

Chemische Ökologie mariner Protisten - Bedeutung für die Dynamik mariner Nahrungsketten

Allan Cembella, Uwe John, Bernd Krock,
Tilman Alpermann, Urban Tillmann

Protisten sind einzellige Mikroorganismen, die in marinen Nahrungsketten, im globalen Kohlenstofffluss und in biogeochemischen Stoffkreisläufen eine wichtige Rolle spielen. Sie können auf lokalen- und regionalen Skalen durch schnelles Wachstum dichte Massenansammlungen von Zellen bilden. Solche Entwicklungen sind als schädliche Algenblüten bekannt, auch „rote Tiden“ genannt, wenn es zu einer Verfärbung des Wassers kommt. Diese Blüten können verheerende Auswirkungen für marine Ökosysteme und den Menschen haben.

Die Artenzusammensetzung und -vielfalt von Protisten, ihr Wachstum und physiologische Eigenschaften sind gut untersucht. Die chemische Ökologie, d.h. Untersuchungen artspezifischer chemischer Interaktionen, ist jedoch weniger gut bekannt. Dabei spielen bioaktive Substanzen, auch Allelochemikalien genannt, vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Wachstumssteuerung, bei der Konkurrenz zwischen Arten und bei der Sukzession im Ökosystem. Von den vermuteten Funktionen allelochemischer Substanzen findet ihr Einsatz als chemische Verteidigung am meisten Beachtung. In dieser Funktion können allelochemische Substanzen dazu dienen, Konkurrenten um Nährstoffe auszuschließen und auch Fraßverluste zu verringern.

Der marine Dinoflagellat *Alexandrium*, ein toxischer Protist, ist von besonderer Bedeutung für die

Chemical ecology of marine protists - implications for marine food web dynamics

Allan Cembella, Uwe John, Bernd Krock,
Tilman Alpermann, Urban Tillmann

Protists are eukaryotic microorganisms that play an important role in food web dynamics, global carbon flux, and biogeochemical cycling. Furthermore, on a local and regional scale, massive proliferation of marine protists can lead to the formation of dense aggregations of cells known as “Harmful Algal Blooms” (HABs), or “red tides,” when visible water discoloration occurs. Such HABs can have devastating consequences for marine ecosystems and human health.

Although much has been described about growth, taxonomic composition and diversity, and ecophysiology of marine protists, relatively little is understood of the species-level chemical interactions controlling growth, competitive outcomes and species succession in the ecosystem – collectively termed chemical ecology. The production of allelochemicals – biologically active components eliciting specific responses in target organisms – may be an important mediator of intra- and inter-specific interactions among marine protists. Among the putative functions of allelochemicals, their use as agents of chemical defence is most often invoked. In this sense, allelochemicals could be targeted to exclude competitors from exploiting limited resources, as well as to avoid or reduce predation.

The marine dinoflagellate Alexandrium, a toxic protist, is of particular relevance to North Sea coas-

küstennahen Ökosysteme der Nordsee. Bei Untersuchungen vor der Ostküste Schottlands wurden mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden und morphologischer Kriterien drei *Alexandrium*-Arten nachgewiesen. Zwei dieser Arten kommen weltweit vor, *A. tamarense* und *A. minutum*, und produzieren Tetrahydropuran-Neurotoxine, die, von Muscheln angereichert, beim Menschen für die Paralytische Muschelvergiftung (PSP) verantwortlich sind. Die dritte Art, *A. ostenfeldii*, produziert ebenfalls Gifte, neuartige makrozyklische Iminotoxine, auch Spirolide genannt. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass allelochemische Effekte auf Mikroalgen und andere Protisten in der Gattung *Alexandrium* häufig vorkommen. Um die Stärke allelochemischer Wirkung von Substanzen zu messen werden so genannte EC_{50} Werte bestimmt. Das ist die Zelldichte, bei der 50 Prozent der Zielorganismen geschädigt sind. Bei *Alexandrium* reichen weniger als 100 Zellen pro Milliliter aus, um andere Mikroalgen und Planktontierchen negativ zu beeinflussen bis hin zur vollständigen Zell-Lyse. Vergleichende Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, dass allelochemische Effekte sehr stark zwischen verschiedenen *Alexandrium*-Arten und sogar zwischen verschiedenen Kulturen einer Art variieren können. Auf jeden Fall können solche schädlichen Auswirkungen signifikant die Bildung und Aufrechterhaltung von *Alexandrium*-Blüten erklären, wenn sie Veränderungen im Konkurrenz- und Fraßverhalten hervorrufen.

Was löst die allelochemische Antwort aus? Es gibt eine Reihe bekannter, von Mikroalgen produzierter Phycotoxine mit starker biologischer Wirkung üblicherweise auf Ionenkanäle oder Enzymfunktionen, und stark toxischen Effekten auf Menschen, marine

tal ecosystems. By application of morphological criteria and rRNA molecular probes, we have detected three Alexandrium species in studies of field populations from the North Sea. Two of these species, A. tamarense and A. minutum, are known worldwide to be producers of tetrahydropurine neurotoxins, which accumulate in shellfish and are responsible for paralytic shellfish poisoning (PSP). The third species, A. ostenfeldii, has been found to produce novel macrocyclic imine toxins known as spirolides. There is increasing evidence that allelochemical effects on microalgae and heterotrophic protists are widely expressed by members of the genus Alexandrium. Low effective concentrations ($EC_{50} < 100 \text{ cells ml}^{-1}$) required to elicit lysis of 50 % of the target cells indicate a high allelochemical potency of Alexandrium spp. Nevertheless, comparative experiments have shown that allelochemical effects differ markedly among different Alexandrium species and even among strains within a species. In any case, such deleterious consequences may be highly significant in explaining the formation and maintenance of Alexandrium blooms, if they provoke alterations in grazing behaviour and affect competitive outcomes.

What is causing the allelochemical response? There are a number of known phycotoxins with potent biological activity towards cells and tissues, usually affecting ion channels or enzyme function, and thus causing, toxic effects against humans, marine mammals and seabirds. Our initial suspicions thus concentrated on the known phycotoxins produced by Alexandrium, the saxitoxin derivatives associated with PSP and the spirolides. However, current knowledge indicates that allelochemical properties of Alexandrium spp. are not correlated to

Säuger und Meerestiere. Unsere anfänglichen Überlegungen konzentrierten sich deshalb auf die von *Alexandrium* produzierten bekannten Phycotoxine – die mit PSP zusammenhängenden Saxitoxinderivate und die Spirolide. Unsere gegenwärtigen Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die allelochemischen Eigenschaften von *Alexandrium* spp. nicht mit diesen Phycotoxinen zu korrelieren sind. Es sind somit unbekannte extrazelluläre Substanz(en), die offensichtlich nicht im Zusammenhang mit PSP-Toxinen oder Spirolidgehalten stehen, für diese starken allelochemischen Effekte verantwortlich.

Auch wenn somit keine Hinweise für eine mögliche allelochemische Wirkung von Spiroliden und anderer Phycotoxine gegen Protisten vorliegen, ist die Frage nach der chemisch-ökologischen Relevanz

these phycotoxins. Unknown extracellular substance(s), apparently unrelated to PSP toxins or to spirolide content, are responsible for the potent allelochemical effects.

In spite of the lack of evidence of allelochemical interaction against protists, it is still relevant to question the chemical ecological significance of spirolides and other phycotoxins. In parallel studies of the biosynthetic pathway to spirolide production, in collaboration with the National Research Council, Halifax, Canada, we have effectively demonstrated the polyketide nature of spirolides. Polyketides are secondary metabolites, most commonly found in bacteria and fungi, but also in certain protists and higher plants.

Like spirolides, most of the known phycotoxins produced by marine protists are polyethers, and thus are presumed although not proven to be polyketide-derived. Polyketide biosynthesis in both prokaryotes (bacteria) and eukaryotes (protists, fungi, plants and

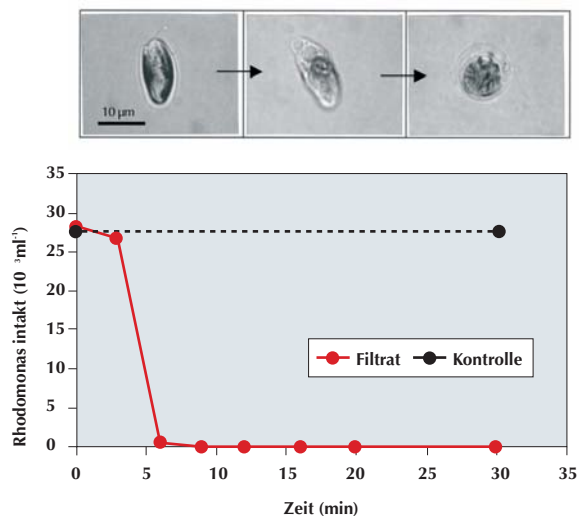


Abb. 7: Die Zelyse von *Rhodomonas baltica* (obere Bildserie) nach Exposition mit allelochemischen Substanzen von *Alexandrium* ist ein schneller Prozess. Während im Kontrollversuch die Anzahl intakter Zellen mit der Zeit unverändert bleibt, sind im Inkubationsversuch mit Filtrat einer Kultur von *Alexandrium ostenfeldii* bereits nach wenigen Minuten nahezu alle Zellen vollständig zerstört.

Fig. 7: Cell lysis of Rhodomonas baltica (upper panel) after exposure to Alexandrium allelochemicals is a rapid process. In the control experiment number of intact cells remained unchanged. However, when co-incubated with the cell-free filtrate from a culture of Alexandrium ostenfeldii, almost all cells are completely lysed after a few minutes.

dieser Substanzen berechtigt. In parallelen Untersuchungen zu den Biosynthesewegen der Spirolide in Zusammenarbeit mit dem National Research Council in Halifax, Kanada konnten wir die Polyketidnatur von Spiroliden eindeutig nachweisen. Polyketide sind Sekundärmetabolite, hauptsächlich von Bakterien und Pilzen, aber auch in Protisten und höheren Pflanzen. Die meisten der bekannten Phycotoxine mariner Protisten sind Polyether und gehören somit möglicherweise ebenfalls zu der Gruppe der Polyketide. Die Polyketid-Biosynthese verläuft sowohl in Prokaryoten (Bakterien) als auch in Eukaryoten (Protisten, Pilzen, Pflanzen und Tieren) über das Enzym Polyketidsynthase (PKS). Wir sind auf der vielversprechenden Suche nach beteiligten regulatorischen Genen, indem wir erste genomische Ansätze zur funktionalen Genexpression bei verschiedenen Protisten-Arten verfolgen. Bei *Alexandrium ostenfeldii* konnte eine Reihe verschiedener Gene identifiziert werden, die vermutlich im Zusammenhang mit der Toxinsynthese stehen. Darunter waren auch Gene, die für PKS zu kodieren scheinen. Allerdings ließen sich nur 9 Prozent aller Sequenzen bekannten Genen zuordnen. Diese geringe Übereinstimmung mit bekannten Genen stellt nach wie vor eine große Herausforderung für Untersuchungen zur Expression und zur funktionellen Regulierung von Biosynthesegenen von Sekundärmetaboliten in Dinoflagellaten, und besonders für die Spirolidbiosynthese in *Alexandrium*, dar.

animals) is typically mediated by the enzyme polyketide synthase (PKS). We have embarked on a promising search for the associated regulatory genes using limited genomic approaches to functional gene expression for a number of protistan species. For *Alexandrium ostenfeldii*, we detected several genes putatively related to toxin synthesis, including genes that appear to encode PKS. Yet only 9 % of the total sequences were homologues to known genes. The low degree of sequence homology in *A. ostenfeldii* continues to present a challenge for determining the expression and regulatory function of biosynthetic genes for dinoflagellate secondary metabolites, and specifically for spiroside biosynthesis in *Alexandrium*.

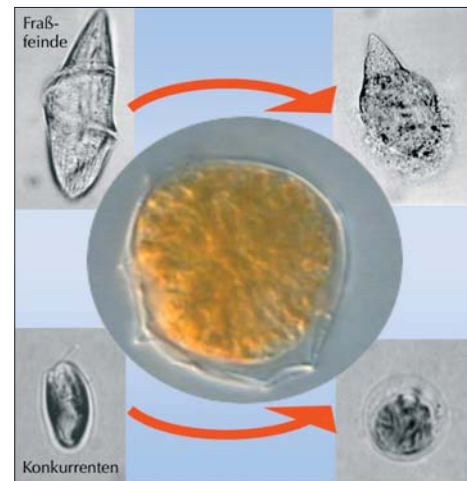


Abb. 8: Extrazelluläre allelochemische Substanzen von *Alexandrium* spp. können Zell-Lyse bei sowohl einzelligen Fraßfeinden als auch bei Konkurrenten verursachen.

Fig. 8: Extracellular allelochemical substances produced by Alexandrium spp. may cause cell lysis of both protistan grazers and competitors.