die Fläche der Bande mittels eines Gaussfits bestimmt. Hierfür wurde das Programm Origin verwendet. Die so erhaltenen Peakflächen der Banden wurden gegen die jeweiligen Messpositionen Spektren (z. B. 50  $\mu$ m von der Algenoberfläche in z-Richtung entfernt) aufgetragen.

**Erstellen des Maps (Falschfarbenbildes)** Die Raman Bande bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  (C=C Schwingung) wurde verwendet, um die räumliche Verteilung der Carotinoide auf einem  $50 \times 50$  Messpunkte grossen Bereich der Alge in einem Falschfarbendbild darzustellen. Hierzu wurden die in diesem Bereich aufgenommenen Spektren wie schon beschrieben untergrundkorregiert und die Intensität der Bande bei  $1528\text{ cm}^{-1}$  (C=C Schwingung) in das Programm Origin eingelesen und als Konturplot dargestellt. Die Farbfüllung erfolgte bis zu den Konturlinien.

**Bestimmung der Konzentration an Fucoxanthin in der laminaren Grenzschicht von *C. taxifolia*** Die Berechnung der Konzentration an Fucoxanthin (2) in der laminaren Grenzschicht beruht auf der Annahme, dass sich der in der Studie von Saha *et al.* (2011) ermittelte Gesamtfucoxanthingehalt, in einem Bereich zwischen Algenoberfläche und  $150\text{ }\mu\text{m}$  von dieser entfernt befindet. Aufgrund dieser Annahme konnte eine durchschnittliche Konzentration von  $580\text{ }\mu\text{M}$  für diesen Bereich kalkuliert werden. In einem weiteren Schritt konnte durch Integration der für Fucus ermittelten Gradienten (Vergl. Abbildung 3.14) die lokale Fucoxanthin-Konzentration ermittelt werden.

### Auswertung der FT-Raman-Spektren

#### Untergrundkorrektur, Glättung, Normierung und Bildung von Mittelwertspektren

Die mit dem Multi-Ram-Spektrometer aufgenommenen FT-Raman-Spektren wurden mit Hilfe der Pakete Peaks und Libre des Statistikprogramms R (Team, 2012; Morhac, 2008) untergrundkorregiert (4 Ordnung). Die Spektren zur Ermittlung der Verteilung von Caulerpenin innerhalb der intakten Assimilatoren von von *C. taxifolia* und *C. prolifera* (siehe Seite 82) wurde zusätzlich noch geglättet.

Für die Auswertung der Messungen zum Wundverschluss wurden die Spektren auf die für den jeweiligen Wundverschlussabschnitt oder die in den intakten Alge charakteristischen Schwingungsbanden normiert. Aufgrund ihrer jeweiligen charakteristischen Zusammensetzung wurden die Spektren verschiedenen Zonen des Wundverschlusses zugeordnet. Aus den so sortierten Spektren wurden die Mittelwertspektren inklusive Standardabweichung der jeweiligen Zone gebildet. Hierfür wurden die normierten y-Werte aller Spektren einer Zone für einen x-Wert erst aufsummiert und anschließend durch die Anzahl der aufsummierten y-Werte dividiert. Letztendlich wurden die so erhaltenen Mittelwertspektren noch auf die  $\text{CH}_2$  Schwingungsbande normiert um die Intensität der Spektren-Banden zwischen den verschiedenen Zonen der Alge vergleichen zu können.

Die Spektren der gemessenen Standards wurden ebenfalls untergrundkorregiert und mit dem Programm R graphisch dargestellt. Auch die Spektren Graustufenkarten wurden untergrundkorregiert sowie auf die  $\text{CH}_2$  Schwingungsbande normiert und geglättet.

Alle hier abgebildeten Spektren der FT-Raman-Messungen wurden mit dem Programm R (Team, 2012) erstellt.

**Erstellen der Graustufenkarte** Anhand der untergrundkorrigierten, normierten und geglätteten Spektren wurde mittels des Programms R eine Graustufenkarte für die Intensität der C≡C-Bande des Caulerpenins (**3**) erstellt.

Hierfür wurde die integrierte Fläche unter der Bande für die C≡C-Streckschwingung ( $2187\text{ cm}^{-1}$ ) für die einzelnen Messpunkte ermittelt und in Form von Grauabstufungen je Flächenanteil dargestellt. Hierbei ist zu Beachten das nur Messpunkte in die Darstellung aufgenommen worden sind deren Spektrum ein deutliches Signal an der gesuchten Bandenposition gegenüber des angrenzenden Rauschens auf der x-Achse aufwies. Als Kriterium für ein deutliches Signal musste hierbei die integrierte Fläche der Banden bei  $2187\text{ cm}^{-1}$  mit den Grenzen bei  $2172\text{ cm}^{-1}$  und  $2202\text{ cm}^{-1}$  größer sein als 3,5 mal die integrierte Fläche um die Bande herum mit den Grenzen  $2000\text{ cm}^{-1}$  und  $2500\text{ cm}^{-1}$  (Gleichung 5.1).

$$\frac{\int_{2172}^{2202} f(x)d(x)}{2202 - 2172} > 3,5 \frac{\int_{1665}^{2165} f(x)d(x)}{1665 - 2165} \quad (5.1)$$

Zur Bestimmung der für  $\beta$ -Carotin (**5**) charakteristischen C=C-Streckschwingung wurde die gleiche Formel, mit zur relativen Wellenzahl ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) und Breite dieser Bande angepassten Grenzen ( $1500\text{ cm}^{-1}$ – $1550\text{ cm}^{-1}$ , 5.2), verwendet.

$$\frac{\int_{1500}^{1550} f(x)d(x)}{1500 - 1550} > 3,5 \frac{\int_{1665}^{2165} f(x)d(x)}{1665 - 2165} \quad (5.2)$$

In den Graustufenkarten sind demnach Messpositionen deren Spektren aufgrund von Gleichung 5.1 und 5.2 verworfen worden sind als weiße Fläche mit entsprechender Nummerierung der Messposition dargestellt. Des weiteren werden fehlende Daten aufgrund von nicht erfassten Bereichen der Alge durch das Messgitter oder Probleme der Messsoftware Opus als vollkommen weiße Bereiche dargestellt.

**Berechnung der strukturellen Eigenschaften des Caulerpenins und seiner Derivate mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT)** Die Strukturellen und Elektronischen Eigenschaften des Caulerpenins (**3**) und seiner möglichen Proteinquervernetzenden Derivate wurden mittels quantenchemischen Berechnungen unter Verwendung des Programms GAUSSIAN 09 Frisch *et al.* (2009) von Dipl. Chem. Maximilian Bräutigam durchgeführt. Sowohl die Geometrie als auch die Schwingungsfrequenzen und die

Normalkoordinaten des Grundzustandes wurden hierbei durch die Kalkulation der Mittelwerte der (DFT) unter Verwendung der B3LYP Dichtefunktion durchgeführt. Das 6-311G Basis Set wurde für alle Atome angewendet. Um die fehlende inharmozität und die annähernde Betrachtung der Elektronen Kolloration zu korrigieren (Merrick *et al.*, 2007) wurden die harmonischen Frequenzen mit dem Faktor 0.97 skaliert. Alle für diese Rechnungen dargestellten Abbildungen der Strukturen mit den Verschiebungs-Vektoren wurden unter Verwendung des Programm Gabedit (Allouche, 2010) und POVray (Persistence of Vision Pty. Ltd., 2004) erstellt.

### Auswertung der CARS-Aufnahmen

Für die Auswertung der mittels CARS-Spektroskopie erhaltenen Aufnahmen wurde zuerst die jeweilige Wellenzahl ( $\nu_{vib}$ ) berechnet bei der das CARS-Bild aufgenommen wurde.

Hierfür wurde die Differenz der Wellenzahl des verwendeten Pump- ( $\nu_p$ ) und des Stoke-Lasers ( $\nu_s$ ) ermittelt, welche dem der gesuchten Wellenzahl  $\nu_{vib}$  entspricht. Da sich die Wellenzahl ( $\nu$ ) aus der Wellenlänge ( $\lambda$ ) mit  $1/\lambda$  (cm) berechnen lässt, ergibt sich aufgrund der in dieser Arbeit bekannten Wellenlängen des Pump- und Stokes-Lasers ( $\lambda_{pump}$ ,  $\lambda_{stokes}$ , nm) folgende Gleichung:

$$\nu_{vib} = \frac{10^7}{\lambda_{pump}} - \frac{10^7}{\lambda_{stokes}} \quad (5.3)$$

Die CARS-Bilder wurden im Anschluss hinsichtlich ihrer berechneten Wellenzahl sortiert. Die mittels des Programms LSM 5 (Zeiss, Deutschland) als JPEG gespeicherten Bilder des aufgenommenen CARS-Kanals wurden visuell im Vergleich mit den nicht resonanten Aufnahmen ausgewertet. Eine weitere detaillierte Berechnung war aufgrund des großen Störsignals nicht möglich.

### 5.7.2 MS-Spektren

Die Auswertung der in dieser Arbeit gemessenen Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit der Software MassLynx® 4.1. Die Peakintegration für die Auswertung der Extrakte mittels C<sub>18</sub>-Methode erfolgte mit dem Programm QuanLynx®. Die weitere Auswertung und Darstellung der hierbei erhaltenen Daten erfolgte mit dem Statistik Program R (Team, 2012) und ist in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

## Literaturverzeichnis

- Adolph S, Jung V, Rattke J, Pohnert G: Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**. 44(18):2806–2808.
- Albrecht AC: On the theory of Raman intensities. *The Journal of Chemical Physics* **1961**. 34(5):1476.
- Allouche AR: Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. *Journal of computational chemistry* **2010**. 32(1):174–182.
- Amade P, Lemée R: Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. *Aquatic Toxicology* **1998**. 43(4):287–300.
- Amsler CD (Hg.): *Algal chemical ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1 Auflage, **2007**.
- Andras TD: Seaweed allelopathy against coral: surface distribution of seaweed secondary metabolites by imaging mass sepectrometry. Dissertation, Georgia Institute of Technology, Georgia, **2012**.
- Annesley TM: Ion suppression in Mass spectrometry. *Clin Chem* **2003**. 49(7):1041–1044.
- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, Mourão PAS: Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology* **2005**. 15(1):11–20.
- Armstrong E, Yan L, Boyd KG, Wright PC, Burgess JG: The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* **2001**. 461(1-3):37–40.
- Baena J, Lendl B: Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current opinion in chemical Biology* **2004**. 8(5):534–539.
- Ballard L, Glasgow L, Hoskins L, Krohe T: The resonance Raman excitation profile of fucoxanthin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1989**. 45(12):1235–1238.

- Barbier P, Guise S, Huitorel P, Amade P, Pesando D, Briand C, Peyrot V: Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. *Life sciences* **2001**. 70(4):415–429.
- Beeker WP, Groß P, Lee CJ, Cleff C, Offerhaus HL, Fallnich C, Herek JL, Boller KJ: A route to sub-diffraction-limited CARS Microscopy. *Optics Express* **2009**. 17(25):22632–22638.
- Begley RF, Harvey AB, Byer RL: Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Applied Physics Letters* **1974**. 25(7):387–390.
- Bernstein BB, Jung N: Selective pressures and coevolution in a kelp canopy community in southern California. *Ecological Monographs* **1979**. 49(3):335–355.
- Bertram U, Bodmeier R: Parameters affecting the drug release from in situ gelling nasal inserts. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2006**. 63(3):310–319.
- Bianchi T, Kautsky L, Argyrou M: Dominant chlorophylls and carotenoids in macroalgae of the Baltic Sea (Baltic proper): their use as potential biomarkers. *Sarsia: a Norwegian Journal of Marine Biology* **1997**. 82:55–62.
- Bjornland T, Aguilar-Martinez M: Carotenoids in red algae. *Phytochemistry* **1976**. 15(2):291–296.
- Blinks LR: The Photosynthetic Function of Pigments other than Chlorophyll. *Annual Review of Plant Physiology* **1954**. 5(1):93–114.
- Boudouresque CF, Lemée R, Mari X, Meinesz A: The invasive alga *Caulerpa taxifolia* is not a suitable diet for the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquatic Botany* **1996**. 53(3):245–250.
- Box A, Sureda A, Tauler P, Terrados J, Marbà N, Pons A, Deudero S: Seasonality of caulerpenyne content in native *Caulerpa prolifera* and invasive *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* in the western Mediterranean Sea. *Botanica Marina* **2010**. 53(4).
- Box A, Sureda A, Terrados J, Pons A, Deudero S: Antioxidant response and caulerpenyne production of the alien *Caulerpa taxifolia* (Vahl) epiphytized by the invasive algae *Lophocladia lallemandii* (Montagne). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2008**. 364(1):24–28.
- Brahma SK, Hargraves PE, Howard WF, Nelson WH: A resonance Raman method for the rapid detection and identification of algae in water. *Applied Spectroscopy* **1983**. 37(1):55–58.

- Brandmüller J, Hacker H, Schrötter HW: Photoelektrische Registrierung der Raman-Spektren farbiger Substanzen mit He-Ne-6328 Å-Laser-Erregung. *Chemische Berichte* **1966**. 99(3):765–775.
- Braune W (Hg.): *Meeresalgen: Ein Farbbildführer zu den verbreiteten benthischen Grün-, Braun- und Rotalgen der Weltmeere*. Gantner, A R, 1 Auflage, **2008**.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Hg.): *Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag, Basel, 1 Auflage, **1994**.
- Brock E, Nylund GM, Pavia H: Chemical inhibition of barnacle larval settlement by the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* **2007**. 337:165–174.
- BSH: *Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie. Baltic Sea SST 2012*. **2012**.
- Cammann K (Hg.): *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum, Akad. Verlag, **2001**.
- Ceccherelli G, Piazzoli L, Balata D: Spread of introduced *Caulerpa* species in macroalgal habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2002**. 280(1-2):1–11.
- Cengiz S, Cavas L, Yurdakoc K, Pohnert G: The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. *Marine Biotechnology* **2010**. 13(2):321–326.
- Cha S, Zhang H, Ilarslan HI, Wurtele ES, Brachova L, Nikolau BJ, Yeung ES: Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *The Plant Journal* **2008**. 55(2):348–360.
- Cheng JX, Book LD, Xie XS: Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Letters* **2001a**. 26(17):1341–1343.
- Cheng JX, Volkmer A, Book LD, Xie XS: An epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001b**. 105(7):1277–1280.
- Cheng JX, Volkmer A, Xie XS: Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of the Optical Society of America B* **2002**. 19(6):1363–1375.
- Cheng JX, Xie XS: Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**. 108(3):827–840.

- Chisholm JRM, Dauga C, Ageron E, Grimont PAD, Jaubert JM: 'Roots' in mixotrophic algae. *Nature* **1996**. 381(6581):382–382.
- Cimino G, Crispino A, Di Marzo V, Gavagnin M, Ros JD: Oxytoxins, bioactive molecules produced by the marine opisthobranch mollusc *Oxynoe olivacea* from a diet-derived precursor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1990**. 46(7):767–770.
- Copeland RA, Spiro TG: Ultraviolet Raman hypochromism of the tropomyosin amide modes: a new method for estimating. alpha.-helical content in proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1986**. 108(6):1281–1285.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG: Natural products (secondary metabolites). In BB Buchanan, W Grissem, RL Jones (Hg.) *Biochemistry and molecular biology of plants*. **2000**. 1250–1318.
- Dawes C, Goddard R: Chemical composition of the wound plug and entire plants for species of the coenocytic green alga *Caulerpa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1978**. 35(3):259–263.
- Dawes CJ, Barilotti DC: Cytoplasmic organization and rhythmic streaming in growing blades of *Caulerpa prolifera*. *American Journal of Botany* **1969**. 56(1):8–15.
- De Nys R, Dworjanyn SA, Steinberg PD, *et al.*: A new method for determining surface concentrations of marine natural products on seaweeds. *Marine Ecology Progress Series* **1998**. 162:79–87.
- Demtröder W (Hg.): *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken*. Springer, 5 Auflage, **2007**.
- Dicke M, Sabelis MW: Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* **1988**. 2(2):131.
- Dixon J, Schroeter SC, Kastendiek J: Effects of the encrusting Bryozoan, *Membranipora Membranacea*, on the loss of blades and fronds by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (*Laminariales*). *Journal of Phycology* **1981**. 17(4):341–345.
- Dobretsov S, Dahms HU, Harder T, Qian PY: Allelochemical defense against epibiosis in the macroalga *Caulerpa racemosa* var. *turbinata*. *Marine Ecology Progress Series* **2006**. 318:165–175.
- Dostal R: Sur les mouvements des chloroplasts dans le *Caulerpa prolifera*. *Preslia* **1932**. 11:32–34.
- Dreher T, Grant B, Wetherbee R: The wound response in the siphonous alga *Caulerpa simpliciuscula* C. Ag.: Fine structure and cytology. *Protoplasma* **1978**. 96(1):189–203.

- Dreher T, Hawthorne D, Grant B: The wound response of the siphonous green algal genus *Caulerpa* III: Composition and origin of the wound plugs. *Protoplasma* **1982**. 110(2):129–137.
- Dumay O, Pergent G, Pergent-Martini C, Amade P: Variations in caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*. *Journal of chemical Ecology* **2002**. 28(2):343–352.
- Duncan MD, Reintjes J, Manuccia TJ: Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters* **1982**. 7(8):350.
- Dworjanyn SA, De Nys R, Steinberg PD: Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biology* **1999**. 133(4):727–736.
- Efremov EV, Buijs JB, Gooijer C, Ariese F: Fluorescence rejection in resonance Raman spectroscopy using a picosecond-gated intensified charge-coupled device camera. *Applied Spectroscopy* **2007**. 61(6):571–578.
- Eick K: *Einfluss von Oberflächenanalytik auf die bakterielle Besiedlung von marinen Algen*. Staatsexamensarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2011**.
- Ermakov IV, Sharifzadeh M, Ermakova M, Gellermann W: Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue. *Journal of Biomedical Optics* **2005**. 10(6):064028.
- Esquenazi E, Yang YL, Watrous J, Gerwick WH, Dorrestein PC: Imaging mass spectrometry of natural products. *Natural Product Reports* **2009**. 26(12):1521–1534.
- Evans C, Xie X: Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2008**. 1:883–909.
- Evans CL, Potma EO, Puoris'haag M, Côté D, Lin CP, Xie XS: Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**. 102(46):16807–16812.
- Eysel HH, Eckert J: Einkristall-Raman-Spektren von Alaunen. I. Innere Schwingungen, Frequenzbereich 300 bis 1200 cm<sup>-1</sup>. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **1976**. 424(1):68–80.
- Filho IPT, Turner J, Pittman RN, Proffitt E, Ward KR: Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation. *Journal of Applied Physiology* **2008**. 104(6):1809–1817.

- Fischel JL, Lemee R, Formento P, Caldani C, Moll JL, Pesando D, Meinesz A, Grelier P, Pietra P, Guerriero A, Milano G: Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia*. *Anticancer research* **1995**. 15(5B):2155.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA: Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian. **2009**.  
URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp073974n>
- Galler A, Muller G, Schinzel R, Kratzsch J, Kiess W, Munch G: Impact of Metabolic Control and Serum Lipids on the Concentration of Advanced Glycation End products in the serum of children and adolescents with type 1 diabetes, as determined by Fluorescence spectroscopy and N -(carboxymethyl)lysine ELISA. *Diabetes Care* **2003**. 26(9):2609–2615.
- Gantt E, Cunningham Jr F: Algal pigments. *Encyclopedia of Life Sciences* **2001**.
- Gerasimenko NI, Chaykina EL, Busarova NG, Anisimov MM: Antimicrobial and hemolytic activity of low-molecular metabolites of brown seaweed *Laminaria cichorioides* (Miyabe). *Applied Biochemistry and Microbiology* **2010**. 46(4):426–430.
- Gianguzza P, Airoidi L, Chemello R, Todd CD, Riggio S: Feeding preferences of *Oxyntoe olivacea* (Opisthobranchia: Sacoglossa) among three *Caulerpa* species. *Journal of molluscan studies* **2002**. 68(3):289–290.
- Goddard RH, Dawes CJ: An ultrastructural and histochemical study of the wound response in the coenocytic green alga *Caulerpa ashmeadii* (*Caulerpales*). *Protoplasma* **1983**. 114(3):163–172.
- Graham LE, Wilcox LW: *Algae*. Prentice Hall, **1999**.
- Gremlich HU: Infrared and Raman spectroscopy. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* **2000**.
- Grosser K, Zedler L, Schmitt M, Dietzek B, Popp J, Pohnert G: Disruption-free imaging by Raman spectroscopy reveals a chemical sphere with antifouling metabolites around macroalgae. *Biofouling* **2012**. 28(7):687–696.
- Guerriero A, Depentori D, D'Ambrosio M, Pietra F: Caulerpenyne-amine reacting system as a model for in *vivo* interactions of ecotoxicologically relevant sesquiterpenoids of the mediterranean-adapted tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia*. *Helvetica chimica acta* **1995**. 78(7):1755–1762.

- Haber M, Carbone M, Mollo E, Gavagnin M, Ilan M: Chemical defense against predators and bacterial fouling in the Mediterranean sponges *Axinella polypoides* and *A. verrucosa*. *Marine Ecology Progress Series* **2011**. 422:113–122.
- Harder T: Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence. In *Marine and Industrial Biofouling*, Band 4. **2009**. 219–231.
- Haugan J, Liaaen-Jensen S: Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). *Biochemical systematics and ecology* **1994**. 22(1):31–41.
- Hawthorne DB, Dreher TW, Grant BR: The wound response in the siphonous alga *Caulerpa simpliciuscula* C. Ag.: II. The effect of wounding on carbon flow. *Protoplasma* **1981**. 105(3):195–206.
- Hay ME, Fenical W: Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1988**. 19(1):111–145.
- Hegazi MM, Pérez-Ruzafa A, Almela L, Candela ME: Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1998**. 829(1-2):153–159.
- Hennion MC: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**. 856(1-2):3–54.
- Huang Y, Beal C, Cai W, Ruoff R, Terentjev E: Micro-Raman spectroscopy of algae: Composition analysis and fluorescence background behavior. *Biotechnology and bioengineering* **2010**. 105(5):889–898.
- Hunter RD: Changes in carbon and nitrogen content during decomposition of three macrophytes in freshwater and marine environments. *Hydrobiologia* **1976**. 51:119–128.
- Hurd CL: Water motion, marine macroalgal physiology, and production. *Journal of Phycology* **2000**. 36(3):453–472.
- Janse JM: Polarität und Organbildung bei *Caulerpa prolifera*. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* **1906**. 42:394–460.
- Jennings JG, Steinberg PD: Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* **1997**. 109(3):461–473.
- John DM, Maggs CA: Species problems in eukaryotic algae: a modern perspective. In MF Claridge, HA Dawah, MR Wilson (Hg.) *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, UK, **1997**. 83–105.

- Jung V: Untersuchungen zur chemischen Verteidigung der invasiven Grünalge *Caulerpa taxifolia*. Dissertation, Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, **2003**.
- Jung V, Pohnert G: Rapid wound-activated transformation of the green algal defensive metabolite caulerpenyne. *Tetrahedron* **2001**. 57(33):7169–7172.
- Jung V, Thibaut T, Meinesz A, Pohnert G: Comparison of the wound-activated transformation of caulerpenyne by Invasive and noninvasive *Caulerpa* species of the Mediterranean. *Journal of Chemical Ecology* **2002**. 28(10):2091–2105.
- Kientz B, Thabard M, Cragg S, Pope J, Hellio C: A new method for removing microflora from macroalgal surfaces: an important step for natural product discovery. *Botanica Marina* **2011**. 54:457–469.
- Kjellerup S, Kiørboe T: Prey detection in a cruising copepod. *Biology Letters* **2012**. 8(3):438–441.
- Kogelnik H, Porto SPS: Continuous helium-neon red laser as a Raman source. *Journal of the Optical Society of America* **1963**. 53(12):1446.
- Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V: Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus* with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology* **2005**. 31(1):195–212.
- Koyama Y: Resonance Raman Spectroscopy. In G Britton, S Liaaen-Jensen, H Pfander (Hg.) *Carotenoids 1B*:. Birkhäuser Verlag, 1 Auflage, **1995**. 135–146.
- Krafft C, Dietzek B, Popp J: Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues. *Analyst* **2009**. 134(6):1046–1057.
- Kubaneck J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO, Fenical W: Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**. 100(12):6916–6921.
- Kusch J: Induction of defensive morphological changes in ciliates. *Oecologia* **1993**. 94(4):571–575.
- Lachnit T, Blmel M, Imhoff JF, Wahl M: Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquatic Biology* **2009**. 5(2):181–186.
- Lachnit T, Wahl M, Harder T: Isolated thallus-associated compounds from the macroalga *Fucus vesiculosus* mediate bacterial surface colonization in the field similar to that on the natural alga. *Biofouling* **2010**. 26(3):247–255.

- Lane AL, Nyadong L, Galhena AS, Shearer TL, Stout EP, Parry RM, Kwasnik M, Wang MD, Hay ME, Fernandez FM: Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**. 106(18):7314.
- Lemée R, Pesando D, Durand-Clément M, Dubreuil A, Meinesz A, Guerriero A, Pietra F: Preliminary survey of toxicity of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced into the Mediterranean. *Journal of Applied Phycology* **1993**. 5(5):485–493.
- Levin IW, Lewis EN: Fourier transform Raman spectroscopy of biological materials. *Analytical Chemistry* **1990**. 62(21):1101A–1111A.
- Lichtlé C, Spilar A, Duval JC: Immunogold localization of light-harvesting and photosystem I complexes in the thylakoids of *Fucus serratus* (*Phaeophyceae*). *Protoplasma* **1992**. 166(1):99–106.
- Liška I: Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. *Journal of Chromatography A* **2000**. 885(1-2):3–16.
- Lobban CS: *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, **1994**.
- Lutz M: Resonance Raman spectra of chlorophyll in solution. *Journal of Raman Spectroscopy* **1974**. 2(5):497–516.
- Maker PD, Terhune RW: Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. *Physical Review* **1965**. 137(3A):A801–A818.
- Manhart JR, McCourt RM: Molecular data and species concepts in the algae. *Journal of Phycology* **1992**. 28(6):730–737.
- Marcelli A, Cricenti A, Kwiatek WM, Petibois C: Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy. *Biotechnology Advances* **2012**. 30(6):1390–1404.
- Markham J, Hagmeier E: Observations on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms. *Phycologia* **1982**. 21(2):125–130.
- Matousek P, Towrie M, Ma C, Kwok WM, Phillips D, Toner WT, Parker AW: Fluorescence suppression in resonance Raman spectroscopy using a high-performance picosecond Kerr gate. *Journal of Raman Spectroscopy* **2001**. 32(12):983–988.
- Matousek P, Towrie M, Stanley A, Parker AW: Efficient rejection of fluorescence from Raman spectra using picosecond Kerr gating. *Applied Spectroscopy* **1999**. 53(12):1485–1489.

- Mazzella N, Delmas F, Delest B, Méchin B, Madigou C, Allenou JP, Gabellec R, Caquet T: Investigation of the matrix effects on a HPLC-ESI-MS/MS method and application for monitoring triazine, phenylurea and chloroacetanilide concentrations in fresh and estuarine waters. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**. 11(1):108.
- McCourt RM: Green algal phylogeny. *Trends in Ecology and Evolution* **1995**. 10(4):159–163.
- McLachlan J, Craigie JS: Algal inhibition by yellow ultraviolet-absorbing substances from *Fucus vesiculosus*. *Canadian Journal of Botany* **1964**. 42(3):287–292.
- Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA: The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**. 11(6):853–862.
- Meinesz A, Belsher T, Thibaut T, Antolic B, Mustapha KB, Boudouresque CF, Chiaverini D, Cinelli F, Cottalorda JM, Djellouli A: The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean. *Biological Invasions* **2001**. 3(2):201–210.
- Meinesz A, Benichou L, Blachier J, Komatsu T, Lemée R, Molenaar H, Mari X: Variations in the structure, morphology and biomass of *Caulerpa taxifolia* in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina* **1995**. 38(1-6):499–508.
- Meinesz A, Hesse B: Introduction of the tropical alga *Caulerpa taxifolia* and its invasion of the Northwestern Mediterranean. *Oceanologica acta. Paris* **1991**. 14(4):415–426.
- Menzel D: How do giant plant cells cope with injury?—The wound response in siphonous green algae. *Protoplasma* **1988**. 144(2):73–91.
- Merlin J: Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure and Applied Chemistry* **1985**. 57(5):785–792.
- Merrick JP, Moran D, Radom L: An evaluation of harmonic vibrational frequency scale factors. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**. 111(45):11683–11700.
- Meyer T, Akimov D, Tarcea N, Chatzipapadopoulos S, Muschiolik G, Kobow J, Schmitt M, Popp J: Three-dimensional molecular mapping of a multiple emulsion by means of CARS microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**. 112(5):1420–1426.
- Morhac M: Peaks: Peaks. **2008**. R package version 0.2.

- Mulderij G, Smolders AJP, Donk E: Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biology* **2006**. 51(3):554–561.
- Muller CH: The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **1966**. 93(5):332–351.
- Naumann A, Navarro-González M, Peddireddi S, Kües U, Polle A: Fourier transform infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology* **2005**. 42(10):829–835.
- Nultsch W: *Allgemeine Botanik: 20 Boxen; Glossarium mit 803 Stichworten*. Thieme, Stuttgart; New York, 10 Auflage, **1996**.
- Nyadong L, Hohenstein EG, Galhena A, Lane AL, Kubanek J, Sherrill CD, Fernández FM: Reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) of natural products of a marine alga. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**. 394(1):245–254.
- Nylund G, Gribben P, de Nys R, Steinberg P, Pavia H: Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Marine Ecology Progress Series* **2007**. 329:73–84.
- Occhipinti-Ambrogi A, Savini D: Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* **2003**. 46(5):542–551.
- Oswald RC, Telford N, Seed R, Happey-Wood CM: The effect of encrusting bryozoans on the photosynthetic activity of *Fucus serratus* L. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **1984**. 19(6):697–702.
- Ott J: *Meereskunde. Einführung in die Geographie und Biologie der Ozeane*. UTB, Stuttgart, 2 Auflage, **1996**.
- Parab NDT, Tomar V: Raman spectroscopy of algae: A review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* **2012**. 3(131):2–7.
- Parker FS: *Applications of infrared, raman, and resonance raman spectroscopy in biochemistry*. Springer, **1983**.
- Paul VJ, Fenical W: Chemical defense in tropical green algae, order *Caulerpales*. *Marine Ecology Progress Series* **1986**. 34(1-2):157–169.
- Percival E: The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal* **1979**. 14(2):103–117.

- Persistence of Vision Pty Ltd: Persistence of Vision (TM) Raytracer. **2004**.  
URL <http://www.povray.org/>
- Petry R, Schmitt M, Popp J: Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences. *ChemPhysChem* **2003**. 4(1):14–30.
- Pohnert G, Jung V: Intracellular compartmentation in the biosynthesis of caulerpene: study on intact macroalgae using stable-isotope-labeled precursors. *Organic Letters* **2003**. 5(26):5091–5093.
- Potma EO, Boeij WPd, Haastert PJMv, Wiersma DA: Real-time visualization of intracellular hydrodynamics in single living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**. 98(4):1577–1582.
- Raman CV, Krishnan KS: A new type of secondary radiation. *Nature* **1928**. 121(3048):501–502.
- Ramus J: The Biology of Seaweeds. In CS Lobban, MJ Wynne (Hg.) *The biology of seaweeds*. Blackwell Scientific, Oxford. University of California Press, **1981**. 458–492.
- Rasband, WS: ImageJ. **1997**.  
URL <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Rees D: Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Band 24. Elsevier, **1970**. 267–332.
- Rempt M, Weinberger F, Grosser K, Pohnert G: Conserved and species-specific oxylipin pathways in the wound-activated chemical defense of the noninvasive red alga *Gracilaria chilensis* and the invasive *Gracilaria vermiculophylla*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2012**. 8:283–289.
- Rimai L, Heyde ME, Gill D: Vibrational spectra of some carotenoids and related linear polyenes. Raman spectroscopic study. *Journal of the American Chemical Society* **1973**. 95(14):4493–4501.
- Rimai L, Kilponen R, Gill D: Excitation profiles of laser Raman spectra in the resonance region of two carotenoid pigments in solution. *Journal of the American Chemical Society* **1970**. 92(12):3824–3825.
- Robert B: The Electronic Structure, Stereochemistry and Resonance Raman Spectroscopy of Carotenoids. In HA Frank, AJ Young, G Britton, RJ Cogdell (Hg.) *The Photochemistry of Carotenoids*, Band 8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1999**. 189–201.

- Robert B: Resonance Raman spectroscopy. *Photosynthesis Research* **2009**. 101(2-3):147–155.
- Sabnis DD, Jacobs WP: Cytoplasmic streaming and microtubules in the coenocytic marine alga, *Caulerpa prolifera*. *Journal of Cell Science* **1967**. 2(4):465–472.
- Saha M, Rempt M, Gebser B, Grueneberg J, Pohnert G, Weinberger F: Dimethylsulphopropionate (DMSP) and proline from the surface of the brown alga *Fucus vesiculosus* inhibit bacterial attachment. *Biofouling* **2012**. 28(6):593–604.
- Saha M, Rempt M, Grosser K, Pohnert G, Weinberger F: Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling* **2011**. 27(4):423–433.
- Schlichting H, Gersten K: *Boundary layer theory: with 22 tables*. Springer, Berlin; Heidelberg [u.a.], **2000**.
- Schmitt M, Leimeister B, Baia L, Weh B, Zimmermann I, Kiefer W, Popp J: Characterization of diffusion processes of pharmacologically relevant molecules through polydimethylsiloxane membranes by confocal micro-resonance Raman spectroscopy. *ChemPhysChem* **2003**. 4(3):296–299.
- Schmitt TM, Hay ME, Lindquist N: Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology* **1995**. 76(1):107–123.
- Schubert R, Wagner G: *Botanisches Wörterbuch: Pflanzennamen und botanische Fachwörter. Mit einer Einführung in die Terminologie und Nomenklatur*. UTB, Stuttgart, 12 Auflage, **2000**.
- Schut TCB, Puppels GJ, Kraan YM, Greve J, van der Maas LL, Figdor CG: Intracellular carotenoid levels measured by Raman microspectroscopy: Comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals. *International Journal of Cancer* **1997**. 74(1):20–25.
- Semwogerere D, Weeks ER: Confocal microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. G. Wnek, and G. Bowlin, editors. Taylor and Francis, New York **2005**.
- Seyedsayamdost MR, Carr G, Kolter R, Clardy J: Roseobacticides: Small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *Journal of the American Chemical Society* **2011**. 133(45):18343–18349.
- Shepherd VA, Beilby MJ, Heslop DJ: Ecophysiology of the hypotonic response in the salt-tolerant charophyte alga *Lamprothamnium papulosum*. *Plant, Cell and Environment* **1999**. 22(4):333–346.

- Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A, Strasburger E: *Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Spektrum Akademischer Verlag, 34. korr. nachdruck Auflage, **1998**.
- Smekal A: Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften* **1923**. 11(43):873–875.
- Smith CM, Walters LJ: Fragmentation as a strategy for caulerpa species: fates of fragments and Implications for management of an invasive weed. *Marine Ecology* **1999**. 20(3-4):307–319.
- Smith E, Dent G: *Modern Raman spectroscopy: A practical approach*. John Wiley & Sons, **2005**.
- Spencer K, Mattis P, Team TGD: GNU Image Manipulation Program. **2012**.  
URL <http://www.gimp.org/>
- Stauber J, Jeffrey S: Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *Journal of phycology* **1988**. 24(2):158–172.
- Stevens CL, Hurd CL: Boundary-layers around bladed aquatic macrophytes. *Hydrobiologia* **1997**. 346(1):119–128.
- Takáts Z, Wiseman JM, Cooks RG: Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**. 40(10):1261–1275.
- Taylor JA, West DW: The use of Evan's Blue stain to test the survival of plant cells after exposure to high salt and high osmotic pressure. *Journal of Experimental Botany* **1980**. 31(2):571–576.
- Team RC: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, **2012**.
- Van de Hoek C, Mann D, Jahns HM: *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, **1996**.
- Vanellander B, Paul C, Grueneberg J, Prince EK, Gillard J, Sabbe K, Pohnert G, Vyverman W: Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**. 109(7):2412–2417.
- Varela-Álvarez E, Gómez Garreta A, Rull Lluch J, Salvador Soler N, Serrao EA, Siguán MAR: Mediterranean species of *Caulerpa* are polyploid with smaller genomes in the invasive ones. *PLoS ONE* **2012**. 7(10):e47728.

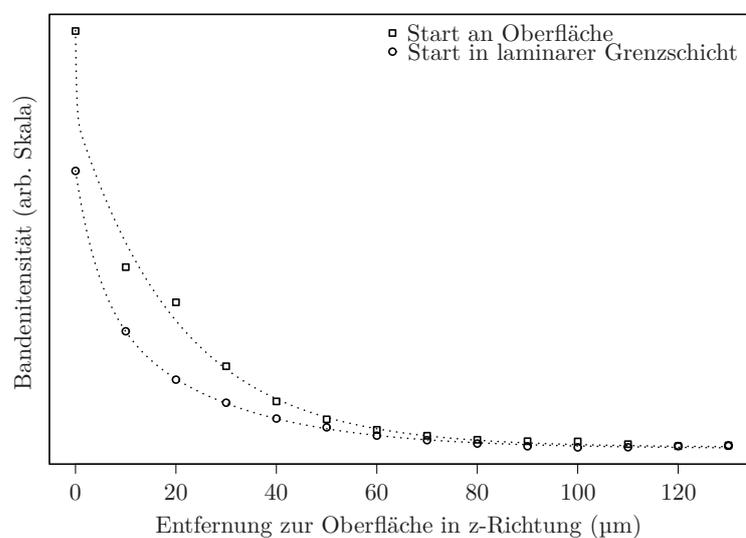
- Viano Y, Bonhomme D, Camps M, Briand JF, Ortalo-Magne? A, Blache Y, Piovetti L, Culioli G: Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota sp.* evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *Journal of natural products* **2009**. 72(7):1299–1304.
- Vidoudez C, Casotti R, Bastianini M, Pohnert G: Quantification of dissolved and particulate polyunsaturated aldehydes in the Adriatic Sea. *Marine drugs* **2011**. 9(4):500–513.
- Volkmer A, Book LD, Xie XS: Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay. *Applied Physics Letters* **2002**. 80(9):1505–1507.
- Wächtler M, Guthmüller J, González L, Dietzek B: Analysis and characterization of coordination compounds by resonance Raman spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**. 256(15–16):1479–1508.
- Wahl M: Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine ecology progress series* **1989**. 58(1):175–189.
- Wahl M: Ecological lever and interface ecology: epibiosis modulates the interactions between host and environment. *Biofouling* **2008**. 24(6):427–438.
- Wahl M: Epibiosis. In M Wahl (Hg.) *Marine Hard Bottom Communities*. **2009**. 61–72.
- Wahl M, Hay ME: Associational resistance and shared doom: effects of epibiosis on herbivory. *Oecologia* **1995**. 102(3):329–340.
- Wattier R, Maggs CA: Intraspecific variation in seaweeds: the application of new tools and approaches. *Advances in Botanical Research* **2001**. 35:171–212.
- Wedler G: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Wiley-VCH, 4 Auflage, **1997**.
- Weinberger F, Pohnert G, Berndt ML, Bouarab K, Kloareg B, Potin P: Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany* **2005**. 56(415):1317.
- Weissflog I, Vogler N, Akimov D, Dellith A, Schachtschabel D, Svatos A, Boland W, Dietzek B, Popp J: Toward in vivo chemical imaging of epicuticular waxes. *Plant Physiology* **2010**. 154(2):604–610.
- Weissflog IA, Grosser K, Bräutigam M, Dietzek B, Pohnert G, Popp J: Raman spectroscopic insights into the chemical gradients within the wound plug of the green alga *Caulerpa taxifolia*. *ChemBioChem* **2013**. 14(6):727–732.

- Weißflog J: Synthese und Anwendung funktionalisierter Bisenoylacetate: neue Werkzeuge zur Aufklärung der Wundverschlussreaktion der Grünalge *Caulerpa taxifolia* und zur selektiven Markierung von Esterasen. Dissertation, Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, **2010**.
- Weissflog J, Adolph S, Wiesemeier T, Pohnert G: Reduction of herbivory through wound-activated protein cross-linking by the invasive macroalga *Caulerpa taxifolia*. *ChemBioChem* **2008**. 9(1):29–32.
- Welling M, Pohnert G, Küpper FC, Ross C: Rapid biopolymerisation during wound plug formation in green algae. *The Journal of Adhesion* **2009**. 85(11):825–838.
- West EJ, Barnes PB, Wright JT, Davis AR: Anchors aweigh: Fragment generation of invasive *Caulerpa taxifolia* by boat anchors and its resistance to desiccation. *Aquatic Botany* **2007**. 87(3):196–202.
- Williams SL: Introduced species in seagrass ecosystems: Status and concerns. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2007**. 350(1-2):89–110.
- Withnall R, Chowdhry B, Silver J, Edwards H, de Oliveira L: Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2003**. 59(10):2207–2212.
- Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, Ifa DR: Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrometry Reviews* **2012**. 23(3):218–43.
- Zumbusch A, Holtom GR, Xie XS: Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Physical Review Letters* **1999**. 82(20):4142–4145.

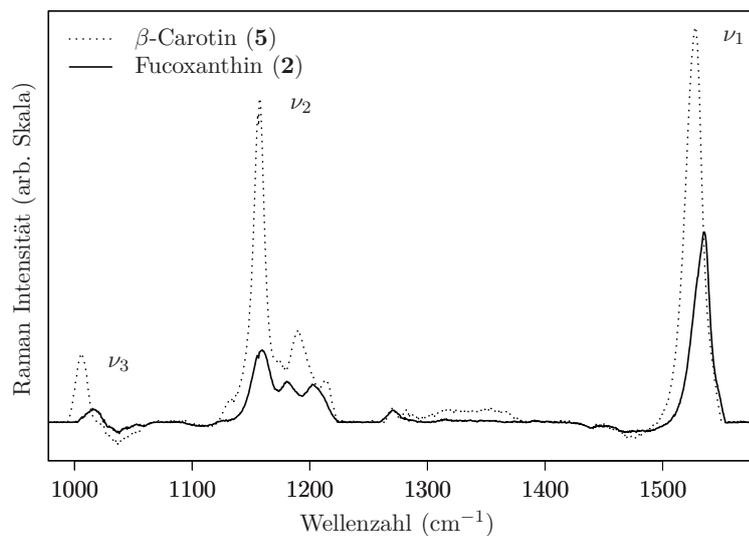
# 6 Anhang

## 6.1 Daten und Spektren

### Resonanz-Raman-Spektroskopie



**Abb. 6.1:** Abnahme der C=C-Streckschwingung ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) in der laminaren Grenzschicht von *U. spec* mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche. Der Startpunkt der Messungen war auf der Oberfläche oder in der laminaren Grenzschicht. Die gestrichelte Linie spiegelt die Anpassung der Daten an eine doppelt exponentielle Funktion wieder.

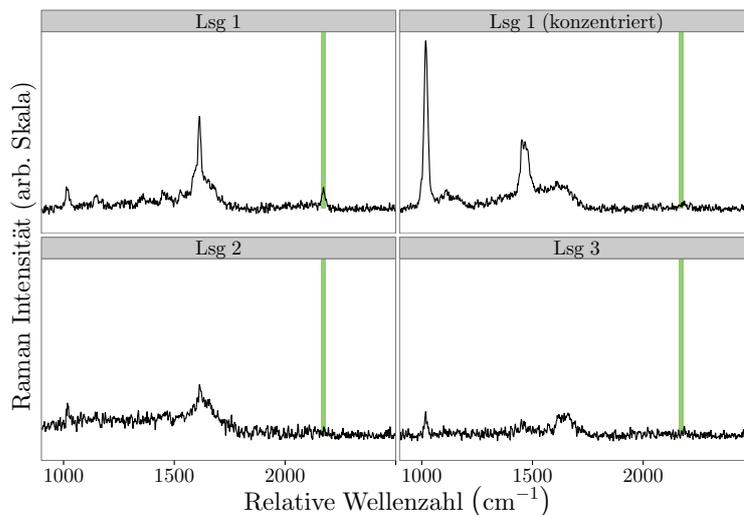


**Abb. 6.2:** RR-Spektrum von Fucoxanthin (**2**) (durchgezogene Linie) und  $\beta$ -Carotin (**5**) (gestrichelte Linie) gelöst in Methanol. Die verschiedenen Banden  $\nu_i$  stellen die Schwingungsbanden für die C=C-Streckschwingung bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ), der C-C-Streckschwingung bei  $1155\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) und der Kohlenstoff-Methyl-Schwingung bei  $1005\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) der Carotinoide dar.

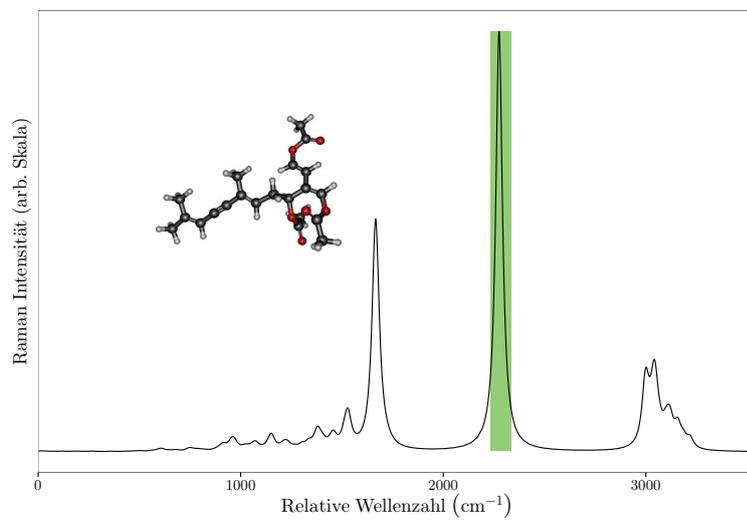
## FT-Raman-Spektroskopie

**Tab. 6.1:** Position für die C≡C-Schwingung der DFT-Rechnungen aus Abbildung 6.4 bis 6.8.

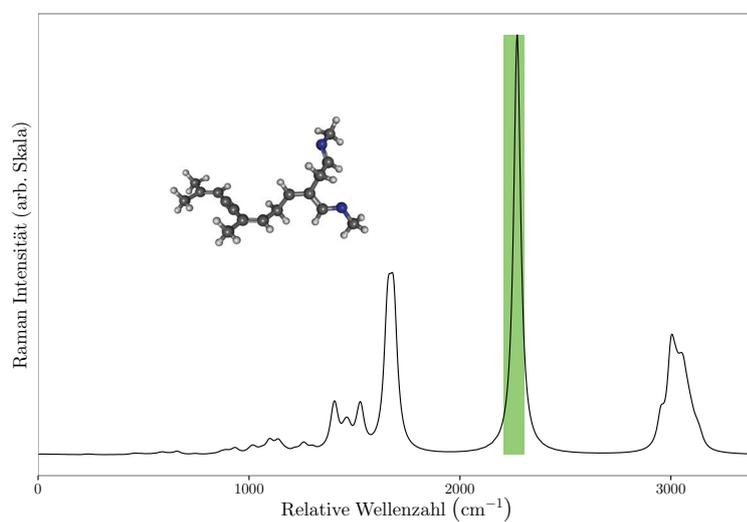
Metabolit	Position C≡C (cm <sup>-1</sup> )
Caulerpenin ( <b>3</b> )	2207
Diimin ( <b>9</b> )	2203
Oxidiimin ( <b>10</b> )	2229
Metabolit ( <b>6</b> )	2189
Metabolit ( <b>7</b> )	2205



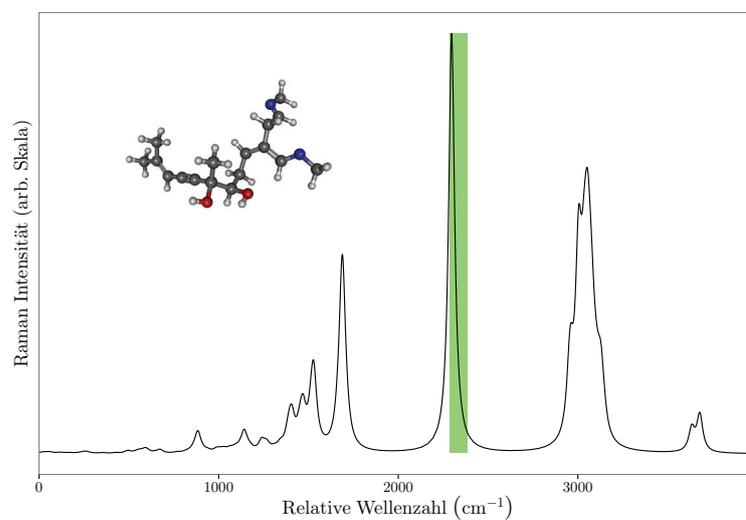
**Abb. 6.3:** A) FT-Raman-Spektrum der Lösung 1 bestehend aus dem Produkt von Caulerpenin (**3**), Esterase und Proteinen (siehe Lösung 1 Abschnitt 5.6.1) deutlich ist hier die C≡C-Schwingung bei 2173 cm<sup>-1</sup> zu erkennen (grün hervorgehoben) B) Weiteres Spektrum von Lösung 1 nach dessen Aufkonzentrierung. C) Spektrum von Lösung 2 (Caulerpenin (**3**) und Esterase, Abschnitt 5.6.1) D) FT-Raman-Spektrum von Caulerpenin (**3**) und Proteinen (siehe Lösung 3 Abschnitt 5.6.1).



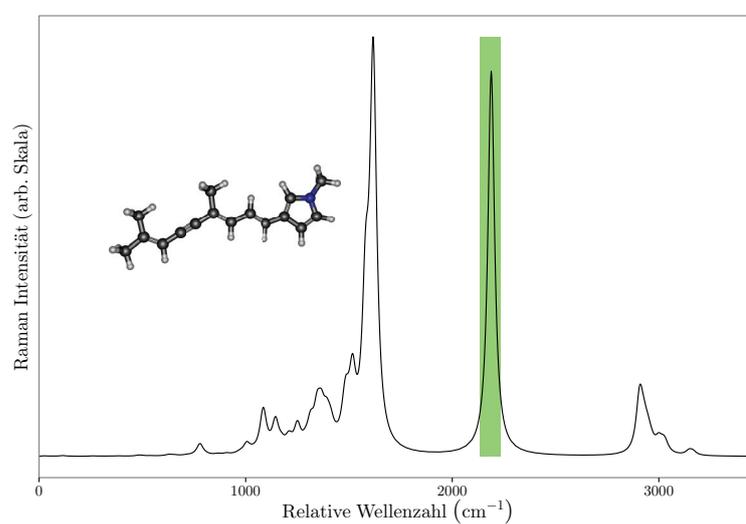
**Abb. 6.4:** Mittels DFT berechnetes Spektrum von Caulerpenin (**3**). Die Bande für die C≡-Streckschwingung ist grün hervorgehoben.



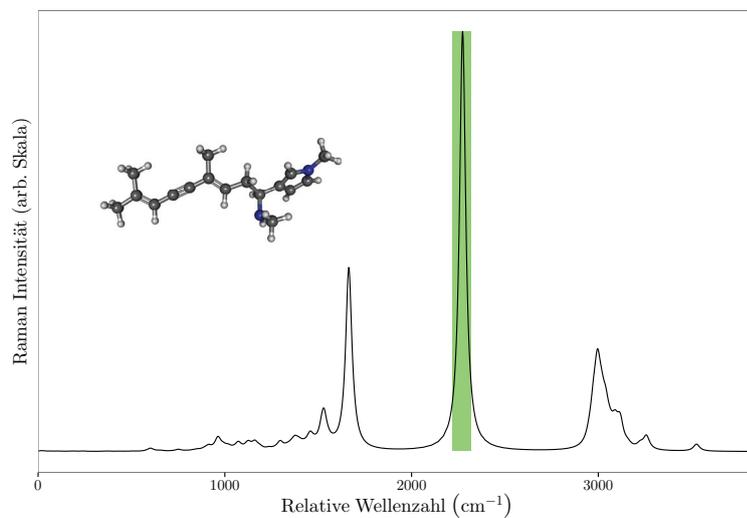
**Abb. 6.5:** Mittels DFT berechnetes Spektrum von Diimin (**9**). Die Bande für die C≡-Streckschwingung ist grün hervorgehoben.



**Abb. 6.6:** Mittels DFT berechnetes Spektrum von Oxidiimin (**10**). Die Bande für die C≡-Streckschwingung ist grün hervorgehoben.

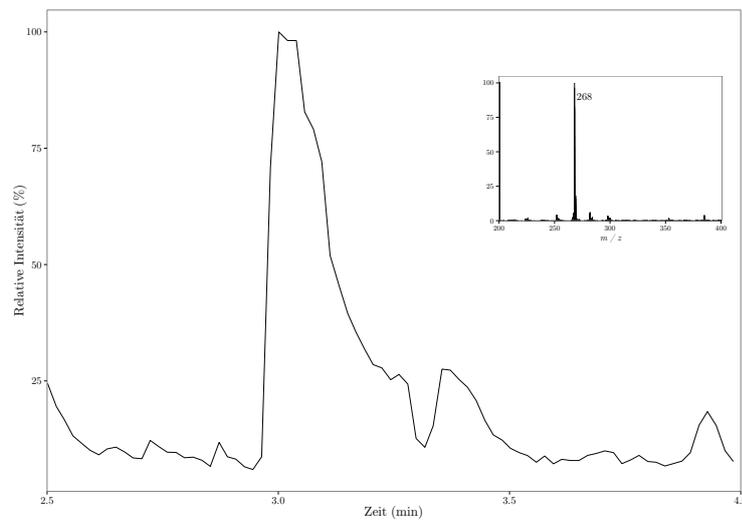


**Abb. 6.7:** Mittels DFT berechnetes Spektrum von Metabolit (**6**). Die Bande für die C≡-Streckschwingung ist grün hervorgehoben.

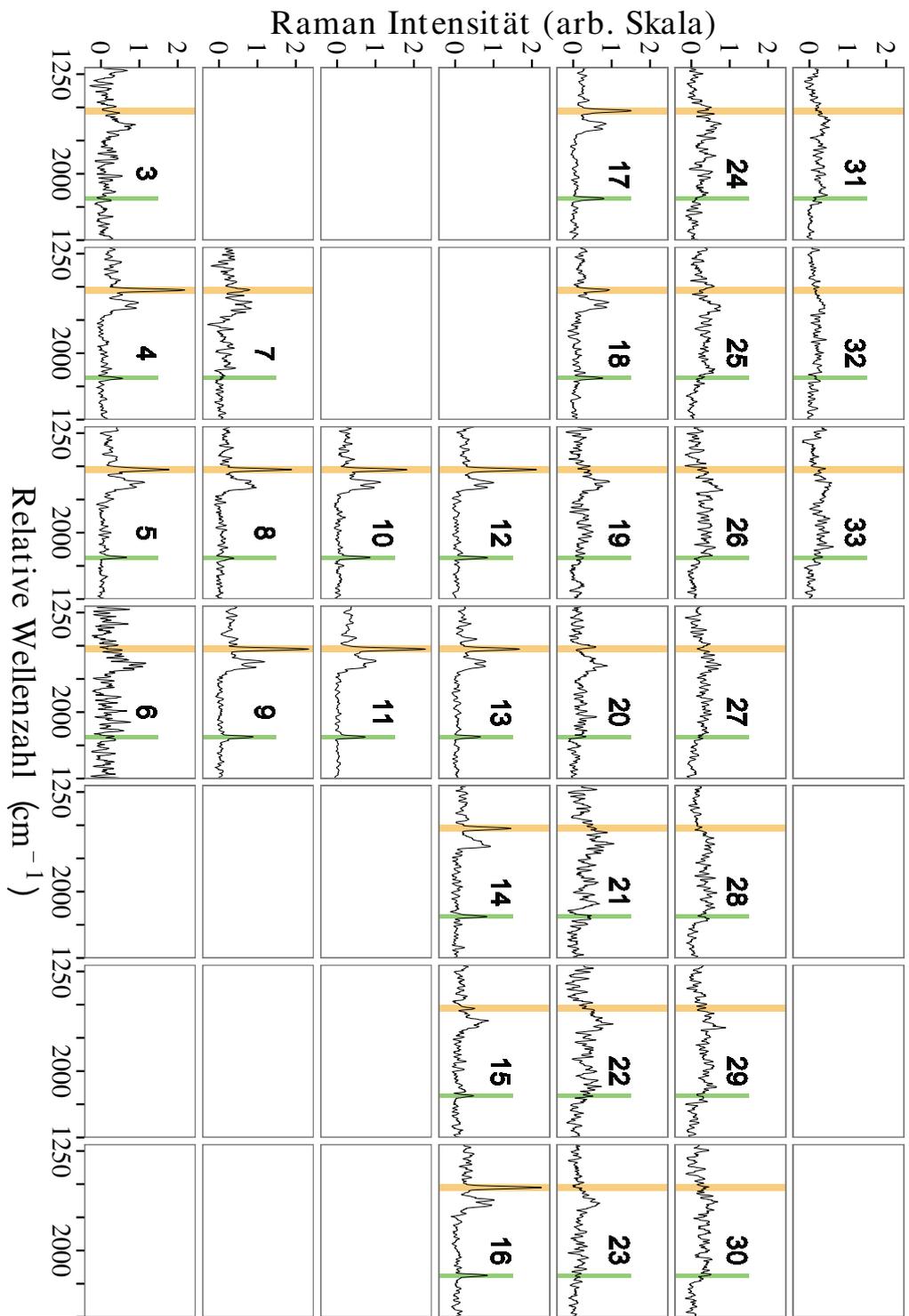


**Abb. 6.8:** Mittels DFT berechnetes Spektrum von Metabolit (7). Die Bande für die C≡C-Streckschwingung ist grün hervorgehoben.

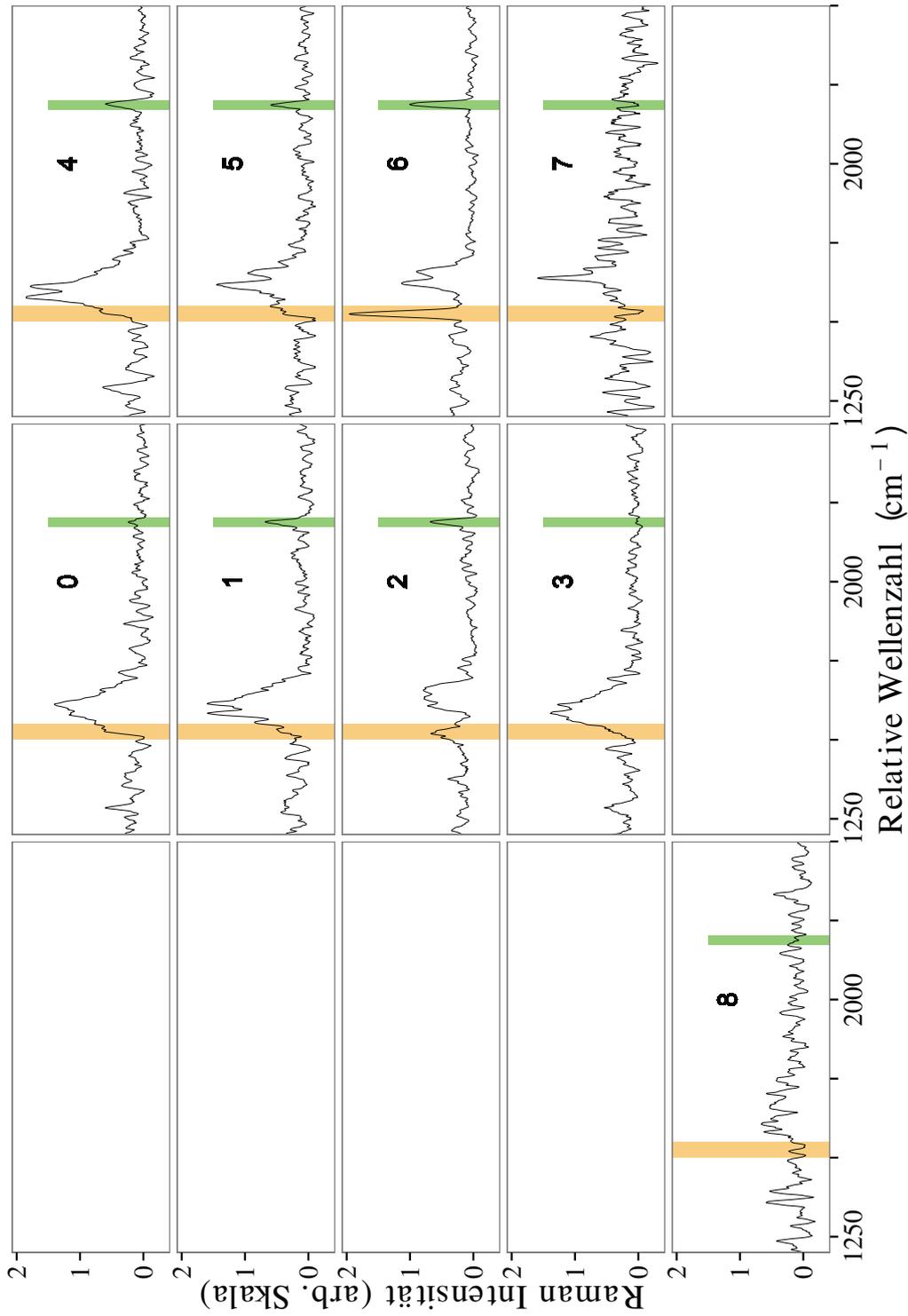
### Experimenteller Teil



**Abb. 6.13:** Mittels UPLC-MS erhaltenes Chromatogramm für die Massenspur bei 268 m/z ([M+H]<sup>+</sup>, positiver Modus) und das dazugehörige Spektrum eines Syntheseextraktes des Metaboliten (6) nach Guerriero *et al.* (1995).



**Abb. 6.9:** Untergrundkorrigierte, normierte und geglättete Spektren dargestellt für einen Bereich von 1200  $\text{cm}^{-1}$ -2500  $\text{cm}^{-1}$  für die Messpunkte eines Stolons und angrenzenden Rhizoids von *C. tanzania* aus der Abbildung 3.40. Die farbigen Banden heben den Bereich für die  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingung des Caulerpinins (**3**) (grün) und die  $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) (orange) hervor.



**Abb. 6.10:** Untergrundkorrigierte, normierte und geglättete Spektren dargestellt für einen Bereich von  $1200\text{ cm}^{-1}$ – $2500\text{ cm}^{-1}$  für den Bereich des cytoplasmatischen Bewegung innerhalb von *C. prolifera* zu den Graustufenkarten aus Abbildung 3.40. Die farbigen Banden heben den Bereich für die C≡C-Streckschwingung des Caulerpinins (**3**) (grün) und die C=C-Streckschwingung des  $\beta$ -Carotins (**5**) (orange) hervor.

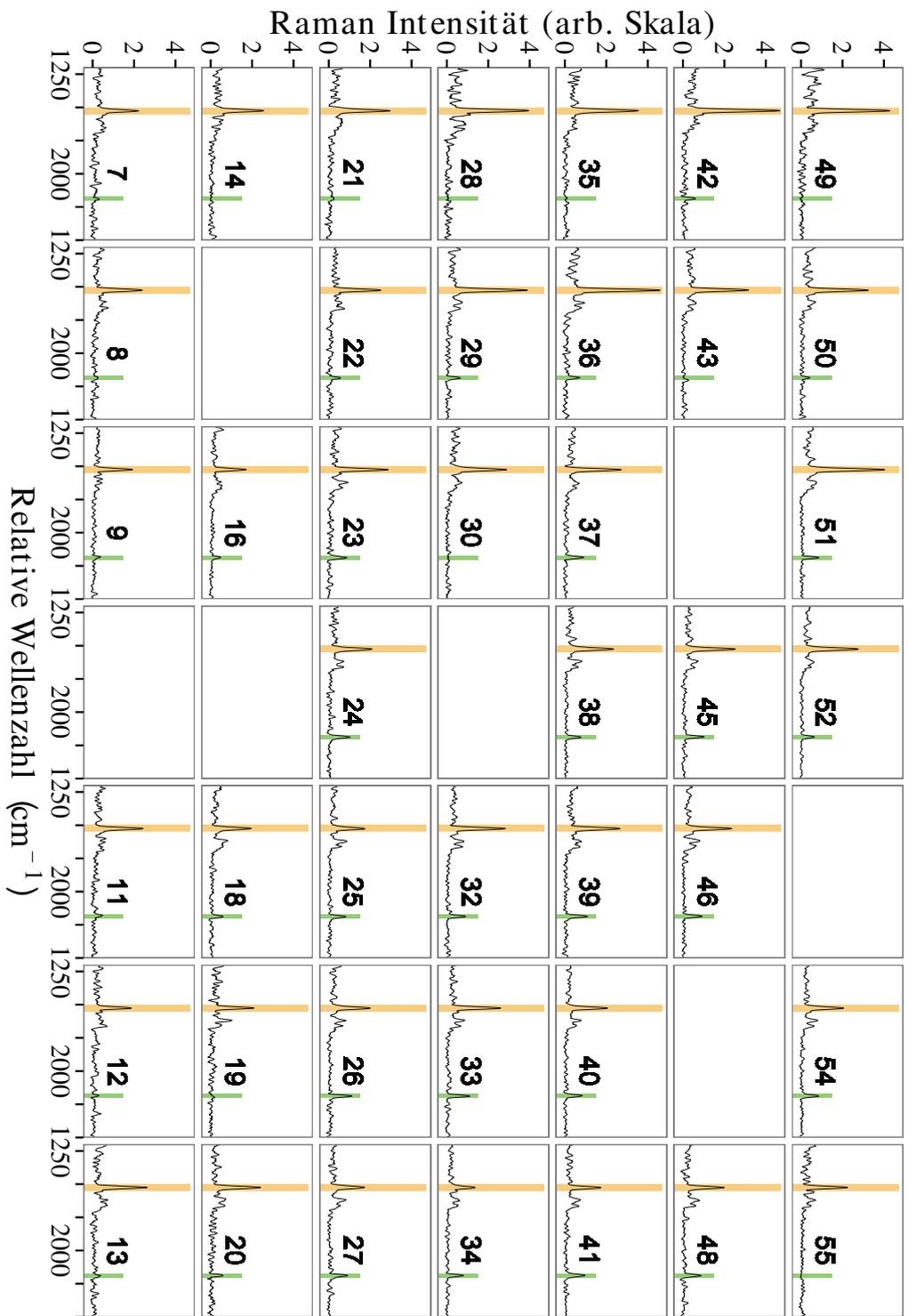


Abb. 6.11: Untergrundkorrigierte, normierte und geglättete Spektren zu den Graustufenkarten A und B aus Abbildung 3.42. Dargestellt für einen Bereich von 1200 cm<sup>-1</sup>–2500 cm<sup>-1</sup> mit farbigen Hervorhebungen in grün für die C≡C-Streckschwingung des Caulerpinins (3) und in orange für die C=C-Streckschwingung des β-Carotins (5).

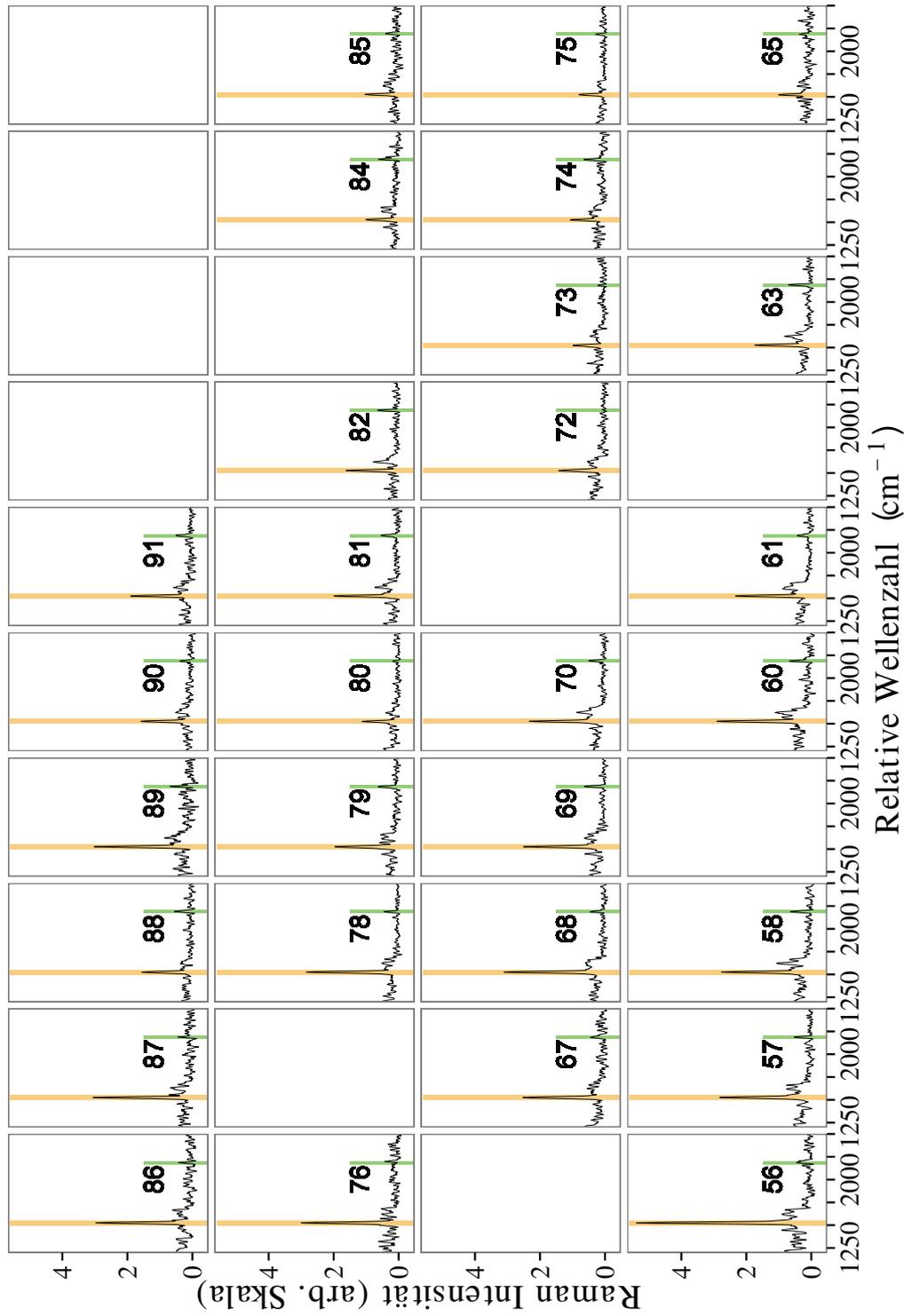


Abb. 6.12: Untergrundkorrigierte, normierte und geglättete Spektren zu den Graustufenkarten A und B aus Abbildung 3.43. Dargestellt für einen Bereich von  $1200\text{ cm}^{-1}$ – $2500\text{ cm}^{-1}$  mit farbigen Hervorhebungen für die C≡C-Streckschwingung des Caulerpenins (**3**) (grün) und des  $\beta$ -Carotins (**5**) (orange).

## 7 Danksagung

Als ich mich vor einiger Zeit auf machte, um in Jena meine Doktorarbeit zu beginnen, war es nicht nur ein Umzug in einen mir noch unbekanntem Teil von Deutschland, sondern auch der Sprung von der experimentellen Ökologie in die Bioanalytik. Natürlich bringt so ein Sprung in ein neues Fachgebiet viel Neues und Ungewohntes mit sich. Zum Glück haben mir viele Leute geholfen, mich sowohl in dem geographischen als auch in dem wissenschaftlichen Neuland zurechtzufinden. Bei diesen Personen möchte ich mich hier bedanken und alle, die hier nicht erwähnt werden, bitte ich um Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Pohnert, der mir die Arbeit an dieser Dissertation in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Vielen Dank für die Hilfe, die kreativen Ideen, die guten Ratschläge und konstruktive Diskussionen. Vor allem möchte ich mich aber auch für die Geduld bedanken, die du aufgebracht hast, als ich am Ende ins Stolpern kam und die Zeit, und Hilfe die du mir gegeben hast, um wieder zurück auf meinen Weg zu finden.

Bei Prof. Dr. Boland möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten des Max-Planck-Institutes und die Ratschläge für meine Experimente bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei der IMPRS bedanken, die mich und meine Arbeit finanziell unterstützt hat. Durch die angebotenen IMPRS-Kurse konnte ich einen Einblick in die unterschiedlichsten Bereiche der chemischen Ökologie werfen und Kontakte zu vielen Wissenschaftlern zu knüpfen. Besonders möchte ich mich bei Karin Groten bedanken, die für meine kleinen und großen Probleme immer eine Lösung fand.

Vor dieser Arbeit waren für mich CARS, FT- und Resonanz-Raman-Spektroskopie eher Böhmisches Dörfer. Dank meiner beiden Kooperationspartnerinnen Linda Zedler und Ina Weißflog konnte ich mich schnell in der für mich neuen Materie zurechtfinden.

Ich danke Linda für die vielen Sommertage, die wir zusammen in einem vollkommen dunklen, klimatisierten Raum am IPHT mit den Messungen an den Algen verbrachten. Auch die anschließenden Auswertungen und Diskussionen der Daten ließen sich gemeinsam besser bewerkstelligen. Danke.

Was mit Telefongesprächen begann, führte zu einer sehr produktiven Kooperation und ging in eine Freundschaft über. Hiermit möchte ich mich besonders bei Ina Weißflog für unsere zahlreichen Diskussionen und den Mut bedanken, unsere kreativen Ideen auch auszuprobieren.

Auch bei Prof. Dr. Dietzek, Prof. Dr. Schmitt und Prof. Dr. Popp möchte ich mich für die Gelegenheit bedanken, die CARS, RR- und FT-Raman- Messungen am

IPHT und IPC durchführen zu können sowie die zahlreichen kreativen Ideen und die Hilfe während unserer Kooperation.

Auch meinen Kooperationspartnern aus Kiel Dr. Mahasweta Saha und Dr. Florian Weinberger danke ich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit, die guten Ratschläge und Hilfe vor Ort.

Meine Zeit in Jena wäre ohne die Arbeitsgruppe Pohnert nicht halb so produktiv gewesen. Stets in wechselnder Besetzung stand sie mir bei zahlreichen konstruktiven Diskussionen, zeitintensiven Experimenten und legendären Grillfesten zur Seite. Durch euch konnte ich mich hier schnell eingewöhnen – Danke.

Zum Glück hatte ich auch die beiden besten Laborpartner, die man sich als Biologin in einem Syntheselabor nur wünschen kann. Zuerst führte mich Jerrit Weißflog in den Verhaltenscodex eines Chemikers ein und ließ sich auch nicht durch meine biologischen Fragen und Sichtweisen abhalten, mir mit seinen Ratschlägen und Weisheiten/Simpsonszitaten zur Seite zu stehen. Später war es Phillipp Richter, der mit mir das Labor teilte und meine Fragen beantwortete, mir beim Auswerten von NMR-Spektren half und mein aufgeregtes Händchen bei den Synthesen hielt – Danke.

Den guten Seelen dieser Arbeitsgruppe Madlen und Hannes danke ich für die Hilfe beim Überwinden bürokratischer Hürden, den unermüdlichen Einsatz bei der Suche nach Laborgegenständen und für die erholsamen, gemeinsamen Stunden im Pausenraum.

Manchmal hat man das Glück schon in den ersten Wochen nach einem Umzug jemanden zu treffen, mit dem man sich auf Anhieb versteht. Anders kann ich mir auch nicht erklären, wie Andrea es sonst geschafft hat, meine Diss mehrmals, trotz meiner wirren Formulierungen, zu lesen und mir konstruktive Kritik zu geben. Ich danke dir dafür, dass du immer für mich da warst und mich auch in den dunklen Stunden nicht alleine gelassen hast.

Caro, Stefanie, Michi, und Dr. Astrid Spielmeyer danke ich dafür, dass ihr euch nicht durch meine Fragen, Experimente, Rechnungen oder Satzkonstruktionen verwirren ließt und mir oft einen Weg aus den verstricktesten Situationen zeigen konntet.

Nicht immer war alles, was Björn und ich während unserer Arbeitsfrühstücke ausheckten, wissenschaftlich ernst, dennoch bereicherte es meine Arbeit und unsere Arbeitsgruppe sehr – Danke für die morgendlichen Sichtweisen eines Chemikers und die lustigen Aktionen. Aber auch abends konnte man noch kreative Ideen, Unterstützung und Hilfestellung von der Forschergruppe Dr. Thomas Wichard erhalten oder in vielen Gesprächen einfach noch einiges über das Leben lernen – Danke. Tino danke ich für die Hilfe und die moralische Unterstützung bei meinen Raman-Messungen. Mit keinem kann man so gut ein Büro einrichten wie mit Rafael. Unsere Gespräche und Theorien haben mir die anstrengende letzte Phase der Diss erleichtert – Danke. Dr. Martin Rempt danke ich für die kreativen Ideen.

Ulli und Familie danke ich für die Hilfe beim Sammeln von Algen und dem Jagen

von Krabben an der Kieler Förde. Besonderer Dank geht an Björn und Katha II, die mit mir auch bei extremen Bedingungen Experimente an der Ostsee durchführten und für die Erkenntnis, dass nicht jeder Tee mit Rum schmeckt.

Meine Kooperationen führten mich in die Weiten der Physikalischen Chemie. Viele Leute des IPHT und IPC standen mir und meinen Kooperationspartnerinnen bei Problemen, Messungen oder der Auswertungen hilfreich zur Seite. Ich danke ganz herzlich Ines Latka und Dr. Nadine Vogler, die sich die Zeit genommen haben, *Caulerpa* sp. mit mir auch mal mit dem CARS oder Witec anzusehen. Danke Stefan, dass du für Ina und mich einige Messungen am FT-Raman durchgeführt hast. Traten Probleme beim CARS oder Resonanz-Raman auf, halfen Dr. Dennis Akimov, Sandro und Tobias Meyer uns schnell aus der Patsche – Danke! Mit meinen Fragen und Anmerkungen zum FT-Raman-Spektroskop habe ich Valli und Michael ganz schön auf Trab gehalten. Vielen Dank für die Wege die ihr zurückgelegt habt, wenn das FT-Raman mal wieder anders wollte als ich. Nicht zu vergessen, ein Dankeschön für die Tipps und vor allem die Hilfe bei der Auswertung der Spektren mit R durch Bernd und Dr. Nadine Vogler. Danke auch Max, der sich nicht gescheut hat, für die Frau mit den Algen die DFT-Rechnungen durchzuführen.

Auch die Mitarbeiter der NMR-Abteilung, Herr Bronn von Masslynx, Jan S. und Mina, kreuzten im Laufe der letzten Jahre meinen Weg und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Hierfür nochmals Danke. Durch Prof. Dr. Levent Cavas hatten wir zum Glück immer genügend Mengen an Algenmaterial für die Extraktion von Caulerpenin zur Verfügung und konnten auch einiges über *Caulerpa* sp. außerhalb des Aquariums erfahren – vielen Dank.

Zahlreiche Händler und Hobbyzüchter von *Caulerpa* sp. schreckten nicht davor zurück, mir einen Teil ihrer Lieblinge für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung zu stellen - Danke!

“Und nun steh auf, geh raus, geh spielen und lauf – deinem Traum entgegen.”  
(Neophyta, Thomas D.)

Ich danke meinen Eltern für die Möglichkeit; immer meinem Traum entgegenlaufen zu können, frei meine Entscheidungen zu treffen und auch Fehler machen zu dürfen mit der Gewissheit, dass es bei Ihnen immer einen Platz für mich gibt und sie mich fangen wenn ich falle. Ich weiß, ich habe euch besonders am Ende viele schlaflose Nächte bereitet und das mit dem Fangen lassen war eine schwierige Sache – Danke, dass ihr nie aufgehört habt, an mich zu glauben.

Auch meiner mittlerweile recht großen Familie und meinen vielen Freunden danke ich für die Unterstützung und das Mut machen besonders am Ende meiner Diss.

Diese Arbeit, mein sogenanntes Abenteuer im wilden Osten, wäre nicht möglich gewesen wenn Dirk mich nicht hätte gehen lassen! Trotz der Entfernung warst du immer da, hast mit mir diskutiert, verzwickte R-Grafiken erstellt, auf mich gewartet und dich auch nicht bei dem unerwartet nervenaufreibenden Endspurt von meinen Launen abschrecken lassen, sondern mich weiterhin bestärkt und unterstützt – Danke.

## 8 Erklärung

### 8.1 Prozentueller Anteil an den Kooperationsarbeiten

Die in dieser Arbeit beschriebenen CARS- und Raman-Experimente wurden in einer gleichberechtigten Kooperation mit den Dipl. Chemikerinnen Ina Weißflog und Linda Zedler durchgeführt. Nachfolgend werden die prozentuellen Anteile an den verschiedenen Arbeitsschritten zu den CARS- und Raman-Experimenten von Dipl. Biologin Katharina Grosser in den jeweiligen Kooperationsarbeiten mit Dipl. Chemikerin Linda Zedler und Dipl. Chemikerin Ina Weißflog detaillierter aufgeführt. Auch die Beteiligung von Dipl. Biologin Katharina Grosser an den Kooperationsarbeiten mit Dr. Mahasweta Saha und Dr. Martin Rempt ist nachfolgend aufgeführt.

#### CARS- und FT-Raman-Experimente in Kooperation mit Dipl. Chem. I. Weißflog

- Beschaffung und Kultivierung der Algen 100 %
- Probenvorbereitung für die CARS- und FT-Raman-Messungen 70 %
- Durchführung der CARS-Messungen 10 % <sup>1</sup>
- Auswertung der CARS-Messungen 0 %
- Durchführung der FT-Raman-Messungen 50 % <sup>2</sup>
- Synthese und Beschaffung der Standards 100 %
- Auswertung der FT-Raman-Messungen 50 %
- Arbeit an der Veröffentlichung "Raman spectroscopic insights into the chemical gradients within the wound plug of the green alga *Caulerpa taxifolia*" 50 % (ChemBioChem, 2012)

---

<sup>1</sup>Die Messungen wurden aufgrund des spezifischen Aufbaus und der Geräteeinstellungen von Dipl. Chemikerin I. Weißflog/ Dipl. Chemikerin L. Zedler durchgeführt. Dipl. Biologin K. Grosser hatte hierbei eine assistierende Funktion.

<sup>2</sup>Hierbei wurden die Messungen sowohl von beiden Kooperationspartnern zusammen als auch bei Krankheit oder sonstigen Ereignissen von nur jeweils einem Partner durchgeführt.

- Arbeit an der Veröffentlichung "Wound plug chemistry and morphology of two species of *Caulerpa*: a comparative Raman microscopy study" 50 % (eingereicht bei Marine Biology)

**Resonanz-Raman-Experimente in Kooperation mit Dipl. Chem. L. Zedler**

- Beschaffung und Kultivierung der Algen 100 %
- Probenvorbereitung für die Resonanz-Raman-Messungen 100 %
- Durchführung der Resonanz-Raman-Messungen 20 % <sup>1</sup>
- Beschaffung der Standards 100 %
- Auswertung der Resonanz-Raman-Messungen 40 %
- Arbeit an der Veröffentlichung "Disruption-free imaging by Raman spectroscopy reveals a chemical sphere with antifouling metabolites around macroalgae" (Biofouling 2011) 50 %

**Anteil an der Kooperationsarbeit mit Dr. M. Rempt** Für die Veröffentlichung "Conserved and species-specific oxylipin pathways in the wound-activated chemical defense of the noninvasive red alga *Gracilaria chilensis* and the invasive *Gracilaria vermiculophylla*" (Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2012) wurde von K. Grosser zu 50 % die biologischen Experimente als auch zu 90 % die Kultivierung der verwendeten Organismen durchgeführt.

**Anteil an der Kooperationsarbeit mit Dr. M. Saha** Für die Veröffentlichung "Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*" (Biofouling, 2011) wurde von Dr. M. Rempt und K. Grosser die Identifikation des Fucoxanthins aus der aktiven Fraktion durchgeführt.

## **8.2 Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

---

Katharina Grosser Jena, 12. Januar 2014