# Friedrich-Schiller-Universität Jena

Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät Institut für Anorganische und Analytische Chemie



# Analytische Untersuchung von Verteidigungsmetaboliten bei Mikroalgen

# Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines  $Bachelor\ of\ Science\ im\ Studiengang\ Chemie$ 

vorgelegt von
Hannah Busch
aus Stadtlohn

Jena, im August 2020

# Gutachter

- 1. Dr. Thomas Wichard
- 2. Prof. Dr. Georg Pohnert

# Inhaltsverzeichnis

1	Ein	leitung
	1.1	Phytoplankton
		1.1.1 Diatomeen
		1.1.2 Dinoflagellaten
		1.1.3 Algenblüten
	1.2	Parasitismus
		1.2.1 Infektionskreislauf
		1.2.2 Co-Evolution und Virulenz
	1.3	Verteidigungsstrategien und Resistenz
		1.3.1 Morphologische Verteidigung
		1.3.2 Verhaltensbestimmte Verteidigung
		1.3.3 Chemische Verteidigung
		1.3.4 Indirekte Verteidungung
	1.4	Metabolom
		1.4.1 Metabolomik
		1.4.2 Arbeitsweise
	1.5	Zielsetzung
2	Mai	terial und Methoden 13
_	2.1	Material
	2.2	Verwendete Organismen und Wachstumsbedingungen
	2.3	Bestimmung der Zelldichte
	2.4	Untersuchung auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Parasitoiden und auf
		Änderungen im Metabolom unterschiedlicher Diatomeen-Arten
		2.4.1 Experimentelles Design
		2.4.2 Extraktion und Probenvorbereitung
		2.4.3 Wirkung des Exometaboloms
	2.5	Co-Kultivierungsexperiment zur Bestimmung der Empfindlichkeit und Ver-
	2.0	teidigungsinduktion bei Ceratium sp
		2.5.1 Experimentelles Design
		2.5.2 Extraktion und Probenvorbereitung
	2.6	UHPLC-HR-MS-Analyse der Endometabolom-Proben
	2.7	Messung von flüchtigen Exometabolom-Komponenten mittels SPME-GC-MS 20
	۷.۱	2.7.1 Experimentelles Design
		2.7.1 Experimentenes Besign
	2.8	Datenauswertung
	4.0	2.8.1 Vergleich von Zelldichten und Wachstumsraten
		2.0.1 vergieren von Zenarenden und Wachstumstaten

		2.8.2	Compound Discoverer	21
		2.8.3	MetaboAnalyst	21
3	Erg	ebnisse	9	23
	3.1	Labor	tests zur Bestimmung der Empfindlichkeit oder Resistenz verschiede-	
		ner Di	atomeen-Mikroalgen gegen den Parasitoiden	23
		3.1.1	Empfindlichkeit von Diatomeen-Spezies gegen ${\it Lagenisma~coscinodisci}$	23
		3.1.2	Empfindlichkeit von Dinoflagellat-Spezies gegen ${\it Parvilucifera\ rostrata}$	24
		3.1.3	Vergleichende Bewertung der Empfindlichkeit aller untersuchter Algen	24
	3.2	Co-Ku	ıltivierung zur Untersuchung auf einen Resistenztransfer von einer	
		resiste	nten Mikroalgen auf eine empfindliche verwandte Art durch das Exudat	29
	3.3	Unters	suchung auf endometabolomische Veränderungen in den Diatomee-	
		Mikro	algen durch Behandlung mit dem Parasitoiden	31
		3.3.1	Verwendete Featureanzahl und Normalisierungsfaktoren für die Kul-	
			turen	31
		3.3.2	Keine signifikante Veränderung im Metabolom von Lithodesmium	
			$undulatum \text{ (Helg52)} \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots$	32
		3.3.3	Wenige heraufregulierte Features in Coscinodiscus granii (Cos37	
			und Cos20) bei der Infektion mit dem Parasitoiden	33
		3.3.4	Kaum metabolomische Änderungen in Gegenwart des Parasitoiden	
			bei der resistenten Art Coscinodiscus wailesii (Cos5)	38
		3.3.5	Signifikante metabolomische Veränderungen in den behandelten	
			Proben der resistenten Diatomeen-Art Coscinodiscus radiatus (Cos43)	39
		3.3.6	Überprüfung der Metabolom-Daten auf die Anwesenheit von Phyto-	
		<b>T</b> T .	hormone in Diatomeen-Mikroalgen	
	3.4		suchung der flüchtigen Metabolite aus dem Exometabolom von Diatomeen-	
	9 -	1		45
	3.5		ultivierung zur Prüfung auf Verteidigungsinduktion bei Ceratium sp.	4.0
			eine benachbarte infizierte Kultur	48
		3.5.1	Zustand und Wachstum von Ceratium sp. in der Co-Kultivierung.	48
		3.5.2	Untersuchung auf Veränderungen im Endometabolom von Ceratium	F.O.
		2 5 2	sp. durch Infektion oder Induktion	50
		3.5.3	Phytohormone in <i>Ceratium sp.</i>	51
4	$\operatorname{Disl}$	kussior	1	<b>52</b>
	4.1	Metho	den-Diskussion	52
		4.1.1	Extraktionmethode, analytisches Prinzip, Datenaufbereitung und	
			(statistische) Auswertung der LC-MS-Analyse	52
		4.1.2	Bestimmung der Zelldichte	
		4.1.3	SPME-GC-MS-Analyse als vielversprechende Methode	57

	4.2 Mögliche Ursachen der Resistenz von Odontella sinensis, Lithodesmium			
		undulatum und Coscinodiscus wailesii gegen den Parasitoiden Lagenisma		
		coscinodisci	59	
		4.2.1 Selektivität der Zoosporen für Wirtszellen	59	
		4.2.2 Morphologischer Resistenz oder Gen-für-Gen-Resistenz aus der Co-		
		Evolution von Wirt und Parasitoid	60	
	4.3	Bedeutung der signifikant veränderten Features bei Coscinodiscus radiatus	61	
	4.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Isolate von ${\it Coscinodiscus\ granii}$ .	64	
	4.5	Semi-Resistenz und induziertes Priming von Ceratium sp	65	
	4.6	Bedeutung der Phytohormone bei der Verteidigungreaktion von Mikroalgen	67	
5	Zus	ammenfassung und Ausblick	69	
$\operatorname{Li}$	terat	urverzeichnis	i	
A	Bild	lanhang	iv	
В	Tab	ellenanhang	ix	
$\mathbf{C}$	Eige	enständigkeitserklärung	ciii	

# 1 Einleitung

# 1.1 Phytoplankton

In den Meeren dieser Welt wimmelt es nur so von lebenden Organismen, die oft viel zu klein sind, um sie mit bloßem Auge sehen zu können. Diese Mikroorganismen werden als Phytoplankton bezeichnet und stellen bedeutende Primärproduzenten der Meere dar. Durch Photosynthese erzeugen die Organismen des Phytoplankton aus anorganischen Ausgangsstoffen wie zum Beispiel Kohlenstoffdioxid CO<sub>2</sub> organische Produkte, die sie für verschiedene Bestandteile ihrer Zellen benötigen. Als Primärproduzent wird das Phytoplankton von Lebewesen aus höheren Trophieebenen gefressen und bildet damit den Beginn der marinen Nahrungskette.

Die photosynthetische Fähigkeit des Phytoplanktons hat auch große Bedeutung für das Leben außerhalb des Wassers, da ein großer Teil der weltweiten Sauerstoff-Produktion durch die Kleinstlebewesen in den Meeren und Gewässern geleistet wird<sup>[1]</sup> und auch bei der Fixierung und Umsetzung von CO<sub>2</sub> tragen marine Organismen einen erheblichen Anteil. Zu den am häufigsten vorkommenden Organismen des Phytolpanktons zählen Mikroalgen aus der Klasse der Dinoflagellaten und aus der Klasse der Diatomeen (Kieselalgen).<sup>[1]</sup>

#### 1.1.1 Diatomeen

Bei den photosynthetischen Diatomeen handelt es sich um eine diverse Gruppe einzelliger Mikroalgen, deren Zellwände aus Silikat bestehen. Die verschiedenen Diatomeen-Arten variieren stark in ihrer Größe und während die Zellen mancher Arten als einzelne Zellen vorliegen, bilden andere Arten Ketten aus den einzelnen Diatomeen-Zellen (Abbildung 1.1). Diatomeen pflanzen sich in der Regel durch asexuelle Zellteilung fort. Aufgrund der starren Zellwand aus Silikat wird die Zellwand der Tochterzelle innerhalb der Elternzelle aufgebaut, weshalb eine Tochterzelle kleiner sein wird als die Elternzelle. Diese Form der Zellteilung hat zur Folge, dass die Größe der Algenzellen mit der Zeit abnimmt und wenn schließlich eine kritische Größe unterschritten wird, kommt es zur sexuellen Fortpflanzung[2]. Im Allgemeinen sind Diatomeen weniger für die Produktion von Toxinen bekannt, jedoch können Mikroalgen aus der Gattung Pseudo-nitzschia Domoinsäure produzieren. Wenn die Mikroalge in sehr hoher Konzentration vorliegt, kann sich Domoinsäure in der Nahrungskette im Meer anreichern und bei Menschen, die mit dem Toxin kontaminierte Fische und Meeresfrüchte verzehren, kommt es zu einer amnetischen Form der Muschelvergiftung (Amnesic Shellfish Poisoning). [3]

### 1.1.2 Dinoflagellaten

Auch die Dinoflagellaten bilden eine große und heterogene Gruppe von photosynthetischen Mikroalgen, die sich durch das Aufweisen sogenannter Geißeln (Flagellen) auszeichnen, mit





**Abbildung 1.1:** Verschiedene Diatomeen-Spezies. A Coscinodiscus granii, B, Odontella sinen-sis

denen sie sich im Wasser fortbewegen können. Einige Dinoflagellaten-Arten kennzeichnen sich außerdem durch ihre Biolumineszenz<sup>[4]</sup> und mache Arten bilden Zysten, um beispielsweise bei ungünstigen Bedingungen wie Nährstoffmangel zu überleben.<sup>[5]</sup> Dinoflagellaten können massiven Algenblüten bilden und wenn es dabei zu einer erhöhten Produktion von Toxinen kommt, wird von schädlichen Algenblüten (*Harmful Algae Blooms*, HBAs) gesprochen. Zum Beispiel können manche Mikroalgen aus der Gattung *Alexandrium* drei verschiedene Arten von Toxinen produzieren - Saxitoxin, Gonyautoxin und Spirolide.<sup>[6]</sup> Genau wie bei den Diatomeen können sich Menschen nach Anreicherung der Toxine in der Nahrungskette vergiften. Dabei kommt es z.B bei Saxitoxinen zu einer als *Paralytic Shell-fish Poisoning* (PSP) bezeichneten Vergiftung, die in schlimmen Fällen durch Atmungsoder Herzversagen zum Tod führen kann.

# 1.1.3 Algenblüten

Algenblüten von Diatomeen, Dinoflagellaten oder andern Mikroalgen sind ein Phänomen, das in den vergangenen Jahrzehnten häufiger und in den Meeren weiter verbreitet aufgetreten ist.<sup>[3]</sup> Dabei können schädliche Algenblüten nicht nur die menschliche Gesundheit beeinflusse, sie haben auch großen Einfluss auf das marine Ökosystem. So können HBAs unter anderem auch für massenhaftes Fischsterben sorgen, indem sie die Kiemen der Tiere schädigen.<sup>[7]</sup> Für vermehrtes Auftreten von HBAs gibt es mehrere Ursachen, an denen auch vor allem der Klimawandel und anderes menschliches Handeln einen großen Anteil haben.

Eine Voraussetzung für das Wachstum von Mikroalgen und somit Entstehen einer Algenblüte ist das ausreichende Vorhandensein von Nährstoffen, wobei für die Mikroalgen vor allem Stickstoff und Phosphor von Bedeutung sind und für Diatomeen zusätzlich auch Silizium, da sie damit ihre Zellwände aufbauen. Durch Umweltverschmutzung und den Eintrag von Düngemitteln in Gewässer durch den Menschen kann der Nährstoffgehalt steigen und somit das Entstehen von HABs fördern. [8] Weiterhin ist für das Wachstum

von Mikoalgen auch die Temperatur wichtig und es konnte gezeigt werden, dass sich die Erwärmung der Meere durch den Klimawandel positiv auf das Aufkommen von HBAs auswirkt. [9] Auch andere Folgen des Klimawandels wie das vermehrte Auftreten von Stürmen oder die Veränderung von Meeresströmungen können mit verantwortlich für die globale Ausbreitung von HABs sein, [10] da dadurch Mikroalgen in neue Lebensräume gelangen und sich dort gegebenenfalls verbreiten können. Außerdem trägt auch der Transport von Mikroorganismen im Ballastwasser von großen Frachtschiffen zur Verbreitung bei. [11]

Neben dem bereits genannten Nährstoffgehalt und der Temperatur wirkt sich auch das Sonnenlicht und die Anwesenheit von natürlichen Feinden auf das Wachstum der Mikroalgen aus. Zu den natürlichen Gegnern der Algen zählen sowohl Fressfeinde wie beispielsweise Ruderflusskrebse, als auch parasitäre Feinde. Dabei kann der Befall von Mikroalgen mit einem Parasiten sogar dazu führen, dass ganze Algenblüten beendet werden. [12]

# 1.2 Parasitismus

Als Parasitismus wird eine Lebensform bezeichnet, bei der ein Organismus, der Parasit einen anderen, den Wirt als Lebensraum und Nahrungsquelle benutzt und somit auf Kosten dieses Wirtes lebt, der dadurch Nachteile erleidet. Als Parasitoide werden dabei diejenigen Parasiten bezeichnet, die ihren Wirt töten. Da in dieser Arbeit mit ebensolchen Parasitoiden gearbeitet wurde, wird dieser Ausdruck im Folgenden verwendet. Weiterhin lassen sich Endoparasiten von Ektoparasiten unterscheiden, von denen erstere im Inneren ihres Wirtes leben, während letztere nicht in den Wirtskörper eindringen, sondern an dessen Oberfläche leben.

Auch Diatomeen und Dinoflagellaten können von Parasitoiden befallen werden und einige Dinoflagellat-Arten weisen sogar selbst parasitären Lebensweisen auf.<sup>[13]</sup> Bei den in dieser Arbeit untersuchten Parasitoiden handelt es sich zum einen um solche aus der Gattung der *Paraluzifera*, die Dinoflagellaten befallen können. Zum anderen wurde der Oomyceten-Parasitoid *Lagenisma coscinodisci* für die Infektion von Diatomeen verwendet. Der Ablauf einer Infektion weist bei beiden Parasitoiden große Ähnlichkeit auf und soll im Folgenden kurz umrissen werden.

### 1.2.1 Infektionskreislauf

Zu Beginn jeder neuen Infektion einer Algenzelle steht die frei-lebende, infektiöse Form des Parasitoiden als Zoosporen. Die begeißelten relativ kleinen Zoosporen heften sich zunächst an die Zellwand der Mikroalgen und gelangen von dort aus in die Zelle hinein. Im Fall von Parvilucifera sp. stirbt die Wirtszelle kurz nachdem es zur Infektion mit den Zoosporen kommt<sup>[14]</sup> und der Parasitoid kann somit als nekrotroph bezeichnet werden, da er sich im Folgenden von der toten Zelle ernährt. Dahingegen bleibt bei der Infektion von Diatomeen mit Lagenisma coscinodisci die Wirtzelle zunächst am Leben und der

Parasitoid nutzt das metabolomische System der Mikroalge für sich selbst aus. [15] Diese Art der Nährstoffaufnahme von einem noch lebenden Wirt wird als biotroph bezeichnet. In den Fällen von beiden Parasitoiden folgt nach der erfolgreichen Infektion von Algenzelle mit Zoosporen eine Phase, in der sich der Parasitoid von seinem Wirt ernährt (Trophont). Daran schließt sich dann die Reproduktionsphase an, in der der Parasitoid im Inneren der Wirtszelle ein Sporangium ausbildet [14], [15] in welchem neue Zoosporen gebildet werden. Für der Freisetzung der Zoosporen konnte für Parviluzifera sinerae nachgewiesen werden, dass sie abhängig von der Konzentration einer chemischen Substanz erfolgt, die von den Wirtszellen und anderen Mikroalgen abgegeben wird. [14] Die Zoosporen verlassen dabei einzelnd die Zelle durch einen oder mehrere Ausgänge. Im Gegensatz dazu verlassen alle Zoosporen von Lagenisma coscinodisci das Sporangium innerhalb weniger Sekunden durch einen Austrittskanal. [15] Die freigesetzten Zoosporen der Parasitoide heften sich wieder an eine neue Wirtszelle und der Infektionskreislauf kann erneut beginnen (Abbildung 1.2). Wenn es zu einer mehrfachen Infektion einer Wirtszelle kommt, kann es in der Reproduktionsphase des Parasitoiden zu genetischer Rekombination durch Meiose kommen.

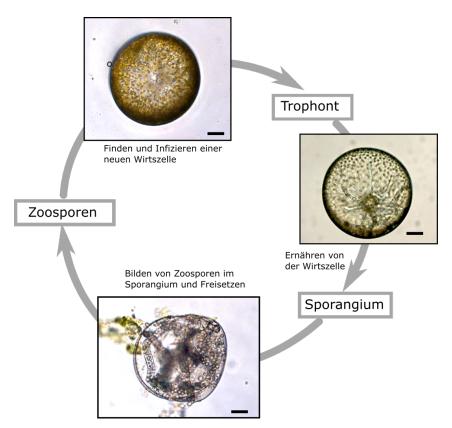


Abbildung 1.2: Infektionskreislauf des Parasitoiden Lagensima coscinodisci. Die verschiedenen Stadien einer Infektion wurden beispielhaft an der Infektion der Mikroalge Coscinodiscus granii mit dem Parasitoiden abgebildet. Das Bild für das Finden und Infizieren eines neuen Wirtes ist als Symbolbild zu betrachten. Das Bild für "Ernährung von der Wirtszelle" wurde aus der Literatur<sup>[15]</sup> übernommen. (Maßstab 20 μm)

# 1.2.2 Co-Evolution und Virulenz

Im Zusammenleben der Parasitoide und ihrer Wirte besteht das Potential zu einer antagonistischen Co-Evolution, bei der sich die beiden Organismen beständig weiterentwickeln und es so zu einer Art "Wettrüsten" zwischen ihnen kommt. Diese Co-Evolution kann unter anderem durch die Red-Queen-Hypothese beschrieben werden und bietet eine Möglichkeit die genetische Diversität auch innerhalb einer Art zu erklären. Im Rahmen der Red-Queen-Hypothese kann außerdem sexuelle Fortpflanzung als Methode zur Kombination von Genen interpretiert werden, die dazu dient eine schnellere Anpassung und Evolution des Wirtes zu ermöglichen. Co-Evolution kann auch schon in der kurzen Zeitspanne einer Algenblüte auftreten, wie am Beispiel eines Parasitoiden und der Dinoflagellaten-Art Alexandrium minutum gezeigt werden konnte.<sup>[16]</sup>

Im co-evolutionären Wettrüsten kann sich die Virulenz des Parasitoiden verbessern. Diese kann sich bei den betrachteten marinen Organismen durch verschieden Faktoren auszeichnen, zu denen die Anzahl und Produktionsgeschwindigkeit der Zoosporen gehören. Weiter spielen auch die Lebensdauer der Zoosporen nach Freisetzung aus dem Sporangium und ihre Fähigkeit einen potentiellen Wirt zu finden eine Rolle. Die begeißelten Zoosporen können beispielsweise durch eine von ihrem Wirt abgegebene Chemikalie angezogen werden (Chemotaxis)<sup>[17]</sup> und dadurch haben sie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine neue Infektion. Die Virulenz der marinen Parasitoiden umfasst ebenfalls Faktoren die mit der Produktion von bioaktiven Substanzen zu tun hat, die beispielsweise die Stoffwechselwege des Wirtes manipulieren und so die Infektion erfolgreicher machen.<sup>[15]</sup>

Konträr zur Parasitoidvirulenz entwickeln die Mikroalgen als Wirte in der Coevolution Strategien zur Verteidigungen gegen den Parasitoiden.

# 1.3 Verteidigungsstrategien und Resistenz

Die Mikroalgen als Wirte von Parasitoiden können durch die Coevolution Möglichkeiten entwickeln sich gegen den feindlichen Organismus zu wehren. Dies kann in manchen Fällen dazu führen, dass ein Wirt vollständig resistent gegen einen Parasitoiden wird und nicht mehr von diesem infiziert werden kann. Weiterhin können manche Wirt auch eine in dieser Arbeit als semi-Resistenz bezeichnete Verteidigung ausbilden. Dies bedeutet, dass der Wirt zwar von dem Parasitoiden befallen werden kann, aber es nicht zu einem vollständigen Infektionskreislauf in der Wirtszelle kommt. Sowohl eine vollständige Resistenz als auch die semi-Resistenz können auf unterschiedlichen Verteidigungsstratiegien beruhen. Dabei lassen sich induzierte Strategien von solchen unterscheiden, die permanent wirken. Jede Art der induzierten Verteidigung benötigt ein für die Wirtsorganismen wahrnehmbares Signal, dass den Verteidigungsmechanismus in Gang setzt. Im Falle der Mirkoalgen muss es sich dabei um ein über chemische Substanzen vermitteltes Signal handeln, da es sich bei den Algen um Einzeller handelt, die kein Nervensystem oder andere Sinnesorgane zur

# Wahrnehmnung besitzen.

Mechanismen zur Verteidigung oder Resistenz bringen in der Regel Kosten für die Wirtsorganismen mit sich, wie beispielsweise eine reduzierte Wachstumstumsrate durch Verbrauch von Nährstoffen und Energie.<sup>[18]</sup> Induzierte Verteidigungsstrategien weisen in dieser Hinsicht einen Vorteil gegenüber einer permanenten Verteidigung auf, da sie nur situationsangepasst aktiviert werden.

Im Folgenden wird auf die verschiedenen Strategien der Verteidigung eingegangen und viele der genannten Beispiele beziehen sich dabei nicht auf eine Wirt-Parasitoid-Interaktion, sonder auf die Wechselwirkung mit den Ruderfußkrebsen als Fressfeinden der Mikroorganismen. Dies liegt darin begründet, dass die Wechselwirkung mit den Parasitoiden bislang weniger tiefgehend untersucht wurde als solche mit den Fressfeinden. Allerdings könnten sich sehr ähnliche Verteidigungsstrategien wie bei den Ruderfußkrebsen auch in der Interaktion mit Parasitoiden abspielen. Alternativ zu der Fressfeid-Beute-Beziehung können auch Parallelen zwischen der Interaktion von Mikroalgen mit Viren zu der Mikroalge-Parasitoid-Wechselwirkung gezogen werden. Viren sind z.B. teilweise dazu in der Lage die metabolische Produktion von Mikroalgen zu ihren Gunsten zu modulieren. Allerdings können dabei Unterschiede zwischen einzelnen Individuen einer Algengemeinschaft festgestellt werden, die zu einer höheren bzw. niedrigeren Empfindlichkeit einiger Algenzellen gegen die Viren führt<sup>[19]</sup> und die Mikroalgen haben auch hier verschiedene Strategien entwickelt, um dem Pathogen zu entkommen. Weitere Vergleiche sind auch mit marinen Bakterien möglich, die beispielsweise auf empfindliche Mikroalgen-Spezies algizid wirken und diese lysieren können, während andere Arten der gleichen Gattung sich als resistent erweisen.<sup>[20]</sup> Auch wurde z.B. gezeigt, dass bakterielle Symbioten sich in algizide-produzierende Feinde der Mikroalge umwandeln können, wenn diese aufgrund des Alters der Algenzellen bestimmte kleine Moleküle produzieren.<sup>[21]</sup>

### 1.3.1 Morphologische Verteidigung

Für Endoparasitoide, die auch in den Experimenten dieser Arbeit genutzt wurden, ist es das Ziel in das Innere der Algenzelle zu gelangen, um dort zuerst die Phase der Nährstoffaufnahme und anschließend die Reproduktionsphase zu durchlaufen, bevor schließlich Zoosporen freigesetzt werden. Dieses erste Ziel des Parasitoiden kann dadurch verhindert werden, dass sich die Zellwand der Mikroalge für den Parasitoiden als undurchlässig erweist. Hierbei handelt es sich um eine permanente physiologische Verteidigung.

Ein Beispiel für eine ähnliche Verteidigungsstrategie von Diatomeen gegen ihre Fressfeinde, die Ruderfußkrebse stellt der Aufbau einer sehr dicken Silikat-Zellwand dar. Diatomeen-Spezies mit einer solchen dick-wandigen Zellwand zeigten eine geringere Sterblichkeit durch die Ruderfußkrebse als Arten mit einer dünneren Zellwand. Die Diatomeen-Art Coscinodiscus wailesii nutzt außerdem ihre enorme Zellgröße als morphologische Verteidigung gegen Fressfeinde, jedoch kostet es die Mikroalge Energie um solch große Zellen zu

bilden.<sup>[22]</sup>

# 1.3.2 Verhaltensbestimmte Verteidigung

In Gegenwart des Parasitoiden *Parvilucifera infectans* bildet die Dinoflagellat-Spezies *Alexandrium ostenfeldii* Zysten aus, die sich als resistent gegen die Infektion mit dem Parasitoiden erwiesen.<sup>[23]</sup> Dieses Verhalten von *A. ostenfeldii* beruht dabei auf Induktion und wird durch chemische Substanzen ausgelöst, die von dem Parasitoiden an das umgebende Wasser abgegeben und von der Mikroalge wahrgenommen werden.<sup>[23]</sup>

Eine andere Möglichkeit der induzierten Verteidigung bei frei beweglichen Mikroalgen wie den Dinoflagellaten stellt Vermeidungsverhalten dar. Beispielsweise konnte bei der HBA-bildenden Mikroalge Heterosigma akashiwo eine durch den Fressfeind ausgelöste Veränderung des Schwimmverhaltens beobachtet werden, [24] das dazu führte, dass sich die Mikroalge vom Fressfeind distanzierte. Auch die Vermeidung von Fressfeinden oder Parasitoiden beruht darauf, dass die Algenzelle Botenstoffe aus dem Exudat des feindlichen Organismus wahrnimmt und darauf reagiert.

# 1.3.3 Chemische Verteidigung

In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk der Untersuchung weniger auf den zuvor genannten Strategien zur Verteidigung liegen, sondern mehr auf solchen Mechanismen, die auf vom Wirtsorganismus abgegebenen chemischen Substanzen beruhen.

Die HBA-bildende Dinoflagellat-Spezies Alexandrium minutum produziert als chemische Verteidigung vor Fressfeinden beispielsweise einen höheren Gehalt der Neurotoxine, [25] die im Menschen auch die PSP Vergiftungserscheinungen auslösen. Dabei wird die Toxinproduktion durch Signalstoffe der Fressfeinde induziert und erhöht die Resistenz der Mikroalgen gegen die Fraßaktivität der Ruderfußkrebse, [25] indem entweder die Ruderfußkrebse die Giftigkeit der Mikroalge erkennen und diese als Folge daraus nicht fressen oder indem die Krebse einige Zellen der giftigen Alge fressen und dadurch außer Gefecht gesetzt werden. Auch Diatomeen weisen eine induzierte Produktion von chemischen Stoffen zur Verteidigung gegen Fressfeinde auf. Diese wird dabei nicht durch die Anwesenheit der Ruderfußkrebse aktiviert, sondern erst bei Verwundung der Einzeller. Durch das verwundungsaktivierte Freisetzen dieser poly-ungesättigten Aldehyden (PUAs) wird der Nachwuchs der Ruderfußkrebse geschädigt  $^{[26]}.^{[27]}$  Dadurch schützt die verwundete Zelle zwar nicht sich selbst, aber andere Individuen derselben Algenspezies in der Umgebung. Zusätzlich wirkt diese Verteidigungsstrategie nicht unmittelbar, sondern erst zeitverzögert auf die nachfolgende Generation der Ruderfußkrebse<sup>[27]</sup> und kann dadurch auch anderen Algenarten zu Gute kommen, mit der die ursprünglichen Algenspezies in Konkurrenz um Nährstoffe steht.

Neben der direkten Wirkung von chemischen Substanzen auf den feindlichen Organis-

mus können bei Induktion freigesetzte Signalstoffe auch innerhalb einer Spezies wirken und in den Individuen einer Gemeinschaft eine Erhöhung der Verteidigung verursachen. Solche als Priming bezeichneten Effekte wurden bisher vor allem in Landpflanzen beobachtet<sup>[28]</sup>,<sup>[29]</sup> aber auch die marine Makroalge *Pyropia haitanensis* konnte ein durch ein Oxylipin vermittelter Priming-Effekt beobachtet werden.<sup>[30]</sup>

# 1.3.4 Indirekte Verteidungung

Als letzte Strategie zur Verteidigung soll hier die indirekte Verteidigung genannt werden, die zwar auch durch chemische Botenstoffe vermittelt wird, aber weder auf den feindlichen Organismus direkt wirkt, noch einen Einfluss auf die Individuen der angegriffenen Spezies hat. Stattdessen werden bei dieser vor allem von Landpflanzen genutzten Verteidigungsstrategie natürliche Feinde des Fressfeindes der Pflanze durch flüchtige Signalstoffe angelockt, [31] die die Anzahl der Fressfeinde verringert. Auch diese Art der Verteidigung wird oft verwundungsaktiviert induziert.

Das Vorkommen von indirekten Verteidigungsstrategien bei Mikroalgen lässt sich bei Dimethylsulphoniopropionat- oder Dimethylsulfid-produzierenden Organismen vermuten.<sup>[18]</sup> Diese beiden Substanzen werden von Mikroalgen unter anderem bei Fraßaktivität von Ruderfußkrebsen freigesetzt und wirken anziehend auf beispielsweise Seevögel als Fressfeinde der Ruderfußkrebsen.<sup>[32]</sup> Gleichzeitig wird jedoch auch der Dinoflagellaten-Parasitoid Parvilucifera infectans durch hohe Dimethylsulfid-Konzentrationen dazu angeregt Zoosporen aus dem ausgewachsenen Sporangium frei zu setzen.<sup>[14]</sup>

# 1.4 Metabolom

Bei den chemischen Substanzen, die als Signalstoffe sowohl innerhalb der selben Art (z.B. bei Priming-Effekten) als auch zwischen Spezies (wie beispielsweise bei Abwehrmitteln oder bei der Wahrnehmung eines Feindes) wirken, handelt es sich um Sekundärmetaboliten. Diese werden von einem Organismus produziert, haben jedoch im Gegensatz zu Primärmetaboliten keine lebensnotwendige Funktion. Die Sekundärmetaboliten bilden eine sehr heterogene Gruppe und werden nicht konstant vom Organismus produziert, sondern als Antwort auf einen induzierenden Umweltfaktor. Bei diesen Faktoren kann es sich wie zuvor beschrieben, um die Anwesenheit eines Fressfeindes oder Pathogens handeln, aber auch abiotische Faktoren wie z.B. Nährstoffmangel oder Temperaturänderungen können die Herstellung bestimmter Sekundärmetabnolite anstoßen. Die Gesamtheit aller Metabolite wird als Metabolom bezeichnet.

Die Resistenz einer Mikroalge gegen eine Parasitoiden kann auf chemischer Verteidigung beruhen und somit bilden die in der Gegenwart des Parasitoiden produzierten Metaboliten den Schlüssel zum Verständnis dieser Art der Resistenz. Dabei ist es essentiell, dass Metanolite, die an das umgebende Medium abgegeben werden (Exometabolite) von solchen

unterschieden werden, die innerhalb eines Organismus wirken (Endometabolite). Sowohl Exo- als auch Endometabolite können einen Beitrag zur Resistenz bzw. Verteidigungsstrategie der Mikroalge gegen den Parasitoiden beitragen.

### 1.4.1 Metabolomik

Zum Auffinden und Identifizieren für die Verteidigung relevanter Endo- und Exometabolite muss möglichst das gesamte Metabolom des betrachteten Organismus quantifiziert werden. Jedoch ist Metabolomik im strengen Wortsinne - die Quantifizierung aller Metabolite nicht möglich, da die Anzahl der identifizierten Metabolite und die Präzision der Quantifizierung gegenläufige Ziele bilden, zwischen denen ein Kompromiss gefunden werden muss. Weiter ist es z.B. auch nicht möglich alle verschiedenen Verbindungen aus verschiedenen Substanzklasse mit der selben Ionisierungsart zu identifizieren. Kombinatorische Ansätze, bei denen in vielen einzelnen Experimenten jeweils eine Komponente oder eine Gruppe von Substanzen des Metaboloms mit hoher Präzision quantifiziert werden, stellen einen Weg dar, ein möglichst vollständiges Bild des Metaboloms einer untersuchten Spezies zu erhalten. Jedoch erstreckt sich eine solche Arbeit über viele Jahre hinweg und zusätzlich ist auch nicht immer ein Nutzen durch die bloße Identifizierung und Quantifizierung aller Metaboliten gegeben. Weiterhin kann das Metabolom zwischen einzelnen Individuen einer Spezies variieren (z.B. durch Alter oder gesundheitlichen Zustand) und auch andere Faktoren (wie z.B. die Nährstoffsituation oder die Temperatur) können die Bildung und den Gehalt von Metaboliten beeinflussen. Zielführender für die meisten Untersuchungen ist es daher sich auf einige wenige Metabolite, die für das jeweils betrachtete Thema als bedeutend ausgewählt wurden, zu fokussieren oder mit vergleichender Metabolomik zu arbeiten.

Gerade die Änderung des Metaboloms durch einen Umweltfaktor können für eine Thematik, wie beispielsweise die Untersuchung von Verteidigungsstrategien einer Spezies, von großer Bedeutung sein. Das Ziel vergleichender Metabolomik ist es dabei, diejenigen Metabolite, die sich zwischen zwei oder mehr unterschiedlich behandelten Gruppen signifikant unterschieden zu identifizieren, zu quantifizieren und auf ihre Wirkung hin zu prüfen und zu interpretieren.

Aktuelle Beispiele zeigen, dass mit dem Ansatz der vergleichenden Metabolomik Einblicke in die metabolomischen Veränderungen während einer parasitären Infektion gewonnen werden können<sup>[15]</sup> und auch die Identifikation von gezielten Veränderungen eines Pathogens im Metabolismus seines Wirts möglich sind.<sup>[33]</sup> Weiter konnte beispielsweise auch die Struktur eines Pheromons von einer Diatomeen-Spezies durch den metabolomischen Vergleich von Exametabolomen aufgeklärt werden, das bei der sexuellen Reproduktion der Mikroalge eine entscheidende Rolle trägt.<sup>[34]</sup>

### 1.4.2 Arbeitsweise

Ansätze, die sich mit der Untersuchung des Metboloms einer Spezies befassen, beruhen in der Regel im experimentellen Teil auf chromatographischen Trennmethoden gekoppelt mit der Analytik durch Massenspektrometrie. Es sollte jedoch beachtet werden, dass neben den eigentlichen Versuchen ebenso die Planung und Auswertung dieser Experimente einen sehr großen Teil der Arbeit darstellen und auch von größter Wichtigkeit für die Verwendbarkeit der Daten und somit für die Richtigkeit der abgeleiteten Erkenntnisse für die ursprüngliche Fragestellung sind. Ein Überblick über den Arbeitsablauf in

**/ORBEREITUNG** metabolomische Fragestellung z.B. Wie schützt sich eine resistente Alge gegen parasitären Befall? Planung und experimentelles Design Probennahme + Erhalt von Metadaten z.B. Zelldichte, Nährstoffverbrauch, pH-Wert etc. Probenvorbereitung z.B. Extraktion, Aufreinigung, Derivatisierung Analytische Messung z.B. mit LC-MS2 Rohdaten Aufbereitung z.B. Basislinienkorrektur, Peak-Picking statistische Identifikation Analyse Ergebnisprüfung mit Rohdaten dient dazu mögliche Fehler zu erkennen INTERPRETATION Interpretation ggf. auch Zusammenführung mit anderen Ergebnissen z.B aus Transkriptom-Analyse

**Abbildung 1.3:** Arbeitsablauf bei metabolomischen Arbeiten (adaptiert nach [35])

der Metabolomik ist in Abbildung 1.3 zu finden.

Das Schaffen und Planen eines Versuchsansatzes für eine metabolomische Fragestellung stellt den ersten Teil im metabolomischen Arbeitsablauf dar. Nach dieser Vorbereitungsphase schließt sich der experimentelle Teil der Arbeit an, bei dem es sehr wichtig ist Metadaten aus beispielsweise der Kultivierung einer Algenart aufzunehmen. Solche Metadaten, wie Zelldichte zu Beginn, das Medium, der Nährstoffgehalt am Ende der Kultivierungsphase, der Temperaturund Lichtzyklus, stellen die Grundlage für die Replizierbarkeit des Experimentes und damit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse dar. Auch sollten Versuche zur metabolomischen Datenerfassung oder auch zu anderen analytischen Fragestellungen immer mit mindesten drei Replikationen von Proben<sup>[36]</sup> durchgeführt werden, da vor allem biologische Proben einer natürlichen Varianz unterworfen sind und durch die Replikate statistische Sicherheit der Ergebnisse gewährleisten wird.

Die Wahl der Extraktionsmethode und auch die Details zur analytischen Messung bestimmen, welche Art von Substanzen bei diesen Schritten bevorzugt und welche benachteiligt werden.<sup>[37]</sup> Bei dieser Wahl kann

sich die Extraktion oder die Messung auch ungünstig für Metabolite, die für die Fragestellung hoch relevant sein können, erweisen, die als Folge nicht detektiert werden und damit für die Auswertung verloren gehen. Auch bei flüchtigen oder instabilen Metaboliten muss mit dem Verlust der Substanzen während des analytischen Prozesses gerechnet werden. Die Aufbereitung umfasst unter anderem das Filtern und Normalisieren der Rohdaten aus der analytischen Messung kennzeichnet einen essentiellen Schritt im Arbeitsablauf von metabolomischen Arbeiten, da hierbei maßgeblich beeinflusst wird, welche Features in der nachfolgenden statistischen Analyse als signifikant erkannt werden. Als Features im engeren Sinne sollen in dieser Arbeit die nach der Datenprozessierung der Rohdaten erhaltenen Signale mit mindestens einer zugeordneten Retentionzeit, Summenformel und einem m/z-Wert bezeichnet werden. Im weiteren Sinne werden auch Signale ohne eine zugeordnete Summenformel Features genannt, diese werden jedoch nicht zur weiteren Auswertung genutzt, sondern aus der Featureliste entfernt. Mit den aufbereiteten Daten werden weiter in der Auswertung statistische Analysen und Tests durchgeführt, um signifikante Features zu identifizieren. Das Ergebnis dieser Analysen sollte mit den Rohdaten abgeglichen werden, um die Richtigkeit der statistischen Auswertung zu prüfen.

Bei die Fragestellung interessante und relevante Features, die auch für eine weiterführende Interpretation oder Auswertung genutzt werden sollen, muss die Identität der Substanz verifiziert werden. Durch MS/MS-Daten ist oft schon eine mögliche Strukturformel und damit Idenität des Features gegeben. Diese muss jedoch durch weitere Überprüfungen wie beispielweise durch Co-Injektion eines Standards bestätigt werden. Die so identifizierten Metabolite können dann im Sinne der Fragestellung interpretiert werden und mit Ergebnissen aus anderen experimentellen Ansätzen wie z.B. einer Genom-Analyse zusammengeführt werden.

# 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Ursachen der Empfindlichkeit bzw. Resistenz verschiedener erst kürzlich isolierter Mikroalgen untersucht werden. Dabei unterteilen sich die Modell-Organismen in zwei verschiedene Wirt-Parasitoid-Systeme: erstens sechs verschiedene Diatomeen-Arten, die in ihrer natürlichen Umgebung mit dem Oomycet-Parasitoid Lagenisma coscinodisci zusammen in einem gemeinsamen Ökosystem leben, und zweitens ein System aus der Dinoflagellate-Spezies Ceratium sp. und dem Parasitoiden Parvilucifera rostrata.

Dabei sollen folgende Hypothesen für die möglich Resistenz der Mikroalgen überprüft werden:

• Induzierte chemisch Verteidigung: Die Gegenwart des Parasitoiden löst in den Mikroalgen eine Verteidigungsreaktion aus, die zu Änderungen im Metabolom führt und dadurch die Resistenz verursacht.

- Verteidigung durch schädlich oder abhaltend wirkende Exometabolite: Die Verteidigungsstrategie der Mikroalgen beruht darauf, Exometabolite zu produzieren, die eine schädliche oder abhaltende Wirkung auf die Zoosporen haben.
- Induzierte Verteidigung durch Priming: Mit dem Parasitoiden infizierte Zellen einer Spezies verursachen in benachbarten nicht-infizierten Zellen derselben Spezies Priming-Effekte aus, die Reaktionen zur Aktivierung der Verteidigung in den induzierten Algenzellen auslösen.
- Vermittlung der Resistenz über Phytohormone: Vergleichbar wie in Landpflanzen wird die Verteidigungsreaktion bei Mikroalgen über Phytohormone aktiviert und reguliert.

Die Vorgehensweise gliedert sich dabei in folgende Teile.

1. Feststellung der Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber dem Parasitoiden.

In einem ersten Schritt werden einfache Kultivierungsexperimente in 40 ml-Kulturflaschen mit den Mikroalgen und ihrem jeweiligen Parasitoiden durchgeführt. Die Behandlung der Algen mit den Parasiten erfolgt dabei über die Zugabe des Parasiten in seiner Form als Sporangium in nicht mehr lebenden Algenzellen oder als infektiöse Zoosporen. Der Zustand der Kulturen wird während der Kultivierungsphase mikroskopisch beobachtet und durch das Zählen der Zellen in Zählkammern wird die Zelldichte bestimmt, woraus die Wachstumsrate bestimmt werden kann. Daran kann zusätzlich zu der mikroskopischen Beobachtung die Auswirkung des Parasitoiden auf die Mikroalgen beurteilt werden.

Weiterhin soll auch der Aufbau einer Co-Kultivierungskammer genutzt werden, die den Stoffaustausch durch Diffusion zwischen zwei Kammern erlauben, allerdings keinen Wechsel von lebenden Organismen (Mikroalgen, Parasiten, Bakterien) zwischen den beiden Kammern ermöglichen. Dadurch können mögliche Priming-Effekte und Wirkungen des Exudats beobachtet werden.

# 2. Analyse des Metaboloms.

Um metabolomische Anderungen in der Gegenwart des Parasitoiden aufzudecken, werden das Exometabolom und das Endometabolom der Mikroalgen extrahiert. Dabei wird für das Endometabolom eine Flüssig-Extraktion der Algenzellen nach einer Ultraschallbehandlung genutzt und das Exometabolom wird zum einen durch eine Festphasenextraktion (SPE) und zum anderen durch eine Festphasen-Mikroextraktion (SPME) aus dem Medium gewonnen. Die anschließende Analyse des Metaboloms erfolgt über Gaschromatographie (LC) und Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit (hochauflösender) Massenspektrometrie.

3. Auswertung der gewonnenen Daten.

Die Auswertung der metabolomischen Daten soll mit statistischen Methoden auf

Grundlage der Online-Plattform *MetaboAnalyst* durchgeführt werden und dabei soll der Ansatz der vergleichenden Metabolomik genutzt werden, um relevante Features zu identifizieren. Weiterhin wird auch nach bestimmten Features gezielt gesucht, von denen bekannt ist, dass mit der parasitären Infektion in Zusammenhang stehen. Zusätzlich soll auch geprüft werden, ob Phytohormone an der Verteidigungsreaktion der Mikroalgen auf den Parasitoiden beteiligt sind.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Material

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Chemikalien in analytischer Reinheit käuflich erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

# 2.2 Verwendete Organismen und Wachstumsbedingungen

Es wurden zwei verschiedene Wirt-Parasit-Systeme untersucht. Die Dinoflagellaten-Art Alexandrium minutum und die zugehörigen Parasiten Parvilucifera infectans sowie Parvilucifera rostrata wurden aus dem Atlantischen Ozean bei Frankreich isoliert und wurden von der Roscoff Culture Collection bereitgestellt. Die Kultivierung dieser Arten erfolgte im Penzé-Medium. Dies besteht aus einem Liter von Meerwasser (Practical Salinity Units 27) aus dem Lebensraum der Mikroalgen und ihrer Parasiten, bei dem es sich um einen Meeresarm mit folglich reduziertem Salzgehalt handelt. Zu dem Meerwasser wurde 15 ml Guillard's Nährmedium (F/2, Marine Water Enrichment Solution, G0154, Sigma-Aldrich) sowie 1 ml eines 1%igen Bodenextraktes zugegeben, das zur Kultivierung der Parasiten dient. Die Dinoflagellaten-Art Ceratium sp. wurde aus einer Probe aus dem Mittelmeer bei Griechenland 2018 isoliert und der Roscoff Culture Collection als Referenz bereitgestellt. Alle Diatomeen-Arten und der zugehörige Parasitoid Lagenisma coscinodisci wurden gegen Ende der Algenblüte in Helgoland im November 2019 isoliert. Als Medium wurde für dieses Wirt-Parasit-System 15 ml des mit Silicat angereichertes F2-Nährmedium (1 ml sterile filtrated sodium metasilicate solution 30g/L + F/2 G9903, Sigma-Aldrich) mit 11 Meerwasser aus Helgoland (Salzgehalt  $35 \,\mathrm{g} \cdot \mathrm{l}^{-1}$ ) gemischt.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Kulturen bei 14 Stunden Licht pro Tag mit einer Photonenflussdichte von  $100\,\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  gelagert und kultiviert. Für die Dinoflagellaten wurde einem Temperaturzyklus mit 19°C während der Tagesphase und

17°C bei der Nachtphase eingesetzt, für die Diatomeen 16°C und 12°C.

Tabelle 2.1: Untersuchte Mikroalgen und Parasitoide mit ihren Taxa und dem jeweils verwendeten Nährmedium. Die Artbezeichnung wurde dabei über SSU Partial 18S rRNA Gensequenzierung bestimmt (Zusammenarbeit mit Dr. Yun Deng, unveröffentlichte Daten).

Funktion	Taxon	Name	Strain-Nummer	Medium
Wirt Dinoflagellaten		$Ceratium\ sp.$	RCC8613 GP9-6	F2
		$Alexandrium\ minutum$	RCC3018	Penzé
Parasitoid	Perkinsozoa	Parvilucifera rostrata <sup>a</sup>	RCC2857	Penzé
Wirt	Diatomeen	$Lithodesmium \ undulatum$	Helg2019-Helg52	F2+
		$Coscinodiscus\ granii$	Helg2019-Cos37	F2+
		$Coscinodiscus\ granii$	Helg2019-Cos20	F2+
		$Coscinodiscus\ wailesii$	Helg2019-Cos5	F2+
		$Coscinodiscus\ radiatus$	Helg2019-Cos43	F2+
		$Odontella\ sinensis$	$\mathrm{Helg}2019\text{-}\mathrm{Helg}41$	F2+
Parasitoid	Oomyceten	$Lagenisma\ coscinodisci$	Helg2019-Lag9	F2+

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Um *P. rostrata* über einen längeren Zeitraum am Leben zu halten, wird der Parasitoid mit *A. minutum* zusammen kultiviert.

# 2.3 Bestimmung der Zelldichte

Während der Kultivierung der Mikroalgen mit den jeweiligen Parasiten wurden die Kulturen mit einem biokularen Mikroskop von VWR auf ihren Zustand geprüft. Auch die Bestimmung der Zelldichte zu Beginn jedes Experimentes und auch am Ende der Kultivierungsphase erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, unter diesem Mikroskop. Dazu wurde für das Zählen der Zellen eine 1 ml Sedgewick Rafter Zählkammer genutzt und eine unverdünnte Probe der jeweiligen Kultur verwendet. Für die Kulturen von *Lithodesmium undulatum* wurde aufgrund der geringen Größe der Mikroalge eine Neubauer-Zählkammer mit 0,0025 mm² und einer Tiefe von 0,100 mm genutzt und das Zählen erfolgte unter einem invertierten Mikroskop von Olympus. Alle Zellen wurden vor dem Zählen mit einer 1%igen Lugol-Lösung fixiert.

# 2.4 Untersuchung auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Parasitoiden und auf Änderungen im Metabolom unterschiedlicher Diatomeen-Arten

# 2.4.1 Experimentelles Design

Um die metabolomische Veränderung in Gegenwart des Parasiten Lagenisma coscinodisci (Lag9) innerhalb derselben Spezies und auch zwischen verschiedenen Spezies zu untersuchen und zu vergleichen wurden Lithodesmium undulatum (Helg52), Coscinodiscus wailesii (Cos5), Odontella sinensis (Helg41), Coscinodiscus radiatus (Cos43) und zwei Isolate von Coscinodiscus granii (Cos37 und Cos20) unbehandelt und mit dem Parasiten behandelt kultiviert (vgl. Abbildung 2.1). Alle Kulturen wurden mit vier biologischen Replikationen angesetzt.

Für die unbehandelten Kulturen wurden 38 ml F2-Medium und 5 ml der jeweiligen Stammlösung der Mikroalgen-Kultur vorgelegt, für die parasitoid-behandelten Kulturen waren es 35 ml F2-Medium, 5 ml Stammlösung der jeweiligen Alge und 3 ml der Stammlösung von *L. coscinodisci*. Die Zelldichte zwischen den unterschiedlichen Algenstämmen wurde nicht angeglichen. Die Ausgangskonzentrationen und das Alter der Kulturen wurden in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

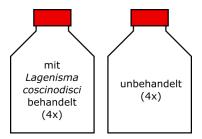


Abbildung 2.1: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Empfindlichkeit verschiedener Diatomeen-Spezies gegen den Parasitoiden Lagenisma coscinodisci. Alle sechs verschiedenen Diatomeen-Spezies wurden in 40 ml-Kulturflaschen mit jeweils vier biologischen Replikationen mit dem Parasitoiden L. coscinodisci zusammen und mit jeweils vier Replikationen ohne den Parasitoiden für neun Tage kultiviert.

### 2.4.2 Extraktion und Probenvorbereitung

Die Kulturen wurden für neun Tage kultiviert. Es wurde von jeder Kultur 2 ml abgenommen, um die Zelldichte und den Zustand der Kultur zu bestimmen und jeweils 40 ml wurden in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Es wurde für 15 Minuten bei 16°C und 2000 rpm zentrifugiert und 30 ml des Überstands für die Analyse des Exometaboloms abdekantiert. Der Zellüberstand mit dem Exometabolom wurde bei 4°C gelagert und die nach dem Dekantieren in 10 ml verbliebenen Zellen für die Endometabolom-Analyse

Tabelle 2.2: Alter der Stammkultur und Ausgangskonzentrationen der unterschiedlichen Diatomeen-Kulturen und der Parasit-Kultur zu Beginn des Experiments zur Bestimmung der Empfindlichkeit und zur metabolomischen Untersuchung.

Art	Alter	Ausgangskonzentration
	[Tage]	$[{\rm Zellen/Sporangia\cdot ml^{-1}}]$
Helg52	9	442
$\cos 5$	18	34
Helg41	14	105
$\cos 43$	18	50
$\cos 37$	18	61
$\cos 20$	18	36
Lag9	11	28

wurden zunächst unter Anlegen eines Drucks von 750 mbar über eine Filterpapier (Whatman Glass microfiber filter GF/C, 25mm) gefiltert. Der Filter mit den Zellen wurde anschließend in 1,6 ml des Extraktionsmittels (Methanol (Fisher Scientific) : Ethanol (Merck) : Chloroform (VWR Chemicals), 2:6:2) überführt. Nach einer fünf-minütigen Ultraschallbehandlung wurde das Extraktionsmittel vollständig in ein Zentrifugenröhrchen (2 ml) überführt und bei 12000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 1,2 ml in ein Glasfläschchen (4 ml) überführt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Über die Massendifferenz zum leeren Glasfläschchen wurde die Masse des Extrakts bestimmt.

Die Extraktion des Exometaboloms aus dem Zellüberstand erfolgte mittels Festphasen-extraktion auf einer HLB-Kartusche (Waters Oasis, 6cc/200 mg). Die Konditionierung der Kartusche (mit 4 ml UHPLC-Methanol, Fisher Scientific) wurde durch Gravitation durchgeführt. Das anschließende Equilibrieren (4 ml UHPLC-Wasser, Fisher Scientific), Auftragen des Zellüberstands (30 ml) und Waschen (4 ml HPLC-Wasser) wurde bei einem angelegten Druck von 800 mbar durchgeführt. Das Eluieren von der Kartusche wurde durch reine Gravitation mit 3 ml HPLC-Methanol in ein zuvor gewogenes Glasfläschchen (4 ml) verrichtet. Zur Kontrolle wurde zusätzlich zu den Proben auch reines Medium und Medium mit internem Standard (deutero-Ection 10  $\mu$ M; para-Fluorophenylalanin 10  $\mu$ M) der Festphasenextraktion unterzogen. Alle Proben wurden im Stickstoffstrom getrocknet und die Masse des Extraktes wurde über die Massendifferenz zum leeren Fläschchen bestimmt.

Zur Probenvorbereitung für die UHPLC-HR-MS-Analyse wurden die Proben des Endometaboloms in 500  $\mu$ l eines Methano/Wasser-Gemisches (70:30, jeweils von Fisher Scientific) gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen (1,2ml) überführt. Nachdem für 20 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert wurde, wurden 100  $\mu$ l in ein LC-MS-Fläschchen mit Mirkoeinsatz überführt. Zur Qualitätskontrolle (QC) der LC-MS-Analyse wurde jeweils eine Mischung

aus  $10\,\mu l$  von denjenigen Proben mit derselben Algenspezies erstellt (sowohl unbehandelte als auch behandelte Proben). Eine weitere QC-Probe wurde als Mischung aus  $3\,\mu l$  aller Probe mit Ausnahme der Medium-Proben hergestellt. Bis zur Analyse wurden alle vorbereiteten LC-MS-Proben bei -20°C gelagert.

# 2.4.3 Wirkung des Exometaboloms

Mit dem Ziel zu testen, ob sich aktive Metaboite im Exudat der Mikroalgen befinden und sich somit die weitere Untersuchung und Analyse des Exometaboloms im Rahmen dieser Arbeit als lohnenswert erweisen würde, wurde eine Co-Kultivierung der resistenten Mikroalge Coscinodiscus wailesii (Cos5) und der empfindlichen Dinofagellaten-Art C. granii (Cos20) angesetzt. Dabei wurden zwei verschiedene Szenarien getestet und eine Co-Kultivierung zur Kontolle verwendet (Abbildung 2.2). Es wurden keine biologischen Replikationen durchgeführt, da keine metabolomischen Daten aus diesem Experiment gewonnen werden sollten.

In der ersten Konstellation wurde Cos5 mit der empfindlichen Art C.~granii, die mit dem Parasitoiden Lagenisma~coscinodisci~ behandelt wurde, in einer Co-Kultivierungskammer kultiviert. Im zweiten Szenario wurden beiden Mikroalgen mit dem Parasitoiden versetzt. Als Kontrolle wurde außerdem Cos20 unbehandelt und mit dem Parasitoiden behandelt zusammen co-kultiviert. In jeder Kammer befanden sich 50 ml der jeweiligen 26 Tage alten Stammkultur mit einer Konzentration von 264 Zellen · ml $^{-1}$  für Cos5 und 46 Zellen · ml $^{-1}$  für Cos20. Bei den behandelten Kulturen wurden jeweils 50  $\mu$ l der elf Tage alten Stammkultur von L.~coscinodisci~ (mit Cos20 als Wirt) mit einer Konzentration von 68 Sporaniga · ml $^{-1}$  zugegeben.

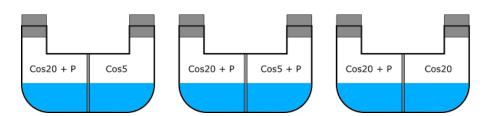


Abbildung 2.2: Experimenteller Ansatz zur Überprüfung der Wirkung des Exometaboloms. Der Aufbau der dargestellten Co-Kultivierungskammer erlaubt den Austauschen von chemischen Substanzen aus dem Exudat der Mikroalgen zwischen den Kammern. Dadurch kann die Wirkung des Exudats einer resistenten Mikroalge (hier: Cos5) auf eine empfindliche mit dem Parasitoiden (P) behandelte Alge (hier: Cos20) getestet werden (links). Falls die resistente Alge nur durch den Parasitoiden induziert aktive Exometabolite produziert, wurde in einem zweiten Ansatz auch die resistente Algen parasitär behandelt (Mitte). Zur Kontrolle wurde die empfindliche Mikroalge behandelt und unbehandelt co-kultiviert (rechts).

# 2.5 Co-Kultivierungsexperiment zur Bestimmung der Empfindlichkeit und Verteidigungsinduktion bei Ceratium sp.

# 2.5.1 Experimentelles Design

Um zu prüfen, ob die Infektion von Ceratium sp. strain RCC6813 mit dem Parasiten Parvilucifera rostrata strain RCC2857 bei einer zweiten Kultur von Ceratium sp. eine Verteidigungsreaktion induziert, wurde ein Co-Kultivierungsexperiment durchgeführt. Hierbei wurden jeweils eine infizierte und eine gesunde Kultur so zusammen kultiviert, dass kein physischer Kontakt der Mikroalgen möglich war, aber der Stoffaustausch durch eine Membran erlaubt wurde. Das Experiment wurde mit vier biologischen Replikationen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine gesunde Kultur gegen reines Medium ebenfalls mit vier biologischen Replikationen co-kultiviert. Die Zellen von Ceratium sp. waren 35 Tage alt und es wurden 25 ml der Stammkultur mit 25 ml von frisch hergestellte F2-Medium vorgelegt, sodass die Zellkonzentration zu Beginn des Experiments bei 112 Zellen  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> lag. Von der ebenso alten P. rostrata Kultur wurden 50  $\mu$ l zugegeben, sodass eine Konzentration des Parasiten von 0,91 Zellen  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> gegeben war.

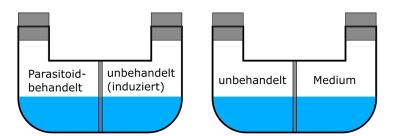


Abbildung 2.3: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Empfindlichkeit und der Verteidigungsinduktion bei Ceratium sp. bei Behandlung mit dem Parasitoiden Parvulucifera rostrata. In den Co-Kultivierungskammeren wurde im ersten Ansatz (links) mit dem Parasitoiden Parvilucifera rostrata behandelte Kulturen von Ceratium sp. mit unbehandelten Kulturen co-kultiviert. Im zweiten Ansatz wurde zur Kontrolle eine unbehandelte Kultur mit Medium co-kultiviert (rechts). Für beide Ansätze wurden vier biologische Replikationen hergestellt.

### 2.5.2 Extraktion und Probenvorbereitung

Nach einer 14-tägigen Wachstumsphase bei 14 h Licht mit einer Photonenflussdichte von  $100 \,\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , einer Temperatur von konstant  $13^{\circ}\text{C}$  und  $40 \,\text{Rotation} \cdot \text{min}^{-1}$  wurde von jeder Kultur der Co-Kultivierung eine Probe genommen (2 ml), um die Zelldichte und den Zustand der Zellen zu bestimmen.

Zur Extraktion wurde jede Kultur zuerst jeweils mit einen Zellenfilter (Corning Cell Strainer,  $40\,\mu\text{m}$ , Nylon) gefiltert und der so abgetrennte Zellüberstand bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Die Zellen wurden in  $10\,\text{ml}$  sterilem F2-Medium

suspendiert und wie in 2.4.2 gefiltert und anschließend extrahiert.

Die Extraktion des Exometaboloms aus dem Zellüberstand erfolgte analog wie in 2.4.2 mittels Festphasenextraktion, nachdem 4 ml des Zellüberstand zur Nährstoffanalyse abgenommen wurden. Auch hier wurden eine Medium-Kontrolle der Extraktion unterzogen. Die Extrakte wurden im Stickstoffstrom getrocknet und ihre Masse über die Massendifferenz zum leeren Fläschen bestimmt.

Zur Probenvorbereitung für die UHPLC-HR-MS-Analyse des Endometabolom wurden zu dem getrockneten Extrakt 100  $\mu$ l einer Methanol/Wasser-Mischung (70:30) gegeben. Nachdem die Probe mit Hilfe eines Vortexmischers vollständig in Lösung gebracht wurde, wurde die gesamte Lösung in ein LC-MS-Fläschchen mit Mirkoeinsatz überführt. Zur Qualitätskontrolle (QC) wurde eine QC-Probe aus einer Mischung von 10  $\mu$ l aller Proben mit Ausnahme der Proben, die nur Medium bzw. Medium mit internem Standard enthalten, erstellt.

# 2.6 UHPLC-HR-MS-Analyse der Endometabolom-Proben

Die Analyse aller Endometabolom-Proben erfolgte nach dem Protokoll von  $Vallet\ et\ al.^{[15]}$  über Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie UHPLC (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific) mit anschließender Detektion durch hochauflösender Massenspektrometrie HR-MS mit einem Q-Exactive Plus Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) sowie durch UV/Vis-Absorption im Bereich von 190-200 nm (Thermo Fisher Scientific). Über einen Autosampler, der alle Proben während der Messungen auf 10°C temperiert hielt, wurden jeweils 10  $\mu$ l einer Probe injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C18-Umkehrphase (2,6  $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm, Accucore, Thermo Fisher Scientific) bei einer Säulentemperatur von 25°C. Als mobile Phase wurden ein Gradientenprogramm mit 2%igem und reinem Acetonitril jeweils mit einem Säurezusatz von 0,1% Ameisensäure verwendet, bei dem auch die Flussrate graduell erhöht wurde (Tabelle 2.3).

**Tabelle 2.3:** Zusammensetzung der mobilen Phase (Wasser, H<sub>2</sub>O; Acetonitril, ACN; Ameisensäure, FA) und Gradientenprogramm für die UHPLC-Analyse der Endometabolom-Proben.

$\mathbf{Zeit}$ [min]	Fluss $[ml \cdot min^{-1}]$	Lösungsmittel A $[\%]$	Lösungsmittel B $[\%]$
		$H_2O + 2\% ACN + 0.1\% FA$	ACN + 0.1% FA
0	0,400	100	0
0,2	0,400	100	0
9,2	0,400	0	100
13,2	0,700	0	100
13,3	0,400	100	0
14,2	0,400	100	0

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im Zeitraum vom 0,75-14 min der Messung. Es wurden Masse/Landungsverhältnisse (m/z) zwischen 500 und 1 500 mit einer Auflösung von 140 000 sowohl bei positiver als auch bei negativer Polarisation detektiert.

Für die QC-Proben wurde die chromatographische Methode unverändert verwendet, die Detektion erfolge jedoch mit Tandem-Massenspektrometrie MS/MS einmal mit positiver und einmal mit negativer Polarisation. Die sekundären Massenspektren wurde dabei mit einer Auflösung von 70 000 aufgenommen und wurden aus einer Überlagerung von Massenspektren mit unterschiedlichen Kollisionsenergien (CE) von 15, 30 und 45 erhalten. Dabei wurde das ACG Ziel auf  $1\cdot10^5$  und die maximale Ionenzeit auf 50 ms gesetzt. Zur Isolierung der Sekundärspektren wurde ein Fenster von  $0.4\,m/z$  verwendet.

# 2.7 Messung von flüchtigen Exometabolom-Komponenten mittels SPME-GC-MS

# 2.7.1 Experimentelles Design

Mit dem Ziel die flüchtigen Komponenten des Exometaboloms der Mikroalgen zu erfassen, wurde eine Festphasen-Mikroextraktion (SPME) durchgeführt und über eine massenspektrometrie-gekoppelte Gaschromatographie (GC-MS) analysiert. Dazu wurden jeweils 10 ml einer Kultur in einer späten Phase des Wachstums von *C. wailesii* (Cos5) und von *C. granii* (Cos20) mit dem Parasiten *L. coscinodisci* (Lag9, 1 ml, vier Tage alt) behandelt, als Kontrolle wurden die unbehandelten Kulturen verwendet. Um bei der Mikroextraktion das Aufnehmen von Plastikbestandteilen der Kulturflaschen zu vermeiden, wurden die Kulturen in Glasfläschen angesetzt.

# 2.7.2 Extraktion und GC-MS-Analyse

Für die Extraktion wurde eine Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane-Faser (50/30 µm, Supelco, graue Faser) verwendet, nachdem diese für 30 min bei 230°C und für fünf Minuten bei 270°C gereinigt wurde. Zur Extraktion wurde die gereinigte Faser für 12 Stunden dem Medium der Kulturen ausgesetzt. Die thermische Desorption erfolgte bei 230°C im Injektor des Gaschromatographen (GC Trace 1310, Thermo Fisher Scientific) und es folgte die Auftrennung der Komponenten über eine Inferno ZB-5HT Säule (30 m × 0,25 mm × 0,1 µm, Phenomenex) mit einem konstanten Fluss des Trägergases Helium von 1 ml·min<sup>-1</sup> bei dem vorgegebenen Ofenprogramm (Tabelle 2.4). Es wurde eine Split-Rate von zehn mit einem Split-Fluss von 10 ml·min<sup>-1</sup> eingestellt. Die Detektion erfolgte über Massenspektrometrie mit einem Single Quadrupol (ISQ LT, Thermo Fisher Scientific) bei Elektronenstoß-Ionisierung in einem Bereich von m/z = 35 - 450.

**Tabelle 2.4:** Ofenprogramm für die GC-MS-Analyse der flüchtigen Komponenten des Endometaboloms aus der SPME.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Gradient $[^{\circ}C \cdot min^{-1}]$
0	40	-
2	40	10
22	240	30
23,3	280	-
27,3	280	-

# 2.8 Datenauswertung

### 2.8.1 Vergleich von Zelldichten und Wachstumsraten

Der Vergleich von Zelldichten und Wachstumsraten bei unterschiedlichen Bedingungen (z.B. parasitoid-behandelt und unbehandelt) erfolgte durch statistische Auswertung mit SigmaPlot (Version 14.0). Dabei wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, sowie einfache statistische Tests durchgeführt (t-Test, one-way ANOVA mit Power Analyse, jeweils nach Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Varianzhomogenität).

# 2.8.2 Compound Discoverer

Die erste Aufbereitung der aus der UHPLC-HR-MS-Analyse gewonnenen Daten erfolgte zuerst über *Compound Discoverer* (Version 3.1.0.305). Der Arbeitsablauf kann dabei in folgendem Schema dargestellt werden. (Abbildung 2.4). Dabei wurden die Voreinstellungen der einzelnen Schritte unverändert bei den Voreinstellungen für ungezielte Metabolomik-Untersuchungen belassen.

Für Features mit MS/MS-Spektren wurden teilweise zusätzlich eine Auswertung über Sirius (Version 4.0.1) vorgenommen, um die von Compound Discoverer zugeordneten Strukturen zu verifizieren bzw. einen Strukturvorschlag zu generieren.

### 2.8.3 MetaboAnalyst

Von der Ergebnisliste aus Compound Discoverer wurden alle Features entfernt, denen keine Summenformel zugeordnet werden konnte und die übrig bleibenden Features wurden für die statistische Auswertung mit der Online-Plattform MetaboAnalyst<sup>[38]</sup> genutzt. In MetaboAnalyst wurde keine Filteroption ausgewählt, da die Rohdaten bereits durch Compound Discoverer gefiltert wurden. Die Normalisierung der Daten erfolgte anhand probenspezifischer Faktoren, die sich aus der Anzahl der extrahierten Zellen ergaben. Für die Kontroll-Proben mit reinem Medium z.B aus dem Ceratium sp. Co-Kultivierungsexperiment wurde ein Faktor von eins verwendet. Die Skalierung der Daten wurde, wenn nicht anders angegeben, als Pareto-Skalierung durchgeführt.

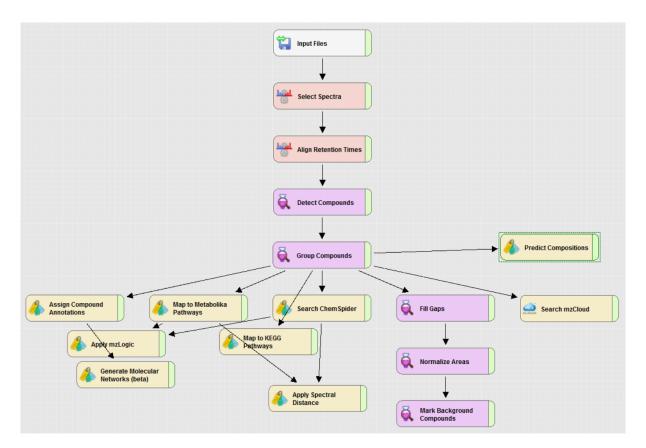


Abbildung 2.4: Arbeitschschritte für die Datenaufbereitung und Feature-Identifizierung in Compound Discoverer. Die Hauptschritte sind in orange und violett farbenden Kästchen dargestellt.

Die univariate und multivariate statistische Auswertung und Darstellung erfolgte anhand verschiedener Methoden in *MetaboAnalyst* (t-Test, *Fold Change* Analyse, ANOVA, Pattern Hunter, Hauptkomponentenanalyse (PCA), Heatmap, Volcano-Plot).

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Labortests zur Bestimmung der Empfindlichkeit oder Resistenz verschiedener Diatomeen-Mikroalgen gegen den Parasitoiden

### 3.1.1 Empfindlichkeit von Diatomeen-Spezies gegen Lagenisma coscinodisci

Für sechs verschiedene Diatomeen-Arten wurde jeweils vier biologische Replikationen angesetzt, die mit dem Parasitoiden Lagenisma coscinodisci behandelt wurden und jeweils vier weitere Replikationen wurden ohne Behandlung angesetzt. Alle Replikationen derselben Algenart wurden aus einer gemeinsamen Stammkultur hergestellt und wiesen somit die selbe Ausgangskonzentration auf. Dieses Experiment wurde genutzt, um die Empfindlichkeit der Diatomeen gegen den Parasitoiden zu bestimmen, indem der Zustand der Mikroalgen unter dem Mikroskop beobachtet wurde, um mögliche Infektionen zu erkennen (vgl. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2). Zusätzlich wurden auch die Zelldichten aller Replikationen zu Beginn und am Ende der Kultivierungsphase bestimmt und nach einer Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden jeweils die Endkonzentrationen derselben Spezies über einen t-Test auf einen signifikanten Unterschied getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Beobachtete Infektion bei den paraitoid-behandelten Diatomeen-Arten, Mittelwert der Zelldichten zu Beginn  $\bar{c}_{Start}$  und am Ende der Kultivierungsphase für die unbehandelten Proben  $\bar{c}_{End}$  sowie für die mit dem Parasitoiden behandelten Proben  $\bar{c}_{End+P}$  jeweils mit Standardabweichung SD. Die Endkonzentrationen wurden über einen t-Test (Student-t-Test, wenn nicht anders angegeben) bei einer statistischen Sicherheit von 95% auf einen signifikanten Unterschied geprüft.

Strain-Code	Infektion	$\overline{c}_{Start}$	$\overline{c}_{End} \pm SD$	$\overline{c}_{End+P}\pm SD$	Sigifikant
			$[{ m Zellen}\cdot{ m m}]$	$\mathrm{l}^{-1}$ ]	(P-Wert)
Helg52	nein	442	$3438 \pm 1197$	$7500 \pm 5303$	$nein (0,224^{a})$
Helg41	nein	105	$443\pm75$	$423\pm17$	$nein (0,642^a)$
$\cos 37$	ja	61	$161 \pm 19$	$97\pm11$	ja (0,001)
$\cos 20$	ja	36	$188\pm22$	$41\pm17$	ja ( $<0.001$ )
$\cos 5$	nein	34	$99 \pm 16$	$78 \pm 9$	nein $(0,069)$
$\cos 43$	nein	50	$224\pm15$	$179\pm17$	ja (0.008)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Bei diesen Datensätzen konnte keine Varianzhomogenität angenommen werden und deshalb wurde zum Vergleich der Mittelwerte ein Welch-t-Test durchgeführt.

Anhand der sichtbaren Sporangia (vgl. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2) in den Zellen der mit  $L.\ coscinodisci$  behandelten Kulturen der beiden Isolate von  $Coscinodiscus\ granii$  (Cos37 und Cos20) und auch anhand der signifikant geringeren Zelldichte am Ende der Wachstumsphase der parasitoid-behandelten Kulturen im Vergleich zu der Zelldichte der

unbehandelten Kulturen wurde festgestellt, dass sich die beiden Isolate mit L. coscinodisci infizieren ließen und ein vollständiger Infektionszyklus des Parasitoiden ablaufen konnte, bei dem der Parasitoid neue Zoosporen ausbildete. Bei allen übrigen Arten wurde keine Infektion beobachtet und nur bei Cos43 wurde eine signifikant unterschiedliche Zelldichte zwischen den parasitoid-behandelten und den unbehandelten Kulturen am Ende der Wachstumsphase festgestellt. Es wurde gefolgert, dass die Diatomeen-Arten Lithodesmium undulatum (Helg52), Odontella sinensis (Helg41) und Coscinodiscus wailesii (Cos5) gegenüber dem Parasitoiden resistent waren und dieser keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroalgen hatte. Für Coscinodiscus radiatus (Cos43) wurde ebenfalls eine Resistenz gegen die Infektion festgestellt, aber der Parasitoid hemmte das Wachstum der Mikroalge im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur.

# 3.1.2 Empfindlichkeit von Dinoflagellat-Spezies gegen Parvilucifera rostrata

Für die Dinoflagellat-Art Ceratium sp. wurde die Zelldichte und der Zustand des Mikroorganismus aus dem Co-Kultivierungsexperiment genutzt, um die Empfindlichkeit gegenüber dem Parasitoiden Parvilucifera rostrata zu beurteilen. Dazu wurden der Zustand und die Zelldichten aus der mit dem Parasitoiden behandelten Kammer und diejenigen aus der Kammer mit der unbehandelten Alge aus der Kontrolle (vgl. Abbildung 2.3) genutzt. Analog wie bei den Diatomeen-Daten wurden die durchschnittlichen Zelldichten der vier Replikationen der parastioid-behandelten und unbehandelten Kulturen mit einen t-Test verglichen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bedingungen festgestellt (vgl. Tabelle 3.9).

Unter dem Mikroskop offenbarten sich jedoch nach der 14-tägigen Kultivierungsphase in den mit *P. rostrata* behandelten Kulturen Infektionen in einigen Algenzellen (vgl. Abbildung 3.3). Allerdings befand sich keine der Mikroalgen in der späten Phase der Infektion, in der der Parasitoid neue Zoosporen bildet. Daraus wurde geschlossen, dass *Ceratium sp.* sich semi-restistent gegen *P. rostrata* verhielt. Das heißt, dass eine Infektion mit dem Parasitoiden zwar möglich ist, jedoch die Infektion selbst nach 14 Tagen nicht die letzte Phase erreicht und der Parasitoid sich dadurch nicht fortpflanzen kann. Weiterhin wurde das Wachstum der Mikroalge durch die Infektion mit dem Parasitoiden nicht signifikant beeinflusst.

### 3.1.3 Vergleichende Bewertung der Empfindlichkeit aller untersuchter Algen

Die Ergebnisse der Experimente zur Prüfung der Empfindlichkeit der Mikroalgen wurden in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Von den untersuchten Mikroalgen wurden zwei empfindliche Diatomeen-Arten identifiziert und eine semi-resistente Dinoflagellaten-Art.

Aus vorangegangenen Experimenten konnte außerdem auch die Dinoflagellaten-Spezies Alexandrium minutum (RCC3018) als empfindlich für P. rostrata erkannt werden (vgl.

# Abbildung 3.3).

Die Bestimmung der Empfindlichkeit diente als Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen des Metaboloms der Diatomeen-Mikroalgen, bei dem zunächst das Exometabolom einer resistenten Spezies auf aktive Metabolite geprüft wurde, indem sie mit einer empfindlichen Spezies zusammen co-kultiviert wurde (Abschnitt 3.2). Auch im Dinoflagellat-Parasitoid-System wurde das Exudat einer mit *P. rostrata* infizierten Kultur der semi-resistenten Mikroalge *Ceratium sp.* durch Co-Kultivierung mit einer nicht infizierten Kultur auf aktive Exometabolite untersucht, die eine Verteidigungsinduktion auslösten (Abschnitt 3.5).

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse aus der Untersuchung zur Empfindlichkeit der der geprüften Diatomeen-Mikroalgen gegen *Lagenisma coscinodisci* und der Dinoflagellat-Mikoalgen gegen *Parviluzifera rostrata*.

Strain-Code	${f Empfindlichkeit}$	
Helg52	resistent	
Helg41	resistent	
$\cos 37$	empfindlich	
$\cos 20$	empfindlich	
$\cos 5$	resistent	
$\cos 43$	resistent, aber stark beeinflusst	
RCC8613	$_{ m semi-resistent}$	
RCC3018	empfindlich	

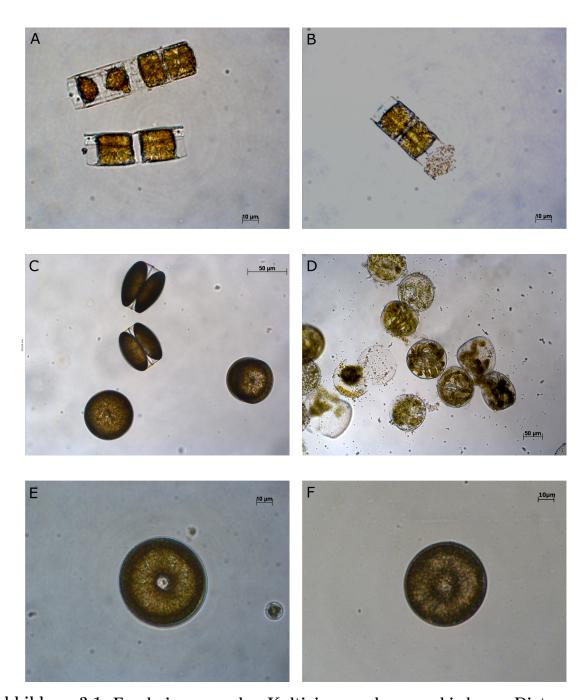


Abbildung 3.1: Ergebnisse aus der Kultivierung der verschiedenen DiatomeenSpezies mit Lagenisma coscinodiscus zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen den Parasitoiden (I). Dargestellt sind jeweils die mit
dem Parasitoiden behandelten Kulturen (rechts) und die unbehandelten
Kontroll-Kulturen (links) nach neun-tägiger Kultivierung. [A,B Lithodesmium
undulatum (Helg52); C,D Coscinodiscus granii (Cos37); E,F Coscinodiscus radiatus (Cos43), die einzelnen Algen repräsentieren den Zustand der gesamten
Kultur.]

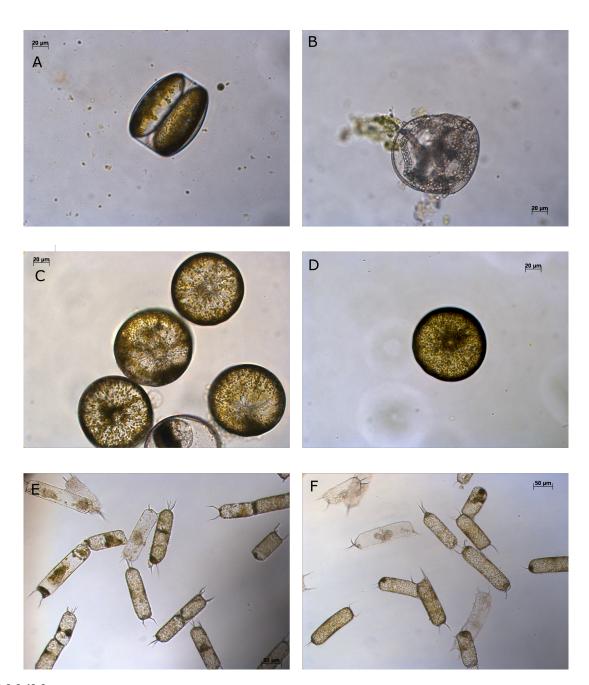


Abbildung 3.2: Ergebnisse aus der Kultivierung der verschiedenen DiatomeenSpezies mit Lagenisma coscinodiscus zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen den Parasitoiden (II). Dargestellt sind jeweils die mit
dem Parasitoiden behandelten Kulturen (rechts) und die unbehandelten
Kontroll-Kulturen (links) nach neun-tägiger Kultivierung. [A,B Coscinodiscus
granii (Cos20), die einzelnen Algen repräsentieren des Zustand der gesamten
Kultur; C,D Coscinodiscus wailesii (Cos5); E,F Odontella sinensis (Helg41)]

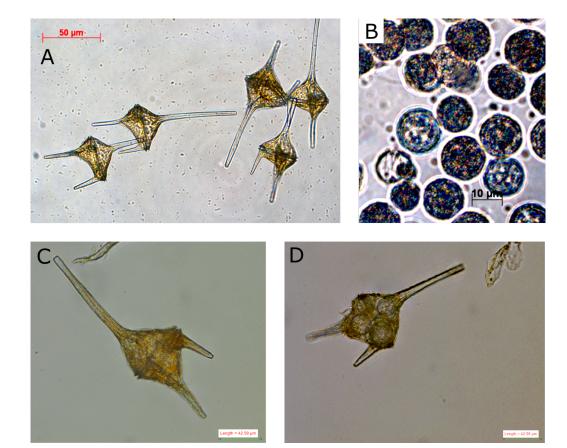


Abbildung 3.3: Ergebnisse aus der Kultivierung von Ceratium sp. mit Parvilucifera rostata zur Prüfung der Empfindlichkeit. Nach 14-tägiger Kultivierungsphase wurden in der behandelten Kultur nicht infizierte Zellen aufgefunden (C), die keinen Unterschied zu den Zellen aus der unbehandelten Kultur aufwiesen (A). Gleichzeitig wurden auch einfach oder teilweise mehrfach mit dem Parasitoiden infizierte Zellen (D) beobachtet, die sich jedoch alle im frühen Stadium der Infektion befanden. Zum Vergleich ist die später Phase der Infektion mit der Bildung des Sporangiums am Beispiel der für den Parasitoiden empfindlichen Spezies Alexandrium minutum (B) mit dagestellt.

# 3.2 Co-Kultivierung zur Untersuchung auf einen Resistenztransfer von einer resistenten Mikroalgen auf eine empfindliche verwandte Art durch das Exudat

Mit dem Ziel zu überprüfen, ob eine resistenten Diatomeen-Mikroalgen Exometabolite produzierte, die durch eine schädliche oder abhaltende Wirkung auf die Zoosporen von L. coscinodisci die Infektion mit dem Parasitoiden verhindern, wurde eine Co-Kultivierung zwischen der resistenten Mikroalge C. wailesii (Cos5) und der parasitoid-behandelten empfindlichen Art C. granii (Cos20) angesetzt. Damit sollte überprüft werden, ob das Exudat von Cos5, dass durch durch die Trennmembran der Co-Kultivierungskammern in die Kammer mit Cos20 diffundieren konnte, eine Infektion der empfindlichen Mikroalge verhindern könnte (Resistenztransfer). Da die Resistenz von Cos5 sowohl permanent als auch induziert sein könnte, wurde im ersten Ansatz nur die empfindliche Mikroalge mit dem Parasitoiden behandelt und im zweiten Ansatz beide Algen der Co-Kultivierung. Falls also Cos5 einen potentiellen aktiven Metaboliten nur bei Induktion durch die physische Kontakt mit Parasitoiden bildete, konnte der mögliche Resistenztransfer dennoch durch diesen Versuchsaufbau beobachtet werden.

Anhand der nachfolgenden Fotos (Abbildung 3.4) ließ sich erkennen, dass in keinem der beiden Versuchsansätze ein Resistenztransfer von *C. wailesii* auf *C. granii* in der Co-Kultivierung stattfand. Bei der empfindlichen Spezies Cos20 wurde weiter die Infektion mit *L. coscinodisci* und das Ablaufen eines vollständigen Infektionskreislaufs beobachtet. Weiterhin bestätigte die Kontroll-Co-Kultivierung von einer mit *L. coscinodisci* behandelten und einer unbehandelten Kultur von *C. granii*, dass keine Übertragung des Parasitoiden zwischen den Kammern möglich ist.

Als Ergebnis aus der Co-Kultivierung wurde geschlossen, dass keine Übertragung der Resistenz durch das Exudat von Coscinodiscus wailesii auf die empfindliche Mikroalge C. granii (Cos20) möglich ist. Damit erwies sich die Hypothese eines induzierten oder permanenten aktiven Metaboliten, der die Zoosporen des Parasitoiden schädigt oder von den Zellen der Mikroalge abhält, als Ursache für die Resistenz von Cos5 als unwahrscheinlich. Das mögliche Vorhandensein von aktiven Exometaboliten, die z.B. Priming-Effekte auslösen könnten, wurde nicht abgelehnt.

Für die anderen in dieser Arbeit verwendeten Diatomeen-Arten wurden ähnliche Co-Kultivierungsexperimente durchgeführt, die zu ähnlichen Ergebnissen führten (Daten werden in dieser Arbeit nicht präsentiert). Deshalb wurde entschieden sich in dieser Arbeit verstärkt mit Veränderungen des Endometaboloms zu befassen und die UHPLC-MS-Analyse nur mit den Proben des Endometaboloms durchzuführen (Abschnitt 3.3). Durch die Lagerung der Exometabolom-Proben bei -20°C wurden diese zunächst jedoch noch für zukünftige Untersuchungen aufbewahrt.

Für eine weitere Überprüfung des Exometaboloms wurde außerdem mit den beiden in der

Co-Kultivierung untersuchten Diatomeen-Arten Coscinodiscus wailesii und Coscinodiscus granii (Cos20) eine Festphasen-Mikroextraktion durchgeführt (Abschnitt 3.4).

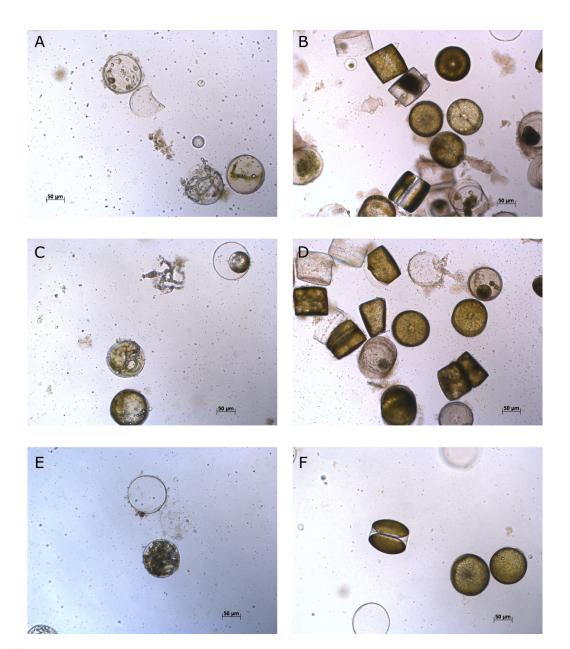


Abbildung 3.4: Ergebnisse aus der Co-Kultivierung von C. wailesii (Cos5) und C. granii (Cos20). Nach 16-tägiger Kultivierungsphase wurde in der Co-Kultivierung von einer mit L. coscinodisci behandelten Kultur von Cos20 (A) keine übertragene Resistenz durch das Exudat der benachbarten Cos5 Kultur (B) beobachtet. Auch im zweiten Ansatz, bei dem Cos5 ebenfalls parasitoid-behandelt wurde (D), wurde keine Resistenz der empfindlichen Mikroalge Cos20 (C) festgestellt. In der Kontrolle wurde bei Behandlung mit dem Parasitoiden, die Infektion mit L. coscinodisci registriert (E), während die unbehandelte Kultur (F) keinerlei Anzeichen einer Veränderung zeigte.

# 3.3 Untersuchung auf endometabolomische Veränderungen in den Diatomee-Mikroalgen durch Behandlung mit dem Parasitoiden

Nach der Feststellung der Empfindlichkeit der Diatomeen-Algen gegenüber *L. coscinodisci* war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob es durch die Behandlung mit dem Parasitoiden zu einer signifikanten Änderung im Metabolom der Mikroorganismen kommt. Nach der Kultivierungsphase wurden sowohl das Endometabolom als auch das Exometabolom extrahiert, die Untersuchung auf metabolomische Veränderungen wurden jedoch nur bei den Proben des Endometaboloms durchgeführt, da sich die Hypothese von aktiven Exometaboliten als Ursache für die Resistenz der nicht empfindlichen Mikroalgen als unwahrscheinlich erwies (vgl. 3.2).

# 3.3.1 Verwendete Featureanzahl und Normalisierungsfaktoren für die Kulturen

Für die Prüfung auf metabolomische Änderungen bei Behandlung mit dem Parasitoiden wurden die Extrakte des Endometabolom der sechs verschiedenen Diatomeen-Spezies über UHPLC-HR-MS analysiert und mit Hilfe von MetaboAnalyst statistisch ausgewertet. Die Rohdaten wurden zuvor mit Compound Discoverer aufbereitet, sodass Feature-Listen erhalten wurde, in denen aus der hochauflösenden Masse der Peaks eine mögliche Summenformel bei einer maximalen Abweichung von 5 ppm der empirischen und theoretischen Masse bestimmt wurde. Dabei konnte innerhalb dieser Grenze nicht für alle detektierten Peaks eine Summenformel bestimmt werden und solche Features, für die keine Summenformel ermittelt wurde, wurden von der nachfolgenden statistischen Auswertung mit MetaboAnalyst ausgeschlossen (Tabelle 3.3). Zusätzlich wurde für manche Features aus der Liste von Compound Discoverer ein möglicher Strukturvorschlag generiert.

Bei der vergleichenden Metabolomik, die auf der Online-Plattform *MetaboAnalyst* durchgeführt wurde, wurden jeweils die parasitoid-behandelten und die unbehandelten Kulturen derselben Algenart verglichen. Zur statistischen Auswertung wurden die zu vergleichenden Endometabolom-Proben der einzelnen Kulturen anhand von Faktoren aus der am Ende der Kultivierung gemessenen Zelldichte normalisiert (Tabelle 3.4, alle weiteren Faktoren im Anhang Tabelle B.1 bis Tabelle B.4).

Die statistischen Auswertungen von MetaboAnalyst bezogen sich auf die normalisierten und skalierten Peakflächen der Features. Im Nachfolgenden wurden solche Features, für deren Peakflächen im t-Test von MetaboAnalyst ein signifikanten Unterschied festgestellt wurde (P<0,05), als signifikant veränderte bzw. signifikant erhöhte/verringerte Features bezeichnet.

Nachfolgen wurden außerdem nur die Ergebnisse dargestellt, die auf robusten Datensätzen

**Tabelle 3.3:** Gesamtzahl der Features aus *Compound Discoverer* und Anzahl derjenigen Features mit einer zugeordneten Summenformel.

Strain-Code	Anzahl der Features	davon mit Summenformel
Helg52	1429	1392
Helg41	1520	1465
$\cos 37$	1176	1140
$\cos 20$	941	917
$\cos 5$	1040	1009
$\cos 43$	920	895

**Tabelle 3.4:** Normalisierungsfaktoren für die Peakflächen aus *Compound Discoverer* auf Basis der Zelldichte am Ende der Kultivierungsphase beispielhaft für *C. wailesii* (Cos5).

$c_{End}$ [Zellen · ml <sup>-1</sup> ]	Faktor
78	1,50
104	1,13
95	1,23
117	1
77	1,52
91	1,29
72	1,63
71	1,65

beruhten und so ein Mindestmaß an statistischer Sicherheit gewährleisten. Bei den Probe von *Odontella sinensis* konnten zwei Proben nicht verwendet werden, sodass mit nur zwei biologischen Replikationen keine statistische Sicherheit gegeben war. Ergebnisse aus einer solchen Auswertung wurden als nicht zuverlässig oder robust betrachtet, weshalb auf die statistischen Auswertungen verzichtet wurde. Die Analyse für *O. sinensis* wurde jedoch für zukünftige Experimente geplant.

## 3.3.2 Keine signifikante Veränderung im Metabolom von $Lithodesmium\ undulatum\ (Helg52)$

Bei der Mikroalge L. undulatum wurden keine zwischen der Gruppe der parasitoidbehandelten und der unbehandelten Proben signifikant veränderten Features gefunden und auch die Hauptkomponentenanalyse (PCA) offenbarte für diesen Organismen keinen Trennung der 95%-Konfidenzintervalle der Gruppen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde zwar nicht grundsätzlich ausgeschlossen, dass durch die Gegenwart von Lagenisma coscinodisci eine Änderung im Metabolom von Helg52 auslöst wurde, jedoch wurde angenommen, dass die Behandlung des Parasiten nicht zu einer mit der gewählten Methode messbaren Veränderung der Produktion von Metaboliten bei Lithodesmium undulatum führte.

## 3.3.3 Wenige heraufregulierte Features in *Coscinodiscus granii* (Cos37 und Cos20) bei der Infektion mit dem Parasitoiden

Die beiden Isolate von C. granii ließen sich während der Kultivierungsphase mit dem Parasitoiden infizieren und zeigten keine Resistenz gegen L. coscinodisci, sodass nach der neun-tägigen Kultivierung die meisten Zellen Sporangia aufwiesen oder bereits abgestorben waren und somit nur noch als leere Zellhülle zu erkennen waren. Dementsprechend unterschieden sich die metabolomischen Datensätze der unbehandelten und der parasitoidbehandelten Proben bei beiden Arten deutlich voneinander, was beispielsweise an der Ergebnisdarstellung der PCA von Cos37 zu erkennen war (Abbildung 3.5). Das 95%-Konfidenzintervall der Proben der behandelten Kulturen (grün) und der Proben der unbehandelten Kulturen (blau) überschnitt sich nicht. Dies bedeutet, dass eine hohe Varianz zwischen den Features der Proben aus den parasitoid-behandelten Kulturen und derjenigen aus den unbehandelten Kulturen bestand und ein signifikanter Unterschied zwischen den Probengruppen erkannt werden konnte. Da die beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 mehr als 50% der Gesamtvarianz repräsentierten, wurde die Unterscheidung der Probengruppen als realtiv robust angesehen. Das Ergebnis wies darauf hin, dass das Metabolom von Cos37 durch die Infektion mit L. coscinodisci stark verändert wurde und gleichzeitig auch die Varianz innerhalb der verschiedenen biologischen Proben aus den mit dem Parasitoid behandelten Kulturen annahm.

Der t-Test identifizierte bei einer statistischen Sicherheit von 95% insgesamt 70 signifikant veränderte Features. Diese Ergebnis des t-Tests wurde in Kombination mit dem Ergebnis der Fold Change Analyse als Volcano-Plot dargestellt (Abbildung 3.6). Durch die Wahl eines Grenzwerts von drei für die Fold Change Analyse wurde Features, deren Peakfläche in einer der Probengruppen um mindestens das dreifache größer war als in der anderen Probengruppe, in dieser Analyse identifiziert. Der Volcano-Plot führte die Ergebnisse des t-Tests und der Fold Change Analyse zusammen und markierte die durch die beiden statistischen Auswertungen ermittelten Features (pink). An der Darstellung war zu erkennen, dass der Großteil der markierten Features in der parasitoid-behandelten Probengruppe herunter reguliert wurde. Dies deckte sich mit den mikroskopischen Beobachtungen, die in den parasitoid-behandelten Proben neben den infizierten Zellen auch eine hohe Anzahl an bereits abgestorbenen Zellen als leere Zellhülle zeigten. In diesen abgestorbenen Algenzellen fand kein Stoffwechsel mehr statt und es wurden dementsprechend keine Metabolite mehr gebildet, sodass der Gehalt der meisten Metabolite in den parasitoid-behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben abnahm, was durch die Herabregulierung der Features wiedergegeben wird.

Für die wenigen in den mit dem Parasitoiden behandelten Proben signifikant erhöhten

Features von Cos37 (Tabelle 3.5) wurde kein Strukturvorschlage durch Compound Discoverer generiert und da keine MS/MS-Daten für diese Features vorlagen, konnte keine Auswertung mit Sirius erfolgen. Gemeinsam war den Features jedoch, dass sie eine hohe Anzahl an Heteroatomen und eine hohe Masse aufwiesen. Zusätzlich waren diese in den parasitoid-behandelten Proben signifikant erhöhten Features kennzeichnend für Cos37. Sie wurden in den Proben von Cos20 überhaupt nicht detektiert.

Trotzdem waren die Ergebnisse von Cos20 insgesamt ähnlich zu denen von Cos37 (vgl. Abbildung A.1 und Abbildung A.2). Es kam ebenfalls zu einer Trennung der 95%-Konfidenzintervalle der Probengruppen in der PCA, bei der die parasitoid-behandelten Proben eine wesentlich geringere Varianz aufwiesen als die unbehandelten Proben, und alle signifikanten veränderten Features aus dem t-Test und Features aus der Fold Change Analyse waren ausschließlich in der unbehandelten Probe erhöht.

Aus vorangegangenen Experimenten waren bereits eine Zahl von Metaboliten bekannt, die bei der Infektion von C. granii mit Lagenisma coscinodisci erhöht werden. [Vallet2018] In den Datensätze von Cos20 und Cos37, die von Compound Discoverer erhalten wurden, wurde explizit nach Features gesucht, die mit diesen literaturbekannten Metaboliten übereinstimmten. Da für die Analytik mittels UHPLC-MS dieselbe Methodik angewandt wurde, konnte bei übereinstimmender Summenformel zusätzlich die Retentionszeit herangezogen werden, um die Übereinstimmung eines Features mit dem bekannten Metaboliten zu verifizieren. Von 19 bekannten Metaboliten wurden sieben in Summenformel und Retentionszeit übereinstimmende Features aufgefunden (Tabelle 3.6). Nicht für alle der Features aus Cos20 und Cos37 konnte jedoch eine signifikante Erhöhung in der mit dem Parasitoiden behandelten Probengruppe nachgewiesen werden. Für zwei Features von Cos37 wurde gegenteilig sogar eine signifikante Verringerung in den behandelten Proben festgestellt (vgl. Abbildung 3.7, Abbildung 3.8).

Tabelle 3.5: Angegeben wurden die in den parasitoid-behandlten Endometabolomproben von  $C.\ granii\ (\text{Cos37})$  signifikant erhöhte Features (P<0,05) aus dem t-Test mit dem normalisierten und Pareto-Skalierten Datensatz von MetaboAnalyst mit der von  $Compound\ Discoverer\ zugeordneten\ Summenformel,\ der\ Massendifferenz\ von\ theoretischer\ und\ gemessener\ Masse\ \Delta m\ und\ der\ Retentionszeit.$ 

Summenformel	$\Delta m$ [ppm]	Retentionszeit [min]
$C_{39}H_{68}N_6O_8$	-3,56	12,178
$C_{22}H_{49}N_7O_9$	4,51	6,513
$C_{37}H_{41}N_2OP_3S_2$	2,05	$7,\!44$
$C_{29}H_{63}N_7O_9P_2$	-4,18	6,594
$C_{49}H_{84}N_5O_7P_3$	$0,\!56$	9,184
$C_{19}H_{48}N_9O_8P_3$	-3,05	9,63

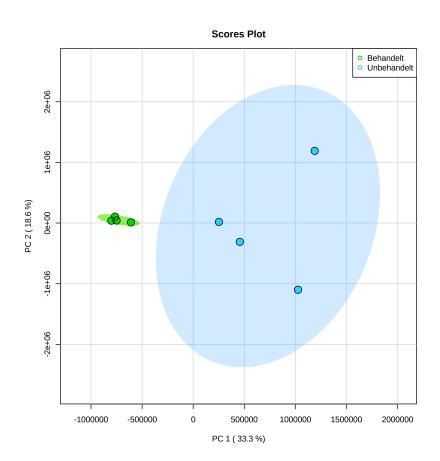


Abbildung 3.5: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse für Coscinodiscus granii (Cos37) aus Metabo Analyst. Die farbigen Punkte standen für die einzelnen Endometabolomproben, die mit dem Parasitoiden behandelt wurden (grün) bzw. unbehandelt waren (blau). Die farbigen Flächen um die Punkte herum stellten das 95%-Konfidenzintervall für die jeweilige Probengruppe dar (blau für unbehandelt, grün für behandel). Der zweidimensionale Plot repräsentierte 51,9% der Gesamtvarianz der Datensätze.

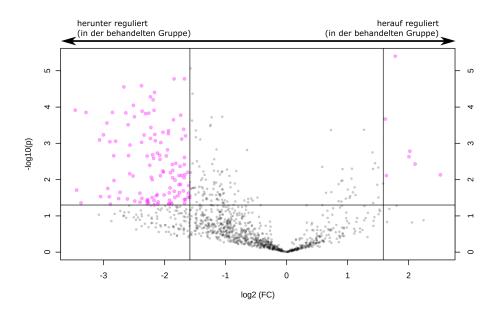


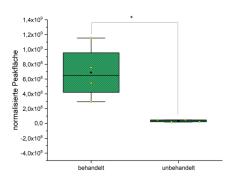
Abbildung 3.6: Volcano-Plot für Coscinodiscus granii (Cos37) aus MetaboAnalyst. Dargestellt sind die Features des Endometaboloms anhand ihrer Werte aus dem t-Test (y-Achse) und der Fold Change Analyse (x-Achse). Dabei wurden diejenigen Features pink markiert, die im t-Test bei einer statistischen Sicherheit von 95% signifikant waren oder in der Fold Change Analyse über dem Grenzwert von drei lagen (d.h. die Peakfläche in einer Gruppe mindestens drei-Mal so groß, wie in der anderen Gruppe).

Tabelle 3.6: Aufgelistet wurden literaturbekannte Metabolite und zugehörige Features, die in den Endometabolom-Daten von C. granii (Cos20 und Cos37) aufgefunden wurden. Über einen t-Test (Student-t-Test, wenn nicht anders angegeben) wurden die Daten aus Compound Discoverer nach der Normalisierung mit dem Faktoren aus der Zelldicht auf einen signifikanten Unterschied geprüft. Ein (+) symbolisiert die Anwesenheit, ein (-) die Abwesenheit eines Features im Datensatz. Ein (\*) deutet weiter darauf hin, dass das Feature in den unbehandelten Proben signifikant erhöht war. (4-CTC, 1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin-3-carbonsäure; Lyso:PC, Lysophosphatidylcholin)

Metabolit	Summenformel	$\cos 20$	Signifikant	$\cos 37$	Signifikant
			(P-Wert)		(P-Wert)
Adenosin	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	+	ja (0,037 <sup>a</sup> )	+	ja (0,029 <sup>b</sup> )
4-CTC	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	+	ja (0.012)	-	-
Lyso:PC $(20:5)$	$C_{28}H_{48}NO_7P$	+	nein $(0,695)$	+	$ja* (0,029^a)$
Lyso:PC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	-	-	+	$nein (0,343^b)$
Lyso:PC (18:2)	$C_{26}H_{50}NO_7P$	+	nein $(0.072)$	+	$nein (0.063^{a})$
Lyso:PC (22:5)	$C_{30}H_{52}NO_7P$	+	nein $(0.064)$	+	$nein (0,150^{a})$
Phoenicoxanthin	$C_{40}H_{52}O_3$	+	nein $(0,767)$	+	ja* (<0,001)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Varianzhomogenität wurde abgelehnt, deshalb wurde ein Welch-t-Test durchgeführt.

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Normalverteilung wurde abgelehnt, deshalb wurde ein Mann-Whitney-Rangsummen-Test durchgeführt.



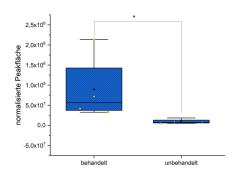
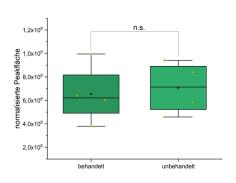


Abbildung 3.7: Literaturbekannter Metabolit Adenosin. In den Endometabolom-Daten von C. granii (links in grün Cos20, rechts in blau Cos37) wurde die Features anhand der Summenformel ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ) und der Retentionszeit (1,316 min bei Cos20 bzw. 1,334 min bei Cos37) als Adenosin identifiziert. Der von  $Compound\ Discoverer$  generierte Strukturvorschlag bestätigte die Zuordnung zusätzlich. Dargestellt sind die anhand der Zelldichte normalisierten Peakflächen, die übereinstimmend mit der Literatur bei beiden Mikroalgen in den behandelten Proben signifikant erhöht waren (vgl. Tabelle 3.6).



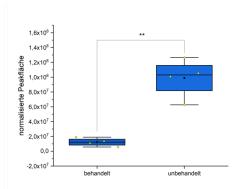


Abbildung 3.8: Literaturbekannter Metabolit Phoenicoxanthin. In den Endometabolom-Daten von *C. granii* (links in grün Cos20, rechts in blau Cos37) wurde die Features anhand der Summenformel ( $C_{40}H_{52}O_{3}$ ) und der Retentionszeit (9,249 min bei Cos20 bzw. 9,780 min bei Cos37) als Phoenicoxanthin identifiziert. Der von *Compound Discoverer* generierte Strukturvorschlag bestätigte die Zuordnung zusätzlich. Dargestellt sind die anhand der Zelldichte normalisierten Peakflächen, die sich abweichend von der Literatur bei Cos20 nicht signifikant unterschieden. Bei Cos37 wurde gegenteilig zur Literatur sogar eine signifikante Verringerung des Features in den behandelten Proben bestimmt (vgl. auch Tabelle 3.6).

## 3.3.4 Kaum metabolomische Änderungen in Gegenwart des Parasitoiden bei der resistenten Art Coscinodiscus wailesii (Cos5)

C. wailesii stellte eine Mikroalge aus der Gattung Coscinodiscus dar und passte damit in das Wirtsschema von L. coscinodisci. In der Kultivierung wurde jedoch keine Infektion des Mikroorganismus mit dem Parasitoiden beobachtet, woraus der Schluss gezogen wurde, dass Cos5 gegen Lagenisma coscinodisci resistent war. Im Vergleich der Endometabolome der unbehandelten und der parasitoid-behandelten Algenkulturen wurden zwar durch die Fold Change Analyse einige Features mit einer mindestens um das dreifache größeren Peakfläche identifiziert, jedoch wurde für kein Feature im t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Probengruppen festgestellt.

Der Score Plot der PCA (Abbildung 3.9), der annährend die Hälfte der Gesamtvarianz repräsentierte (45,6%), zeigt ein deutliches Überlagern der 95%-Konfidenzintervalle der behandelten (grün) und unbehandelten (blau) Probengruppe. Die Metabolom-Datensätze von Cos5 bei Behandlung mit dem Parasitoiden und ohne Behandlung ließen dementsprechend keine Unterscheidung zwischen den Probengruppen zu, sodass auch eine starke metabolomische Änderung, die im Zusammenhang mit der Gegenwart des Parasitoiden stand, nicht aus den Daten abgeleitet werden konnte.

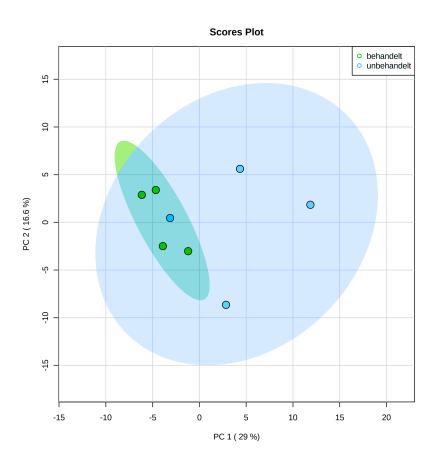


Abbildung 3.9: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse für Coscinodiscus wailesii (Cos5) aus MetaboAnalyst. Die farbigen Punkte stellten die einzelnen behandelten (grün) und unbehandelten (blau) Endometabolomproben von Cos5 dar und mit den farbigen Flächen wurden die 95%-Konfidenzintervalle für die behandelte (grün) und unbehandelte (blau) Gruppe abgegrenzt.

## 3.3.5 Signifikante metabolomische Veränderungen in den behandelten Proben der resistenten Diatomeen-Art Coscinodiscus radiatus (Cos43)

Auch Coscinodiscus radiatus stellte einen für L. coscinodisci möglichen Wirten dar, wurde aber während der Kultivierung nicht infiziert. Der Vergleich der Metabolom-Datensätze über einen t-Test mit MetaboAnalyst zeigte mehrere hochsignifikant veränderte Features (fünf Features mit P<0,01) und einige weitere signifikant veränderte Features (72 weitere Features mit P<0,05) auf. Weiterhin wurden in der Fold Change Analyse 100 Features identifiziert, die in jeweils einer der beiden Probengruppen eine mindestens um das drei-fache vergrößerte normalisierte Peakfläche aufwiesen. Im Socre Plot der PCA (vgl. Abbildung A.3) trat eine klare Abgrenzung der 95%-Konfidenzintervalle der beiden Probengruppen zu Tage, sodass die Metabolomdatensätze der parasitoid-behandelten und der unbehandelten Proben von Cos43 voneinander getrennt werden konnten. Ähnlich wie bei der PCA von Cos37 wurde auch im Score Plot der PCA von Cos43 eine im Vergleich zu den unbehandelten Proben verringerte Varianz in mit dem Parasitoid behandelten Proben ersichtlich.

Aus den statistischen Analysen wurde gefolgert, dass es in Gegenwart des Parasitoiden L. coscinodisci bei der Mikroalge C. radiatus zu einer messbaren signifikanten Änderung im Metabolom kam, die im Zusammenhang mit einer induzierten Verteidigung der Mikroalge stehen könnte.

Aus der Liste der im t-Test von *MetaboAnalyst* als signifikant verändert ermittelten Features wurden auffallend viele Features mit einem Steran-Grundgerüst identifiziert, die in den parasitoid-behandelten Proben des Endometaboloms herunter reguliert wurden. Für die zwei beispielhaft ausgewählten Features wurden die MS/MS-Spektrum dargestellt, sowie die Boxplot-Diagramme der normalisierten und skalierten Peakflächen aus *MetabAnalyst*, die einen signifikanten Unterschied zwischen den Probengruppen zeigen (Abbildung 3.10). Die MS/MS-Daten wurden zusätzlich über *Sirius* ausgewertet und bestätigten dort die Strukturelemente Features (vgl. Tabelle B.6).

Unter den Features, die von *MetaboAnalyst* in den mit dem Parasitoiden behandelten Proben als signifikant erhöht erkannt wurden, befand sich unter anderem eine ungesättigte Fettsäure, deren Strukturvorschlag als Eicosapentansäure auch durch *Sirius* bestätigt wurde (vgl. Tabelle B.6), wobei keine Festlegung der Konformation erfolgte. Weiter wies auch ein Carotinoid in der parasitoid-behandelten Probengruppe eine signifikant höhere Peakfläche auf. Die genaue Struktur dieses Features konnte von *Sirius* nicht bestätigt werden, allerdings wurde die Einordnung als Carotinoid verifiziert. Eicosapentansäure und eine mögliche Struktur des Carotinoid wurden mit den zugehörgen MS/MS-Spektren und den Boxplot-Digrammen der Peakflächen dargestellt (Abbildung 3.11).

Neben den vier bisher genannten Lipiden wurden unter anderem auch Methylbutyrylcarnitin und Propionylcarnitin unter den signifikant veränderten Features identifiziert. Eine Auflistung der Features, die durch dem t-Test als signifikant ermittelt wurden und für die eine Strukturformel durch *Compound Discoverer* oder *Sirius* generiert wurde, wurde im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle B.5).

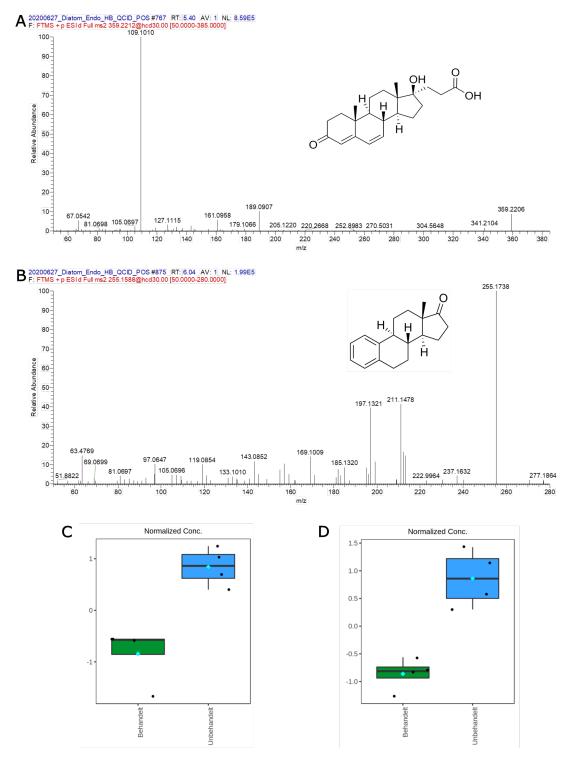


Abbildung 3.10: In den parasitoid-behandelten Proben von C. radiatus signifikant verringerte Features. Die MS/MS-Spektren und Boxplot-Darstellungen der normalisierten und skalierten Peakflächen aus MetaboAnalyst von Canrenosäure (A,C) und 3-Desoxyestron (B,D) wurden als Beispiele für Substanzen mit einem Steran-Grundgerüst gewählt, die in den mit L. coscinodisci behandelten Proben von C. radiatus im Vergleich zu den unbehandelten Proben signifikant reduziert vorlagen. (Massendifferenz  $\Delta m$  aus Sirius: Canrenosäure 1,65 ppm; 3-Desoxyestone 1,86 ppm)

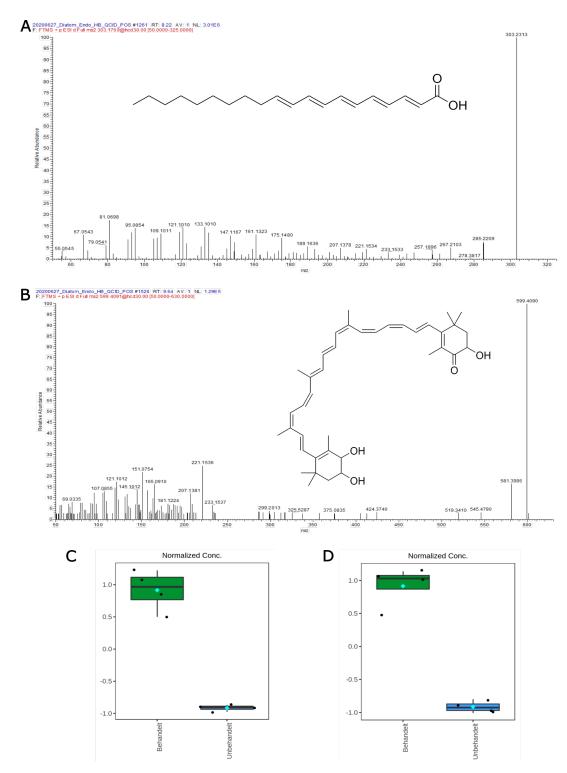


Abbildung 3.11: In den parasitoid-behandelten Endometabolomproben von C. radiatus signifikant erhöhte Features. Widergegeben wurden die MS/MS-Spektren und Strukturformeln von Eicosapentansäure (A) und einem Carotinoid (B) (3,3',4'-Trihydroxy-beta,beta-caroten-4-on, keine Verifikation der genauen Struktur über Sirius), sowie die Boxplot-Diagramme (C, Eicosapentansäure; D, Carotinoid) der normalisierten und skalierten Peakflächen aus Metaboanalyst, die eine signifikante Erhöhung in der behandelten Probengruppe aufwiesen. (Massendifferenz  $\Delta m$  aus Sirius: Eicosapentansäure 1,20 ppm; Carotinoid -0,40 ppm)

### 3.3.6 Überprüfung der Metabolom-Daten auf die Anwesenheit von Phytohormone in Diatomeen-Mikroalgen

Die metabolomischen Datensätzen der Mikroalgen wurde anhand der Summenformel gezielt auf die Anwesenheit einiger Phytohormonen (Salicylsäure, Jasmonsäure, Methyljasmonat, Indol-3-essigsäure, Abscisinsäure) geprüft, um herauszufinden, ob eine mögliche Verteidigungsreaktion über ähnliche Signalwege wie bei Landpflanzen ablaufen könnte. Nachfolgend wurden die Phytohormone und die Ergebnisse aus den Datensätzen zusammengefasst (Tabelle 3.7, vgl. auch Tabelle B.7). Für die Feature mit der Summenformel von Methyljasmonat im Datensatz von Helg52 und Cos43 wurde ein MS/MS-Spektrum aufgenommen, jedoch wurde die Struktur des Features als Phytohormon nicht durch die Auswertung mit Sirius bestätigt. Die Identität der Features als Phytohormone konnte dementsprechend in keinem Fall verifiziert werden und somit beruht die Identifizierung ausschließlich auf der aus der hochauflösenden Masse generierten Summenformle und auf dem Strukturvorschlag aus Compound Discoverer.

Bei den aufgefundenen Phytohormonen wurde mit einem t-Test geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Peakflächen der Proben bei Behandlung mit *L. coscinodisci* und bei denjenigen ohne Behandlung bestand (Tabelle 3.8). Bei der resistenten Mikroalge *C. radiatus* (Cos43) wurde eine signifikante Erhöhung von dem als Methyl-Jasmonat identifizierten Feature in der unbehandelten Probengruppe bestimmt (P=0,008) und die empfindliche Spezies *C. granii* (Cos37) zeigte eine hoch signifikante Abnahme von einem als Jasmonsäure erkannten Feature (P<0,001), was übereinstimmend mit der (signifikanten) Abnahme vieler Features in den parasitoid-behandelten Proben war. Gleichzeitig wurde eine signifikante Erhöhung eines zu Salicylsäure zugeordneten Feature in der mit dem Parasitoiden behandelten Probengruppe ermittelt, jedoch deutete die Boxplot-Darstellung der Daten darauf hin, dass die Signifikanz durch einen Ausreißer in einer der parasitoid-behandelten Proben von Cos37 verursacht wurde (Abbildung 3.12). Für die als Phytohormone indentifizierten Features in allen übrigen Proben wurde keine Signifikanz erfasst.

Tabelle 3.7: In den Feature-Listen aus Compound Discoverer wurden mehrere Features gefunden, deren Summenformel mit denen der Phytohormone übereinstimmt. Wenn zur Summenformel zusätzlich der Strukturvorschlag für das Phytohormon von Compound Discoverer generiert wurde, wurde dies durch (+) gekennzeichnet, das Auffinden der Summenformel wurde durch (+/-) symbolisiert. Ein (-) zeigte an, dass ein Phytohormone nicht in den Feature-Listen gefunden wurde. (SA, Salicylsäure; JA, Jasmonsäure; Me-JA, Methyljasmonat; IAA, Indol-3-essigsäure; ABA, Abscisinsäure)

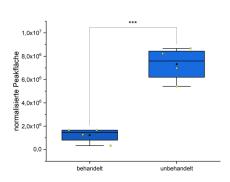
Hormon	Summenformel	$\cos 37$	$\cos 20$	$\cos 5$	Cos43	Helg52	Helg41
SA	$C_7H_6O_3$	+	-	-	-	-	-
JA	$C_{12}H_{18}O_3$	+	-	-	-	-	+
Me-JA	$C_{13}H_{20}O_3$	-	-	+	+/-	+	-
IAA	$C_{10}H_9NO_2$	-	-	-	-	-	-
ABA	$C_{15}H_{20}O_4$	-	-	+	-	-	-

Tabelle 3.8: Die an der Zelldichte normalisierten Peakflächen für die Phytohormone aus der Feature-Liste von Compound Discoverer wurden mit einem t-Test (Student-t-Test, wenn nicht anders angegeben) bei 95% statistischer Sicherheit auf einen signifikanten Unterschied zwischen der behandelten und unbehandelten Probengruppe getestet. (SA, Salicylsäure; JA, Jasmonsäure; Me-JA, Methyljasmonat; ABA, Abscisinsäure)

Hormon	Alge	Signifikant	erhöht in
		(P-Wert)	
Me-JA	$\cos 5$	nein $(0,329)$	-
	Helg52	nein $(0,794)$	-
	$\cos 43$	ja (0.008)	unbehandelt
ABA	$\cos 5$	$nein (0.093^a)$	-
SA	$\cos 37$	ja? $(0.029^{b})$	behandelt
JA	$\cos 37$	ja (<0,001)	unbehandelt

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Varianzhomogenität wurde abgelehnt, deshalb wurde ein Welch-t-Test durchgeführt.

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Normalverteilung wurde abgelehnt, deshalb wurde ein Mann-Whitney-Rangsummen-Test durchgeführt.



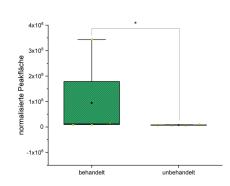


Abbildung 3.12: Boxplot-Darstellung zweier Phytohormone aus der Feature-Liste von Cos37. Die mit den Faktoren aus der Zelldichte normalisierten Peakflächen aus Compound Discoverer für die Phytohormone Jasmonsäure (links, blau) und Salicylsäure (rechts, grün) wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen der parasitoid-behandelten und der unbehandelten Probengruppe auf. Die Signifikanz bei Salicylsäure wurde auf einen Ausreißer in der Probengruppe zugeführt.)

## 3.4 Untersuchung der flüchtigen Metabolite aus dem Exometabolom von Diatomeen-Spezies

Um neben dem Experiment der Co-Kultivierung von *C. wailesii* (Cos5) und *C. granii* (Cos20) eine weitere Überprüfung des Exometaboloms auf veränderliche Metabolite in Gegenwart bzw. bei Infektion mit *Lagenisma coscinodisci* durchzuführen, wurde das Exudat der Mikroalgen mittels SPME-GS-MS untersucht. Im Abschnitt 3.2 wurde bereits dargelegt, dass sich mit großer Wahrscheinlichkeit keine Metabolite im Exudat von Cos20 befand, die in der im Co-Kultivierungsexperiment vorliegenden Konzentration eine biologische Wirkung auf *L. coscinodisci* oder *C. granii* hatten. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Exometabolom von Cos5 und Cos20 durch die Gegenwart bzw. die Infektion mit dem Parasitoiden veränderte. Das Experiment wurde auch vor allem dazu genutzt zu prüfen, ob sich eine SPME-GC-MS-Analyse als zweckmäßig für die Untersuchung des Exometaboloms erwies. Deshalb wurden die Proben nur mit einem biologischen Replikat untersucht und die Auswertung erfolgte über eine visuelle Kontrolle der Spektren.

In den Spektren von der empfindlichen Spezies Coscinodiscus granii wurden keine Unterschiede zwischen der unbehandelten und der mit dem Parasitoid behandelten Probe festgestellt (Abbildung 3.13). Der Großteil der Peaks in den Chromatogrammen wurde durch die SPME-Faser verursacht. Dies ließ sich durch die Massenspektren feststellen, da immer wieder gleiche Fragmente aufgefunden wurden und diese durch die NIST MS Search Funktion zu typischen Substanzen der Faser zugeordnet werden konnten. Die Peaks traten ebenfalls bei der Messung der gereinigten nicht-inkubierten Faser auf. Die teilweise größeren Verschiebungen von Peaks in den unterschiedlichen Chromatogrammen kamen durch die händische Injektion der SPME-Faser zustande.

Im Vergleich der Chromatogramme und Massenspektren von Cos5 wurden tatsächlich mehrere Peaks gefunden, die ausschließlich in der mit dem Parasitoiden behandelten Probe auftraten. Es wurde anhand der Spektren des Mediums und von gereinigten Faser vor der Inkubation weiterhin ausgeschlossen, dass die Substanzen aus dem Medium stammten bzw. sich schon vor der Messung auf der Faser befanden. Im Folgenden wurde beispielhaft ein Ausschnitt aus den Chromatogrammen der parasitoid-behandelten Probe aus der Kultur von Cos5 mit einem Peaks dargestellt, der nur in der mit *L. coscinodisci* behandelten Probe auftrat (Abbildung 3.14). Anhand der Fragmentierungen im Massenspektrum (Abbildung 3.15) wurde von durch die NIST MS Search Funktion ein Strukturvorschlag generiert, der zusammen mit dem Chromatogramm abgebildet wurde. Die Struktur wies einen Match-Faktor von 757 auf, das bedeutete, dass zwar eine gewisse Ähnlichkeit zwischen dem aufgenommenen Massenspektrum und dem Vergleichsspektrum aus der Bibliothek bestand, jedoch wurde der Strukturvorschlag als nur mäßig zuverlässig angesehen. [39] Für die anderen Peaks ergaben sich vergleichbare Werte (vgl. Abbildung A.5 Abbildung A.6).

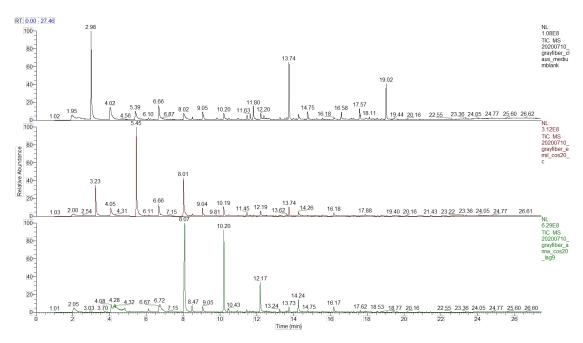


Abbildung 3.13: Chromatogrammen der SPME-GC-MS-Analyse von *C. granii* (Cos20). Die Chromatogramme wurden aufgenommen, nachdem jeweils ein Faser für zwölf Stunden im Medium (oben), in einer unbehandelten Kultur von Cos20 (mitte) und in einer am Tag zuvor mit dem Parasitoiden *L. coscinodisci* behandelten Kultur (unten) inkubiert wurde. Die Desorption erfolge für die GC bei 230°C und das Massenspektrum wurde mit Elektonenstoß-Ionisierung aufgenommen.

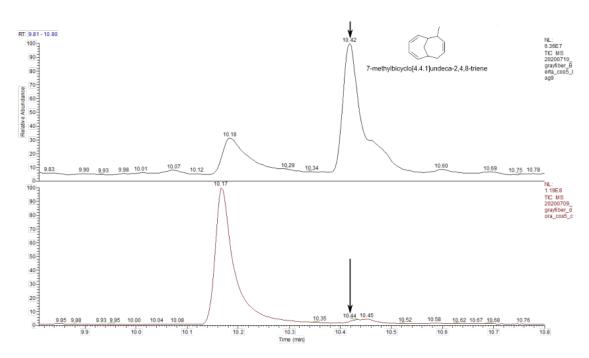


Abbildung 3.14: Ausschnitt aus dem Chromatogrammen der SPME-GC-MS-Analyse von C. wailesii (Cos5). Die Messung mit Elektronenstoß-Ionisierung im Massenspektrum erfolgte nach zwölf-stündiger Inkubation der Faser in einer am Tag zuvor mit dem Parasitoiden behandelten (oben) und einer unbehandelten (unten) Kultur von Cos5. Mit Pfeilen gekennzeichnet wurde ein Peak, der nur im Spektrum der behandelten Probe auftrat und nicht dem Medium oder der gereinigten Faser zugeordnet werden konnte. Der zugehörige Strukturvorschlag aus der NIST MS Search Funktion wurde mit abgebildet (Match-Faktor=757).

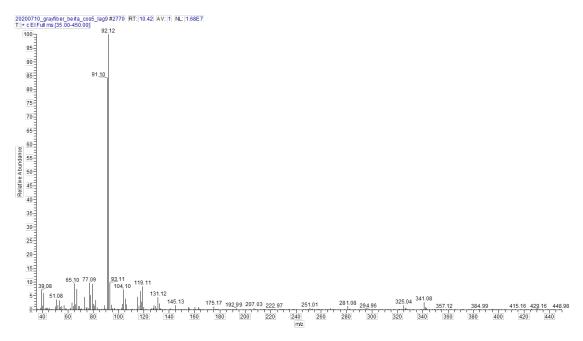


Abbildung 3.15: Massenspektrum zu dem Peak aus Abbildung 3.14. Der Peak bei 10,42 min wurde nur im Chromatogramm der Probe von der mit *L. coscinodisci* behandelten Kultur von *C. wailesii* detektiert und das hier abgenbildete Massenspektrum wurde zur Generierung des Strukturvorschlags mit der *NIST MS Search* Funktion genutzt.

## 3.5 Co-Kultivierung zur Prüfung auf Verteidigungsinduktion bei Ceratium sp. durch eine benachbarte infizierte Kultur

#### 3.5.1 Zustand und Wachstum von Ceratium sp. in der Co-Kultivierung

Die Co-Kultivierung von Ceratium sp. (RCC8613) als mit dem Parasiten (RCC2857) behandelte Kultur und als unbehandelte Kultur in den Co-Kultivierungskammern wurde dazu genutzt, zu prüfen, ob in der unbehandelten Kultur (im Folgenden als induzierte Kulturen bezeichnet) eine Verteidigungsreaktion induziert werden konnte.

Die zu testende Hypothese bei diesem Experiment war es, dass Ceratium sp. in Gegenwart des Parasiten bzw. bei Infektion mit dem Parasiten eine chemische Substanz an das umgebenden Medium abgab, die in den Algenzellen in der Umgebung eine Verteidigungsreaktion induzierte. In den verwendeten Co-Kultivierungskammer konnte eine mögliche Substanz zwischen den Kammern der behandelten und der induzieren Kultur ausgetauscht werden, jedoch war kein physischer Kontakt der unbehandelten Kultur mit dem Parasiten oder Algenzellen der behandelten Kultur möglich. Als Kontrolle wurden unbehandelte Kulturen mit Medium co-kultiviert.

Nach der 14-tägigen Wachstumsphase konnte, wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, eine Infektion der behandelten Kulturen beobachtet werden, ohne dass dabei die letzte Phase der Infektion, die Bildung von Zoosporen auftrat. In den Kammern der induzierten Kulturen und der Kontroll-Kulturen wurde keine Infektion festgestellt und auch kein ungewöhnliches Verhalten, wie beispielsweise eine Sedimentation der Algenzellen. In einem Kontroll-Experiment mit der für den Parasitoiden empfindlichen Art Alexandrium minutum wurde verifiziert, dass eine Infektion und die Entwicklung von P. rostrata über einen kompletten Lebenszyklus hinweg im experimentellen Aufbau mit der Co-Kultivierungskammer möglich war (Daten werden in dieser Arbeit nicht dargestellt.).

Als weiterer Indikator für eine mögliche induzierte Reaktion wurden die Zelldichten am Ende der Wachstumsphase bei den drei verschiedenen Bedingungen (parasitoid-behandelt, unbehandelt, induziert) miteinander verglichen (Tabelle 3.9). Dabei konnte nach der Bestätigung von Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, P=0,351>0,05) und Varianzhomogenität (Brown-Forsythe-Test, P=0,420>0,05) über eine one-way ANOVA bei einer statistischen Sicherheit von 95% kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelldichten (P=0,228) festgestellt werden. Der post-hoc Test zur Identifizierung, welche der Gruppen sich signifikant von den übrigen unterschied, entfiel dementsprechend. Aus der Power Analyse wurde jedoch erkannt, dass mit der Anzahl der Proben nur eine geringe Wahrscheinlichkeit gegeben war einen signifikanten Unterschied zwischen den Probengruppen zu finden, wenn dieser existiert (Ergebnisse Power Analyse 0,141<0,8). Das Ergebnis der statistischen Auswertung wurde zusätzlich graphisch dargestellt (Abbildung 3.16).

Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Infektion von Ceratium sp. mit dem

Tabelle 3.9: Zelldichten von Ceratium sp. am Ende der 14-tägigen Wachstumsphase  $\bar{c}_{End}$  bei den verschiedenen Bedingungen der Kulturen (unbehandelt, behandelt und induziert) aus der Co-Kultivierung. Die one-way ANOVA wurde durchgeführt, nachdem weder die Normalverteilung (PP=0,351>0,05) noch die Varianzhomogenität (P=0,420>0,05) der Probengruppen abgelehnt wurden, und ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelldichten (P=0,228>0,05).

Bedingung	$\overline{c}_{End} \pm SD$	Signifikant
	[Zellen $\cdot$ ml <sup>-1</sup> ]	(P-Wert)
unbehandelt	$83 \pm 10$	)
behandelt	$104\pm19$	nein $(0,228)$
induziert	$88 \pm 20$	J

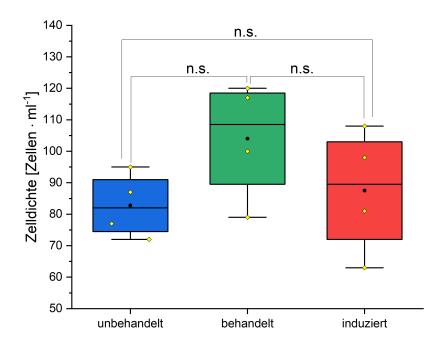


Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der statistische Auswertung der Zelldichten von Ceratium sp. aus dem Co-Kultivierungsexperiment. Die Zeldichten der verschiedenen Bedingungen (unbehandel, behandelt, induziert) wurden über eine one-way ANOVA verglichen und es wurde eine Signifikanz festgestellt (P=0,228).

Parasitoiden *Parvilucifera rostrata* keinen Effekt auf das Wachstum der infizierten Kultur hatte. Außerdem wurde auch kein induzierender Effekt der infizierten Kultur auf eine benachbarte nicht mit dem Parasitoiden behandelte Kultur bezüglich des Zellwachstums festgestellt. Falls eine Verteidigungsinduktion durch die behandelte Kultur im Modell-Organismen stattfindet, so beeinflusste die induzierte Reaktion den Metabolismus der Mikroalgen, ohne dass dabei das Zellwachstum zu beeinträchtigen.

## 3.5.2 Untersuchung auf Veränderungen im Endometabolom von Ceratium sp. durch Infektion oder Induktion

Analog wie bei den Diatomeen-Kulturen wurde auch bei dem Co-Kultivierungsexperiment der Dinoflagellaten-Art Ceratium sp. sowohl das Endometabolom als auch das Exometabolom untersucht. Jedoch wurde auch hier entschieden nur das Endometabolom der Mikroalgen einer genaueren Analyse zu unterziehen. Von den 2257 Features von Compound Discoverer wurden die 2146 Features, denen bei einer maximalen Massendifferenz von  $\Delta m=5$  ppm einer Summenformel von Compound Discoverer zugeordent wurde, für die Analyse mit MetaboAnalyst verwendet. Dabei wurden in einem ersten Ansatz die Daten mit den drei Bedingungen parasitoid-behandelt, unbehandelt, induziert und dem Datensatz des Mediums verglichen, das zur Kontrolle zusammen mit die Kulturen extrahiert wurde. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den Features in einer one-way ANOVA jedoch nur zwischen den Proben aus den Kulturen und dem Medium ermittelt. Da jedoch das Ziel war, metabolomische Veränderungen aufgrund der Infektion oder der Induktion durch eine mit dem Parasitoiden behandelten Kultur zu finden, wurden in einem zweiten Ansatz nur die drei Gruppen aus den verschieden behandelten Kulturen untersucht. Es wurden hierbei keine signifikant veränderten Features identifiziert und auch die PCA zeigte Uberschneidungen der 95%-Intervalle und wenig Varianz zwischen den Proben der unterschiedlichen Bedingungen. Die Heatmap der 25 Features mit den niedrigsten P-Werten aus der ANOVA spiegelt die Ergebnisse wider (Abbildung 3.17; es ist zu beachten, dass die Bezeichnung der Features sich aus der Summenformel, der Masse und der Retentionszeit zusammensetzt und in der Graphik nicht vollständig angegeben wurde). Zwar wurden einige Features beispielsweise in der parasitoid-behandelten Probengruppe erhöht (zu erkennen an der roten Färbung), jedoch variiert die Erhöhung auch stark innerhalb der Probengruppe und in den Gruppe der induzierten und unbehandelten Proben konnten auch einzelne Proben mit einer Erhöhung des Features gefunden werden (vgl. z.B. Feature mit C25 H46 O10506,307).

Bei der Datenauswertung mit der *Pattern Hunter* Analyse von *MetaboAnalyst*, mit der nach Features gesucht wurde, die kennzeichnend für eine Probengruppe waren, fiel eine ungewöhnlich hohe Anzahl an halogen-haltigen Features auf, die jedoch nicht auf eine Probengruppe beschränkt war, sondern in allen Probengruppen auftrat. Beispielsweise wurden unter den vierzehn Features, die in der *Pattern Hunter* Analyse als markant für die parasitoid-behandelte und induzierte Gruppe ausgewählt wurden, zwei halogenierte Verbindungen und gleichzeitig wurde eine anderes brom-haltiges Feature als kennzeichnend für die Gruppe der unbehandelten Proben aufgefunden (Abbildung A.4).

### 3.5.3 Phytohormone in Ceratium sp.

Analog wie bei den Metabolom-Daten der Diatomeen-Mikroalgen wurden auch die Daten von Ceratium sp. auf die Anwesenheit von Phytohormonen geprüft. Dabei wurden die Phytohormone Jasmonsäure und Methyldihydrojasmonat unter den Features gefunden (vgl. Tabelle B.7). Jedoch wurde in einer one-way ANOVA keine signifikante Änderung zwischen den Probengruppen parasitoid-behandelt, unbehandelt und induziert gefunden (Jasmonsäure P=0,104>0,05 und Methyldihyrdojasmonat P=0,197>0,05).

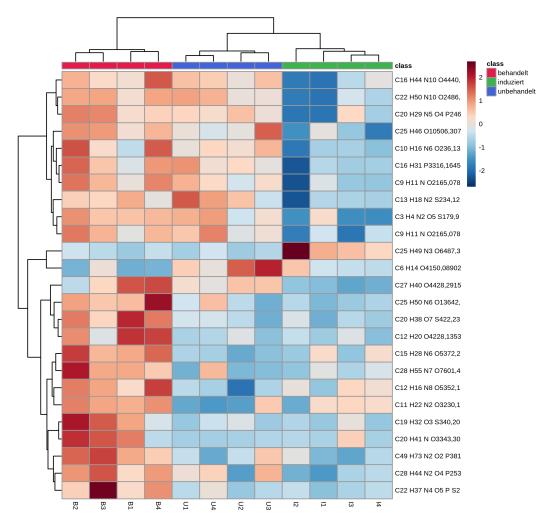


Abbildung 3.17: Ergebnisdarstellung des t-Tests für Ceratium sp. als Heatmap. Die 25 nicht signifikanten Features mit dem kleinesten P-Wert aus der one-way ANOVA von MetaboAnalyst, wobei die Unterschiede der normalisierten und Pareto-skalierten Peakflächen jedes Features reihenweise durch eine farbliche Skala angegeben wurden (rot, erhöhte; blau, verringert). Am Kopf jeder Spalte ist die Zuordnung der Probe zur jeweiligen Gruppe durch die Farbe markiert (rot, parasitoid-behandelt; blau, unbehandelt; grün, induziert) und die dargestellten Features wurden mit der Summenformel, der Molmasse und der Retentionszeit benannt, allerdings wurde die Benennung nicht vollständig abgebildet.

#### 4 Diskussion

#### 4.1 Methoden-Diskussion

Die Methodenwahl besitzt einen immensen Einfluss auf das Ergebnis einer metabolomischen Untersuchung. Dabei spielen verschiedene Faktoren von der Probennahme bis zur Auswertung eine Rolle in dieser Einflussnahme. Die Wahl der Methoden kann dazu führen, dass keinerlei Erkenntnisse aus den erhobenen Daten gewonnen werden können oder dass im schlimmsten Fall falsche Erkenntnisse aus den Versuchen gezogen werden. [40] Aus diesem Grund sollte bei der Arbeit im metabolomischen Bereich bei der Vorbereitung eines Experiments und auch bei der Ergebnisinterpretation ein besonderes Augenmerk auf die verwendete Methodik gelegt werden, um die Robustheit der Ergebnisse zu prüfen. In dieser Arbeit wird deshalb zunächst die verwendete der analytische Prozess diskutiert, bevor die Ergebnisse aus den Experimenten selbst vor dem Hintergrund der Methodenwahl beleuchtet werden.

## 4.1.1 Extraktionmethode, analytisches Prinzip, Datenaufbereitung und (statistische) Auswertung der LC-MS-Analyse

Die erste Einflussgröße, die bei den hier durchgeführten UHPLC-MS-Experimenten zur Untersuchung des Endometaboloms einen große Auswirkung hatte, sind die unter dem Begriff Metadaten zusammengefassten Faktoren. Dazu zählt beispielsweise das Alter bzw. die Wachstumsphase einer untersuchten Kultur, mit denen sich das Metabolom von Mikroalgen in der Zusammensetzung und auch im Gehalt der Metabolite verändert. [41] Weiterhin können auch abiotische Faktoren wie der Nährstoffgehalt, das Licht und die Temperatur für Veränderungen im Metabolom und für eine erhöhte oder verminderte Empfindlichkeit einer Mikroalge für einen Parasitoiden [17] verantwortlich sein. Um deshalb eine Vergleichbarkeit der parasitoid-behandelten und der unbehandelten Proben einer Mikroalge zu gewährleisten wurden alle Kulturen und biologischen Replikationen einer Spezies aus einer Stammkultur am selben Tag angesetzt, unter denselben Bedingungen kultiviert und auch am selben Tag extrahiert. Bei einem Vergleich mit Ergebnissen aus anderen Experimenten oder mit Ergebnissen aus der Literatur, ist jedoch oft nur eine bedingte Vergleichbarkeit der Metadaten gegeben und deshalb können die Resultate aus den eignen Experimenten beispielsweise abweichen.

Wenn metabolomische Reaktionen auf einen Stimulus beobachtet werden sollen, wie im Falle dieser Arbeit die Reaktion der Mikroalgen auf die Anwesenheit von bzw. die Infektion mit einem Parasitoiden, stellt auch die Wahl des Extraktionszeitpunktes eine entscheidende Einflussgröße dar. Der Zeitpunkt sollte nicht zu früh sein, da in einem solchen Fall die Reaktion der Mikroalge auf den Parasitoiden noch nicht eingetreten sein könnte bzw. die

Produktion der Metabolite noch nicht in einem messbaren Ausmaß stattgefunden haben könnte. Der Zeitpunkt der Extraktion darf jedoch auch nicht zu spät liegen, da der Verteidigungszustand der Algen eventuell nicht dauerhaft anhält und Verteidigungsmetabolite wieder abgebaut werden könnten.

Als nächste Einflussgröße im Arbeitsablauf ergibt sich die Extraktionsmethode selbst. Vor allem durch die Polarität des Extraktionsmittels werden bestimmte Metabolite quantitativ extrahiert und andere überhaupt nicht und so können unterschiedliche Extraktionsmittel zu unterschiedlichen extrahierten Metaboliten oder Metabolit-Gehalten führen, die dann wiederum zu unterschiedlichen Interpretationen des Ergebnisses führen können.<sup>[40]</sup> Besonders bei Methanol als Extraktionsmittel kann auch die Bildung von Artefakten durch Methylierung beobachtet werden, die sowohl bei der Extraktion selbst entstehen, als auch bei der anschließenden Lagerung der Proben.<sup>[42]</sup>

Bei der in dieser Arbeit verwendete Extraktionsmethode handelt es sich um ein Standardprotokoll zur Extraktion von Diatomeen- und Dinofagellat-Zellen aus der Arbeitsgruppe,
das bereits mehrfach angewandt wurde und unter anderem zu Erkenntnissen im Bereich der
metabolomischen Änderungen bei Infektion mit einem Parasitoiden geführt hat. [Vallet2018]
Durch die Mischung aus drei verschiedenen Lösungsmitteln als Extrakionsmittel kann eine
große Bandbreite verschiedener Metabolite extrahiert werden. Nichtsdestotrotz sorgt das
Extraktionsmittel für eine Voreingenommenheit der extrahierten Metabolite und für einen
Informationsverlust durch nicht oder nur unvollständig extrahierten Metaboliten.

Als dritter großer Faktor nimmt auch das analytische Prinzip einen Einfluss auf das Ergebnis der Analyse. Einleitend wurden als Features im weiteren Sinne diejenigen Signale aus dem LC-MS-Daten bezeichnet, die mindestens eine zugeordnete Retentionszeit und einen m/z-Wert bzw. eine (hochaufgelöste) Masse aufweisen. Mit diesen Angaben lässt sich ein Feature zwar charakterisieren, allerdings reichen diese Merkmale vor allem bei dem Ansatz einer ungezielte metabolomische Untersuchung nicht zur Identifikation des Metaboliten mit einer Strukturformel aus.<sup>[37]</sup> Durch die hohe Anzahl an Metaboliten in einer einzigen Probe lassen sich erstens nicht alle Substanzen mit z.B. dem in dieser Arbeit verwendeten Programm auf einer C18-Säule auftrennen und zweitens kann aus der hochaufgelösten Masse zwar (meistens) eine Summenformel abgeleitet werden, dabei kann jedoch noch lange keine Aussage über die Struktur oder Funktionalität eines Features getroffen werden. Gerade solche Features mit einer großen Anzahl an Atomen können enorm viele verschiedene Strukturen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen bilden. Weiter werden bei der Generierung der Summenformel in der Regel nur begrenzte Elemente verwendet (C, H, O, N, S, P und ggf. Halogene, Na, K), wodurch Metabolite mit ungewöhnlichen Elementen wie beispielsweise Selen-haltige Verbindungen vernachlässig werden.<sup>[37]</sup> Bei der verwendeten chromatographischen Methode handelt es sich wie bei der Extraktionsmethode um ein Standardprotokoll und aufgrund der begrenzten Zeit wurden keine Versuche zur Optimierung der Methode unternommen.

Durch die Aufnahme von MS/MS-Spektren ist es möglich die Struktur eines Features mit einer höheren Sicherheit zu bestimmen. Allerdings können nicht für jedes im MS1 detektierte Feature ein MS/MS aufgenommen werden und bei gleichzeitiger Aufnahme von MS- und MS/MS-Daten einer Probe nimmt die Sensitivität im MS1-Spektrum ab.<sup>[37]</sup> Um dies zu umgehen werden, wie auch in dieser Arbeit, die einzelnen Proben nur als MS1-Spektrum aufgenommen und die MS/MS-Spektren werden aus den gesammelten QC-Proben gewonnen.

Als vierte und letzte Einflussgröße soll noch die statistische Auswertung der Daten genannt werden, die aufgrund der hohen Datenmenge in metabolomischen Untersuchungen unerlässlich ist. Durch die statistische Analyse werden aus hunderten bis tausenden Features diejenigen selektiert, die sich z.B. in einem Vergleich von Probengruppen signifikant unterscheiden (z.B. im t-Test oder einer ANOVA) oder spezifisch für eine Gruppe der Proben sind (z.B. durch Fold Change oder Pattern Hunter Analyse). Dabei hängt das Ergebnis eines statistischen Tests unter anderem an der Varianz innerhalb der einzelnen Proben einer Gruppe ab. Je kleiner die Varianz innerhalb einer Gruppe ist, desto eher können auch kleine Varianzen zwischen zwei Gruppen als signifikant erkannt werden. Dies lässt sich beispielsweise an der Hauptkomponentenanalyse und der Ergebnisdarstellung derselben als Score Plot bemerken. Der Score Plot von C. granii (Cos37) und C. wailesii (Cos5) repräsentierten eine ähnliche Gesamtvarianz der jeweiligen Datensätze (bei Cos37 51,9%, bei Cos5 45,6%) und während sich bei Cos37 die 95%-Konfidenzintervalle der parasitoid-behandelten und der unbehandelten Probengruppe deutlich auftrennten, überschnitten sich die Intervalle bei Cos5. Dies lag unter anderem daran, dass die Varianz innerhalb der mit dem Parasitoiden behandelten Proben von Cos37 wesentlich geringer war als in den Proben von Cos5 und dadurch auch das Konfidenzintervall bei Cos37 in der Score Plot Darstellung war. Die Varianz innerhalb einer Gruppe wird zum Teil durch die zufälligen Unterschiede in biologischen Proben verursacht, sie kann jedoch auch künstlich durch eine ungleiche Behandlung der Proben z.B. bei der Extraktion entstehen.

Das Ergebnis aus statistischen Analysen wird weiter von den verwendeten Ausgangsdaten beeinflusst, die durch Aufbereitung der Rohdaten hervorgehen. Die Aufbereitung der Rohdaten umfasst unter anderem Filterschritte für die Reduktion von Störsignalen und Schritte zur Basislinienkorrektur von Peaks, sowie Schritte zur Retentionszeitkorrektur und zur Normalisierung der Peakflächen der einzelnen Proben, [43] um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben zu erzeugen. Für die einzelnen Schritte der Datenaufbereitung gibt es oft mehrere verschiedene Möglichkeiten, wie z.B. bei der Datenskalierung in MetaboAnalyst, bei dem/der Benutzer/in unter anderem die Optionen Pareto-, Range- und Auto-Skalierung offen stehen. [38] Für die Entscheidung, welche der Möglichkeiten genutzt werden sollte, gibt es keine allgemeingültige Einigkeit, es wird unter anderem eine empirische Auswahl empfohlen, bei der die Methode verwendet wird, die die beste Normalverteilung ergibt. Bemessen werden soll dies dabei visuell an der Verteilungsfunktion der normalisierten

Daten.<sup>[38]</sup> Eine Aufbereitung der Rohdaten mit unterschiedlichen Methoden kann dazu führen, dass verschiedene Features als Ergebnis von statistischen Tests ausgegeben werden und sich somit auch die Interpretation der Daten unterscheidet.

Die Analyse von metabolomischen Daten wird durch statistische Hilfsmittel wie Metabolomische zwar erleichtert, dennoch benötigt eine tief gehende Auswertung der Daten viel Zeit. Besonders dann, wenn nur kleine metabolomische Veränderungen zwischen Proben auftreten, müssen die unterschiedlichen statistischen Test genutzt werden, um möglichst diejenigen Features zu identifizieren, die für die Fragestellung der metabolomischen Untersuchung von Bedeutung sind. Im Falle dieser Arbeit wurde auf Grund der zeitlichen Beschränkung nicht für alle gewonnen Datensätze eine tief gehende Auswertung durchgeführt. Stattdessen wurde am Beispiel von Cos43 als dem Organismus mit der deutlichsten Veränderung im Metaboloms gezeigt, wie eine Auswertung ablaufen könnte und wie aus den Features mögliche Hypothesen für die Verteidigungsstrategie entwickelt werden können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass jede Methode in der Metabolomik mit Informationsverlust einhergeht, da in keinem Fall das gesamte Metabolom mit nur einem experimentellen und analytischen Ansatz untersucht werden kann. Dadurch kann es immer passieren, dass die für eine Fragestellung besonders aufschlussreichen und relevanten Metabolite nicht als Features detektiert werden und damit Schlüsselelemente fehlen, die beispielsweise die Resistenz einer Mikroalge gegen einen Parasitoiden erklären können. Weiterhin erzeugt die Methodenwahl auch in der Regel eine gewisse Voreingenommenheit der gewonnenen Daten und stellt nur eine Momentaufnahme eines dynamischen Systems dar. Dementsprechend können die ersten abgeleiteten Erkenntnisse aus metabolomischen Untersuchungen erst einmal als Hypothesen betrachtet werden, die weiterer Verifikation bedürfen. Auch alle in dieser Arbeit abgeleiteten Resultate über die bei Behandlung mit dem Parasitoiden veränderten Features und ihre Bedeutung für die Verteidigungsstrategie der Mikroalgen können nur als Hypothesen betrachtet werden. Für die Bestätigung dieser Möglichkeiten müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um beispielsweise die Identität der Features durch eine Co-Injektion mit einem Standard der Substanz zu bestätigen.

Die gewählten Methoden zur Untersuchung des Endometaboloms stellen dadurch, dass es sich um Standardprotokolle (z.B. Extraktions- und LC-MS-Methode) und anerkannte Methoden in der statistischen Auswertung von Metabolom-Daten (z.B. MetaboAnalyst) handelt eine robuste Grundlage für die anschließende Auswertung dar und die Ergebnisse der Experimente aus dieser Arbeit können aufbauend darauf im Folgenden interpretiert werden.

#### 4.1.2 Bestimmung der Zelldichte

In dieser Arbeit wurden zur Normalisierung der Peakflächen der einzelnen Proben unter anderem probenspezifische Faktoren verwendet, die aus der Zelldichten resultierten, welche wiederum durch das Zählen von Zellen in einer Zählkammer bestimmt wurden. Diese Methode ist durch einen systematischen Fehler belastet, da unter anderem nur ein begrenztes Volumen einer Kultur gezählt wird und von diesem ausgehend auf die Anzahl der Zellen im Gesamtvolumen geschlossen wird. Besonders, wenn z.B. das Probenvolumen durch eine inhomogene Verteilung bei der Probennahme nicht repräsentativ für die Probe ist oder wenn die Zelldichte sehr gering bzw. sehr hoch ist, kann sich durch Fehlerfortpflanzung ein beträchtlicher Fehler für die berechnete Zelldichte ergeben.<sup>[44]</sup> Weiterhin kommt es zu eine Varianz der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen zählenden Personen. Die Normalisierung anhand der auf der Zelldichte basierenden Faktoren überträgt den Fehler vom Zählen der Zellen auf die Metabolom-Datensätze und damit auch auf die Ergebnisse, wodurch die Resultate der Analyse beeinflusst werden können. Weiter kann die Zelldichte auch als Kriterium für die Virulenz eines Parasitoiden bzw. die Resistenz eines Wirtes genutzt werden. Beispielsweise bei Versuchen zum Resistenztransfer kann die Zelldichte genutzt werden, um zu prüfen, ob die Infektion einer empfindliche Mikroalge durch das Exudat einer resistenten Spezies gehemmt wird, sodass nach der Kultivierungsphase ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelldichten den infizierten exudat-behandelten und der infizierten unbehandelten Kulturen besteht. Bei solchen Experimenten ist es essentiell wichtig, dass die Zelldichte richtig und auch präzise bestimmt wird.

Eine mögliche Alternative zum händischen Zählen stellt automatisiertes Zählen beispielsweise über ein Flow Cytometer dar. Dabei kann zum einen Zeit eingespart werden und zum anderen wird die subjektive Varianz zwischen Zählenden vermieden, sodass sich die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses für die Zelldichte erhöht. Das Flow Cytometer basiert meistens auf der Messung der Fluoreszenz oder des Streulichts der Zellen und ermöglicht dadurch auch Unterscheidung von Zelltypen in einer Probe. Dies könnte beispielsweise genutzt werden, um gleichzeitig die Anzahl an Mikroalgenzellen und Zoosporen einer Probe bestimmen. In einem Methodenvergleich hat sich jedoch heraus gestellt, dass die Bestimmung der Zelldicht mittels Flow Cytometrie unter Umständen mit einer geringe Präzision und Richtigkeit einher gehen kann und weiterhin müssen Zellen, die keine natürliche Fluoreszenz aufweisen angefärbt werden, was wiederum zu Fehlern führen kann. Es ist deswegen notwendig ein zuverlässiges Protokoll für die zu zählende Zellart zu entwickeln, um das Potential eine Flow Cytometers nutzen zu können.

In dieser Arbeit wurde sich nach einigen Test-Versuchen gegen die Verwendung eines Fow Cytometers entschieden, da es an einem verwendbaren Protokoll mangelte und die Entwicklung desselben keinen Aspekt der Zielsetzung bildete. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte somit durch manuelles Zählen. Dies hatte weiterhin den Vorteil, dass der

Zustand der Algenkultur bezüglich der Infektion mit dem Parasitoiden beurteilt werden konnte und eventuelle morphologische Veränderungen sofort aufgefallen wären. Um die Richtigkeit der Zelldichten zu gewährleisten wurde darauf geachtet, dass die Kulturen vor der Probennahme homogenisiert wurden und bei sehr hohen bzw. sehr niedrigen Zelldichten wurde eine Verdünnung durchgeführt bzw. weggelassen.

#### 4.1.3 SPME-GC-MS-Analyse als vielversprechende Methode

Die Festphasen-Mikroextraktion gekoppelt mit GC-MS-Analytik wird oft eingesetzt, um flüchtige Metabolite beispielsweise aus dem Gasraum über einer Zellkultur zu adsorbieren und anschließend zu analysieren<sup>[46]</sup>. <sup>[47]</sup> Jedoch wurden die SPME-Fasern ebenfalls eingesetzt, indem sie im Medium einer Algenkultur inkubiert wurden und dort Substanzen aus dem Exudat der Mikroorganismen adsorbierten. <sup>[48]</sup>

Der in dieser Arbeit durchgeführt Versuch zur SPME wurde dazu genutzt, um die Funktionalität der Methode für Fragestellungen zur metabolomischen Veränderungen bei Behandlung einer Kultur von Mikroalgen mit einem Parasitoiden zu prüfen. Weiterhin wurde auch die Hypothese eines potentiellen in diesem Falle flüchtigen Exometaboliten mit einer schädigenden oder abhaltenden Wirkung auf die Zoosporen durch die GC-MS-Analyse geprüft, ohne dass dabei eine weitere strukturelle Identifizierung des potentiellen Metabolitens durchgeführt werden sollte.

Da es sich also um einen bisher für diese Art der Fragestellungen ungetesteten experimentellen Ansatz handelte, wurde der Versuch ohne biologische Replikationen durchgeführt mit dem Vorhaben die Methode gegebenenfalls für zukünftige Experimente zu nutzen und dementsprechend in dem Falle mit mehreren biologischen Replikaten zu arbeiten, um die Robustheit und statistische Sicherheit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Bei der Analyse von Coscinodiscus granii (Cos20) wurden keine relevanten Peaks bei der visuellen Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren gefunden. Dahingegen wurden aus Analyse von Coscinodiscus wailesii (Cos5) mehrere Peaks identifiziert, die ausschließlich in der mit dem Parasitoiden behandelten Probe auftraten und die nicht dem Medium oder der Faser selbst zugeordnet werden konnten. Da in der Co-Kultivierung von Cos20 und Cos5 kein Resistenztransfer auf die empfindliche Mikroalge beobachtet wurde, wurde gefolgert, dass die Metabolite, die die Peak in der GC verursachten, wahrscheinlich nicht die hypothetisierte schädliche Wirkung auf die Zoosporen hatten. Stattdessen könnte es sich um Metabolite handeln, die für das induzieren eines möglichen Priming-Effekts verantwortlich sein könnten. Weiter Experimente zu intraspezifischen Priming-Effekten bei Coscinodiscu wailesii könnten beispielsweise in experimentellen Ansätzen mit einer Co-Kultivierung durchgeführt werden, vergleichbar mit den Versuchen mit Ceratium sp. aus dieser Arbeit.

Allerdings ist zu beachten, dass aufgrund der fehlenden biologischen Replikationen nicht bestätigt werden konnte, dass die Peaks tatsächlich von Substanzen aus dem Exudat der

Mikroalge stammen und keine Kontaminationen darstellen, die zwischen der Reinigung der Faser und der Messung nach der inkubierten Faser adsorbiert wurden. Auch die Identität in Form der Summenformel und Struktur der Substanzen, die die Peaks verursachten, konnte nicht verifiziert werden. Die Strukturvorschläge aus der NIST MS Search-Funktion konnten aufgrund der niedrigen Werte des Match-Faktors nicht als zuverlässig angesehen werden und da das ISQ Massenspektrometer keine hochaufgelöste Masse ausgibt, konnte auch keine Summenformel generiert werden.

Ferner wurde festgestellt, dass viele Peaks aus den Chromatogrammen z.T. auch mit relativ hoher Intensität durch die Faser selbst verursacht wurden und diese sich in der Auswertung als Störfaktoren erwiesen, da sie mit anderen möglicherweise relevanten Peaks überlagern konnten. Bei Versuchen mit mehreren biologischen Replikationen und Blindproben (z.B. nicht inkubierte Faser und mit Medium inkubierte Fasern) können jedoch z.B. über die Daten-Aufbereitung die Spektren der gemessenen Proben mit den Blindproben korrigiert werden, um die Störsignale zu reduzieren. In den Experimenten in dieser Arbeit wurde mit grauen Fasern von Supelco gearbeitet, in den Protokollen mit einem ähnlichen Versuchsansatz wurden dagegen rote Fasern derselben Firma genutzt, [48] die ausschließlich aus Polydimethylsiloxan bestehen und eine höhere Schichtdicke ausweisen. Für nachfolgende Versuche können die verschiedenen Fasern getestet werden und auch andere Faktoren, wie z.B. die Dauer, die die Faser dem Medium zur Adsorption ausgesetzt wird, variiert werden, um ein optimiertes Protokoll für die Analyse von flüchtigen Komponenten mittels SPME direkt aus dem Medium zu erstellen.

Für das Ofenprogramm und die Einstellungen der GS-MS wurde sich an einem bereits getestetes Protokoll orientiert<sup>[49]</sup>,<sup>[50]</sup> wobei in den Versuchen dieser Arbeit eine Säule mit dünnerer Schichtdicke verwendet wurde. Außerdem wurde nach mehrfachen Testläufen die Splitrate für die GC auf zehn eingestellt, bei der eine akzeptable Auflösung der Peaks ohne Tailing erreicht wurde, was bei kleineren Splitraten bzw. einer splitlosen Injektion nicht der Fall war.

Auch die Temperatur, die zur Reinigung der Fasern verwendet wurde, wurde in verschiedenen Test-Experimenten validiert und es wurde festgestellt, dass eine Temperatur von 250°C nicht ausreichend war, um auch schwer flüchtige Substanzen wie z.B. sehr lang-kettige Alkane von der Faser zu desorbieren. In Übereinkunft mit den Herstellerangaben für die graue Faser wurde eine die Maximaltemperatur der Faser von 270°C zur Reinigung genutzt.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieses Experimentes die SPME-GC-MS-Analyse als durchaus vielversprechende Methode zur Analyse des Exometaboloms beurteilt werden. Besonders da durch die Methode eine mehrfache Messung derselben Kultur über einen Zeitraum ermöglichen werden kann, wodurch auch die Geschwindigkeit und Dynamik einer induzierten Verteidiungsreaktion besser untersucht werden könnte. Vor dem Einsatz der SPME-Analyse für eine neue metabolomische Fragestellung sollten jedoch Versuche zur

Erstellung eines optimierten Protokolls für die Extraktion und die GC-MS-Messung durchgeführt werden, um die Robustheit der in den tatsächlichen Experimenten gewonnenen Ergebnisse zu gewährleisten.

## 4.2 Mögliche Ursachen der Resistenz von Odontella sinensis, Lithodesmium undulatum und Coscinodiscus wailesii gegen den Parasitoiden Lagenisma coscinodisci

#### 4.2.1 Selektivität der Zoosporen für Wirtszellen

Besonders auf Grund der co-evolutionären Beziehung zwischen einem Parasitoid und seinen Wirten sind die Zoosporen oft auf die zugehörigen Wirtszellen spezialisiert und können deshalb nicht jede beliebige Algenzelle infizieren. Als infektiöse und freibewegliche Form des Parasitoiden nutzen sie Chemotaxis, um Wirtszellen aufzuspüren.<sup>[51]</sup> Sie können dabei chemische Substanzen wahrnehmen, die eine potentielle Wirtszelle an die Umgebung abgibt. Die Zusammensetzung des Exudats von verschiedenen Diatomeen-Arten variiert und auch innerhalb derselben Spezies kann sich die Zusammensetzung an verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase unterscheiden.<sup>[52]</sup> Aufgrund dieser Tatsache nehmen die Zoosporen nicht von jeder Algenzelle chemotaktisch wahr, sondern nur von solchen, die potentielle Wirtszellen für den Parasitoiden darstellen und dadurch weisen die Zoosporen eine Selektivität für ihre Wirte auf.

Lagenisma coscinodisci ist bisher als Parasitoid bekannt, der Mikroalgen der Gattung Coscinodiscus infiziert. [53] Damit fallen die in dieser Arbeit verwendeten Mikroalgen Lithodesmium undulatum (Helg52) und Odontella sinensis (Helg41) nicht in das Wirtsschema des Parasitoiden. Tatsächlich ließen sich in den Experimenten keinerlei Infektion dieser Algenspezies beobachten und bei L. undulatum wurde überdies keine signifikante metabolomische Veränderung festgestellt, die auf eine induzierte Verteidigungsreaktion hingewiesen hätte. Diese Resistenz der Mikroalgen ließ sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Selektivität der Zoosporen für bestimmte Algenspezies zurückführen. Da die Zoosporen die Algenzellen nicht über chemotaktische Wahrnehmung als potentielle Wirtszellen erkennen, infizieren sie dieselben auch nicht. Weiterhin verwenden die Zoosporen eine auf die Wirtszellen angepasste Methode, um in die Zelle einzudringen. [54] Zellen von Mikroalgen wie Odontella sinensis oder Lithodesmium undulatum, die nicht in das Wirtsschema des Parasitoiden fallen, könnten auch aufgrund der ihrer Zellmembran resistent sein, die für die Zoosporen von L. coscinodisci nicht zu durchdringen ist.

### 4.2.2 Morphologischer Resistenz oder Gen-für-Gen-Resistenz aus der Co-Evolution von Wirt und Parasitoid

In einem Isolat von Coscinodiscus wailesii aus dem August 2016 war die Infektion der Mikroalge mit dem Parasitoiden Lagenisma coscinodisci möglich und auch in nachfolgenden Experimenten erwies sich die Alge als empfindlich gegenüber dem Parasitoiden. [55] Im Gegensatz dazu war das Isolat von C. wailesii (Cos5) aus dem November 2019, das in dieser Arbeit verwendet wurde, resistent gegen den Parasitoiden. Dies deutet darauf hin, dass es isolat-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit einer Mikroalge gegenüber einem Parasitoiden geben kann und von der Spezies einer Mikroalge nicht direkt die Resistenz oder Anfälligkeit gegen eine Parasitoiden abgeleitet werden kann.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden durch den Ansatz von vergleichender Metabolomik weder Features aufgefunden, deren Peakflächen zwischen den Probengruppen einen signifikanten Unterschied aufwiesen, noch ließ PCA ließ eine eindeutige Differenzierung der 95%-Konfidenzintervalle der Probengruppen zu. Durch das Co-Kultivierungsexperiment mit einer empfindlichen Algenart wurde es für unwahrscheinlich befunden, dass sich im Exometabolom von Cos5 eine auf die Zoosporen schädlich oder abhaltend wirkende Substanz befand. Zusammengenommen legten die Ergebnisse der Experimente nah, dass die Gegenwart von L. coscinodisci in Cos5 keine signifikanten mit der gewählten Methode messbare Veränderungen im Metabolom verursacht und damit wurde die These einer induzierten chemischen Verteidigung als Ursache für die Resistenz von C. wailesii unwahrscheinlicher. Dies wurde zusätzlich dadurch unterstützt, dass induzierte Verteidigungsreaktionen oft mit Kosten für den Organismus einhergehen, die sich beispielsweise in verringerten Wachstumsraten widerspiegeln, [18] was bei Cos5 nicht beobachtet wurde. Auch eine verhaltensbestimmte Resistenz wurde ausgeschlossen, da in Gegenwart des Parasitoiden keine Verhaltensweise wie das Ausbilden von Zysten oder das Sedimentieren der Algenzellen festgestellt wurde.

Eine mögliche Erklärung für die Resistenz von Coscinodiscus wailesii wäre es, dass sich durch das Co-evolutionäre Zusammenleben mit dem Parasitoiden in der natürlichen Umgebung eine Resistenz aufgrund einer morphologischen Veränderung entwickelt wurde. Da in den Experimenten in keinem Fall das Eindringen der Zoosporen in die Algenzellen von Cos5 statt fand, wäre es beispielsweise möglich, dass sich eine Änderungen im Aufbau der Zellwand als Verteidigung gegen den Parasitoiden entwickelt haben könnte. Wie bereits erwähnt, nutzen die Zoosporen eines Parasitoide oft einen wirts-spezifische Methode, mit der sie in die Wirtszelle eindringen<sup>[54]</sup> und durch eine veränderte Zellwand könnte es den Zoosporen nicht mehr möglich sein die Zellwand zu durchdringen, wodurch die Algenzelle eine Resistenz entwickelt. In einer Langzeit-Kultivierung von dem Isolat von C. wailesii aus 2016 mit dem Parasitoiden L. coscinodisci wurden morphologische Veränderungen der Algenzellen beobachtet. [55] Diese könnten als nicht erfolgreiche Versuche zum Aufbau

einer morphologischen Resistenz durch antagonistisches Zusammenleben der Organismen gedeutet werden. Auch in der Natur leben *C. wailesii* und *L. coscinodisci* zusammen, sodass es sich durch die Co-Evolution der Organismen zur Entwicklung eine erfolgreiche morphologische Verteidigung der Mikroalge gegen den Parasitoiden entwickelt hat.

Durch die Wahl des experimentellen Ansatzes können wie bereits diskutiert nicht alle chemischen Substanzklassen erfasst werden und zusätzlich wird durch die Fokussierung auf das (Endo-)Metabolom ein gewisser Informationsverlust in Kauf genommen. Dadurch, dass also nur ein unvollständiger Teil des Gesamtbildes betrachtet werden kann, können wichtige mit der Resistenz in Verbindung stehende Vorgänge und Substanzen nicht detektiert werden. Besonders auch die Messung der flüchtigen Metabolite aus dem Exometabolom von Cos5, die scheinbar nur in der behandelten Kultur auftraten, kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass mögliche für die Verteidigungsstrategie wichtige chemische Substanzen nicht detektiert wurden.

Die Verteidigung gegen Oomyceten-Parasiten bei Landpflanzen wird beispielsweise vielfach über Protein-Rezeptoren ausgelöst<sup>[56]</sup> und auch für *C. wailesii* wird vermutet, dass die Verteidigung gegen den Parasitoiden auf dem Gen-für-Gen-Konzept beruht.<sup>[55]</sup> In diesem Konzept weist ein Wirt Gene auf, die für einen Rezeptor kodieren, der Signalstoffe binden kann, die das Produkt bestimmter Gene im Parasitoiden sind. Die die Resistenz verursachenden Gene des Wirts können über sexuelle Reproduktion weiter gegeben werden und so für die Resistenz der gesamten Gemeinschaft sorgen. Diese Art der Verteidigung kann mit dem gewählten Ansatz für *C. wailesii* nicht überprüft werden, da die Rezeptoren in eine Substanzklasse fallen, die nicht mit der gewählten analytischen Methode messbar ist. Diese zweite Hypothese für die Verteidigungsstrategie von Cos5 wird zusätzlich dadurch gestützt, dass bei dem Isolat von 2016 nach einer Langzeit-Kultivierung der Mikroalge und des Parasitoiden auch die Entwicklung einer Resistenz festgestellt wurde, nachdem die Alge eine Phase der sexuellen Reproduktion durchlief, <sup>[55]</sup> in der das für die Resistenz verantwortliche Gen in den Mikroalgen weiter gegeben wurde.

Um die beiden vorgestellten Hypothesen für die Ursache der Diatomeen-Art Coscinodiscus wailesii gegen Lagensima coscinodisci als Oomycet-Parasitoiden zu prüfen, müssen Versuche mit andern experimentellen Ansätzen durchgeführt werden. Für die Gen-für-Gen-Resistenz könnte beispielsweise eine Sequenzierung des Genoms der verschiedenen C. wailesii Isolate und des Parasitoiden hilfreich sein.

### 4.3 Bedeutung der signifikant veränderten Features bei Coscinodiscus radiatus

Ähnlich wie bei Cos5 wurde auch in  $Coscinodiscus\ radiatus\ (Cos43)$  keine Infektion mit dem Parasitoiden in den Kultivierungsexperimenten beobachtet. Im Unterschied zu C. wailesii konnte jedoch eine signifikante Abnahme des Zellwachstums in Gegenwart von L.

coscinodisci festgestellt werden und auch im Vergleich der metabolomischen Daten für die behandelten und unbehandelten Kulturen wurden signifikant veränderte Features ermittelt. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass es durch den Parasitoiden zu einer induzierten Reaktion in Cos43 kommt, die zu deutlichen Veränderungen im Metabolom des Mikroorganismus führt. Die Reaktion scheint jedoch mit Kosten für die Mikoalge verbunden zu sein, die sich in verringertem Wachstum der Kulturen niederschlagen. Da die Mikroalge gegen den Parasitoiden resistent ist und die Reaktion nur in Gegenwart von L. coscinodisci beobachtet wurde, kann die Reaktion mit der Verteidigung in Zusammenhang stehen und damit die Resistenz der Mikroalge verursachen. Es kann allerdings ebenfalls sein, dass die Reaktion zwar von dem Parasitoiden verursacht wird, jedoch keine Verteidigungsreaktion darstellt und damit nicht die Resistenz bedingt.

Unter den 77 signifikant veränderten Features von Cos43 bei Behandlung mit dem Parasitoiden konnten verschiedene Lipide identifiziert werden. Bei mehreren Features, bei denen eine Strukturformel identifiziert werden konnte, handelt es sich um Sterol-ähnliche Substanzen mit einem Steran-Grundgerüst. Es wurden bereits viele Sterole mit einer hohen strukturellen Vielfalt in Mikroalgen gefunden werden, [57] die in den Mikroorganismen eine essentielle Komponente der Zellmembran bilden. Weiter spielen Sterole eine Rolle bei der Modulation von membran-gebundenen Protein und auch der Signalübertragung. [58] Der Sterol-Gehalt in Diatomeen verändert sich abhängig von abiotischen Faktoren wie der Temperatur und dem Salzgehalt<sup>[58]</sup> und ebenfalls von der Wachstumsphase, in der sich eine Mikroalgenkultur befindet.<sup>[41]</sup> Aus dem Metabolom-Vergleich der behandelten und unbehandelten Kulturen ging hervor, dass viele der Steran-Features in den behandelten Kulturen herunter reguliert wurden. In Zusammenhang mit der verringerten Wachstumsrate könnte der verringerte Gehalt dieser Features z.B. dahingehend interpretiert werden, dass Ressourcen, die für den Aufbau der Zellmembran genutzt werden, in Gegenwart des Parasitoiden durch einen veränderten metabolomischen Weg für die Verteidigung verwendet werden und deshalb nicht mehr für das Zellwachstum zur Verfügung stehen. Die Frage, die sich hieraus ergibt, wie sich der Stoffwechselweg verändert und wie die Verteidigung gegen den Parasitoiden abläuft.

Bei einem der auch durch MS/MS-Daten verifizierten Features, die bei der Behandlung mit L. coscinodisci signifikant mehr gebildet wurden, handelt es sich um Eicosapentansäure. Das Vorkommen dieser ungesättigte Fettsäure ist unter marinen Lebewesen weit verbreitet und Oxylipine, die sich aus der Eicosapentansäure ableiten, stehen unter anderem in Verbindung mit der Resistenz von einer Diatomeen-Spezies gegen ein algizides Bakterium. [59] Die verwundungs-aktiviert verstärkt gebildete Oxylipine werden dabei von der gegen das Bakterium resistenten Mikroalge an die Umgebung abgegeben und unter diesen hoch regulierten Oxylipinen konnten besonders solche identifiziert werden, die sich von der Eicosapentansöure ableiten. Es ist durchaus denkbar, dass die Verteidigungsreaktion von Diatomeen gegen Parasitoide und gegen Bakterien über ähnliche Strategien abläuft. Da

in dieser Arbeit nur das Endometabolom der Mikroalgen untersucht wurde, konnte nicht festgestellt werden, ob tatsächlich Oxylipine an das Medium abgegeben wurden. Aber es erscheint prinzipiell möglich, dass die Eicosapentansäure als Vorläufer-Verbindung der Oxylipine im Endometabolom der Mikroalge bei einer induzierten Verteidigungsreaktion hochreguliert wird, um über nachfolgende Oxidationswege als Oxylipine an die Umgebung abgegeben zu werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, könnten die Exometabolom-Proben von *C. radiatus*, die im Rahmen dieser Arbeit zwar extrahiert wurden, jedoch nicht analysiert wurden, analog zu der Analyse des Endometaboloms mittels UHPLC-HR-MS untersucht werden.

Ebenfalls in den mit dem Parasitoiden behandelten Gruppen wurde ein Feature erhöht, dass als Carotinoid eingeordnet wurde. Carotinoide sind lipophile Substanzen mit einem Polyen-System, die in den meisten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen vorkommen und dort das Spektrum des Lichts, das für Photosynthese genutzt wird, vergrößern. Außerdem schützen die Carotinoide den Organismus vor Schäden durch das UV-Licht und wirken als Antioxidtant. Unter abiotischen Stressbedingungen wie beispielsweise Nährstoffmangel wird die Produktion von Carotinoiden erhöht. [60] Grund dafür ist, dass mehr des Antioxidantes benötigt wird, um Schäden der Mikroalge von den unter Stress vermehrt entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu vermeiden. [61] ROS haben die Funktion Signale in zellulären Prozessen weiter zu geben, jedoch können sie auch Schäden z.B. an Lipiden aus der Zellmembran oder auch der DNA verursachen, weshalb der Gehalt von ROS durch verschiedene Antioxidantien wie auch Carotinoiden kontrolliert wird. Es könnte also sein, dass die Reaktion induziert durch den Parasitoiden ähnlich wie auch bei der Reaktion auf abiotischen Stress eine vermehrte Produktion von ROS auslöst.

Neben den Sterol-ähnlichen Features, dem Carotinoid und Eicosapentansäure wurden zwei weitere Features im Metabolom von Cos43 signifikant verändert, für die eine Carnitin-Struktur vorgeschlagen wurde. Aus der Auswertung der MS/MS-Daten mit Sirius wurden die Strukturen als Propionylcarnitin und Methylbutyrylcarnitin bestätigt. Das zwitterionische Carnitin steht in Säugetieren und auch in Pflanzen mit dem Fettsäuremetabolismus in Verbindung bezüglich der β-Oxidation der Fettsäuren.<sup>[62]</sup> Die β-Oxidation wird unter anderem für die Biosynthese von Oxylipinen und von Jasmonaten benötigt. Eine Mutation, die die β-Oxidation hemmt, sorge z.B. in Tomatenpflanzen dafür, dass der verwundungsaktivierte Signalweg der Pflanzen gestört wird. [63] Für kurzkettige Carnitine wie auch Methylbutyrylcarnitin und Propionylcarnitin wurde außerdem bei der Diatomeen-Spezies Phaeodactylum tricornutum eine Anreicherung unter N-limitierten Bedingungen beobachtet und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Glycinbetain kann vermutet werden, dass die Carnitine, ähnlich wie das Betain als Osmolyt wirken könnte. [64] Osmolyte haben in Mikroalgen vor allem eine Schutzfunktion bei hohen Salzgehalten. Von den beiden Caritin-Features wurde Propionylcarnitin bei der Behandlung mit dem Parasitoiden signifikant erhöht, während Metyhlbutyrylcarnitin verringert wurde. Daraus stellt sich die Frage,

inwiefern sich die Funktionen der unterschiedlichen Carnitine unterscheiden könnte. Zusammenfassend konnten viele der signifikant veränderten Features als Lipide klassifiziert werden (Sterol-ähnliche Feature, Eicosapentansäure, Carotinoid) oder mit dem Lipid-Metabolismus in Verbindung gebracht werden (Carnitine zur β-Oxidationen von Fettsäuren). Daraus kann abgeleitet werden, dass die Reaktion von Coscinodiscus radiatus in Gegenwart des Parasitoiden vor allem im Lipid-Metabolismus für Änderungen sorgt. Für nachfolgende Untersuchungen könnte zum einen die Identität der bereits gemessenen Features z.B. durch einen Messung eines analytischen Standards verifiziert werden und zum anderen könnte auch die Funktion der potentiellen Metabolite genauer untersucht werden. Zur weiteren Untersuchung darauf, ob bei der Behandlung mit dem Parasitoiden Oxylipine z.B. aus der Eicosapentansäure gebildet werden, könnte sich eine GC-MS-Analyse des Endometaboloms eignen, da beispielsweise auch die verwundungs-aktiviert freigesetzten poly-ungesättigten Fettsäuren als Oxylipine teilweise flüchtig sind und durch die durchgeführten Flüssig-Extraktion somit nicht messbar gewesen sein könnten.

### 4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Isolate von Coscinodiscus granii

Die beiden Isolate Cos20 und Cos37 zeigten eine (signifikante) Abnahme der meisten Features von den unbehandelten zu den mit dem Parasitoid behandelten Proben, da diese beiden Mikroalgen als empfindlich für Lagensima coscinodisci erwiesen und die abgestorben Mikroalgen keinen Stoffwechsel mehr betreiben, durch den die Metabolite gebildet werden. Folglich ergab sich auch ein signifikanter Unterschied der Metabolome, der auch im Score Plot der PCA durch eine Trennung der Konfidenzintervalle zu erkennen war. Während jedoch bei Cos20 keine in der mit dem Parasitoiden behandelten Probengruppen signifikant erhöhten Features identifiziert wurden, wurden in Cos37 fünf solcher nur in diesem Isolat von C. granii auftretende Features gefunden. Auch dies weist darauf hin, dass es intraspezifische Unterschiede in der Reaktion der Mikroalgen auf den Parasitoiden gibt. Unter der Annahme, dass es sich bei den Features nicht um Artefakte aus der MS-Messung handelt, könnten diese Features potentielle Metabolite darstellen, die in Cos37 in einer durch den Parasitoiden induzierten (Verteidigungs-)Reaktion gebildet werden, die allerdings nicht zur Resistenz gegen den Parasitoiden führte.

Die Infektion von Coscinodiscus granii mit Lagenisma coscinodisci wurde bereits auf einer metabolomischen Ebene untersucht und dabei wurde herausgefunden, dass der Parasitoid die Stoffwechselwege seines Wirts manipuliert und dadurch die Infektion begünstigt. [Vallet 2018] Zu den Metaboliten, die bei einer Infektion gebildet werden gehört 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure (4-CTC), das das Wachstum von C. granii hemmen und den Erfolg der Infektion steigern kann. [15] Das  $\beta$ -Carbolin wurde nur in den Proben von Cos 20 detektiert und war dort signifikant erhöht. Das Fehlen des Me-

taboliten in Cos37 könnte auf eine zu geringe Konzentration der Substanz in der Probe zurückzuführen sein, da sich die Substanz vor allem in der späten Phase der Infektion bei Bildung der Sporangien in den Mikroalgen akummuliert. In diesem Fall wäre in Cos37 zum Zeitpunkt der Extraktion weniger Sporangien in der späten Phase der Infektion gewesen als in Cos20. Um zu überprüfen, ob 4-CTC während der Infektion des Isolats Cos37 gebildet wird, könnten die beiden Isolate von C. granii mit einem gezielten metabolomischen Versuchsansatz quantitativ auf die Substanz während der Infektion analysiert werden. Dabei könnte das  $\beta$ -Carbolin außerdem auch in den verschiedenen Stadien der Infektion z.B. über Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden könnte. Sollte sich herausstellen, dass 4-CTC nicht in Cos37 während der Infektion gebildet wird, könnte dies die Hypothese einer Verteidigungsreaktion von Cos37 stützen, die zwar Cos37 nicht vor einer Infektion mit dem Parasitoiden schützt, aber die Übernahme der Stoffwechselwege durch L. coscinodisci zumindest teilweise verhindert. Um Cos20 und Cos37 weiter mit den Literaturdaten vergleichen zu können, könnte eine erneute Messung der Proben notwendig sein, da die in dieser Arbeit detektierte Featurezahl (941 bzw. 1176) weit unter der Anzahl der Features liegt, die in der Literatur bei der Untersuchung des Metaboloms von C. granii detektiert wurden  $(2601^{[15]})$ .

Von den übrigen literatur-bekannten Substanzen, die sich bei der Infektion von *C. granii* erhöhen, wurden vor allem verschiedene Lysophosphatidylcholine in den Proben aus dieser Arbeit detektiert. Lysophosphatidylcholine kommen in geringen Konzentrationen in vielen biologischen Membranen vor<sup>[65]</sup> und auch an der Lipid-Zusammensetzung in Diatomeen haben sie einen kleineren Anteil<sup>[66]</sup>. <sup>[67]</sup> Sie wirken als Detergenzien und können dadurch Zellmembranen auflösen, gleichzeitig konnte jedoch auch eine entzündungshemmende Eigenschaften von Lysophosphatidylcholinen nachgewiesen werden. <sup>[67]</sup> Die Funktion der bei der Infektion herauf regulierten Lysophosphatidylcholinen für die Mikroalge und den Parasitoiden ist noch nicht eindeutig geklärt. In weiterführenden Experimenten könnte dies untersucht werden.

### 4.5 Semi-Resistenz und induziertes Priming von Ceratium sp.

In den Co-Kultivierungsexperimenten von der Dinofalgellaten-Spezies Ceratium sp. wurde die Infektion der Mikroalge festgestellt, jedoch erreichte die Infektion auch nach 14-tägiger Wachstumsphase nicht die letzte Phase der Infektion und folglich wurde die Mikroalge für diese Arbeit als semi-resistent klassifiziert. Auch in anderen Mikroalgen wurde ein solches als semi-Resistenz bezeichnetes Verhalten gegenüber verschiedenen Isolaten von Parvilucifera rostrata sichtbar. Von der Mikroalge Alexandrium minutum war bereits bekannt, dass diese für den Parasitoiden empfindlich ist, und deshalb wurde diese Art genutzt, um zu verifizieren, dass Parvilucifera rostrata im Aufbau mit der Co-Kultivierungskammer in der Lage ist einen vollständigen Lebenszyklus bis zur Bildung und Freisetzung neuer

Zoosporen zu durchlaufen. Dahingegen wurde bei der Infektion von *Ceratium sp.* in keinem Fall ein Sporangium ausgebildet, der Parasitoid verblieb in der Phase, in der es sich von seinem Wirt ernährt (Trophont) und die Wirtszelle blieb am Leben.

Eine Hypothese dieser Arbeit war es, dass die Resistenz von Mikroalgen durch Priming-Effekte ausgelöst wird. Bei der marinen Markoalge Pyropia haitanensis wird beispielsweise induziertes Priming in den Individuen der Algengemeinschaft festgestellt, das über ein exometabolomische Oxilipin vermittelt wird, welches einzelne Algen als Antwort auf externen Stimuli verstärkt produzieren und an die Umgebung abgeben.<sup>[30]</sup> In den Algen, die dem Oxilipin ausgesetzt werden, kommt es zu signifikante Änderungen des Metaboloms, die die Alge in einen verteidigungsbereiten Zustand versetzt. Bei Ceratium sp. als semi-resistente Mikroalge wurde die Hypothese des Primings geprüft, da die Infektion mit dem Parasitoiden einen möglichen Stimulus für das Priming darstellte und im Gegensatz zu den empfindlichen Mikroalgen Cos20 und Cos37 nicht eine vollständige Infektion der Algen mit dem Parasitoiden über den Kultivierungszeitraum hinweg beobachtet wurde. Im Co-Kultivierungsexperiment von Ceratium sp. wurden weder signifikante Unterschiede bezüglich des Wachstums zwischen der infizierten, der unbehandelten und der möglicherweise durch eine benachbarte infizierte Kultur induzierten Kultur festgestellt, noch wurden zwischen diesen Probengruppen signifikant veränderte Features in den Metabolom-Daten der Mikroalgen aufgefunden. Dies legte den Schluss nah, dass es bei der Mikroalge durch die Infektion von P. rostrata wahrscheinlich nicht zu Priming in einer benachbarten Kultur kommt.

Es wurden während der Datenauswertung viele Features mit Halogenen in der Summenformel registriert, die sich allerdings nicht auf eine Probengruppe beschränkten, sondern in allen Probengruppen auftraten. Die Produktion von verschiedensten halogenierten Strukturen von Mikroalgen ist bereits bekannt und bei manchen Mikroalgen konnte beispielsweise auch eine Abhängigkeit der Bromierungsaktivität von der Strahlung des Lichtes nachgewiesen werden. [69] Bei der braunen Makroalge E ctocarpus siliculosus wird außerdem durch die Infektion mit einem Parasiten der Halogen-Metabolismus angestoßen und es werden halogenierte Metabolite in der infizierten Alge produziert.<sup>[70]</sup> Es wurde in den Experimenten dieser Arbeit zwar keine in den parasitoid-behandelten Proben von Ceratium sp. signifikant erhöhten halogen-haltigen Features ermittelt, die auf eine Anregung des Halogen-Metabolismus hindeuteten, jedoch könnte das Vorhandensein der halogenierten Features in den parasitoid-behandelten, den unbehandelten und den als induzierten bezeichneten Proben darauf hinweisen, dass der Halogen-Metabolismus von Ceratium sp. permanent aktiv ist und dadurch eine permanente Form der Semi-Resistenz verursacht. Dafür spricht auch, dass keine Veränderung bezüglich des Wachstums der Mikroalge bei der Infektion mit P. rostrata festgestellt wurden, was bei induzierten Verteidigungsreaktionen häufig vorkommt. [18] Ein möglicher Zusammenhang von halogenierten Metaboliten und der Verteidigung von Mikroalgen gegen Parasitoide könnte eine zu

prüfende Hypothese für nachfolgende Experimente mit Ceratium sp. und auch anderen Mikroalgen darstellen. Möglich wäre es beispielsweise die für P. rostrata empfindliche Dinofalgellat-Spezies Alexandrium minutum mit Extrakten von Ceratium sp., die die halogenierten Verbindungen enthalten, zu behandeln um dadurch zu prüfen, ob die Infektion wie bei der semi-resistenten Spezies Ceratium sp. vor der Bildung eines Sporangiums stoppt.

# 4.6 Bedeutung der Phytohormone bei der Verteidigungreaktion von Mikroalgen

Phytohormone wie Salicylsäure und Jasmonsäure bilden einen Teil der Signalewege, über die in vielen Landpflanzen die Antwortreaktion auf Stresssituationen reguliert wird. Dabei vermitteln die Hormone nicht nur die Antwort auf abiotischen Stress, wie beispielsweise Trockenheit oder Temperatur, [71] sondern auch auf biotischen Stress z.B. durch Pathogene oder Herbivoren. [72] Auch in vielen Mikro- und Makroalgen wurde das Vorhandensein von Phytohormonen bestätigt [73] und bei der Verteidigungsinduktion einer Makroalge durch Priming wird unter anderem eine signifikante Erhöhung von Methyljasmonat festgestellt. [30] Allerdings ist nicht eindeutig, ob die Phytohormone bei der Makroalge wie bei den Landpflanzen die Verteidigungsreaktion vermitteln oder andere Funktionen haben. In den Untersuchungen hier wurden ebenfalls in einigen Mikroalgen Features gefunden, die als Phytohormone identifiziert wurden, eine weitere Verifikation durch die Co-Injektion mit einem Standard wäre in einem nächsten Untersuchungsschritt noch notwendig. Es wurde in den meisten Fällen kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt der Phytohormone und der Behandlung mit dem Parasitoiden aufgefunden.

In der resistenten Mikroalge Coscinodiscus radiatus wurde eine signifikante Änderung des als Methyljasmonat identifizierten Features in Gegenwart von L. coscinodisci festgestellt, sodass ein Bezug des Phytohormons zur Reaktion der Mikroalge auf den Parasitoiden hergestellt werde konnte. Im Gegensatz zu der Reaktion in Pflanzen, bei der die Konzentration der Phytohormone als Antwort auf einen äußeren Reiz steigt, [71] kam es bei C. radiatus zu einer Abnahme des Methyljasmonat-Gehaltes im Endometabolom der Mikroalge bei der Behandlung mit L. coscinodisci. Dies deutete darauf hin, dass die Funktion des Phytohormons in der Mikroalge nicht wie bei Pflanzen in der Aktivierung und Vermittlung von Verteidigungsreaktionen besteht. Wahrscheinlicher ist es, dass Methyljasmonat im Zuge der veränderten Stoffwechselwege, die auch zu den signifikant veränderten Features im Endometabolom der parasitoid-behandelten Mikroalge führt, entweder abgebaut wird, um verteidigungsrelevante Metabolite herzustellen oder einfach keine Produktion des Phytohormons mehr statt findet. Um die genaue Aufgabe und Bedeutung von Metyhljasmonat für die Resistenz von Coscinodiscus radiatus zu klären, sind weitere Experimente erforderlich, nachdem die Identität des Feature z.B. durch Co-Injektion mit einem Standard verifiziert

#### wurde.

In der empfindlichen Spezies C. granii (Cos37) wurde ein zur Summenformel von Jasmonsäure passendes Feature bei Behandlung der Mikroalge mit dem Parasitoiden signifikant verringert, was für viele der Features aus dem Endometabolom bei dieser Mikroalge beobachtet wurde. Dementsprechend wurde kein Zusammenhang zwischen dem Phytohormon und der Infektion angenommen und auch für Salicylsäure wurde eine Beziehung des Gehalts zur Infektion zurückgewiesen, da die Signifikanz zwischen behandelter und unbehandelter Probengruppe aufgrund eines Ausreißers entstand und somit angezweifelt werden musst. Abschließend konnte aus den hier durchgeführten Experimenten geschlossen werden, dass die Phytohormone mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit der Vermittlung der Verteidigungsreaktion in Verbindung standen, allerdings konnte eine mögliche Bedeutung von vor allem Methyljasmonat für die Resistenz der Diatomeen-Arten gegen Lagensima coscinodisci nicht vollständig abgelehnt werden, gerade im Hinblick darauf, dass dieses Phytohormon ausschließlich in den resistenten Arten aus der Gattung Coscinodiscus und in der resistenten Mikroalge Lithodesmium undulatum aufgefunden wurde. Eine weiterführende Untersuchung auf die Bedeutung von Phytohormonen bei der Verteidigung von Mikroalgen auf einen Parasitoiden könnte also interessante Parallelen zu der Verteidigung bei Landpflanzen aufdecken. Es könnte z.B. eine Wirkung auf die Infektion der Mikroalgen bei der Zugabe von Methyljasmonat in einem Bioassay geprüft werden, nachdem durch eine gezielte Extraktion die phisiologische Konzentration in den Mikroalgen bestimmt wurde.

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es die Ursachen der Empfindlichkeit oder Resistenz einer Reihe von verschiedenen Mikroalgen gegenüber einem Parasitoiden zu untersuchen. Durch die Behandlung und Kultivierung von Mikroalgen-Kulturen mit dem Parasitoiden und der anschließenden mikroskopischen Beobachtung konnten die Diatomeen-Spezies *Lithodesmium undulatum, Odontella sinensis, Coscinodiscus wailesii* und *Coscinodiscus radiatus* als resistent gegen den *Lagenisma coscinodisci* identifiziert werden. Dahingegen erwiesen sich zwei Isolate von *Coscinodisci granii* (Cos20 und Cos37) als empfindlich für den Oomyceten-Parasitoiden. In einem zweiten Wirt-Parasitoid-System aus der Dinoflagellaten-Spezies *Ceratium sp.* und dem Parasitoiden *Parvilucifera rostrata* konnte eine Semi-Resistenz der Mikroalge festgestellt werden, bei der es zwar zu Infektion kam, der Parasitoid jedoch kein vollständigen Lebenszyklus bis zur Bildung neuer Zoosporen durchlief.

Bei der Untersuchung der Endometabolome der Mikroalgen wurden unter anderem Eicosapentansäure als Ausgangsverbindung von Oxylipinen, die z.B. in der Verteidigung von Diatomeen-Mikroalgen gegen Fressfeinde eingesetzt werden, und mehrere andere Lipide signifikant in den parasitoid-behandelten Kulturen herauf bzw. herunter reguliert und es wurde eine signifikante Verringerung des Wachstums in Gegenwart des Parasitoiden festgestellt. Es wurde für *C. radiatus* darauf folgend eine Resistenz auf Basis von induzierten metabolomischen Veränderungen vermutet, die möglicherweise auf ähnlichen Strategien beruht wie die Verteidigung gegen Fressfeinde. Diese Hypothese muss durch nachfolgende Experimente bestätigt werden und auch der Mechanismus der Resistenz könnte untersucht werden.

Die Resistenz von O. sinensis und L. undulatum gegen L. conscinodisci wurden aufgrund keiner messbaren signifikanten metabolomischen Veränderungen und der Tatsache, dass L. coscinodisci als Parasitoid der Gattung Coscinodiscus bekannt ist, zu der Helg41 und Helg52 nicht gehören, auf die Selektivität der Zoosporen des Parasitoiden für seine Wirtszellen zurückgeführt.

Für eine chemische induzierte Resistenz der Mikroalge *C. wailesii* wurden in der metabolomischen Untersuchung der Mikoalge keine Hinweise gefunden und auch eine auf die Zoosporen schädlich oder abhaltende Wirkung des Exometaboloms wurde nicht festgestellt, sodass für diese Diatomeen-Spezies zwei neue mögliche Hypothesen zur Ursache der Resistenz aufgestellt wurden: erstens eine morphologische Ursache und zweitens eine über Protein-Rezeptor vermittelte Verteidigung die auf einer Gen-für-Gen-Resistenz basiert. Beiden Hypothesen könnten in Experimenten mit anderen methodischen Ansätzen überprüft werden.

In einer der beiden empfindlichen Isolate von *C. granii* (Cos37) wurden einige Features identifiziert, die in den parasitoid-behandelten Kulturen signifikant erhöht waren und nicht in den Metabolom-Daten des zweiten Isolates von *C. granii* auftraten. Auch wur-

den Unterschiede zwischen der Regulation von literaturbekannten Metaboliten bei der Infektion mit  $L.\ coscinodisci$  und den Features, die diesen Metaboliten ensprachen, bei Cos37 festgestellt. Die Reaktion der empfindlichen Mikroalgen  $C.\ granii$  auf eine Infektion mit dem Parasitoiden unterschied sich also je nach Isolat. Dies könnte möglicherweise durch unterschiedliche evolutionäre Entwicklungen derselben Spezies verursacht werden, die durch das antagonistische Zusammenleben der Mikroalge mit dem Parasitoiden in der Natur angetrieben werden könnte.

In der Co-Kultivierung der semi-resistenten Dinofagellat-Spezies Ceratium sp. wurden keine induzierenden Effekte von einer infizierten Kultur auf eine nicht parasitoid-behandelte Kultur bezüglich des Wachstums der Zellen oder einer signifikanten Änderung im Metabolom der Mikroalge beobachtet, sodass die Hypothese einer durch Priming induzierten Verteidigung für die Dinofalgellat-Spezies nicht verifiziert werden konnte. Eine mögliche permanente Verteidigung der semi-resistenten Mikroalge könnte im Zusammenhang mit halogenierten Metaboliten stehen, was eine neue zukünfig zu prüfende Hypothese darstellen könnte.

Zwar wurden in einigen der Mikroalgen Features detektiert, die mit der Summenformel der Phytohormone übereinstimmen, jedoch legten die Änderungen dieser Features nicht nah, dass die Verbindungen eine regulatorische Funktion in der Reaktion auf den Parasitoiden der jeweiligen Mikroalge hatten. Dennoch könnte vor allem das Phytohormon Methyljasmonat eine Bedeutung für die Resistenz der Diatomeen gegen *L. coscinodiscui* haben, die in nachfolgenden Experimenten geprüft werden könnte.

#### Literaturverzeichnis

- [1] R. L. Chapman, Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 2013, 18, 5–12, DOI 10.1007/s11027-010-9255-9.
- [2] C. Bowler, A. De Martino, A. Falciatore, Current Opinion in Plant Biology 2010, 13, 623-630,DOI https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.014.
- [3] F. M. Van Dolah, Environmental health perspectives 2000, 108 Suppl 1, 133-141, DOI 10.1289/ ehp.00108s1133.
- [4] M. Valiadi, D. Iglesias-Rodriguez, *Microorganisms* 2013, 1, 3–25, DOI 10.3390/microorganisms1010003.
- [5] I. Bravo, R. I. Figueroa, *Microorganisms* **2014**, 2, 11–32, DOI 10.3390/microorganisms2010011.
- [6] D. M. Anderson, T. J. Alpermann, A. D. Cembella, Y. Collos, E. Masseret u. a., Harmful algae 2012, 14, 10–35, DOI 10.1016/j.hal.2011.10.012.
- [7] M. Svendsen, N. Andersen, P. Hansen, J. Steffensen, Fishes 2018, 3, DOI 10.3390/fishes3010011.
- [8] J. Heisler, P. Glibert, J. Burkholder, D. Anderson, W. Cochlan u. a., Harmful algae 2008, 8, 3–13, DOI 10.1016/j.hal.2008.08.006.
- [9] C. J. Gobler, O. M. Doherty, T. K. Hattenrath-Lehmann, A. W. Griffith, Y. Kang u. a., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 4975, DOI 10.1073/pnas.1619575114.
- [10] G. M. Hallegraeff, Journal of Phycology 2010, 46, 220–235, DOI 10.1111/j.1529-8817.2010. 00815.x.
- [11] G. M. Hallegraeff, Marine Ecology Progress Series 1998, 168, 297–309.
- [12] A. Chambouvet, P. Morin, D. Marie, L. Guillou, Science 2008, 322, 1254, DOI 10.1126/science. 1164387.
- [13] D. W. Coats, Journal of Eukaryotic Microbiology 1999, 46, 402–409, DOI 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04620.x.
- [14] E. Garces, E. Alacid, A. Rene, K. Petrou, R. Simo, ISME J 2013, 7, 1065-8, DOI 10.1038/ismej. 2012.173.
- [15] M. Vallet, T. U. H. Baumeister, F. Kaftan, V. Grabe, A. Buaya u. a., Nature Communications 2019, 10, 4938, DOI 10.1038/s41467-019-12908-w.
- [16] F. Blanquart, M. Valero, C. Alves-de-Souza, A. Dia, F. Lepelletier u. a., *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2016**, 283, 20161870, DOI doi:10.1098/rspb.2016.1870.
- [17] S. F. Kühn, Journal of Plankton Research 1998, 20, 443-454, DOI 10.1093/plankt/20.3.443.
- [18] M. Pančić, T. Kiørboe, Biological Reviews 2018, 93, 1269–1303, DOI 10.1111/brv.12395.
- [19] S. Rosenwasser, C. Ziv, S. G. v. Creveld, A. Vardi, Trends in Microbiology 2016, 24, 821–832, DOI 10.1016/j.tim.2016.06.006.
- [20] N. Meyer, G. Pohnert, Botanica Marina 2019, 62, 527, DOI https://doi.org/10.1515/bot-2019-0007.
- [21] M. R. Seyedsayamdost, G. Carr, R. Kolter, J. Clardy, Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 18343–18349, DOI 10.1021/ja207172s.
- [22] L. Friedrichs, M. Hörnig, L. Schulze, A. Bertram, S. Jansen u. a., *Marine Ecology Progress Series* **2013**, 481, 41–51, DOI 10.3354/meps10227.

- [23] G. B. Toth, F. Norén, E. Selander, H. Pavia, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **2004**, *271*, 733–738, DOI 10.1098/rspb.2003.2654.
- [24] E. L. Harvey, S. Menden-Deuer, *PLoS One* **2012**, 7, e46438, DOI 10.1371/journal.pone.0046438.
- [25] E. Selander, P. Thor, G. Toth, H. Pavia, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2006**, *273*, 1673–1680, DOI 10.1098/rspb.2006.3502.
- [26] G. Pohnert, Angewandte Chemie International Edition 2000, 39, 4352-4354, DOI 10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4352::AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U.
- [27] A. Ianora, A. Miralto, S. A. Poulet, Y. Carotenuto, I. Buttino u. a., Nature 2004, 429, 403–407, DOI 10.1038/nature02526.
- [28] J. Engelberth, H. T. Alborn, E. A. Schmelz, J. H. Tumlinson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 1781, DOI 10.1073/pnas.0308037100.
- [29] A. Kessler, R. Halitschke, C. Diezel, I. T. Baldwin, Oecologia 2006, 148, 280–292, DOI 10.1007/ s00442-006-0365-8.
- [30] H. Chen, R. Yang, J. Chen, Q. Luo, X. Cui u. a., BMC Plant Biol 2019, 19, 37, DOI 10.1186/ s12870-019-1642-0.
- [31] G.-i. Arimura, C. Kost, W. Boland, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids 2005, 1734, 91–111, DOI https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.03.001.
- [32] G. A. Nevitt, R. R. Veit, P. Kareiva, Nature 1995, 376, 680-682, DOI 10.1038/376680ao.
- [33] S. Rosenwasser, M. A. Mausz, D. Schatz, U. Sheyn, S. Malitsky u. a., The Plant cell 2014, 26, 2689–2707, DOI 10.1105/tpc.114.125641.
- [34] J. Gillard, J. Frenkel, V. Devos, K. Sabbe, C. Paul u. a., Angewandte Chemie International Edition 2013, 52, 854–857, DOI 10.1002/anie.201208175.
- [35] Thermo Fisher Scientific DE, Untargeted Metabolomics Workflows, https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-applications-area/metabolomics-mass-spectrometry/metabolomics-workflows/untargeted-metabolomics-workflows.html, [Online; besucht 05-05-2020].
- [36] L. W. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. H. Beale, R. Beger u. a., Metabolomics 2007, 3, 211–221, DOI 10.1007/s11306-007-0082-2.
- [37] R. Chaleckis, I. Meister, P. Zhang, C. E. Wheelock, Current Opinion in Biotechnology 2019, 55, 44–50, DOI https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.010.
- [38] J. Chong, D. S. Wishart, J. Xia, Current Protocols in Bioinformatics 2019, 68, e86, DOI 10.1002/cpbi.86.
- [39] A. Gujar, T. Anderson, D. Cavagnino, A. Patel, Comparative analysis of mass spectral matching for confident compound identification using the Advanced Electron Ionization source for GC-MS, https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-10598-gc-ms-mass-spectral-matching-tn10598-en.pdf, [Online; besucht 21-07-2020].
- [40] X. Duportet, R. B. M. Aggio, S. Carneiro, S. G. Villas-Bôas, Metabolomics 2012, 8, 410–421, DOI 10.1007/s11306-011-0324-1.
- [41] M. P. Mansour, J. K. Volkman, S. I. Blackburn, Phytochemistry 2003, 63, 145–153, DOI https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00052-9.

- [42] C. Sauerschnig, M. Doppler, C. Bueschl, R. Schuhmacher, Metabolites 2017, 8, DOI 10.3390/ metabo8010001.
- [43] M. Katajamaa, M. Orešič, Journal of Chromatography A 2007, 1158, 318–328, DOI https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.021.
- [44] K. Ongena, C. Das, J. L. Smith, S. Gil, G. Johnston, J Vis Exp 2010, DOI 10.3791/2204.
- [45] C. Camacho-Fernández, D. Hervás, A. Rivas-Sendra, M. P. Marín, J. M. Seguí-Simarro, Plant methods 2018, 14, 30–30, DOI 10.1186/s13007-018-0297-4.
- [46] G. Pohnert, O. Lumineau, A. Cueff, S. Adolph, C. Cordevant u. a., *Marine Ecology Progress Series* **2002**, *245*, 33–45, DOI 10.3354/meps245033.
- [47] T. Wichard, S. A. Poulet, C. Halsband-Lenk, A. Albaina, R. Harris u. a., *Journal of Chemical Ecology* **2005**, *31*, 949–958, DOI 10.1007/s10886-005-3615-z.
- [48] I. Maier, G. Pohnert, S. Pantke-Böcker, W. Boland, Naturwissenschaften 1996, 83, 378–379, DOI 10.1007/BF01142004.
- [49] F. Rui, W. Boland, The Journal of Organic Chemistry 2010, 75, 3958–3964, DOI 10.1021/jo1004372.
- [50] I. Maier, C. Hertweck, W. Boland, The Biological Bulletin 2001, 201, 121–125, DOI 10.2307/ 1543327.
- [51] F. H. Gleason, O. Lilje, Fungal Ecology 2009, 2, 53-59, DOI https://doi.org/10.1016/j. funeco.2008.12.002.
- [52] V. Martin-Jézéquel, S. A. Poulet, R. P. Harris, J. Moal, J. F. Samain, Marine Ecology Progress Series 1988, 44, 303–313, DOI 10.3354/meps044303.
- [53] M. Thines, B. Nam, L. Nigrelli, G. Beakes, A. Kraberg, Mycological Progress 2015, 14, 75, DOI 10.1007/s11557-015-1099-y.
- [54] B. Scholz, L. Guillou, A. V. Marano, S. Neuhauser, B. K. Sullivan u. a., Fungal Ecology 2016, 19, 59–76, DOI 10.1016/j.funeco.2015.09.002.
- [55] A. Buaya, A. Kraberg, M. Thines, Helgoland Marine Research 2019, 73, 2, DOI 10.1186/s10152-019-0523-0.
- [56] H. S. Judelson, A. M. V. Ah-Fong, *Plant Physiology* **2019**, *179*, 1198, DOI 10.1104/pp.18.00979.
- [57] S. W. Rampen, B. A. Abbas, S. Schouten, J. S. Sinninghe Damste, Limnology and Oceanography 2010, 55, 91–105, DOI 10.4319/10.2010.55.1.0091.
- [58] A. C. Jaramillo-Madrid, J. Ashworth, P. J. Ralph, Journal of Marine Science and Engineering 2020, 8, DOI 10.3390/jmse8020085.
- [59] N. Meyer, J. Rettner, M. Werner, O. Werz, G. Pohnert, Mar Drugs 2018, 16, DOI 10.3390/ md16120486.
- [60] J. C. Varela, H. Pereira, M. Vila, R. León, Photosynthesis Research 2015, 125, 423–436, DOI 10.1007/s11120-015-0149-2.
- [61] M. Rezayian, V. Niknam, H. Ebrahimzadeh, Toxicology Reports 2019, 6, 1309-1313, DOI 10. 1016/j.toxrep.2019.10.001.
- [62] B. Bourdin, H. Adenier, Y. Perrin, *Plant Physiology and Biochemistry* **2007**, 45, 926–931, DOI https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.09.009.

- [63] C. Li, A. L. Schilmiller, G. Liu, G. I. Lee, S. Jayanty u. a., The Plant Cell 2005, 17, 971–986, DOI 10.1105/tpc.104.029108.
- [64] J. Popko, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Ischebeck, T. Iven u. a., PLOS ONE 2016, 11, e0164673, DOI 10.1371/journal.pone.0164673.
- [65] H. U. Weltzien, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Biomembranes 1979, 559, 259–287, DOI 10.1016/0304-4157(79)90004-2.
- [66] G.-Q. Chen, Y. Jiang, F. Chen, Food Chemistry 2007, 104, 1580-1585, DOI https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2007.03.008.
- [67] C. Lauritano, K. Helland, G. Riccio, J. H. Andersen, A. Ianora u. a., Mar Drugs 2020, 18, DOI 10.3390/md18030166.
- [68] F. Lepelletier, S. A. Karpov, S. Le Panse, E. Bigeard, A. Skovgaard u. a., Protist 2014, 165, 31–49, DOI https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.09.005.
- [69] C. Hughes, S. Sun, Marine Chemistry 2016, 181, 1-9, DOI https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.02.003.
- [70] M. Strittmatter, L. J. Grenville-Briggs, L. Breithut, P. Van West, C. M. M. Gachon u. a., *Plant cell environment* **2016**, *39*, 259–271, DOI 10.1111/pce.12533.
- [71] S. H. Wani, V. Kumar, V. Shriram, S. K. Sah, The Crop Journal 2016, 4, 162–176, DOI 10.1016/j.cj.2016.01.010.
- [72] J. Lazebnik, E. Frago, M. Dicke, J. J. A. van Loon, Journal of Chemical Ecology 2014, 40, 730–741, DOI 10.1007/s10886-014-0480-7.
- [73] E. R. Tarakhovskaya, Y. I. Maslov, M. F. Shishova, Russian Journal of Plant Physiology 2007, 54, 163–170, DOI 10.1134/S1021443707020021.

### A Bildanhang

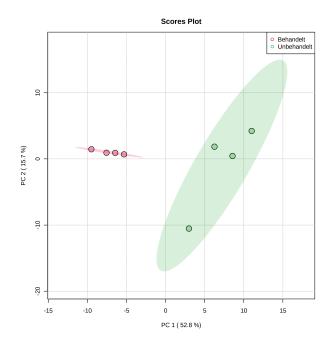


Abbildung A.1: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse des Endometaboloms von C. granii (Cos20) aus MetaboAnalyst. Die Punkte markieren die einzelnen Proben aus den unbehandelten Kulturen (grün) und aus den mit L. coscinodisci behandelten Kulturen (rot). Die farbigen Flächen markieren die 95%-Konfidenzintervalle der unbehandelten (grün) und parasitoidbehandelten (rot) Probengruppen.

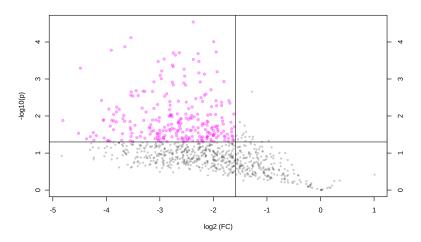


Abbildung A.2: Volcano-Plot der der Features aus der Analyse des Endometaboloms von C. granii (Cos20). Die Features wurden anhand ihrer Ergebnisse aus dem t-Test (y-Achse) und der Fold Change Analyse aufgetragen, wobei in pink solche Features markiert wurden, die sich im t-Test als signifikant erwiesen (P<0,05) in der Fold Change Analyse den Grenzwert von drei überschritten (d.h. die Peakfläche in einer der Probengruppe war mindesten drei-Mal so groß wie in der anderen Gruppe). Im negativen Bereich der x-Achse liegen die in den unbehandelten Proben erhöhte Features und im positiven Bereich der Achse solche, die in den parasitoid-behandelten Proben erhöht waren.

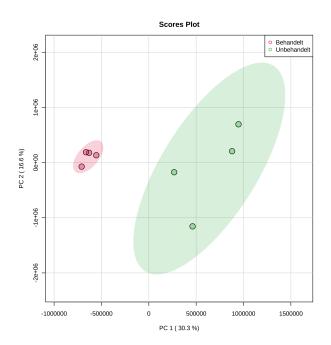
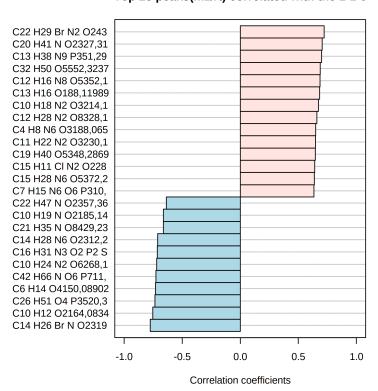


Abbildung A.3: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse des Endometaboloms von C. granii (Cos43) aus MetaboAnalyst. Die Punkte markieren die einzelnen Proben aus den unbehandelten Kulturen (grün) und aus den mit L. coscinodisci behandelten Kulturen (rot). Die farbigen Flächen markieren die 95%-Konfidenzintervalle der unbehandelten (grün) und parasitoidbehandelten (rot) Probengruppen.



Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-0

Abbildung A.4: Graphische Darstellung des Ergebnisses der Pattern Hunter Analyse von den Endometabolomproben Ceratium sp. aus MetaboAnalyst. Mit der Pattern Hunter Funktion wurde nach Features gesucht, deren Peakfläche in den parasitoid-behandelten und den möglicherweise induzierten Proben im Vergleich zu den Proben der unbehandelten Kontoll-Kulturen erhöht waren (Patter 1-1-0). Abgebildet sind die 25 Feature, die diese Muster am besten erfülen (gemessen an den Korrelation Koeffizienten, x-Achse), von denen 14 (rot) dem vorgegebenen Muster und elf dem gegenteiligen Muster (Pattern 0-0-1) entsprachen. Unter den Features befanden sich mehrere, die Halogen-Atome in der Summenformel aufwiesen.

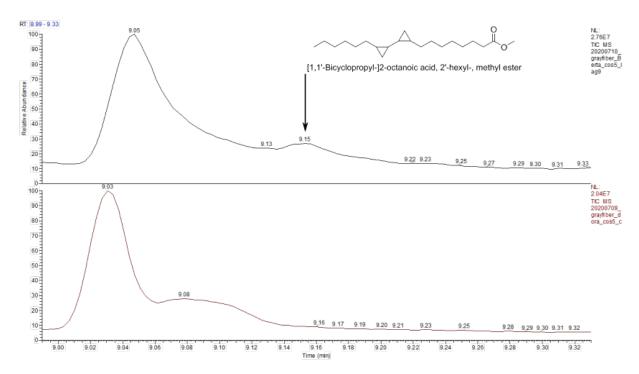


Abbildung A.5: Ausschnitt aus den Chromatogrammen der SPME-GC-MS-Analyse. Mit Pfeilen gekennzeichnet ist ein Peak, der nur im Spektrum der behandelten Probe auftritt. Der zugehörige Strukturvorschlag von NIST MS Search 2.2 erreichte einen Match-Faktor von 623 und wurde mit abgebildet. Oben: Coscinodiscus wailesii mit Lagenisma coscinodisci behandelt, unten: Coscinodiscus wailesii unbehandelt.

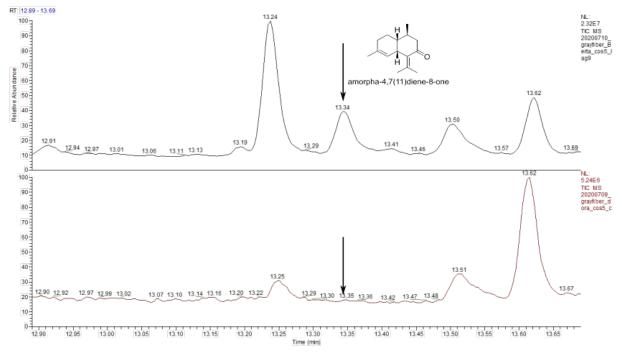


Abbildung A.6: Ausschnitt aus den Chromatogrammen der SPME-GC-MS-Analyse. Mit Pfeilen gekennzeichnet ist ein Peak, der nur im Spektrum der behandelten Probe auftritt. Der zugehörige Strukturvorschlag von NIST MS Search 2.2 erreichte einen Match-Faktor von 765 und wurde mit abgebildet. Oben: Coscinodiscus wailesii mit Lagenisma coscinodisci behandelt, unten: Coscinodiscus wailesii unbehandelt.

# B Tabellenanhang

**Tabelle B.1:** Normalisierungsfaktoren für die Peakflächen aus *Compound Discoverer* auf Basis der Zelldichte am Ende der Kultivierungsphase für *Coscinodiscus granii* (Cos20).

$c_{End}$ [Zellen · ml <sup>-1</sup> ]	Faktor
49	4,41
59	3,66
37	5,84
19	11,37
216	1,00
164	1,32
180	1,20
192	1,13

**Tabelle B.2:** Normalisierungsfaktoren für die Peakflächen aus *Compound Discoverer* auf Basis der Zelldichte am Ende der Kultivierungsphase für *Coscinodiscus granii* (Cos37).

$c_{End}$ [Zellen · ml <sup>-1</sup> ]	Faktor
87	2,07
98	1,84
112	1,61
89	2,02
148	1,22
180	1,00
141	1,27
175	1,03

**Tabelle B.3:** Normalisierungsfaktoren für die Peakflächen aus *Compound Discoverer* auf Basis der Zelldichte am Ende der Kultivierungsphase für *Coscinodiscus radiatus* (Cos43).

$c_{End}$ [Zellen · ml <sup>-1</sup> ]	Faktor
157	1,51
177	1,34
198	1,20
184	1,29
218	1,09
237	1,00
205	1,16
235	1,01

**Tabelle B.4:** Normalisierungsfaktoren für die Peakflächen aus *Compound Discoverer* auf Basis der Zelldichte am Ende der Kultivierungsphase für *Lithodesmium undulatum* (Helg52).

$c_{End}$ [Zellen · ml <sup>-1</sup> ]	Faktor
10000	1,38
13750	1,00
3750	3,67
2500	5,50
2500	5,50
2500	5,50
5000	2,75
3750	3,67

Tabelle B.5: Aufgelistet wurden Features aus der Endometabolom-Analyse von *C. radiatus*, deren Peakflächen einen signifikanten Unterschied (P<0,05) zwischen den parasitoid-behandelten und den unbehandelten Proben im t-Test von *MetaboAnalyst* aufwiesen und für die von *Compound Discoverer* oder *Sirius* ein Strukturvorschlag generiert wurde.

Summenformel	$\Delta m$ [ppm]	$\begin{array}{c} \textbf{Retentions-} \\ \textbf{zeit} \\ [\min] \end{array}$	Strukturvorschlag
$C_{11}H_{16}O_2$	1,66	3,363	5-Pentylresorcinol
$C_{42}H_{60}N_6O_8$	-1,82	6,169	N-[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan- 2-yl]-3-[18-[3-[[1,3-dihydroxy-2- (hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]-3- oxopropyl]-7,12-diethyl-3,8,13,17- tetramethyl-4,11,21,22,23,24- hexahydroporphyrin-2-yl]propanamid
$C_{41}H_{72}NO_8P$	-2,31	9,877	$27\text{-Amino-}24\text{-hydroxy-}24\text{-oxido-}18\text{-oxo-}\\19,23,25\text{-trioxa-}24\Lambda^5\text{-phosphaheptacosa-}6,9\text{-dien-}21\text{-yl-}9,12,15\text{-octadecatrienoate}$
$C_{10}H_{12}O$	3,07	5,385	trans-Anethol
$C_{10}H_{20}N_2O_3$	1,32	2,888	Valylvaline
$C_{22}H_{28}O_3$	0,01	5,576	Norethisteron-acetat
$C_{38}H_{72}N_2O_12$	-0,28	12,213	Azithromycin
$C_{21}H_{32}O_3$	-0,35	10,272	17,20-Dihydroxypregn-4-en-3-on
$C_{40}H_{54}O_4$	0,40	9,794	3,3',4'-Trihydroxy-beta,beta-caroten-4-on
$C_{28}H_{46}O_3$	0,01	11,456	22,23-Dihydroxyergost-4-en-3-on
$C_{10}H_{19}NO_4$	1,29	1,464	Propionylcarnitin
$C_{15}H_{20}O_2$	1,03	5,396	Alantolacton
$C_{20}H_{30}O_2$	1,20	9,939	Eicosapentansäure
$C_{10}H_{13}NO_2$	2,01	4,082	Phenacetin
$C_{27}H_{36}O_3$	0,38	7,982	Quingestanol-acetat
$C_{35}H_{58}O_5$	-0,62	10,226	2-Hydroxy-3-[5-tetradecenoyloxy]propyl- 6,9,12,15-octadecatetraenoat
$C_{40}H_{54}O_4$	-1,07	8,710	3',6-Dihydroxy-7',8'-didehydro-5,6,7,8-tetrahydro-beta,beta-caroten-3,8-dion
$C_9H_{12}O_2$	2,16	5,416	(Dimethoxymethyl)benzol
$C_{18}H_{22}O$	0,96	$6,\!205$	3-Deoxyestron
$C_{10}H_{14}O_2$	1,98	5,998	Tert-butylhydroquinon
$C_{38}H_{62}N_2O_{12}$	0,49	9,537	11-[4-(Dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4-dihydroxy-10-methoxy-5,8,10,12,14-pentamethyl-6,15-dioxo-1-oxa-7-azacyclopentadec-13-yl] 2-(4-methoxyphenyl)acetat
$C_{11}H_{16}O_3$	1,45	3,755	Hexyl-2-furoat
$C_{22}H_{30}O_4$	-0,20	5,560	Canrenosäure
$C_{12}H_{23}NO_4$	0,49	2,919	2-Methylbutyrylcarnitine
$C_{17}H_{18}O_2$	1,06	6,763	Isoeugenyl-benzyl-ether

**Tabelle B.6:** Dargestellt wurden Ergebnisse aus der MS/MS-Spektren-Auswertung mit *Sirius* für ausgewählte signifikant veränderten Features aus den Endometabolom-Daten von *C. radiatus*. Angegeben wurden der CSI:Finger ID Score und der Similarity-Score aus *Sirius* als Kriterien für die Übereinstimmung der gemessenen Spektren mit Vergleichsspektren aus der Datenbank.

Summenformel	Strukturvorschlag	CSI FingerID Score	Similarity-Score
$C_{22}H_{30}O_4$	Canrenosäure	-153,948	$53,\!26$
$C_{18}H_{22}O$	3-Desoxyestron	-72,232	67,00
$C_{20}H_{30}O_2$	Eicosapentansäure	-46,465	69,14
$C_{40}H_{54}O_4$	Carotinoid	-163,142	57,54
$C_{10}H_{19}NO_4$	Propionylcarnetin	-43,865	73,86
$C_{12}H_{23}NO_4$	2-Methylbutyrylcarnitin	-18,414	88,83

Tabelle B.7: Phytohormone aus den Feature-Listen von Compound Discoverer mit der jeweiligen Retentionszeit und der Differenz von theoretischer und gemessener Masse  $\Delta m$ .

Phytohormon	Mikroalge	Retentionszeit [min]	$\Delta m [ppm]$
SA	$\cos 37$	4,139	-0,25
JA	$\cos 37$	5,210	-0,93
	RCC8613	3,993	1,40
Me-JA	$\cos 5$	3,836	1,31
	$\cos 43$	3,878	1,36
	Helg52	3,914	1,49
ABA	$\cos 5$	5,397	-2,01
Me-H-Me	RCC8613	5,349	-0,16

# C Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die eingereichte Arbeit ist nicht anderweitig als Prüfungsleistung verwendet worden oder in deutscher oder einer anderen Sprache als Veröffentlichung erschienen.