

Abschlussbericht an die Max-Buchner-Forschungstiftung

Forschungsprojekt 2715: Untersuchungen der mikrobiellen Assoziation bei der biotechnologischen Kultivierung des Schwammes *Aplysina aerophoba*

Prof. Dr. rer. nat. Christoph Sydtk, Universität Karlsruhe (TH), Institut für Bio- u. Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie

Abstract

Die *ex situ* Kultivierung von marinen Schwämmen stellt eine attraktive Strategie zur Gewinnung von bioaktiven Naturstoffen aus Schwämmen dar. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Verteilung von schwammassoziierten Bakterien sowie deren zeit- und kulturbedingte Veränderungen untersucht. Des Weiteren wurde an der Entwicklung einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) Sonde zur eindeutigen Detektion von Schwammzellen geforscht. Die Populationsanalyse ergab eine höchst stabile bakterielle Gemeinschaft, deren Zusammensetzung an verschiedenen Stellen eines Schwammes innerhalb einer Art am ähnlichsten ist. Der Einsatz der FISH Sonde wird von der Autofluoreszenz der schwammassoziierten Mikroorganismen erschwert.

Einleitung

Marine Schwämme gehören in der pharmakologischen Forschung zu den interessantesten Quellen neuer biologisch aktiver Naturstoffe. Die Herkunft von Schwamm-Metaboliten ist dabei meist schwierig zuzuordnen. Vermutlich stellen assoziierte Mikroorganismen in vielen Fällen die eigentlichen Produzenten dieser Metaboliten dar. Ein kritisches Problem zur Entwicklung neuer Arzneistoffe mariner Herkunft ist dabei der Nachschub an Substanzen. Schon die für die klinischen Prüfungen benötigten Substanzmengen können häufig nur unter großen Schwierigkeiten beschafft werden, da Wildbestände an Schwämmen diese in der Regel nicht liefern können. Nach einer erfolgreichen Zulassung als

Arzneimittel steigt der Substanzbedarf gegebenenfalls noch drastisch.

Schwammspezifische Sekundärmetaboliten sind bisher noch nicht biotechnologisch zugänglich, da es an ausreichend zuverlässigen Methoden zur Kultur von Schwammgewebe, Schwammzellen oder funktionellen Schwämmen fehlt. Totalsynthesen der Naturstoffe sind prinzipiell möglich, angesichts der meist sehr komplexen Strukturen ökonomisch aber nicht vertretbar. Sehr langfristig könnte im Einzelfall die Klonierung und heterologe Expression von Biosyntheseclustern eine denkbare Alternative darstellen.

Nach alternativen Strategien zur Gewährleistung des Substanznachschubs wird daher intensiv gesucht. Eine Möglichkeit ist die biotechnologische Kultivierung wirkstoffproduzierender Schwämme. Das dabei verfolgte Konzept beruht auf der modellhaften Kultivierung funktioneller Schwämme und hat das Ziel, allgemein anwendbare Methoden zur Schwammbiomasseproduktion unter kontrollierten Bedingungen zu entwickeln und somit Sekundärmetaboliten aus Schwämmen nachhaltig zur Verfügung zu stellen. Die aktuellen Arbeiten dazu werden zur Zeit exemplarisch an der Schwammart *Aplysina aerophoba* durchgeführt (Hausmann et al., 2006), da diese Art sowohl mikrobiologisch als auch chemisch gut charakterisiert ist. Allerdings ist die *ex situ* Kultivierung von Schwämmen bisher wenig erfolgreich und über die metabolischen Interaktionen zwischen den Mikroorganismen und ihren Wirten ist nur wenig bekannt. Daher ist es im Hinblick auf eine biotechnologische Kultivierung von Schwämmen sehr

wichtig, eine relevante Charakterisierung der assoziierten Mikroorganismen vorzunehmen und zeit- und kulturbedingte Veränderungen sowohl der Mikroorganismen als auch der Naturstoffe zu erfassen. Des Weiteren beziehen sich die meisten Studien zur Assoziation von Bakterien und Schwämmen auf Mikroorganismen, die das innere Schwammgewebe, das Mesohyl besiedeln, während den Mikroorganismen, die die Oberfläche der Schwämme besiedeln, relativ wenig Beachtung geschenkt wurde (Lee et al., 2006). Aufgrund der sessilen Lebensweise der Schwämme ist besonders eine aufwuchshemmende chemische Abwehr unentbehrlich. Resultierend aus dieser Notwendigkeit sind zwei Möglichkeiten denkbar, 1) entweder produzieren die Schwämme selbst Wirkstoffe mit aufwuchshemmender Wirkung oder b) bestimmte Mikroorganismen, die in der Lage sind, derartige bioaktive Stoffe zu produzieren, werden bevorzugt von den Schwämmen beherbergt. Inzwischen konnte in manchen Fällen gezeigt werden, dass Bakterien, die die Oberfläche von Schwämmen besiedeln, antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass die Oberflächen besiedelnden Bakterien zum Teil für die Produktion von pharmazeutisch interessanten bioaktiven Sekundärmetaboliten in Schwämmen verantwortlich sind. Ob die Wirkstoffe von den Schwämmen oder den Mikroorganismen oder in Kooperation produziert werden, in allen Fällen sollte es zu einer sehr spezifischen Besiedelung der Schwammoberflächen kommen. Eine genaue Charakterisierung der Komposition der Bakterien auf der Oberfläche der Schwämme könnte im Rückschluss Antwort auf die Frage der Herkunft der Metaboliten erlauben. Daher wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit eine Populationsanalyse der Schwammoberflächen besiedelnden Bakterien im Vergleich zu den Bakterien im Mesohyl der Schwämme durchgeführt. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich dieser Gemeinschaften mit der Mikroflora auf verschiedenen be-

lebten und unbelebten Referenzoberflächen, wie andere Invertebraten z.B. eines Seesterns und einer Seegurke oder einem Stein oder im Seewasser. Daneben sollte für eine eindeutige Identifizierung von Schwammzellen auf molekularer Ebene die Entwicklung einer FISH Sonde erfolgen.

Methoden

Die Charakterisierung der Mikroflora von Schwämmen und Referenzproben erfolgte mit Hilfe einer universellen Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation der zuvor isolierten 16S rDNA von Bakterien und der anschließenden sequenzspezifischen Auftrennung der PCR-Produkte mittels Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE). Eine Clusteranalyse des Bandenmusters der in der DGGE aufgetrennten DNA-Fragmente spiegelt die Ähnlichkeiten der bakteriellen Komposition in den jeweiligen Proben wider. Die Sequenzierung der ribosomalen DNA-Fragmente aus der DGGE führt über einen Datenbankvergleich zur taxonomischen Einordnung des entsprechenden Bakteriums.

Für die Entwicklung von schwammspezifischen FISH Sonden wurden zunächst auf der 28S rDNA der Schwammart *Suberites domuncula* zwei Sequenzen für die Bildung eines Primerpaars SUB2F und SPO_SO1R ermittelt. Die Zielsequenz des Vorwärtsprimers SUB2F lässt sich sehr spezifisch nur bei *S. domuncula* finden, die Zielsequenz des Rückwärtsprimers SPO_SO1R dagegen kommt bei vielen unterschiedlichen Schwammarten vor. Daraus resultieren zwei FISH Sonden, eine spezifisch gegen die Schwammart *S. domuncula* gerichtete und eine zweite Sonde, gerichtet gegen unterschiedliche Schwammarten. Die Spezifität der Primer wurde zunächst mittels PCR getestet. Des Weiteren erfolgte zur Kontrolle der zusätzliche Einsatz einer universellen gegen Eukaryonten gerichteten FISH Sonde EUK 516 die gleichzeitig mit den schwammspezifischen Sonden binden sollte. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mittels DAPI. Die Struktur der

Schwammgewebe wurde durch eine histologische HE-Färbung aufgeklärt.

Ergebnisse und Diskussion

Zeit- und kulturbedingte Veränderungen der schwammassoziierten Mikroorganismen

Die Ergebnisse von Vorarbeiten zeigten auf, dass das Spektrum der bakteriellen Population bei *ex situ* kultivierten marinen Schwämmen in einem Zeitraum von 6 Monaten trotz einer massiven Degeneration der Schwämme stabil blieb. Auch das Spektrum der typischen Sekundärmetaboliten blieb erhalten (Gerçe et al., 2009). Dieser für die Gewinnung von Wirkstoffen aus kultivierten Schwämmen wichtige Nachweis der Stabilität der bakteriellen Gemeinschaft wurde im Rahmen dieses Förderstipendiums ergänzt und bestätigt. Der Hauptanteil der bakteriellen Population blieb auch in einer Langzeitkultivierung von 54-76 Wochen in Schwämmen erhalten (Abbildung 1). Interessanterweise konnten vor allem die Schwämme (Nummer 11 und 17) die mit zusätzlicher Belichtung kultiviert wurden, ihre Morphologie am längsten (76 Wochen) erhalten. In der DGGE ist erkennbar, dass bei diesen beiden Schwämmen im Laufe der Kultivierung das Auftreten eines Bakteriums, markiert mit Pfeilen in Abbildung 1, in Vorarbeiten als ein Cyanobakterium "*A. aerophoba* clone TK09" identifiziert, dominant wird. Der positive Effekt von Belichtung auf Schwämme während der *ex situ* Kultivierung ist daher vermutlich auf das vermehrte Wachstum von schwammassoziierten photosynthetischen Mikroorganismen bei gleichzeitigem Transfer von Nährstoffen vom Bakterium an den Wirt (Wilkinson, 1979) zurückzuführen.

Aus diesen vielversprechenden Ergebnissen bezüglich der Stabilität der bakteriellen Gemeinschaft und der Metaboliten und des positiven Effektes von Belichtung resultiert, dass die Kultivierung von Schwämmen für die Gewährleistung des Nachschubs von bioaktiven Naturstoffen einen erfolgversprechenden Ansatz bietet.

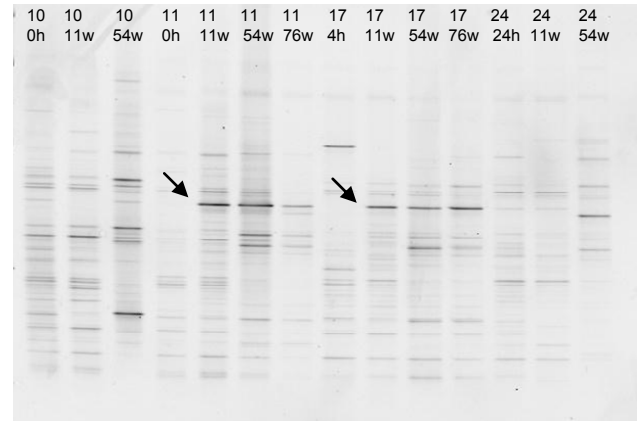


Abb. 1. DGGE der 16S rDNA Fragmente der Bakterien isoliert aus *A. aerophoba*. Untersucht wurden die Schwämme Nummer 10, 11, 17 und 24 nach Entnahme der Schwämme aus ihrem Habitat (0h, 4h & 24h) und nach einer Kultivierungszeit von 11 Wochen (11w), 54 Wochen (54w) und 76 Wochen (76w). Pfeile markieren das Cyanobakterium "*A. aerophoba* clone TK09".

Verteilung der Mikroorganismen in Schwämmen

Die Populationsanalyse der Mikroorganismen auf der Oberfläche von verschiedenen Schwammarten im Vergleich zu den Bakterien im Mesohyl der jeweiligen Schwämme und in Relation zu verschiedenen Referenzoberflächen (Abbildung 2) ergab:

- bei sieben von acht untersuchten Schwammarten war die Ähnlichkeit der bakteriellen Besiedlung zwischen Schwammoberfläche und Schwammesohyl innerhalb einer Schwammspezies am größten, ersichtlich aus der immer paarweisen Anordnung der Oberflächen- und Mesohylproben einer jeweiligen Schwammart in der Clusteranalyse. Die Ähnlichkeiten beliefen sich auf Werte zwischen 49% und 83% (Abbildung 3).
- Im Gegensatz dazu waren die bakteriellen Gemeinschaften der Referenzproben zueinander ähnlicher als zu jedem der Schwämme. Die Ähnlichkeit zwischen den Referenzproben und den Schwämmen betrug nur höchstens 28%.

Durch Arbeiten von Hentschel et al. (2002) ist bekannt, dass die bakterielle Population in verwandtschaftlich und geographisch entfernten Schwammarten zueinander ähnlicher ist als zu jeder anderen

marinen Nicht-Schwamm-Probe. Diese Ergebnisse können nun ergänzt werden: Die bakterielle zwischenartliche Gemeinschaft von Schwämmen ist zueinander sehr ähnlich (28-62%), jedoch ist die innerartliche Ähnlichkeit der die Oberflächen besiedelnden und der im Mesohyl zu findenden Bakterien höher (49-83%). Die Mechanismen, die dazu führen, dass Schwämme den sie besiedelnden Mikroorganismen ein einzigartiges Milieu bieten, das zur Ausprägung einer hochspezifischen und individuellen bakteriellen Gemeinschaft führt, das so verschieden von der sie umgebenden Umgebung ist, ist unklar. Trotz der hohen Ähnlichkeit der bakteriellen Gemeinschaft innerhalb einer Schwammart ist aus der DGGE auch ersichtlich, dass manche Bakterien dominant auf der Oberfläche vorkommen, andere wiederum im Mesohyl vorherrschen. Die Hintergründe für die unterschiedliche Verteilung sollen in weiteren Arbeiten eine Sequenzierung der entsprechenden rDNA-Fragmente aus der DGGE und ein Datenbankvergleich für die taxonomische Ein-ordnung der entsprechenden Bakterien liefern.

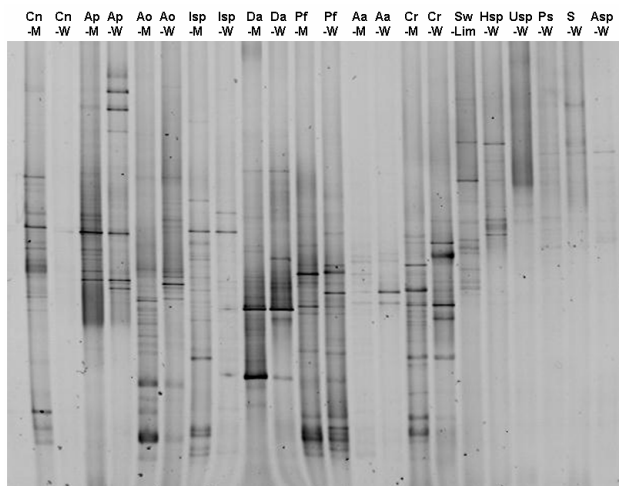


Abb. 2. DGGE der 16S rDNA Fragmente der Bakterien isoliert aus Schwammoberflächenabstrichen (W), Mesohyle (M) und Referenzproben. Cn= *C. nucula*; Ap= *A. polypoides*; Ao= *A. oroides*; Isp= *I. sp.*; Da= *D. avara*; Pf= *P. ficiformis*; Aa= *A. aerophoba*; Cr= *C. reniformis*; Sw-Lim= Limski-Kanal Wasser; Hsp= *Holothuroidea sp.*; Usp= *U. sp.*; Ps= schwarze Fliese; S= Stein; Asp= *Astroidea sp.*

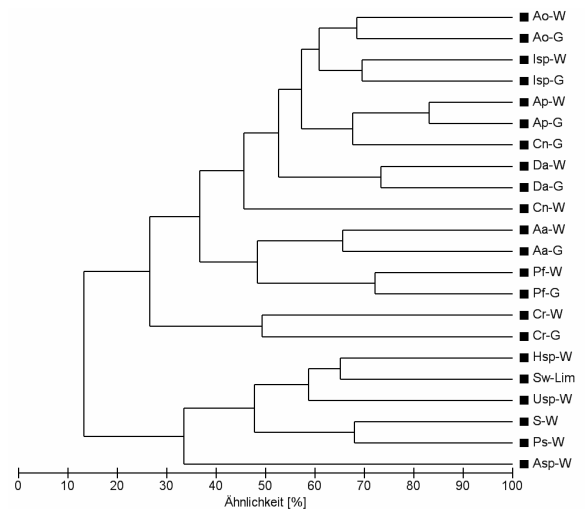


Abb. 3. Dendrogramm der Clusteranalyse der Ähnlichkeiten des DGGE Bandenmusters der 16S rDNA der Bakterien aller untersuchten Schwamm- und Referenzproben.

Entwicklung einer FISH Sonde zum Nachweis von Schwammzellen

Der Spezifitätstest der Primer wurde mittels PCR durchgeführt. Getestet wurden fünf verschiedene Schwammarten *S. domuncula*, *A. aerophoba*, *Axi-nella polypoides*, *Chondrilla nucula* und *Tethya aurantium*, sowie eine Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* und ein Bakterium *Escherichia coli*. Eine erfolgreiche Amplifikation konnte nur bei der 28S rDNA von *S. domuncula* durchgeführt werden (Abbildung 4), was auf eine ausreichende Spezifität der Primer hindeutet.



Abb. 4. Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate, amplifiziert mit Sub2F und SPO_SO1R. 1 = DNA-Leiter, 2 = *S. domuncula*, 3 = *A. aerophoba*, 4 = *A. polypoides*, 5 = *C. nucula*, 6 = *S. domuncula*, 7 = *T. aurantium*, 8 = *S. cerevisiae*, 9 = *E. coli*, 10/13 = Negativkontrolle, 11/12 = *S. domuncula*.

Nach dem Test auf Spezifität erfolgte die Entwicklung der zwei schwammspezifischen Sonden SPO_UNI und SUB_SPEZ. Erste Hybridisierungsversuche mit Schwammgewebegefrierschnitten waren erfolglos, woraufhin eine histologische Färbung der Gewebeschnitte erfolgte. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der histologischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines 10 µm dicken Gefriergewebeschnitts von *A. aerophoba*. Die Schwammzellen, markiert mit einem Pfeil, sind um einen Kanal herum angeordnet.



Abb. 5. Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Gefriergewebeschnitts von *A. aerophoba*. Der Pfeil markiert Schwammzellen, die um einen Kanal = k angeordnet sind. Maßstab = 10 µm.

Zur Überprüfung des Hybridisierungsprotokolls erfolgte anschließend die Durchführung der FISH mit anderen eukaryontischen Organismen. Hierfür wurde die Sonde EUK 516, die allgemein eukaryontische Zellen erfasst, eingesetzt. Abbildung 6 zeigt die erfolgreiche Durchführung der FISH an Hefezellen mit der Sonde EUK 516, Cy3 gekoppelt, sowie der DNA-Kontrollfärbung per DAPI in Einzelkanalaufnahmen.

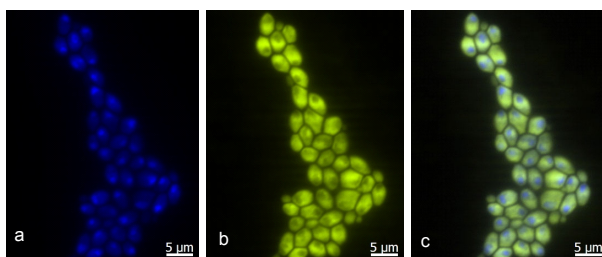


Abb. 6. FISH von *S. cerevisiae*. a) DAPI-Filter b) Cy3-Filter c) DAPI- und Cy3-Filter

Abbildung 7 zeigt mit der EUK 516 Sonde angefärbte Kieselalgen im Gewebe von *S. domuncula* mit der DAPI DNA-Kontrollfärbung in einer Mehrkanalaufnahme.

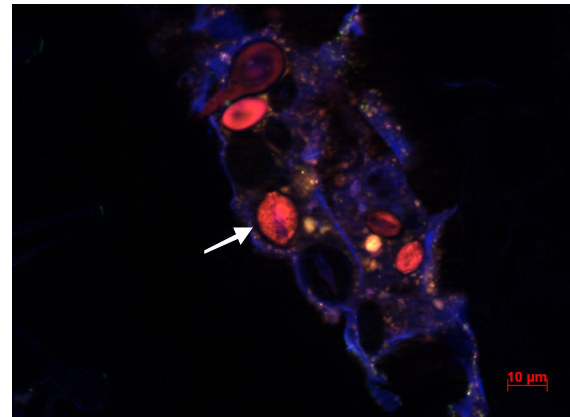


Abb. 7. Mehrkanalaufnahme eines 20 µm dicken Gefrierschnitts von *S. domuncula*, hybridisiert mit Cy3 gekoppelter Sonde EUK 516 und Kontrollfärbung mit DAPI. Der Pfeil markiert eine Kieselalge.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein zu geringes Vorkommen an Ribosomen Grund für die erfolglose FISH von Schwammzellen ist, wurde die Gesamt-RNA aus Schwammzellen von drei unterschiedlichen Schwammarten *A. polypoides*, *Acanthella acuta* und *S. domuncula* isoliert. Eine anschließende RT-PCR zum Erhalt der cDNA und die darauffolgende Amplifikation zeigten, dass ausreichend rRNA in den Zellen vorhanden ist. Des Weiteren zeigt auch dieser Versuch die Spezifität der Primer, da nur bei Proben von *S. domuncula* Amplifikate erzielt wurden (Abbildung 8).

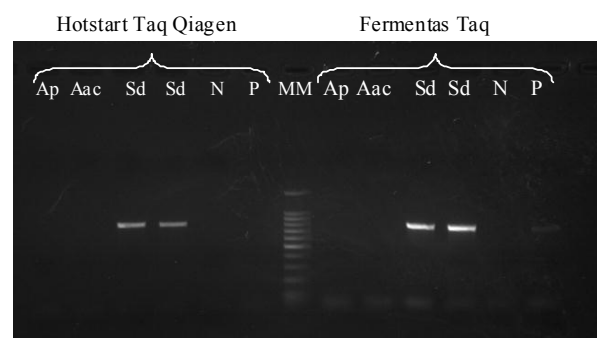


Abb. 8. Gelelektrophorese der amplifizierten cDNA von *A. polypoides* (Ap), *A. acuta* (Aca) und *S. domuncula* (Sd). MM = DNA-Leiter, N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle

Nach den erfolglosen Versuchen der Hybridisierung von Schwammgewebeschnitten wurde die Hybridisierung an Schwammzellen durchgeführt, die zuvor aus dem Gewebeverband gelöst wurden. Bei diesen vereinzelt Schwammzellen war es erstmals möglich, positive Signale zu verzeichnen, die in der Größe und Struktur mit Schwammzellen übereinstimmen. Abbildung 9 zeigt vereinzelt Zellen von *A. polypoides*, die mit der Sonde EUK 516 und der Schwammsonde SPO_UNI hybridisiert wurde. Die DAPI Kontrollfärbung zeigt den angefärbten Zellkern. Allerdings wurden in diesen Versuchsreihen positive Signale von Nicht-Schwamm-Zellen verzeichnet (Abbildung 10).

Ob es sich bei diesen Signalen um Autofluoreszenz handelt oder um unspezifische Bindungen der Sonde an Nicht-Schwamm-Zellen, muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

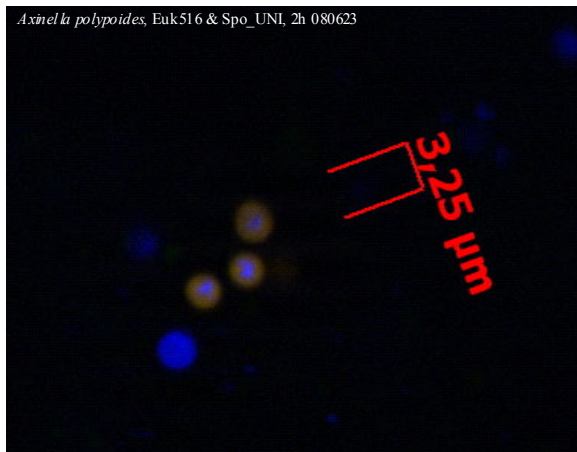


Abb. 9. Mehrkanalaufnahme der FISH von vereinzelt Zellen von *A. polypoides* mit der Sonde EUK 516 und der Schwammsonde SPO_UNI. Die DNA Färbung erfolgte mittels DAPI.

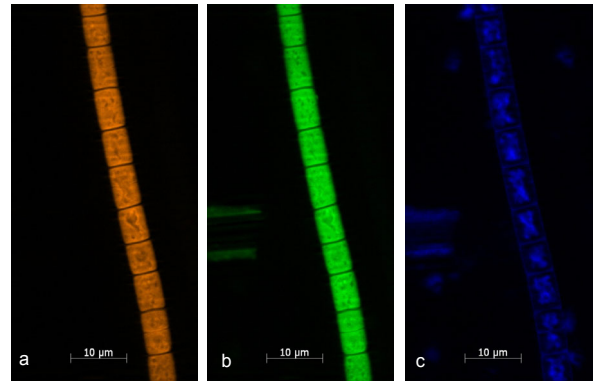


Abb. 10. FISH von vereinzelt Zellen der Schwammart *A. acuta* mit den Sonden SPO_Uni, Cy3 gekoppelt (a) SUB_Spez, FITC gekoppelt (b) und der DAPI-Färbung (c).

Literatur

Hausmann, R., Vitello, M., Leitermann, F., and Syldatk, C. (2006). Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba* - A model sponge for ex situ sponge biomass production. *J Biotechnol* 124, 117-127.

Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., and Moore, B.S. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68, 4431-4440.

Lee, O.O., Lau, S.C.K., and Qian, P.Y. (2006). Consistent bacterial community structure associated with the surface of the sponge *Mycale adhaerens bowerbank*. *Microb Ecol* 52, 693-707.

Gerçe, B., Schwartz, T., Voigt, M., Rühle, S., Kirchen, S., Putz, A., Proksch, P., Obst, U., Syldatk, C. and Hausmann, R., (2009). Morphological, bacterial, and secondary metabolite changes of *Aplysina aerophoba* upon long-term maintenance under artificial conditions, *Microb Ecol*, DOI 10.1007/s00248-009-9560-6

Wilkinson, C.R. (1979). Nutrient translocation from symbiotic cyanobacteria to coral reef sponges. In *Biologie des Spongiaires*, C. Lévi, and N. Boury-Esnault, eds. (Paris, Colloques internationaux du C.N.R.S.), pp. 373-380.