

**Phylogeographie, Artbildung und Biomarker zum  
Umweltmonitoring bei der Ohrenqualle *Aurelia* sp.:  
Organismische und molekulargenetische Untersuchungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Werner Schroth**  
aus Birkenfeld

Frankfurt am Main 2000

vom Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter: Prof. B. Schierwater und Prof. B. Streit

Datum der Disputation: Dezember 2000

---

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Einleitung</b>  | 1  |
| <b>2. Organismische und molekulare Verwandtschaftsanalyse</b>   | 4  |
| 2.1 Einleitung  | 4  |
| 2.2 Material & Methoden   | 5  |
| 2.2.1 Lebenszyklus von <i>Aurelia aurita</i>                    | 5  |
| 2.2.2 Organismische und ökologische Parameter                   | 6  |
| 2.2.3 Molekulargenetische Methoden                              | 9  |
| 2.2.4 DNA-Sequenzdatenanalysen                                  | 11 |
| 2.3 Ergebnisse  | 13 |
| 2.3.1 Organismische und ökologische Befunde                     | 13 |
| 2.3.2 Analyse der ITS-1/5.8S rDNA                               | 19 |
| 2.3.3 Analyse der 16S rDNA                                      | 25 |
| 2.3.4 Hybridisierung zwischen Linien                            | 31 |
| 2.3.5 Organismische und molekulare Befunde im Kontext           | 33 |
| 2.4 Diskussion  | 35 |
| 2.4.1 Genetische Strukturierung und Speziation                  | 35 |
| 2.4.2 Phylogeographie und Hybridisierung                        | 42 |
| 2.4.3 Taxonomie von <i>Aurelia</i>                              | 45 |
| 2.4.4 MtDNA-Rekombination                                       | 47 |
| <b>3. Molekulare Ökotoxikologie: Etablierung von Biomarkern</b> | 49 |
| 3.1 Einleitung  | 49 |
| 3.2 Material & Methoden   | 51 |
| 3.2.1 Testpolypenklone und Schadstoffapplikation                | 51 |
| 3.2.2 Molekulargenetische Methoden                              | 51 |
| 3.2.3 Datenauswertung   | 55 |
| 3.2.4 Freilandexposition  | 55 |
| 3.3 Ergebnisse  | 55 |
| 3.3.1 Phänotypische Befunde                                     | 55 |
| 3.3.2 Isolierung schadstoffkorrelierter Gene                    | 56 |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.3 Genexpression und Dosis-Wirkungsbeziehungen       | 62        |
| 3.3.4 Biomarker im Freilandtest                         | 64        |
| 3.3.5 Hitzeschockprotein HSP70 im evolutionären Kontext | 66        |
| 3.4 Diskussion  | 68        |
| 3.4.1 Molekulare Methoden zur Biomarkerisolierung       | 68        |
| 3.4.2 Biomarkernachweis von Schadwirkungen              | 70        |
| <b>4. Gesamtdiskussion</b>                              | <b>76</b> |
| <b>5. Zusammenfassung</b>                               | <b>80</b> |
| <b>6. Summary</b>                                       | <b>81</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>                          | <b>82</b> |
| <b>8. Danksagung</b>                                    | <b>92</b> |
| <b>9. Anhang</b>  | <b>93</b> |



Meduse der Ohrenqualle *Aurelia aurita*

## 1. Einleitung

Die Medusen der metagenetischen Cnidarier (Nesseltiere) werden je nach Kultur- und Sprachraum z. B. mit einer weiblichen Gestalt mit schlangentartigen Haaren (Medusa), mit stark brennenden Quaddeln auf der Haut oder mit Stränden verklebenden Gallertmassen in Verbindung gebracht. Diese Assoziationen fußen hauptsächlich auf Merkmalen der Scheibenquallen (Scyphozoa), deren bisexuelle Medusen in Größe, Tentakellängen, Nematocytenbesatz und Mesogloehalt gegenüber der relativ unauffälligen ungeschlechtlichen Polypengeneration beeindruckend. Häufig ist die Medusengeneration der Scheibenquallen namensgebend. Die Medusen der Ohrenqualle *Aurelia aurita* (Fahnenquallen, Semaestomeae) sind an den durchscheinenden, ohrenförmig um den Gastralraum angeordneten Gonaden erkennbar. In gemäßigten Klimazonen ist die bisexuelle Vermehrung - und das anschließende oft massenhafte Absterben in Küstennähe - auf den Sommer beschränkt (Lucas 1996), so daß die Medusen der Ohrenqualle häufige spätsommerliche Gäste an Stränden z. B. der Nord- und Ostsee (mit für den Menschen harmloser Nesselwirkung) sind.

Vertreter der von Linné (1758) und Lamarck (1816) typologisierten *Aurelia aurita* sind weltweit

verbreitet und bezüglich der Morphologie, Physiologie, Ethologie und Ökologie gut untersucht (z. B. Fautin & Lowenstein 1992; Costello & Colin 1994; Hammer et al. 1994; Lucas 1994). Unter ökologischen Gesichtspunkten ist das breite Spektrum der Ohrenqualle bezüglich abiotischer Umweltfaktoren hervorzuheben. Die häufig massenhaften Medusenaggregationen und der daraus resultierende Predationsdruck gegenüber dem Mikrozooplankton (Copepoden, Invertebraten- und Fischlarven) weist der Ohrenqualle eine wichtige - und gelegentlich dominierende - Stellung in marinen Plankton-Lebensgemeinschaften zu (Janas & Witek 1993; Schneider & Behrends 1994; Sullivan et al. 1994; Tsikhon-Lukanina et al. 1996). Die breite Anpassungsfähigkeit und hohe Vermehrungsrate wird anekdotenhaft durch eine kürzlich erfolgte Meldung bekräftigt, nach der offensichtlich *Aurelia*-Schwärme die Kühlwasserleitungen eines Kraftwerks in Australien verstopften und lahmlegten (Cnidaria-List-Server).

Das ubiquitäre Vorkommen läßt sich auf eine große ökologische Toleranz gegenüber Klima und Salzgehalt zurückführen, so daß die Ohrenqualle als Bewohner aller Meere von 40° südlicher bis 70° nördlicher Breite und Habitaten mit Salinitäten von 6-41‰ gilt (Kramp 1961). Dabei werden geographische Populationen, Unterarten und Arten der Gattung *Aurelia* anhand morphologischer Medusenmerkmale sowie auf Basis von Allozymunterschieden in unterschiedlicher Konsequenz teilweise in eine Art, *Aurelia aurita* zusammengefaßt, oder in mehrere distinkte Spezies voneinander abgegrenzt (Mayer 1910; Kramp 1961; Russell 1970; Kozloff 1987; Greenberg et al. 1996). Der nicht konsistente taxonomische Status der Ohrenqualle beruht entweder auf phylogenetisch uninformativen diagnostischen Merkmalen oder spiegelt Differenzierungen wider, die mit Artbildungsprozessen erklärt werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollen die phylogenetischen Beziehungen zwischen *Aurelia*-Populationen auf einer weltweiten geographischen Skala unter organismischen und molekularen Aspekten untersucht werden. Die möglichen Speziationsprozesse orientieren sich an den von Avise (2000) klassifizierten beiden Kategorien, nach denen die gängigen Spezieskonzepte auf Basis phylogenetischer und biologischer Kriterien, oder analog von Ridley (1996) nach evolutionären und zeitlich unabhängigen Kriterien eingeteilt werden. Die DNA-Sequenzinformationen eines mitochondrialen Gens (16S rDNA) sowie eines auf dem Kerngenom liegenden ribosomalen Locus (ITS-1/5.8S rDNA) sollen verwendet werden, um die genealogischen Beziehungen verschiedener *Aurelia*-Populationen sowohl phylogeographisch (Avise 1994) als auch bezüglich der phylogenetischen Artkonzepte zu untersuchen (Eldredge & Cracraft 1980; Wiley 1981; Cracraft 1989; Übersicht in Hull 1997). Mittels morphologischer Merkmale, Lebenszyklusdaten und den molekulargenetischen Daten soll gleichzeitig geprüft werden, ob sich die von Avise (2000) genannte Kategorie der biologisch definierten Spezieskonzepte in phänetisch (Sneath & Sokal 1973; Whittmore 1993), ökologisch (van Valen 1976; Schluter 1996) oder reproduktiv (Mayr 1963) getrennte Einheiten bei der Ohrenqualle widerspiegeln. Der Beitrag verschiedener Diversifizierungsfaktoren wie geographische Verbreitung, Selektion und genetische Drift wird in diesem Zusammenhang unter besonderer Berücksichtigung ökologischer Aspekte in Kapitel 2 dargestellt.

Nicht zuletzt auch aufgrund ihrer besonderen ökologischen Plastizität empfiehlt sich die Ohrenqualle zur Nutzung als Biomonitor zur Untersuchung von Umweltbeeinträchtigungen auf Individuenebene. Eine in diesem Zusammenhang nützliche Besonderheit im Lebenszyklus von *Aurelia* betrifft den Übergang von der sich ungeschlechtlich vermehrenden Polypengeneration in

die bisexuelle Medusengeneration, bei dem an der Oralseite des Polypen Medusenlarven (Ephyren) in Form einer polydisken Strobilation abgeschieden werden. Die Strobilation wird extrinsisch durch natürliche Faktoren ausgelöst und kann bei den Polypen der Ohrenqualle künstlich durch Temperaturabsenkung oder Erhöhung der Iod-Ionenkonzentration induziert werden (Spangenberg 1967). Dieses experimentell beeinflussbare Lebenszyklusstadium wurde im Rahmen von ökotoxikologischen Studien verwendet, um den Einfluß von Chemikalien auf die verzögerte Strobilation nach künstlicher Auslösung oder die Störung des Strobilationsverlaufs zu testen (Spangenberg 1984; Thiel & Jarms 1986). Black & Bloom (1984) untersuchten die Beziehung zwischen der Strobilationsinduktion und der Produktion von Hitzeschockproteinen (HSP) nach Temperaturerhöhung und konnten die Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen als Reaktion auf Temperaturstreß immunologisch nachweisen. Diese Studien zeigen, daß die Ohrenqualle ein hohes Reaktionspotential gegenüber variablen Umweltbedingungen besitzt.

Die Charakterisierung dieses Reaktionspotentials soll in der vorliegenden Arbeit mittels der Analyse organismischer Reaktionen gegenüber anthropogen verursachten Streßfaktoren durchgeführt werden. Im Rahmen von experimentellen Schadstoffexpositionen sollen an *Aurelia*-Polypen genetische Reaktionen auf der Ebene der mRNA-Transkription untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt auf der Etablierung von Biomarkern (van Gestel & van Brummelen 1996) mittels molekulargenetischer Methoden, wobei die Durchführbarkeit und Effektivität verschiedener Methodenansätze verglichen werden sollen. Die identifizierten Biomarker sollen im Hinblick auf die Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Schadstoffkonzentrationen und dem Ausmaß der genetischen Reaktion mittels quantitativer PCR-Verfahren näher charakterisiert werden. Ein anschließender Test der im Labor charakterisierten

Biomarker auf die Anwendbarkeit im Freiland soll entsprechende Hinweise für die Sensitivität und Durchführbarkeit des in Kapitel 3 ausgeführten Biomarker-Assays liefern.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Verknüpfung verschiedener biologischer Organisationsebenen im Kontext ökologischer und öko-toxikologischer Forschung (Clements 2000). Erkenntnisse zum Wirken von Umwelteinflüssen auf molekularer Ebene bieten sich als Basis einer Bewertung individueller Reaktionen für Veränderungen auf Populationsebene an. Dieser Zusammenhang wird in Kapitel 4 anhand der Relevanz von Biomarkern für Aussagen auf Populations- und Spezieebene besprochen.

## 2. Organismische und molekulare Verwandtschaftsanalyse

### 2.1 Einleitung

Individuen bilden lokale Populationen oder Fortpflanzungsgemeinschaften, die von Taxonomen üblicherweise zu übergeordneten Arten zusammengefaßt werden. Die Klassifizierung in getrennte Arten basiert auf einer Anhäufung von Merkmalsunterschieden über evolutionäre Zeiträume. Zwei Erklärungsmodelle zur Etablierung von Merkmalsverschiebungen werden debattiert, die Wirkung von selektiven Zwängen und daraus resultierende Adaptationen sowie der Modus einer neutralen und konstanten Evolutionsrate inklusive dem Wirken von genetischer Drift (z. B. Kimura 1983; Gillespie 1986). Gleichzeitig werden die Prozesse, durch die isolierte Arten entstehen, in Form unterschiedlicher Artkonzepte diskutiert. So kann im Fall von sich getrenntgeschlechtlich vermehrenden Individuen der von Mayr (1963, 1982) geprägte Begriff der 'reproduktiv isolierten Einheit' als Indiz für eine stattfindende oder bereits vollzogene Speziation verwendet werden. Andere Artkonzepte basieren auf Überlegungen der phänetischen und phylogenetischen Klassifizierung (Morphospezies, Whittemore 1993; *evolutionary species*, Wiley 1981; *phylogenetic species*, Cracraft 1989; *cohesion species*, Templeton 1989), auf ökologischen Adaptationen (*ecological species*, z. B. Schluter 1996) oder auf dem Verhaltensrepertoire (*recognition species*, Paterson 1985). Die möglichen evolutionären Differenzierungsmechanismen und Speziationsmodelle sollen am Beispiel der Ohrenqualle *Aurelia aurita* diskutiert und empirisch bewertet werden.

Die Ohrenqualle *Aurelia aurita* wird aus Gründen der taxonomischen Inkongruenz nachfolgend mit dem Gattungsbegriff *Aurelia* umschrieben. Ihre große phänotypische Plastizität und ihre weltweite

Verbreitung führte seit der Erstbeschreibung (Linné 1758) oftmals zu Namensänderungen (*Aurellia*, Péron & Leseur 1809, Lamarck 1816). Innerhalb der Gattung kam es zur wiederholten Einführung von Unterarten oder je nach Autor 7-12 'guten' Arten (Mayer 1910, Kramp 1961). In der darauffolgenden Zeit wurden diese wiederum verworfen und als 'ökologische Rassen' in die beiden Spezies *Aurelia aurita* und die von Brandt (1838) beschriebene arktisch verbreitete Schwesternart *Aurelia limbata* aufgeteilt (Russell 1970, Kozloff 1987). Erst kürzlich wurde mit Hilfe von Allozymdaten eine neue Art der Gattung *Aurelia* im pazifischen Raum beschrieben, welche jedoch mangels weiterer Erkenntnisse den beiden existierenden validen Spezies nicht näher zugeordnet werden konnte (Greenberg et al. 1996). Lisa-Ann Gershwin et al. (pers. Mittlg.) sind dabei, die von Chamisso & Eysenhardt (1820) beschriebene *A. labiata* wieder neu zu bestätigen, welche von anderen Autoren bisher als Subtyp der *A. limbata* gehandelt wird. Morphologische Merkmale, wie die Stellung der Sinneskörper am Schirmrand, die Unterteilung von 8 gegenüber 16 Randlappen oder die Verdickung der Galerte werden als ausreichend für die taxonomische Einteilung in eine Art erachtet, während sie von anderen Autoren als geographische Variabilitäten oder schlicht als Konservierungsartefakte abgehandelt werden (Thiel 1970).

Die überspitzte Darstellung der taxonomischen Transformationen und Konfusionen um *Aurelia* begründet sich augenscheinlich durch die Qualität der Unterscheidungsmerkmale und wirft die Frage auf, ob Artbildungsprozesse als Ursache der taxonomischen Varianz geltend gemacht werden können. Dabei sollen Unterscheidungsmerkmale verwendet werden, um 1. die beschriebene subjektive Beurteilung eines Merkmals zu vermeiden und 2. die Qualität evolutiver Veränderungen zu erfassen. Molekulargenetische Merkmale sind objektiv vergleich- und quantifizierbar, unterliegen



keiner modifikatorischen Plastizität und sind damit für die phylogenetische Analyse auf Populations- und Artebene in besonderer Effizienz geeignet (DeSalle & Schierwater 1998). Daneben liefern molekulare DNA-Sequenzdaten einen direkten Einblick in die genealogischen Beziehungen verschiedener Populationen im historischen Kontext (Harrison 1991; Templeton 1994). Die Ergänzung mit morphologischen Merkmalen und Lebenszyklusdaten erleichtert die Suche nach möglichen Gründen für die häufig geschilderten Merkmalsüberlappungen und der daraus resultierenden fehlenden Abgrenzung verschiedener Taxa der Ohrenqualle. Organismische Parameter können Hinweise für das Wirken von Selektion beispielsweise unter variablen Umweltbedingungen liefern. Der Vergleich beider Datentypen erlaubt die Evaluierung der genetischen Beziehungen und geographischen Verbreitungsmuster zwischen den Populationen unter Berücksichtigung der Faktoren Selektion und genetischer Drift.

Die in der Literatur beschriebene phänotypische Variabilität von *Aurelia* erfordert die Untersuchung verschiedener weltweiter Populationen ungeachtet ihrer bisherigen taxonomischen Einteilungen. Im Abschnitt 2.3.1 werden einige ausgewählte Vertreter unter organismischen, morphologischen und ökologischen Gesichtspunkten anhand verschiedener Lebenszyklusstadien vorgestellt. Eine genealogische Rekonstruktion aller zu Verfügung stehenden Populationen wird mittels der molekulargenetischen Sequenzanalyse der beiden ribosomalen Genorte 16S rDNA (mitochondriales Genom) in 2.3.2 und ITS-1/5.8S rDNA (*Internal Transcribed Spacer*, nukleäres Genom) in 2.3.3 vorgenommen. Die Kombination zweier unabhängiger Genorte und Genome erlaubt die Abschätzung eventuell unterschiedlicher Evolutionsraten und möglicher Rekombinations- und Hybridisierungsereignisse zwischen den *Aurelia*-'Populationen'. Die Trennung historischer *versus* rezent entstandener Populations-

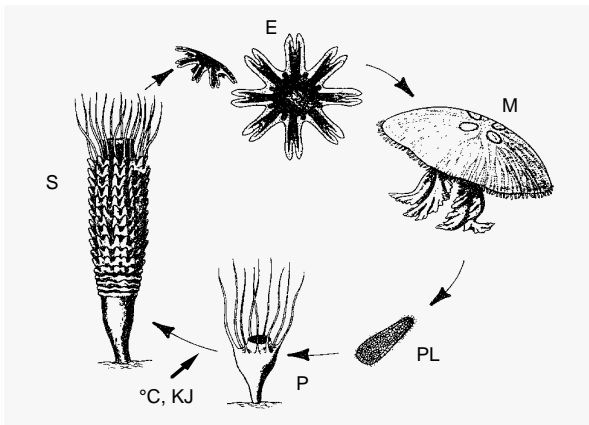
strukturen - der Unterscheidung von Gen- und Speziesphylogenie - wird mittels Instrumentarien der Phylogeographie (Avice 1994) und Koaleszenztheorie (Kingman 1982; Hudson 1990) durch die Analyse zweier Genorte konsistenter. Odorico & Miller (1997) zeigten mittels der Analyse von ITS/5.8S rDNA den Modus einer vernetzten Evolution (*reticulate evolution*, Arnold 1992) - der Hybridisierung und Introgression zwischen Arten - an *Acropora*-Arten (Anthozoa) auf. Es erhebt sich die Frage, ob ein ähnlicher Modus für die Merkmalsvermischung- und überlappung zwischen Populationen der Ohrenqualle verantwortlich ist. Eine Vielzahl von Untersuchungen der 16S rDNA (z. B. France et al. 1996; Orti et al. 1996) und ITS-Region (z. B. Lee & Taylor 1992; Vogler & DeSalle 1994; Chen & Miller 1996) demonstrieren die erfolgreiche Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen auf intra- und interspezifischer Ebene. Zudem bietet die Analyse der repetitierten ribosomalen Kern-DNA einen möglichen Einblick in den Prozeß der *concerted evolution* (Dover 1982). Die Wiederholungseinheiten von Multigen-Familien sollten innerhalb einer Art mit ausreichendem Genfluß homogenisiert werden, während die Sequenzdivergenz zwischen den Arten zunimmt (Li & Graur 1991). Die Analyse der ITS/5.8S-Region ermöglicht über die Verteilung der genetischen Variation die Überprüfung der Auswirkungen von *concerted evolution* bei Artbildungsprozessen der Ohrenqualle.

## 2.2 Material & Methoden

### 2.2.1 Lebenszyklus von *Aurelia aurita*

Die marine Ohrenqualle *Aurelia aurita* ist kosmopolitisch verbreitet. Ihre ökologischen Ansprüche und Toleranzen sind als euryök zu bezeichnen, sie toleriert Salinitäten vom Brackwasser- bis Meerwasserbereich (6-41‰) und ihr klimatischer

Besiedlungsraum reicht von 40° Süd bis 70° nördlicher Breite (Kramp 1961; Russell 1970). Insbesondere in den heimischen Gewässern Nord- und Ostsee erreicht die Ohrenqualle hohe Abundanzen (Mayer 1910, Schneider & Behrends 1994) und ist ein typischer Vertreter der heimischen marinen Fauna. Als metagenetischer Cnidarier verläuft ihr Lebenszyklus (Abb. 2.2.1) im Wechsel zwischen geschlechtlicher (Meduse) und ungeschlechtlicher Generation (Polyp).



**Abb. 2.2.1** Metagenetischer Lebenszyklus von *Aurelia aurita*. Die vegetative Vermehrung erfolgt über den Polyp (P), der unter günstigen Bedingungen Tochterpolypen erzeugt, bzw. ausgelöst durch exogene Signale (Temperatur, Kaliumiodid), in die Strobila (S) übergeht. Über eine endständige Knospung werden Medusenlarven (Ephyren, E) abgeschnürt, die die sexuelle Phase des Generationswechsels einleiten. Die Medusen (M) vermehren sich bisexuell unter Bildung von Planularlarven (PL), die sich an einem Hartsubstrat festsetzen und zum Polypen metamorphosieren.

Das Polypenstadium bildet unter vegetativer Knospung saisonal unabhängig solitäre Tochterpolypen. Ausgelöst durch exogene Faktoren wie Temperaturabsenkung oder eine Erhöhung der Kaliumiodidkonzentration wird die sexuelle Phase durch Ablösung scheibenförmiger Jungmedusen (Ephyren) am oralen Pol eingeleitet, die polydiske Strobilation. Die natürliche Auslösung der Strobilation durch die genannten Faktoren ist eine Reak-

tion auf veränderte Umweltbedingungen. Sie kann ebenso experimentell ausgelöst werden (Spangenberg 1967; Thiel 1970). Die Entwicklung zur geschlechtsreifen Meduse erfolgt innerhalb der für das Verbreitungsgebiet typischen Zeit erhöhter Temperaturen und Nahrungsangebote. In saisonalen Klimazonen ist dies hauptsächlich der Sommer, während innerhalb der 20°C-Isothermen der Tropen ganzjährig Medusen zu erwarten sind. Die Befruchtung der Eier findet in den Gonaden der Weibchen nach Aufnahme der im Wasser frei flottierenden männlichen Gameten statt. Die Planularlarven entwickeln sich in den Taschen des Manubriums (Mundrohr) der Weibchen. Nach Ablösung vom Muttertier und einer kurzen pelagischen Phase setzen sich die Planulae mit dem aboralen Pol auf Steinen, Muschelschalen und sonstigem Hartsubstrat fest und metamorphosieren zum Polypen.

### 2.2.2 Organismische & ökologische Parameter

Von 16 weltweiten Sammelorten (Abb. 2.2.2) wurden insgesamt 67 Proben (Medusen bzw. Polypen) bezogen. Ethanolfixierte Medusen/Polypen und Lebendpolypen wurden von folgenden Personen und Instituten zur Verfügung gestellt: Dr. Gerhard Jarms (Universität Hamburg), dem MPI für Marine Mikrobiologie Bremen, dem Marine Institute Woods Hole (USA), Drs. Allison J. Gong und Claudia Mills (USA), Dr. Adam Benovic (Kroatien), Drs. Paul Groves und Rob Rippingale (Australien), Carolyn Lehmann (Dubai), Drs. Masahiko Sakaguchi und Hiroshi Miyake (Japan), Dr. Anna Kristin Danielsdottir (Island), Pascal Mosconie und Pierre Morniere (Frankreich). In eigenen Exkursionen ans Mittelmeer wurden Medusen aus der Region Perpignan (Frankreich) gesammelt. Die Tabelle 2.1 listet die geographischen Regionen, die jeweilige Anzahl pro Standort und die für alle Analysen geltenden

Identifizierungskürzel auf. Mit Ausnahme der mit \* gekennzeichneten Namen wurden alle Proben von den jeweiligen Kooperatoren als *Aurelia aurita* bezeichnet. Die Proben EP-LAB\* lagen als *A. labiata* charakterisiert vor (Claudia Mills, pers. Mittlg.), die Probe WP-LIMBATA\* wurde aufgrund morphologischer Merkmale als *A. limbata* charakterisiert (Hiroshi Miyake, pers. Mittlg.). Als ein weiterer Vertreter der Semaestomeae (Fahnenquallen) wurde die Feuerqualle *Cyanea capil-*

*lata* als Außengruppe in die Verwandtschaftsanalysen miteinbezogen.



Abb. 2.2.2 Sammelorte von *Aurelia*-Populationen.

**Tabelle 2.1** Auflistung der geographischen Herkunft, Probenanzahl (N) und Klonbezeichnung der untersuchten *A. aurita*-Individuen. Die mit \* markierten Proben EP-LAB\* und WP-LIMBATA\* lagen als *A. labiata* bzw. *A. limbata* charakterisiert vor.

| Meeresbecken                                | Ort/Population           | N | Klon-ID                                |
|---|--------------------------|---|--|
| Nordsee ( <i>Northern Sea</i> , NS)         | Hörnum/Sylt              | 1 | NS-S                                   |
|   | Helgoland                | 2 | NS-HE1, -2                             |
| Ostsee ( <i>Baltic Sea</i> , BS)            | Boiensdorf/Wismar        | 1 | BS-BO                                  |
|   | Kiel                     | 1 | BS-K                                   |
| Ostatlantik ( <i>Eastern Atlantic</i> , EA) | Frankreich/Roscoff       | 1 | EA-ROS                                 |
|   | Frankreich/La Rochelle   | 1 | EA-LR                                  |
|   | Norwegen                 | 1 | EA-NO                                  |
|   | Island                   | 6 | EA-IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6        |
| Westatlantik ( <i>West Atlantic</i> , WA)   | USA/Woods Hole           | 3 | WA-WH4, 5, 6                           |
| Rotes Meer ( <i>Red Sea</i> , RS)           | Offene See               | 1 | RS-1                                   |
|   | Israel/Eilat             | 1 | RS-2                                   |
| Ostpazifik ( <i>Eastern Pacific</i> , EP)   | Washington/Friday Harbor | 5 | EP-LAB1, -LAB2*; EP-FH1, -8, -11       |
|   | Kalifornien/Berkley      | 1 | EP-P1                                  |
|   | Oregon/Newport           | 1 | EP-P15                                 |
|   | Kalifornien/Monterey     | 3 | EP-PM1, -3, -16                        |
|   | Kalifornien/Bodega Bay   | 3 | EP-BBF, -H, -J                         |
| Mittelmeer ( <i>Mediterr. Sea</i> , MS)     | Frankreich/Perpignan     | 8 | MS-PE1, -2, -3, -4, -5, -6, -7; MS-LAG |
|   | Frankreich/Cannes        | 1 | MS-CN                                  |
|   | Kroatien/Mljet lakes     | 4 | MS-MKL1, -2, -3, -4                    |
| Schwarzes Meer ( <i>Black Sea</i> , BL)     | Offene See               | 2 | BL-S1, -2                              |
|   | Bosporus                 | 2 | BL-BO1, -2                             |
| Indischer Ozean ( <i>Indian Ocean</i> , IO) | Australien/Perth         | 5 | IO-PE1, -2, -3, -4, -5                 |
| Persischer Golf ( <i>Indian Ocean</i> , IO) | Ver. Arab. Emirate/Dubai | 6 | IO-DUB1, -2, -3, -4, -5, -6            |
| Westpazifik ( <i>Western Pacific</i> , WP)  | Nord-West-Paz. (Japan)   | 1 | WP-LIMBATA*                            |
|   | Japan/Nordküste          | 1 | WP-JAPF                                |
|   | Japan/Südküste           | 3 | WP-JAP1, -T, -K                        |
| Tropisch unbekannt                          | unbekannt                | 1 | MCA-1                                  |
| Aquarium Berlin                             | unbekannt                | 1 | BERLIN                                 |

Vertreter einiger Populationen wurden als Polypen im Labor weiter gezüchtet und zur vergleichenden Erfassung von Lebenszyklus-Daten und der Charakterisierung morphologischer Merkmale eingesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden bezüglich verschiedener Ephyrenmerkmale durch Erhebungen von Herrn Gerhard Jarms ergänzt; diese Daten werden besonders gekennzeichnet. Die Hälterung der Polypen erfolgte in Boverieschalen bei 37‰ künstlich-em Meerwasser (Tropic Marin), 19-20°C Temperatur und einem 12:12h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Fütterung mit *Artemia*-Larven und der Wasserwechsel erfolgte einmal pro Woche. Die Parameter Polypengröße, Polypen-Dichteentwicklung, Strobilation und morphologische Merkmale von Ephyren und Medusen wurden an Klonen vom Roten Meer (RS-1, RS-2), Nord- und Ostsee (NS-HE1, NS-HE2, NS-S, BS-BO, BS-K), Atlantik/Roscoff (EA-ROS), Atlantik/USA (WA-WH4, WA-WH6), Pazifik/USA (EP-FH8, EP-BBH, EP-PM16), Pazifik/Japan (WP-JAPF, WP-JAPT) und dem Klon MCA-1 mit ungewisser (tropischer) Herkunft (Pascal Mosconie, pers. Mittlg.) ermittelt.

### 1. Polypengröße

Da aufgrund der antagonistischen Wirkung von Ring- und Längsmuskulatur die Größen Länge und Durchmesser negativ korreliert sind und der Streckungsgrad variiert, wurde das Volumen unter der näherungsweise Annahme eines Zylinders berechnet:  $V = L \times \pi r^2$ , wobei gilt: L = Distanz Fuß-Mundscheibe und r = Mundscheibenradius.

### 2. Polypen-Dichteentwicklung

Für jeden lebenden Polypenklon wurde in verschiedenen Zeitabständen die Anzahl der Polypen ermittelt. Populationsdichten verlaufen oftmals zyklisch schwankend und die Anwendung exponentieller oder logistischer Wachstumsmodelle ist daher nur in bestimmten Fällen

zulässig (vgl. Varley et al. 1980). Daher wurde als Meßparameter die aus den Einzelintervallen gemittelte momentane Wachstumsrate  $r^*$  erhoben:

$$r^* = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta N_i}{\Delta t_i}$$

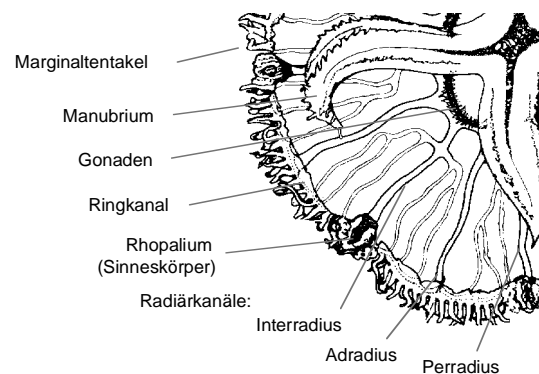
n = Anzahl der Zeitintervalle  
 $\Delta N$  = Veränderung der Polypenanzahl im i-ten Intervall  
 $\Delta t$  = i-tes Zeitintervall in Tagen

### 3. Strobilation

Über den Zeitraum von einem Jahr ( $\approx 1$  Saison) wurde das Auftreten der Strobilation im natürlichen Verlauf sowie unter experimenteller Auslösung durch Temperaturabsenkung protokolliert. Parallel wurden quantitative Parameter ermittelt, wie prozentualer Anteil von Strobilae gegenüber Polypen, Zeitspanne ab Strobilationsbeginn, bzw. Induktionsbeginn bis zum Ablösen der Ephyren.

### 4. Morphologische Merkmale von Ephyren und Medusen

Phänotypische Merkmale sowie die Anzahl der von der Strobila abgelösten Ephyren wurden protokolliert. In einigen Fällen war der Erhaltungszustand der ethanolfixierten Medusen ausreichend gut, um das Verzweigungsmuster der Radiärkanäle (Abb. 2.2.3) als Diagnosemerkmal zur Abgrenzung morphologischer Typen zu untersuchen.



**Abb. 2.2.3** Oralseite der Ohrenqualle mit Benennung einiger morphologischer Merkmale (nach Siewing 1985). Das Verzweigungsmuster der Radiärkanäle dient als taxonomisches Merkmal.

Neben den organismischen Parametern wurden außerdem ökologisch relevante Größen ermittelt: die geographische Herkunft und Entfernung, definiert durch Breiten- und Längengrad und die Einteilung der geographischen Regionen in Klimazonen. Der wichtigste Klimafaktor hierbei ist die Wassertemperatur, ein für die Auslösung der Strobilation determinierender Faktor für das Verbreitungsgebiet. Die gesamten Daten wurden Tests auf Unterschiede zwischen Polypenklonen (parametrische Varianz- und Mittelwertvergleiche ANOVA, nichtparametrische Rangsummentests Kruskal Wallis), Korrelationsverfahren zwischen einzelnen Variablen (Regression, Manteltest) und multivariaten Analysen (Hauptkomponentenanalyse) unterzogen. Die verwendeten Computerprogramme waren EXCEL (V 8, B. Gates), SYSTAT (V 5.2, Systat Inc.) und STATISTICA (V 4.3, StatSoft).

### 2.2.3 Molekulargenetische Methoden

#### *DNA-Isolation und Gelelektrophorese*

Die DNA-Extraktionsmethode (Dellaporta et al. 1983; Sambrook et al. 1989) wurde abhängig von der Probe gewählt. Zwei bis drei Lebendpolypen oder ethanolfixierte Polypen bzw. Medusengewebe (Gonaden und Schirmrand) wurden in 1 mL Homogenisationspuffer (100 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS) gewaschen. Alternativ wurde für das Medusengewebe ein CTAB-Puffer verwendet (100 mM Tris pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB w/v, 0.2% 2-Mercaptoethanol v/v). Das Gewebe wurde in 500 µL Puffer, versetzt mit Proteinase K (Endkonz.: 0.5 mg/L), homogenisiert und 30 min unter Schütteln bei 55°C inkubiert. Die Isolation der DNA von organischen Bestandteilen erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1). Die genomische DNA wurde mit 0.2 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2 Vol. 98%

Ethanol (im Fall der CTAB-Methode mit 2/3 Vol. Isopropanol) bei -20°C für 2h präzipitiert, anschließend zentrifugiert und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Die Resuspension der DNA und die Lagerung erfolgte in 50 µL *lowTE*-Puffer (1 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EDTA). Ein Teil der DNA-Probe wurde zur Abschätzung der DNA-Menge und -Qualität auf horizontalen Flachbettagarosegelen (1% Agarose, TBE-Laufpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA und 0.1 µg/mL Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem DNA-Längenstandard ( $\lambda$ HindIII) verglichen. Die elektrophoretische Trennung der DNA und die photographische Dokumentation (Polaroid) der Agarosegele unter UV-Lichtanregung ist das Standardverfahren aller nachfolgenden DNA-Visualisierungen (6 Volt/cm, 1.4-2% Agarose NEEO Roth, TBE-Laufpuffer, DNA-Längenstandards  $\lambda$ Hind III und 100 bp Leiter, Gibco BRL).

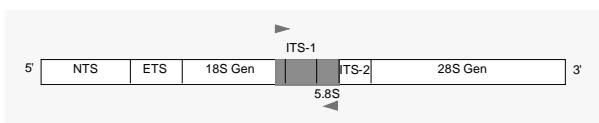
#### *PCR- und RFLP-Analyse*

Das Protokoll der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, Saiki et al. 1988) variierte locuspezifisch in der Wahl der Primer und deren Hybridisierungstemperatur (*Annealing*) mit der DNA-Vorlage. Der Standardreaktionsansatz aller PCR-Analysen beinhaltete in einem Gesamtvolumen von 25 µL: 1 x Amplifikationspuffer Gibco BRL, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dNTPs Boehringer Mannheim (BM), 3-5 pmol Primer, 0.5 U Taq DNA-Polymerase Gibco BRL und 1-10 ng DNA-Templat. Die Reaktion erfolgte im *GeneAmp* 9600 Thermozykler (Perkin Elmer Cetus) bei 3 min/93°C Vordenaturierung, 30-35 Zyklen jeweils 30s/90°C Denaturierung, 30s/50-55°C *Annealing*, 50s/72°C Polymerisierung und 5 min/72°C Elongation. Die Reinigung der PCR-Produkte von überschüssigen Primern und dNTPs erfolgte über eine DNA-Fällung bei Raumtemperatur mit 1 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2.5 Vol. Ethanol oder über Säulenreinigung (*Wizard PCR*

*Purification Kit*, Promega) bzw. Elution aus ausgeschnittenen Agarosegelstücken. Die unterschiedlichen Loci und Primer werden nachfolgend spezifiziert.

Locus 16S rDNA (mitochondriales Genom): L 5' GACTGTTTACCAAAAACATA und H 5' AACTCAAATCATGTAAG (Cunningham & Buss 1993). Diese für Cnidaria spezifischen Primer wurden einmalig verwendet, um ein Fragment am 3'-Ende der mitochondrialen ribosomalen großen Untereinheit (*Large Subunit*, LSU) eines Vertreters der Ohrenqualle zu sequenzieren. Die daraus abgeleiteten *Aurelia*-spezifischen Primer sind L 5' CTCTTGTAAGGTGAAGCC und H 5' CATAATTCAACATCGAGG mit einer *Annealing*-Temperatur von 51°C.

Locus ITS-1/5.8S rDNA (nukleäres Genom): Aus GenBank-Daten wurden für Scyphozoa spezifische Primer erstellt. Die Primer F 5' TAACAA GGTTTCCGTAGG hybridisieren am 3'-Ende der 18S rRNA (*Aurelia aurita*, GenBank Ac.-Nr. U19541) bzw. R 5' CTCAGACAGACATGCTCC am 3'-Ende der 5.8S rRNA (*Cyanea capillata*, GenBank Ac.-Nr. U65481) und umspannen die in Abb. 2.2.4 gezeigte Region ITS-1/5.8S rRNA. Die *Annealing*-Temperatur betrug 52°C.



**Abb. 2.2.4** Einheit der tandem-repetitierten RNA-Genfamilie. Die ribosomalen Gene 18S, 5.8S und 28S werden flankiert von den Regionen NTS (*Nontranscribed Spacer*), ETS (*External Transcribed Spacer*) und ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Der grau unterlegte Bereich zeigt die untersuchte DNA-Region.

pGEM T-Vektor (Plasmid DNA): Die Bakterienkolonie-PCR ermöglichte die Reamplifikation von klonierter DNA aus transformierten *E. coli*-Bakterien mittels den plasmidspezifischen Primern T7 5' TAATACGACTCACTATAGGG

und Sp6 5' ATTTAGGTGACACTATAGAATAC mit einer *Annealing*-Temperatur von 50°C.

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden gegebenenfalls zur weiteren Charakterisierung mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Ein resultierender **Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus** (RFLP, Lansman et al. 1981) zwischen zwei homologen DNA-Fragmenten weist auf genetische Variation bezüglich der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease hin. Der Restriktionsansatz erfolgte in 10 µL Gesamtvolumen mit 1 x Reaktionspuffer, 5-10 U Restriktionsenzym und  $\geq 50$  ng DNA nach Herstellerangaben (Eurogentec, BM).

### **Southern-Hybridisierung**

Die Hybridisierung markierter Gensonden gegen ein Gemisch von unbekanntem DNA-Fragmenten zeigt die Existenz von homologen Komplementärsequenzen an. Die zu analysierende DNA (z. B. gesamtgenomische Extrakte) wurde elektrophoretisch getrennt, *via* Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen (Southern 1975; Blotting-Puffer 20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0) und anschließend bei 120°C für 20 min fixiert. Die Hybridisierung mit einer PCR-synthetisierten Sonde (5' Digoxigenin- bzw. Biotin *end labeling* oder Dig-dUTP *internal labeling*, BM) erfolgte über Nacht bei 42°C in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 2% Blocking-Reagenz, 0.1% N-Laurylsarcosin, 0.02% SDS, 5 x SSC) nach Herstellerangaben (BM). Überschüssige Sonde wurde durch Waschen der Membran in 2 x SSC bei Raumtemperatur und 0.5 x SSC/0.1% SDS (2 x 15 min, 68°C) entfernt. Der Signalnachweis von DNA-gebundener Sonde konnte über ein Chemilumineszenzverfahren *via* alkalischer Phosphatase/Dig-Antikörperreaktion (*Dig Detection Kit*, BM) und Exposition auf Röntgenfilmen (Kodak) erbracht werden.

### **DNA-Klonierung**

Die PCR-Produkte des ITS-1/5.8S RNA-Locus und einiger 16S rDNA-Fragmente wurden zur Bereitstellung reiner (uniformer) Sequenzierem-plate kloniert. Jeweils 20 ng agarose-gereinigtes, säulengereinigtes oder 1 µL ungereinigtes PCR-Produkt wurden in 50 ng pGEM T-Vektor gemäß Herstellerangaben (Promega) ligiert. Die Transformation der Plasmide erfolgte in DH5α-*E. coli*-Bakterien. Das Ausplattieren der Zellen auf Agarplatten unter Zugabe von X-Gal (80 µg/mL) und IPTG (0.5 mM) ermöglichte die Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Bakterienkolonien. Alternativ zu gängigen Plasmidisolationsverfahren wurden die klonierten DNA-Fragmente mittels der Plasmidprimer T7 und Sp6 direkt vom Plasmid reamplifiziert. Dazu wurden rekombinante Bakterienkolonien gepickt, in 40 µL ddH<sub>2</sub>O für 5 min bei 100°C lysiert und zentrifugiert. Die Bakterienkolonie-PCR-Reaktion (Templateinsatz 5 µL Lysatüberstand, 30 PCR-Zyklen) wurde anschließend über eine Säulenreinigung für die DNA-Sequenzierung aufbereitet.

### **DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung (Sanger 1977) erfolgte jeweils an beiden DNA-Strängen eines Fragments gemäß den vom Hersteller empfohlenen PCR-Bedingungen. Die 16S rDNA-Produkte wurden mittels der 16S-spezifischen Primer über den Einbau biotinmarkierter Stoppnukleotide direkt sequenziert (*Biotin Sequencing Kit*, GATC). Klonierte und vom Plasmid reamplifizierte Fragmente (ITS-1/5.8S und einige 16S Proben) wurden mittels Dig-markierter T7 und Sp6 Primer sequenziert (*DIG Taq DNA Sequencing Kit*, BM). Die Auftrennung der dig- bzw. biotinmarkierten Sequenzfragmente erfolgte in 4% Polyacrylamidgelen (Roth) in einer *direct blotting electrophoresis*-Apparatur (DBE, GATC) bei ca. 1900

Volt Spannung und 30 Watt. Die auf Nylonmembranen (1 µm, GATC) transferierten DNA-Sequenzen wurden anschließend über eine Alkalische Phosphatase-Antikörperreaktion durch Blaufärbung visualisiert (*Dig Detection Kit*, BM; *SAP Detection Kit*, GATC). Ein Teil der vom Plasmid amplifizierten ITS-1/5.8S-Proben wurde mittels nichtmarkierter T7 und Sp6 Primer sequenziert und im Automatischen Sequenzer (ABI, Applied Biosystems) aufgetrennt.

### **2.2.4 DNA-Sequenzanalysen**

#### **DNA-Alignment**

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von CLUSTAL X (Thompson et al. 1994) mit unterschiedlich stringenten Parametern ausgerichtet und anschließend manuell editiert. Das Alignment der 16S rDNA-Sequenzen wurde auf Grundlage eines für *Aurelia* erstellten Sekundärstrukturmodells (Gutell et al. 1993, 1994) geprüft. Die Bestimmung variabler *Loop*-Regionen und konservierter *Stem*-Abschnitte bot ein Kriterium bezüglich der Verwendbarkeit unterschiedlicher Regionen in den phylogenetischen Analysen. Das Alignment der ITS-1/5.8S rDNA wurde manuell korrigiert: 1. Erstellen einer Karte konservierter und variabler Abschnitte, 2. Ausschluß der von konservierten Blöcken flankierten hochvariablen Regionen mit zweifelhafter Homologisierbarkeit bzw. mit Sequenzunterschieden > 50%, und 3. Verknüpfung der konservierten Domänen für die phylogenetischen Analysen.

#### **Phylogenetische Rekonstruktionsverfahren**

Die Häufigkeiten der verschiedenen Nukleotidsubstitutionen (Transversionen *versus* Transitionen) wurden über alle paarweisen Vergleiche in PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, \*and

Other Methods, V 4.0b4, Swofford 2000) ermittelt. Die paarweisen genetischen Distanzen wurden in PAUP\* auf Basis der beobachteten Sequenzdivergenz (proportionaler Anteil unterschiedlicher Nukleotidpositionen) unter Einbeziehung von Korrekturfaktoren errechnet. Diese berücksichtigen die Wahrscheinlichkeit multipler Substitutionereignisse pro Nukleotidposition und korrigieren die beobachtete Sequenzdivergenz auf einen höheren Wert (Übersicht in Page & Holmes 1998). Folgende Parameter sind relevant: 1. Übergangswahrscheinlichkeit einer Substitution (Substitutionsmodell, z. B. Jukes & Cantor 1969; *Two-parameter model*, Kimura 1980; *Generale Time Reversible-Modell*, Yang 1994) und 2. Substitutionswahrscheinlichkeit aufgrund der Verteilung invariabler und variabler Positionen (z. B. Gamma-Verteilung, Tamura & Nei 1993). Die Parameter wurden mittels einer Maximum-Likelihood-Analyse bestimmt (*Modeltest* V 3.0, Posada & Crandall 1998), in der aus 56 möglichen Substitutionsmodellen das den DNA-Sequenzdaten am besten angepaßte Modell geschätzt wurde (*likelihood ratio test*, Goldman 1993). Die Rekonstruktion der genealogischen Beziehungen zwischen den Populationen erfolgte mittels der Distanzmethode *Neighbor Joining* (NJ, Saitou & Nei 1987) sowie den diskreten, auf Merkmalstransformation basierenden Analysen Maximum Parsimonie (MP) und Maximum Likelihood (ML) (Felsenstein 1988; Hillis et al. 1993) in PAUP\*. Als Maß für die Unterstützung einzelner Kladen wurden 1000 (NJ, MP) bzw. 100 (ML) Pseudoreplikate des Datensatzes erstellt, reanalysiert und in einem Konsensusdiagramm dargestellt (*bootstrapping*, Felsenstein 1985). Die Wahl der Distanzberechnung in der NJ-Analyse sowie des Substitutionsmodelles für die ML-Analyse basierte auf Ergebnissen aus *Modeltest* (V 3.0). Eine stärkere Gewichtung kladistisch eindeutiger Merkmale gegenüber homoplasiebehafteten Nukleotidpositionen in der MP-Rekonstruktion erfolgte über

den *Rescaled Consistency-Index* (PAUP\*). Die Suche nach der bestangepaßten Baumtopologie erfolgte mittels der PAUP\*-Algorithmen *Branch & Bound* und 'heuristische Suche'.

Die genannten Verfahren bilden die genealogischen Beziehungen zwischen Taxa in Form dichotomer Verzweigungen ab und zeigen Konfliktgruppen als Polytomien im Baum. Demgegenüber erlaubt das *Split Decomposition*-Verfahren (Bandelt & Dress 1992) die Abbildung ähnlich wahrscheinlicher Splits (ein Split unterteilt die Taxa durch eine Kante in zwei Teilmengen) in Form von Parallelogrammen. Diese 'schwach kompatiblen' Splits zeigen Konfliktregionen innerhalb eines Datensatzes, deren phylogenetisches Signal in unterschiedliche Richtungen weist. Das Verfahren wurde eingesetzt um Rekombinationsereignisse zu ermitteln bzw. die genealogischen Beziehungen in Form eines Netzwerkes zu illustrieren (SplitsTree V 2.4, Huson 1998).

### **Statistische Datenanalyse**

Die DNA-Daten wurden auf Homogenität der Basenzusammensetzung zwischen Taxa ( $\chi^2$ -Test) sowie auf das Vorhandensein eines phylogenetischen Signals (g-Statistik, Hillis 1991) mit Hilfe von PAUP\* getestet. Topologische Unterschiede zwischen Baumrekonstruktionen der beiden untersuchten Loci wurden auf ihre Kongruenz geprüft (Rangsummentest, Templeton 1983). Die Erwartung neutraler Evolution (Kimura 1983) bezüglich der Art genetischer Variation wurde mittels des D-Tests (Tajima 1989) im Programm ARLEQUIN (V 2.0, Schneider et al. 2000) geprüft. Die Existenz einer konstanten Rate (*molecular clock*) wurde mit Hilfe eines Likelihood-Tests geprüft, welcher auf unterschiedliche log-Likelihoods von additiven *versus* ultrametrischen Baumrekonstruktionen testet (*Modeltest*, V 3.0). Über eine Kombi-



nation aus *Split Decomposition* und anschließendem Maximum Likelihood-Test nach Holmes et al. (1999) wurden die DNA-Daten auf das Vorkommen von genetischer Rekombination mit dem Programm LARD (*Likelihood Analysis of Recombination in DNA V 2.2*, Rambaut 1999) untersucht. Die Abschätzung populationsgenetischer Parameter ( $F_{ST}$ , Wright 1978; Hudson et al. 1992) und eine AMOVA-Varianzanalyse (*Analysis of Molecular Variance*, Excoffier et al. 1992) erfolgten mittels ARLEQUIN. Mittels eines Mantel-Tests (Mantel 1967) wurde auf eine Korrelation zwischen genetischer Distanz und geographischer Entfernung geprüft. Die Grundlage für diese Überlegung ist das von Wright (1943) postulierte *Isolation by Distance*-Modell, nach dem sich der Genfluß zwischen Populationen um das Ausmaß ihrer geographischen Entfernung reduziert. Die Beziehungen zwischen den Ergebnissen der Molekularanalyse und den morphologischen bzw. ökologischen Parametern wurden mittels Regressions-tests in STATISTICA durchgeführt.

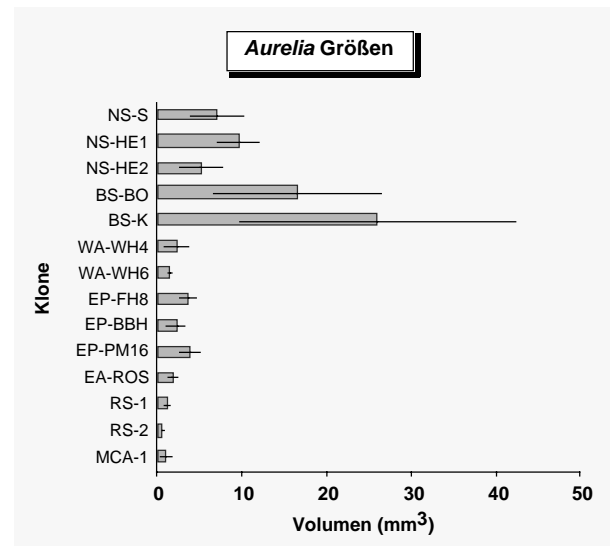
## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Organismische und ökologische Parameter

#### *Polypengröße*

Die Bestimmung des Volumeninhalts als Größenvariable der 14 untersuchten Polypenklone erfolgte jeweils vor der Fütterung, um vom Ernährungszustand unabhängige Ergebnisse zu erzielen. Die Abbildung 2.3.1 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen (10 Replikate mit jeweils 3-5 Polypen). Die ANOVA-Varianzanalyse verweist auf signifikante Unterschiede zwischen Klonen ( $F = 27.8$ ,  $p < 0.001$ ). Ein paar-weise durchgeführter Mittelwertvergleich (Tukey-Test für ungleiche Stichprobengröße,  $p < 0.05$ ) zeigte Größenunterschiede bei 100%

der Vergleiche mit den beiden Ostsee-klonen BS-BO und BS-K, sowie im Anteil von 65% der Vergleiche zwischen den Nordseeklonen NS-S, NS-HE1, 2 und den restlichen Klonen.



**Abb. 2.3.1** Größenvergleich von *Aurelia*-Polypen. Die Größenachse (Abszisse) zeigt das mittlere Volumen in  $\text{mm}^3$  bei Annahme eines Zylinders sowie die Standardabweichung (10 Messungen, jeweils 3-5 Polypen).

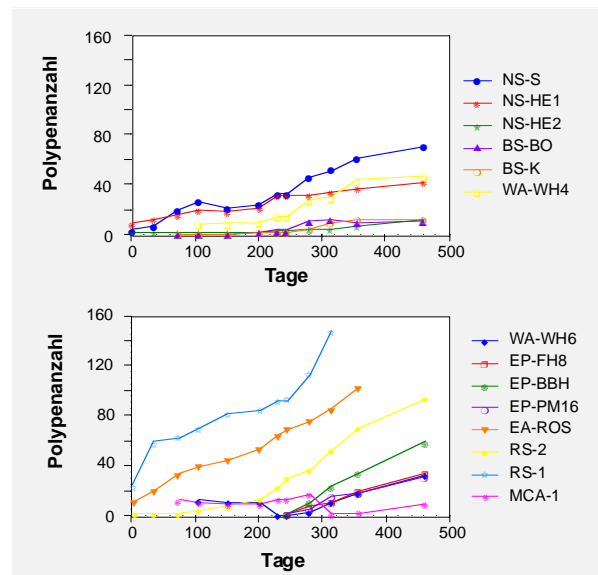
Eine Reduzierung der Faktorstufen durch Gruppierung individueller Klone in die geographischen Regionen Nordsee (NS-S, NS-HE1, 2), Ostsee (BS-BO, BS-K), USA-Atlantik (WA-WH4, 6), USA-Pazifik (EP-FH8, EP-BBH, EP-PM16), Ostatlantik (EA-ROS), Rotes Meer (RS-1, 2) und MCA-1 (Tabelle 2.2) läßt folgende Abhängigkeiten des Merkmals Polypengröße erkennen: *Aurelia*-Polypen der Ostsee sind deutlich größer im Vergleich aller anderen Regionen. Vertreter der Nordsee sind - mit Ausnahme des nicht signifikanten Vergleichs mit Polypen des Raumes USA-Pazifik - ebenfalls größer als die Polypen der restlichen Regionen. Faßt man die Regionen Nord- und Ostsee zusammen, ergibt sich eine tendenzielle Vergrößerung der Polypen der Ohrenqualle von wärmeren nach kühl-gemäßigteren, borealen Klimazonen (vgl. Abb. 2.2.2).

**Tabelle 2.2** Varianzanalyse zwischen den Polypenvolumina geographischer Regionen nach Tukey-Test. Die Diagonale gibt das mittlere Polypenvolumen ( $\text{mm}^3$ ) wider. Die mit \* gekennzeichneten Vergleiche sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.

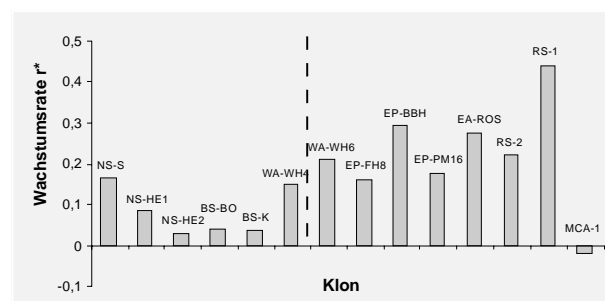
|                 | 1    | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
|-----------------|------|-------|------|------|------|------|------|
| 1. Nordsee      | 7.36 |       |      |      |      |      |      |
| 2. Ostsee       | *    | 20.98 |      |      |      |      |      |
| 3. USA-Atlantik | *    | *     | 1.86 |      |      |      |      |
| 4. USA-Pazifik  | ns   | *     | ns   | 3.17 |      |      |      |
| 5. EA-ROS       | *    | *     | ns   | ns   | 1.82 |      |      |
| 6. Rotes Meer   | *    | *     | ns   | ns   | ns   | 0.89 |      |
| 7. MCA-1        | *    | *     | ns   | ns   | ns   | ns   | 1.02 |

### Dichteentwicklung der Polypen

Die 14 lebend untersuchten Polypenklone wurden unter identischen Hälterungsbedingungen über einen Zeitraum von 470 Tagen gezüchtet um die klonale Vermehrungsrate zu bestimmen. Der Startzeitpunkt war nicht in allen Fällen gleich, so daß einige Klone über einen kürzeren Zeitraum verfolgt wurden, die Zählungen ( $N = 8-12$ ) erfolgten jedoch immer synchron. Die Wachstumskurven wurden visuell unterteilt in Klone, deren Dichteentwicklung relativ flach ist und sich auf ein Plateau ohne nennenswerten Zuwachs einstellt (Abb. 2.3.2 oben) und in Klone mit relativ steiler Entwicklung und höheren Individuenzahlen (Abb. 2.3.2 unten). Eine Ausnahme bildet der MCA-1-Klon, dessen Kultur mehrfach katastrophenartig zusammenbrach. Aus encystierten Polypenresten, ähnlich der natürlichen Podocystenbildung bei Polypen, konnte sich die Kultur jeweils wieder etablieren. Vermutlich war die zu niedrige Hälterungstemperatur von  $19-20^\circ\text{C}$  die Ursache für die stark fluktuierende Entwicklung dieses tropischen *Aurelia*-Klons. In Abbildung 2.3.3 sind die aus dem Verlauf der Dichtekurven abgeleiteten mittleren momentanen Wachstumsraten illustriert. Eine Varianzanalyse (Kruskal-Wallis Rangsummentest,  $p < 0.01$ ) impliziert unterschiedliche Raten zwischen den Klonen. Die dargestellte Gruppierung der Klone in Zuwachsraten niedrig und hoch (Abb. 2.3.3) ist signifikant (Mann-Whitney U,  $p < 0.01$ ).



**Abb. 2.3.2** Dichtewachstum von 14 *Aurelia*-Klonen. Die Klone sind unterteilt in relativ flache (oben) und steile (unten) Dichtekurven.



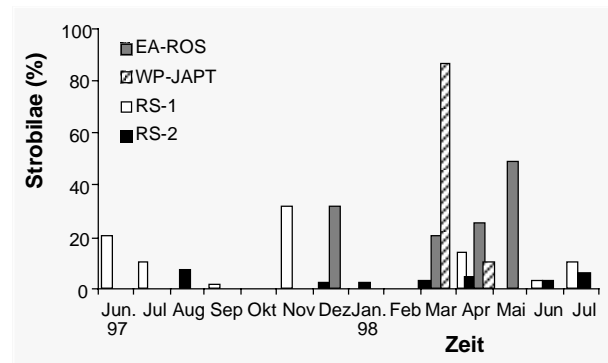
**Abb. 2.3.3** Durchschnittliche momentane Wachstumsraten ( $r^*$ ) von 14 *Aurelia*-Klonen über einen Zeitraum von 470 Tagen. Die gestrichelte Linie teilt die Klone in niedrige und hohe Zuwachsraten ein (mit Ausnahme von MCA-1, s. Text).

Vergleicht man die beiden Merkmale Polypengröße und Dichtewachstum zeigt sich eine negative Beziehung zwischen beiden Variablen ( $r = -0.66$ ), die größten Polypen (Nord- und Ostsee) zeichnen sich durch langsames Dichtewachstum und Erreichen einer Plateauphase aus. Die erhobenen Daten am Polypenstadium weisen auf eine große phänotypische Variabilität verschiedener Populationen der Ohrenqualle hin. Die Beziehung zu ökologischen und geographischen Mustern wird im Abschnittsende (Tabelle 2.5) gezeigt.

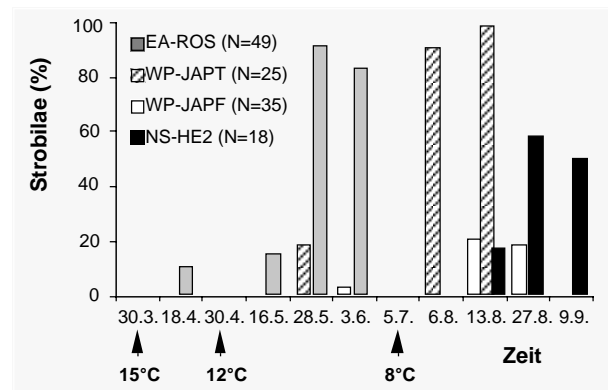
### Strobilation

Unter Berücksichtigung der Temperaturinduzierbarkeit wurde die Strobilationsrate unter konstanten Laborbedingungen (19-20°C) und nach Temperaturabsenkung bestimmt (Anteil von Strobilae in % *versus* der Gesamt-Polypenzahl pro Schale). Von 16 untersuchten Klonen strobilierten 4 Klone bei der Temperatur von 19-20°C. Diese zeigten zwei unterschiedliche jahreszeitliche Muster (Abb. 2.3.4A): die beiden Klone vom Roten Meer (RS-1, 2) lassen keine jahreszeitliche Abhängigkeit erkennen. Der EA-ROS-Klon (Atlantik/Roscoff) erreichte zwei Maxima im Dezember und von März bis Mai. Der japanische Klon (WP-JAPT) erreichte ausschließlich im Frühjahr ein Maximum, allerdings zeitlich etwas früher gegenüber EA-ROS. Diese beiden Klone lassen sich demzufolge als saisonale 'Strobilierer' klassifizieren. Nach sukzessiver Temperaturabsenkung von 15°C, 12°C auf 8°C wurde die Strobilation eines weiteren Klons aus Japan (WP-JAPF) und eines Klons aus der Nordsee (NS-HE2) induziert (Abb. 2.3.4B). Die 'saisonalen' Polypen EA-ROS und WP-JAPT reagierten mit einer nahezu vollständigen Strobilation auf die Temperatursenkung bei 12°C, bzw. 8°C mit einer Reaktionszeit von etwa einem Monat.

A)



B)



**Abb. 2.3.4** A) Jahreszeitlicher Verlauf der Strobilation (in % der Individuenzahl) bei 19-20°C. B) Strobilationsinduktion nach Temperatursenkung auf 15°C, 12°C und 8°C.

Die Reaktion der Klone WP-JAPF und NS-HE2 erfolgte erst bei 8°C nach einer Zeit von 1.5-2 Monaten und zeigten eine verminderte Induzierbarkeit. Die Ergebnisse demonstrieren direkte Abhängigkeiten der Strobilation sowohl von der Jahreszeit als auch von der Temperatur im Vergleich verschiedener Klone ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0.05$ ). Diese ökologisch bedingte Differenzierung ist sowohl lokal (die beiden Japan-Klone) als auch global, z. B. Rotes Meer *versus* Nordsee nachzuweisen.

### *Strobila- und Ephyrenmerkmale*

Die Ephyrenmerkmale der Klone NS-HE2, EA-ROS, WP-JAPT, RS-1 und RS-2 beruhen auf eigenen Beobachtungen. Diese werden zusammen mit Daten von Herrn Gerhard Jarms in Tabelle 2.3 als Mittelwerte (N = 10-80) zusammengefaßt (die Nomenklatur bleibt erhalten, da einige Klone ursprünglich von Herrn Jarms stammen; der Klon Kal\* stammt von der kalifornischen Pazifikküste). Die Merkmale der Strobilae und Ephyren sind:

- 1) Anzahl der Saisons (Jahreszeiten) in denen Strobilation beobachtet wird,
- 2) Induktion der Strobilation durch Kaliumiodid (ja = 1, nein = 0),

3) Temperatur in °Celsius ab der eine Strobilation induziert wird (beobachtet, bzw. von dem Zeitpunkt der natürlichen Strobilation und Klimadaten abgeleitet),

4) Ephyrenanzahl pro Strobila,

5) äußerer Ephyrendurchmesser D nach Ablösung in mm,

6) Ephyrenfarbe (1 = weiß durchsichtig, 2 = weiß/bräunlich, 3 = gelbbraun, 4 = rotbraun)

7) Ephyrenbeweglichkeit (1 = träge, 2 = mittel, 3 = schnell).

**Tabelle 2.3** Strobila- und Ephyrenmerkmale von *Aurelia*-Klonen. Die Daten der Klone NS-HE2, EA-ROS, RS-1, RS-2 und WP-JAPT entstammen eigenen Beobachtungen, die Merkmale der anderen Klone wurden von Herrn G. Jarms und P. Mosconie (MCA-1) ermittelt (\*= nicht näher spezifizierter Klon aus Kalifornien; \*\*= Angaben von Jarms; - = fehlende Daten).

|                            | NS-S | NS-HE1 | NS-HE2 | BS-BO | BS-K | EA-ROS | WP-JAPT | RS-1 | RS-2 | MCA-1 | Kal* |
|----------------------------|------|--------|--------|-------|------|--------|---------|------|------|-------|------|
| 1) Strobilationshäufigkeit | 1    | 1      | 1      | 1     | 1    | 2      | 1/2**   | 4    | 4    | 4     | -    |
| 2) KJ-Induktion            | 0    | 0      | 0      | 0     | 0    | 1      | -       | 1    | 1    | 1     | -    |
| 3) Strobilationstemperatur | 4-8  | 4-8    | 8      | 4     | 4    | 15     | 15      | 19   | 19   | 24    | -    |
| 4) Ephyren/Strobila        | 16   | -      | 16     | 3     | 5    | 16     | 14      | 6    | 6    | -     | 5    |
| 5) Ephyrendurchmesser      | 2.7  | 3.6    | 2.9    | -     | -    | 3.2    | 2.6     | 2.5  | 2.1  | -     | 3.3  |
| 6) Ephyrenfarbe            | 1    | 1      | 1      | 2     | 2    | 4      | 4       | 3    | 3    | -     | 4    |
| 7) Ephyrenbeweglichkeit    | 1    | 1      | 1      | 1     | 1    | 2      | 2       | 3    | 3    | -     | 2    |

### *Wechselseitige Beziehungen organischer und ökologischer Parameter*

Die Tabelle 2.4 zeigt die wechselseitigen Abhängigkeiten aller untersuchten organismischen Parameter mittels einer Korrelationsmatrix (Pearson-Korrelationskoeffizient). Die Werte wurden vorab standardisiert, um eine gleiche Gewichtung (z. B. bei der numerischen Kodierung der Ephyrenfarbe)

zu gewährleisten. Die Ephyrenmerkmale Anzahl pro Strobila und Durchmesser zeigen keine signifikanten Beziehungen zu anderen organismischen Parametern. Im Gegensatz dazu weist die Wachstumsrate der Polypen durchweg starke Abhängigkeiten gegenüber Merkmalen aller Lebenszyklusstadien auf.

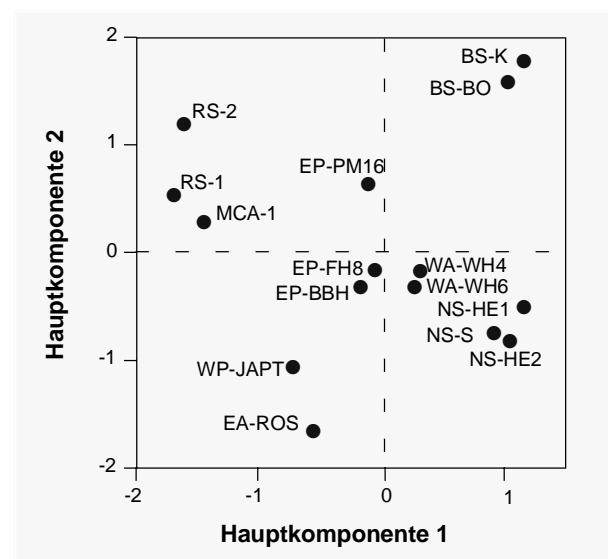
**Tabelle 2.4** Korrelationsmatrix zwischen standardisierten organismischen Parametern: 1. Polypen-Wachstumsrate, 2. Polypenvolumen, 3. Kaliumiodidinduktion, 4. Anzahl Jahreszeiten in denen Strobilation eintritt, 5. Temperatur bei Strobilation, 6. Anzahl Ephyren pro Strobila, 7. Ephyrendurchmesser, 8. Ephyrenfarbe, 9. Ephyrenbeweglichkeit (ns = nicht signifikant).

|                            | Polyp |       | Strobila |      |      |    | Ephyren |      |   |
|----------------------------|-------|-------|----------|------|------|----|---------|------|---|
|                            | 1     | 2     | 3        | 4    | 5    | 6  | 7       | 8    | 9 |
| 1. Wachstumsrate           | -     |       |          |      |      |    |         |      |   |
| 2. Volumen                 | -0.67 | -     |          |      |      |    |         |      |   |
| 3. KJ-Induktion            | 0.78  | ns    | -        |      |      |    |         |      |   |
| 4. Strobilationsrate       | 0.75  | ns    | 0.86     | -    |      |    |         |      |   |
| 5. Strobilationstemperatur | 0.81  | -0.67 | 0.92     | 0.94 | -    |    |         |      |   |
| 6. Ephyren/Strobila        | ns    | ns    | ns       | ns   | ns   | -  |         |      |   |
| 7. Ephyrendurchmesser      | ns    | ns    | ns       | ns   | ns   | ns | -       |      |   |
| 8. Ephyrenfarbe            | 0.68  | ns    | 0.9      | ns   | 0.76 | ns | ns      | -    |   |
| 9. Ephyrenbeweglichkeit    | 0.85  | -0.66 | 0.9      | 0.92 | 0.87 | ns | ns      | 0.71 | - |

Folgende Beziehungen sind hervorzuheben: hohe Polypen-Wachstumsraten korrelieren mit hoher Lokomotion der Ephyren; große Polypen strobilieren bei niedrigen Temperaturen; hohe Strobilationstemperaturen bedingen eine Induzierbarkeit durch Kaliumiodid sowie eine mehrmalige Strobilation im Jahresverlauf; die Färbung variiert in Abhängigkeit von der Beweglichkeit der Ephyren.

Die Variabilität zwischen Klonen bezüglich der 9 organismischen Parameter wurde mittels einer Hauptkomponentenanalyse auf zwei Komponenten reduziert, um eine Gruppierung der einzelnen Klone in einer zweidimensionalen Ebene zu erreichen. Die Abbildung 2.3.5 zeigt zwei Hauptkomponenten die 74% der Variation aller Variablen erklären. Die Hauptkomponente 1 beschreibt 59% und die 2. Hauptkomponente 15% der Gesamtvariation. Die enge Gruppierung der Klone mit gleicher geographischer Herkunft zeigt, daß die erhobenen organismischen Parameter relativ gute Vorhersagen bezüglich der phänotypischen Unterscheidung der *Aurelia*-Klone erlauben. Der Gradient, der durch die 1. Komponente von positiven nach negativen Werten beschrieben wird, kann z. B. auf geographisch bedingte Größenreduktion, aber auch durch klimatisch korrelierte Parameter

erklärt werden. Zur Klärung des Einflusses von Umweltfaktoren wurden die organismischen Merkmale der untersuchten *Aurelia*-Klone auf eine Abhängigkeit zu den Umweltvariablen Breitengrad und Wassertemperatur der Wintersaison (0-10 m Tiefe, aus <http://ingrid.ldgo.columbia.edu/SOURCES/.LEVITUS94>) untersucht. Eine Beziehung zur geographischen Entfernung konnte nicht nachgewiesen werden. Entsprechend sind die Be-



**Abb. 2.3.5** Hauptkomponentenanalyse der 9 untersuchten organismischen Variablen (s. Text). Die 1. Hauptkomponente beschreibt 59%, die 2. Hauptkomponente 15% der beobachteten Gesamtvariabilität. Eine enge Gruppierung von Klonen gleicher geographischer Herkunft wird deutlich.

ziehungen zwischen den organismischen Größen und den Umweltfaktoren als klimatische Abhängigkeiten zu interpretieren (Tabelle 2.5, multiple Regression). Während die Polypenparameter Wachstumsrate und Größe eine mittelstarke Abhängigkeit zum Faktor Klima aufweisen, zeigen die Parameter KJ-Induzierbarkeit, jährliche Häufigkeit der Strobilation und deren Temperaturinduzierbarkeit sowie die Ephyrenbeweglichkeit eine

starke Abhängigkeit von klimatischen Gegebenheiten. Vor allem die Strobilationshäufigkeit sowie die Auslösetemperatur der Strobilation bieten mit Werten von  $R^2 = 0.95$  bzw.  $0.9$  präzise Vorhersagekriterien für die Zuordnung von *Aurelia*-Klonen zum jeweiligen klimatischen Habitat. Die Häufigkeit und Auslösetemperatur der Strobilation sind dabei negativ korreliert mit dem Breitengrad und positiv abhängig von der Wassertemperatur.

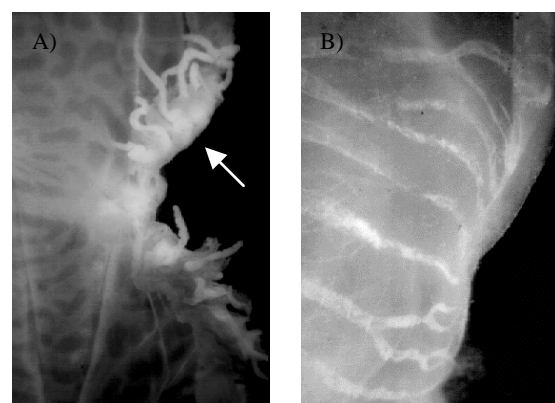
**Tabelle 2.5** Signifikante Abhängigkeiten organismischer Parameter von den Umweltfaktoren Breitengrad und Wassertemperatur (Winter) der jeweiligen Herkunftsorte der untersuchten *Aurelia*-Klone ( $R$  = Korrelationskoeffizient,  $R^2$  = Determinierungskoeffizient,  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit).

|                                   | <b>R</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>p</b> |
|-----------------------------------|----------|----------------------|----------|
| Polyp-Wachstumsrate               | 0.67     | 0.45                 | = 0.025  |
| Polyp-Volumen                     | 0.61     | 0.38                 | = 0.050  |
| KJ-Induktion                      | 0.86     | 0.74                 | < 0.001  |
| Strobilationshäufigkeit (Saisons) | 0.97     | 0.95                 | < 0.001  |
| Strobilationstemperatur           | 0.95     | 0.90                 | < 0.001  |
| Ephyrenbeweglichkeit              | 0.87     | 0.77                 | < 0.001  |

### Medusenmerkmale

Ergänzend zu den bisher vorgestellten Daten wurden am Medusenstadium einige charakteristische Merkmale verglichen. Die in Ethanol fixierten Medusen vom Nord-Westpazifik (WP-Limbata\*) und des Persischen Golfs (IO-DUB1) waren ausreichend gut erhalten, um das Verzweigungsmuster der Radiärkanäle sowie die Färbung zu bestimmen. Das Kanalsystem der Limbata\*-Meduse (Abb. 2.3.6A) ist im Vergleich zu IO-DUB1 (Abb. 2.3.6B) anastomisierend verzweigt und weist am Schirmrand ungleich mehr Dichotomien auf. Die Marginaltentakel und der Schirmrand (Pfeil) sind braun gefärbt, während die IO-DUB1-Meduse einen farblosen Randbereich besitzt. Im Gegensatz dazu ist die Schirmfärbung der Meduse vom Persischen Golf violett-rötlich, während die von Limbata\* weißlich durchsichtig erscheint. Die beiden Merkmale Kanalverzweigung und Braunfärbung des Randbereichs sind die in der Literatur genannten Unterscheidungsmerk-

male zur taxonomischen Abgrenzung der Spezies *A. limbata* von *A. aurita* (Kramp 1961). Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Individuum WP-Limbata\* aus dem Westpazifik nördlich von Japan kann entsprechend der genannten phänotypischen Merkmale als *A. limbata* angesprochen werden.

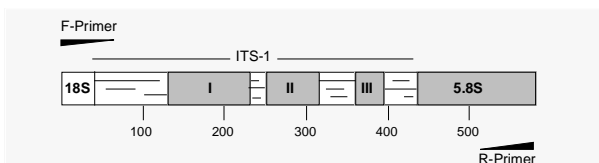


**Abb. 2.3.6** Ausschnitt des Schirmrandbereichs der Medusen WP-Limbata\* (A) und IO-DUB1 vom Persischen Golf (B). Die Radiärkanäle von WP-Limbata\* sind stärker verzweigt und anastomisieren. Der Bereich des Schirmrands und der Marginaltentakel (Pfeil) ist braun gefärbt, während er bei der Meduse vom Persischen Golf farblos ist.

### 2.3.2 Analyse der ITS-1/5.8S rDNA

#### Merkmale der DNA-Region

Die Amplifikation der ITS-1/5.8S DNA-Region war mittels des von *Cyanea capillata* abgeleiteten *Reverse*-Primers erfolgreich. Insgesamt wurden 54 *Aurelia*-Individuen und eine *C. capillata* Probe untersucht, die mit 72 DNA-Sequenzen charakterisiert wurden. Entsprechend beinhaltet jede 4. Probe wenigstens zwei verschiedene Kopien dieser DNA-Region, welches die Klonierung der PCR-Produkte erzwang. Die untersuchte Region umfaßt das 5.8S rRNA-Gen, das mit Ausnahme zweier Allele (146 bp) längenkonstant war (150 bp), und die ITS-1-Region, die neben konservierten Blöcken (I-III, Abb. 2.3.7) mehrere hochvariable Bereiche zeigt. Die Längenvariabilität dieser Regionen ist die Ursache für die Längenvariation des gesamten Locus von 432-513 Nukleotidpositionen (nt). Das DNA-Alignment umfaßt 587 Positionen (siehe Anhang 1.1). Nach Ausschluß des 3'-Endes der 18S-Region sowie der durch Mikrosatelliten und nicht homologisierbare Positionen hochvariablen Bereiche wurde für die weiteren Analysen ein reduziertes Alignment von 354 nt (Domänen I-III und 5.8S RNA) verwendet.

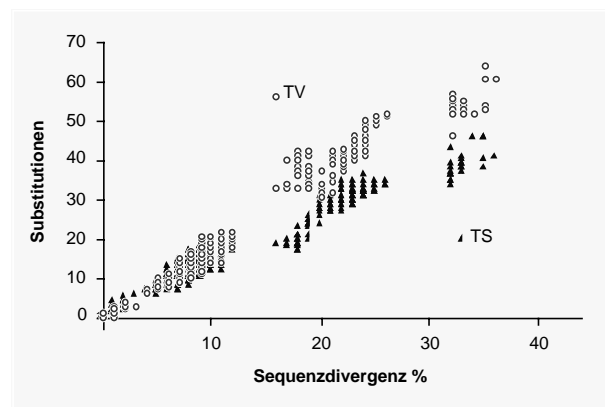


**Abb. 2.3.7** Schema der ITS-1/5.8S RNA-Region mit Positionsangaben und Primerbindungsstellen. Von insgesamt 587 nt wurden die konservierten Domänen I-III sowie die 5.8S rDNA für die Sequenzanalysen zu einem 354 nt umfassenden Fragment zusammengefügt. Linien zwischen den konservierten Domänen zeigen längenvariante Bereiche an.

#### Substitutionsmuster

Die Basenkomposition des reduzierten Datensatzes setzt sich, gemittelt über alle Taxa, zusammen aus 24.2% für Adenin, 21.8% für Cytosin, 24.7%

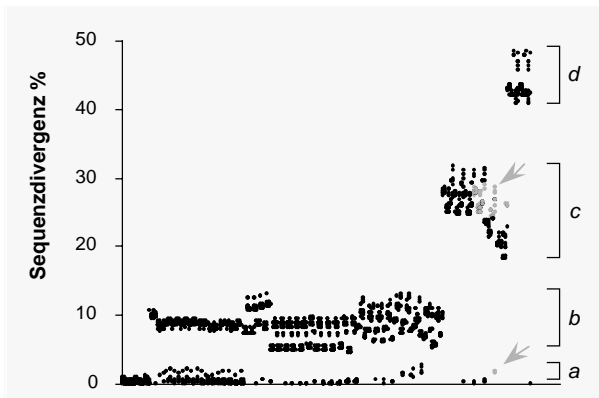
für Guanin und 29.2% für Thymin. Der relativ hohe GC-Anteil von 46% ist homogen über alle Taxa verteilt ( $\chi^2$ -Test) und vermutlich bedingt durch die Analyse ausschließlich konservierter *Stem*-Bereiche. Die Beziehung zwischen den beiden Substitutionstypen Transversion (TV) und Transition (TS) mit der beobachteten Sequenzdivergenz kann das Eintreten von Sättigung mit zunehmender Sequenzdivergenz aufzeigen (Avice 1994). Die Abbildung 2.3.8 veranschaulicht dies für die Transitionen, deren Kurve im Bereich von 20-30% Divergenz gegenüber den linear ansteigenden Transversionen flacher wird. Das durchschnittliche TS/TV-Verhältnis beträgt 0.89. Transitionen sind aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur der beteiligten Basen häufiger zu erwarten. Entsprechend kann ein TS/TV-Wert von  $\leq 1$  anzeigen, daß ein Teil der Transitionen als Rück- und Parallelmutationen nicht mehr beobachtbar sind. Das Substitutionsmuster ist durch nicht gesättigte und daher phylogenetisch eindeutige Transversionen charakterisiert; bezüglich der Transitionen ist bei Divergenzen über 15-20% aufgrund eines TS/TV-Verhältnis  $< 1$  mit multiplen Substitutionen und Homoplasie zu rechnen. Entsprechende Korrekturfaktoren müssen für die phylogenetischen Rekonstruktionen gewählt werden (Miyamoto & Cracraft 1991).



**Abb. 2.3.8** Nukleotidsubstitutionen des ITS-1/5.8S-Locus. Die beobachteten Transversionen (TV) und Transitionen (TS) sind gegen die Sequenzdivergenz über alle Paarvergleiche aufgetragen.

### Genetische Diversität

Der Plot der paarweisen Distanzen zwischen allen DNA-Sequenzen gewährt einen Überblick über das Muster der genetischen Beziehungen (Abb. 2.3.9). Die Sequenzdivergenzen sind nach vier Kategorien (a-d) strukturiert. Die Kategorie a ist relativ homogen und erreicht Werte von 0-3.5%. Die Mehrheit aller Paarvergleiche befindet sich in der Kategorie b innerhalb eines Bereichs von 5-13% Sequenzdivergenz. Die Divergenzen der Kategorie c (20-32%) beinhalten die Vergleiche zwischen 7 *versus* den restlichen 50 Individuen, während bei der Kategorie d (42-48%) lediglich noch zwei extrem divergente Allele beteiligt sind (diese beiden Allele wurden in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt, da eine Pseudogenamplifikation nicht auszuschließen ist). Eine weitere Besonderheit der Ohrenqualle ergibt sich aus den Vergleichen zwischen *Aurelia* und der Außengruppe *Cyanea capillata* (Abb. 2.3.9, graue Punkte mit Pfeil). Die Paarvergleiche in Kategorie a repräsentieren die genetischen Distanzen zwischen *Cyanea* und 5 *Aurelia*-Individuen, welche mit ca. 3% Sequenzdivergenz einem intraspezifischen Niveau entsprechen.

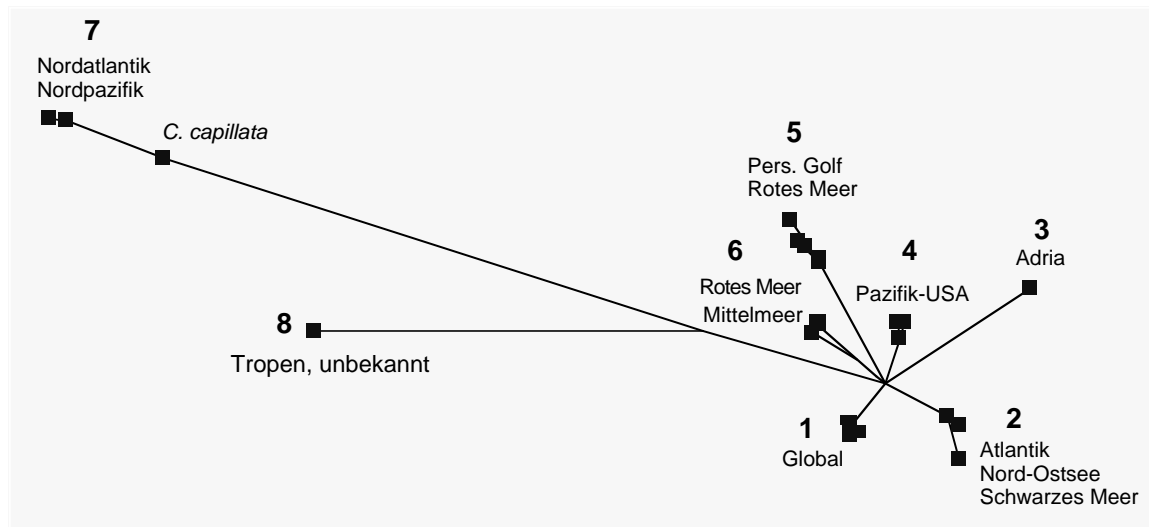


**Abb. 2.3.9** Sequenzdivergenzen zwischen allen beobachteten Allelen der ITS-1/5.8S Region. Die Paarvergleiche sind nach 4 Kategorien (a-d) eingeteilt. Die grau markierten Punkte und Pfeile sind Vergleiche zwischen *C. capillata* und 5 *Aurelia*-Individuen in Kategorie a, sowie die Vergleiche zu den restlichen *Aurelia*-Individuen in Kategorie c.

Im Gegensatz dazu weisen die Paarvergleiche zwischen *Cyanea* und den Allelen der restlichen *Aurelia*-Individuen aus Kategorie c nahezu die größten Werte innerhalb der Gesamtanalyse auf. Die 72 DNA-Sequenzen wurden durch den Ausschluß identischer Sequenzen sowie der beiden erwähnten divergenten Allele auf 50 Allele reduziert. Die Sequenzdivergenzen zwischen diesen repräsentativen Allelen sind in Abbildung 2.3.10 nach geographischer Verbreitung in Form eines ungewurzelten NJ-Phylogramms dargestellt. Die Endknoten repräsentieren die Individuen und Allele der Kategorie a, während die Äste den Distanzen der Kategorie b und c entsprechen. Das Diagramm zeigt 8 genetisch distinkte Linien, wobei keine signifikante Korrelation zwischen genetischer und geographischer Distanz auftritt. Entsprechend werden diese Gruppen in allen folgenden Analysen ungeachtet ihrer geographischen Zusammensetzung als nachfolgend benannte Linien angesprochen:

1. UBI: global, ubiquitär verbreitet im Mittelmeer, Indischer Ozean, Pazifik und Atlantik
2. BOR: gemäßigt/borealer Atlantik, Nord- und Ostsee sowie Schwarzes Meer
3. MKL: 4 Individuen aus einem marinen Seensystem der kroatischen Adria (Mljet)
4. LAB: Pazifikküste der USA inklusive einer als *A. labiata* charakterisierten Probe
5. ARAB: entlang der arabischen Halbinsel (Rotes Meer und Persischer Golf)
6. TET: zwei Individuen aus Mittelmeer und Rotem Meer
7. LIM: boreal/polar verbreitet im Nordatlantik (Island) und einer als *A. limbata* charakterisierten Probe aus dem Nordpazifik (Japan)
8. MCA: repräsentiert durch die Probe MCA-1 mit unbekannter tropischer Herkunft.





**Abb. 2.3.10** Unge wurzeltes NJ-Phylogramm (unkorrigierte Sequenzdivergenz). Das Phylogramm zeigt 8 distinkte genetische Linien und deren geographische Verbreitung sowie die Außengruppe *Cyanea*.

Die Variabilität innerhalb einer genetischen Linie wurde mittels der Alleldiversität  $h = 1 - \sum f_i^2$  durch die Frequenz ( $f$ ) der Allele ( $i$ ) errechnet (Tabelle 2.6). Mit Werten von 0.83-1 sind auffällig hohe Diversitäten zu beobachten, wobei die Unterschiede zwischen Allelen hauptsächlich durch eine oder zwei Nukleotidsubstitutionen bzw. kurzen Wiederholungssequenzen verursacht werden. Beispielsweise führt die Existenz eines Mikrosatelliten zwischen Position 61-131 (TACA)<sub>5-8</sub> zu 5 verschiedenen Allelen der LAB-Linie. Die Diskrepanz zwischen einerseits hoher Alleldiversität und andererseits geringer genetischer Distanz innerhalb der Linien (Tabelle 2.7) wurde mittels eines D-Test auf Abweichung von 'Neutraler genetischer Variation' untersucht.

Der Test beruht auf der unterschiedlichen Abschätzung des Mutationsparameters  $\theta$ , der die genetische Variation auf die effektive Populationsgröße und die Mutationsrate des untersuchten Locus zurückführt. Der Vergleich der beiden  $\theta$ -Schätzungen, basierend auf der durchschnittlichen paarweisen Divergenz und basierend auf der durchschnittlichen Anzahl polymorpher Nukleotidpositionen, liefert die D-Statistik (Tajima 1989). Die Tabelle 2.6 zeigt für die UBI-Linie ein Abweichen von Neutralität und verweist potentiell auf das Wirken von Selektion.

**Tabelle 2.6** Allelzahl und Alleldiversität  $h$  (587 nt) der 8 Linien der Ohrenqualle. Die Abweichung von 'Neutraler genetischer Variation' (Tajima D-Test) für die UBI-Linie kann auf den Einfluß von Selektion zurückgeführt werden (ns = nicht signifikant).

|                     | BOR  | UBI               | TET  | MKL  | LAB  | ARAB | LIM  | MCA |
|---------------------|------|-------------------|------|------|------|------|------|-----|
| Allelzahl N         | 19   | 19                | 2    | 4    | 11   | 7    | 5    | 1   |
| Alleldiversität $h$ | 0.93 | 0.87              | 1.00 | 0.83 | 0.96 | 1.00 | 0.90 | -   |
| Tajima's D          | ns   | -2.2, $p < 0.001$ | ns   | ns   | ns   | ns   | ns   | ns  |

Die Berechnung der genetischen Distanz zwischen den Linien basierte ausschließlich auf den konservierten Domänen (354 nt), sie unterschätzt demzufolge das absolute Ausmaß der Variabilität. Die Korrektur multipler Substitutionen erfolgte mittels des HKY-Modells (Hasegawa et al. 1985) mit ungleichen Basenhäufigkeiten und zwei Substitutionstypen (TS und TV). Unter Einbeziehung einer unterschiedlichen Verteilung variabler Positionen durch Einführung des Gamma-Parameters  $\alpha$  (Tamura & Nei 1993) wurde die genetische Distanz zwischen Allelen mit  $TS/TV = 0.89$  und  $\alpha =$

0.29 errechnet. Die in Tabelle 2.7 gezeigten mittleren genetischen Distanzen zwischen den 8 Linien sind mit 0.057 bis 0.660 (5-30% Sequenzdivergenz) ungleich höher als die innerhalb der Linien (0.005-0.028). Die Linien aus warm-tropischen Regionen, TET und ARAB, weisen bezüglich der Allel-diversität und Distanz innerhalb der Linien die größte Diversität auf. Die Distanz zwischen LIM und *Cyanea* liegt mit 0.045 (3.4%) in der Größenordnung innerhalb von Linien.

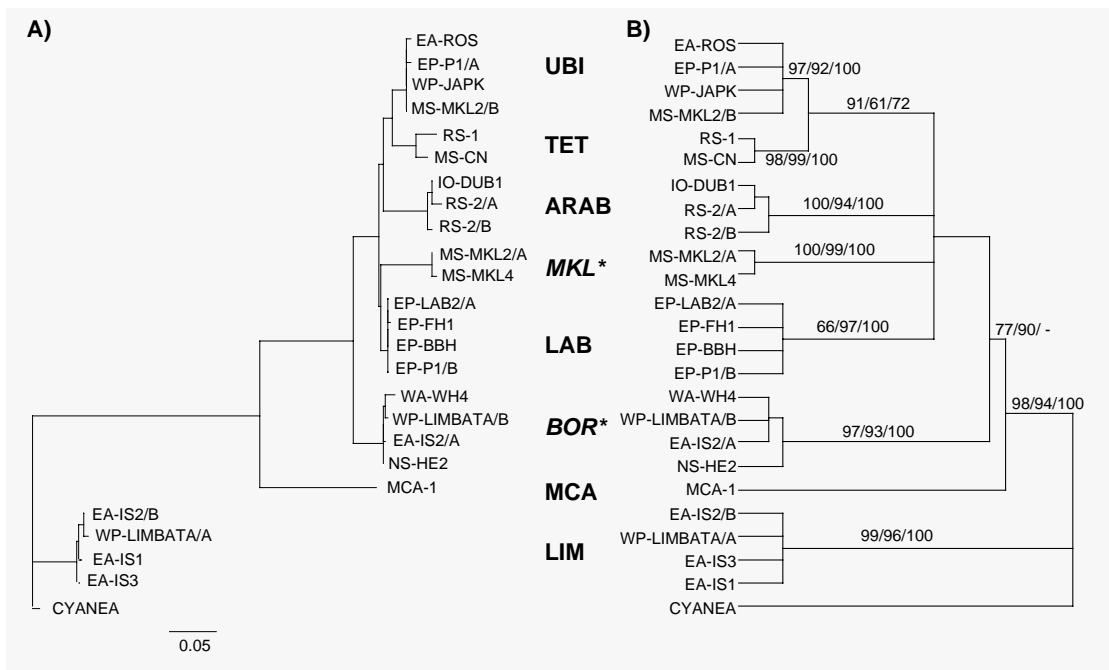
**Tabelle 2.7** Mittlere genetische Distanzwerte innerhalb (Diagonale) und zwischen 8 Linien der Ohrenqualle. Zusätzlich ist die Distanz der Linie LIM zu *Cyanea* gezeigt.

|               | <b>BOR</b> | <b>UBI</b> | <b>TET</b> | <b>MKL</b> | <b>LAB</b> | <b>ARAB</b> | <b>MCA</b> | <b>LIM</b> |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| <b>BOR</b>    | 0.008      |            |            |            |            |             |            |            |
| <b>UBI</b>    | 0.110      | 0.002      |            |            |            |             |            |            |
| <b>TET</b>    | 0.131      | 0.072      | 0.035      |            |            |             |            |            |
| <b>MKL</b>    | 0.155      | 0.098      | 0.144      | 0.009      |            |             |            |            |
| <b>LAB</b>    | 0.114      | 0.057      | 0.089      | 0.087      | 0.003      |             |            |            |
| <b>ARAB</b>   | 0.135      | 0.102      | 0.130      | 0.164      | 0.083      | 0.028       |            |            |
| <b>MCA</b>    | 0.350      | 0.347      | 0.358      | 0.389      | 0.295      | 0.346       | -          |            |
| <b>LIM</b>    | 0.479      | 0.569      | 0.600      | 0.586      | 0.534      | 0.663       | 0.508      | 0.005      |
| <i>Cyanea</i> | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -          | 0.045      |

### *Genealogische Rekonstruktion*

Eine Clusteranalyse über den gesamten Datensatz führte zur Typisierung aller Individuen bzw. Allele in eine entsprechende genetische Linie (siehe Anhang 1.3). Die Reduzierung des Datensatzes auf repräsentative 20 Individuen bzw. 25 Allele ermöglichte die Durchführung exakter (*Branch & Bound*) sowie präziser (*Bootstrap*) Such-Algorithmen im Rahmen der PAUP\*-Analyse. Die Abbildung 2.3.11A zeigt das Ergebnis der mit *Cyanea* gewurzelten NJ-Analyse mit Benennung der genetischen Linien. Die in Tabelle 2.7 gezeigte große Distanz der Linien LIM und MCA zu den restlichen Kladen wird deutlich. Die Verbindungen insbesondere zwischen den Gruppen LAB,

MKL und ARAB, sind relativ zu den Kladenästen kurz, ein Indiz für eine schnelle Kladogenese. Die Variabilität innerhalb einer Linie - gemessen an der Länge der terminalen Alleläste - ist ebenfalls im Vergleich zur Distanz zwischen Linien mit Ausnahme von TET auffällig niedrig. Die Stabilität der Kladengruppierung wurde mit den drei Rekonstruktionsverfahren Neighbor-Joining, Maximum Likelihood und Parsimonie sowie einer *Bootstrap*-Analyse überprüft. Die Abbildung 2.3.11B zeigt das Konsensuskladogramm mit den kladenspezifischen prozentualen *Bootstrap*-Werten (NJ/ML/MP).

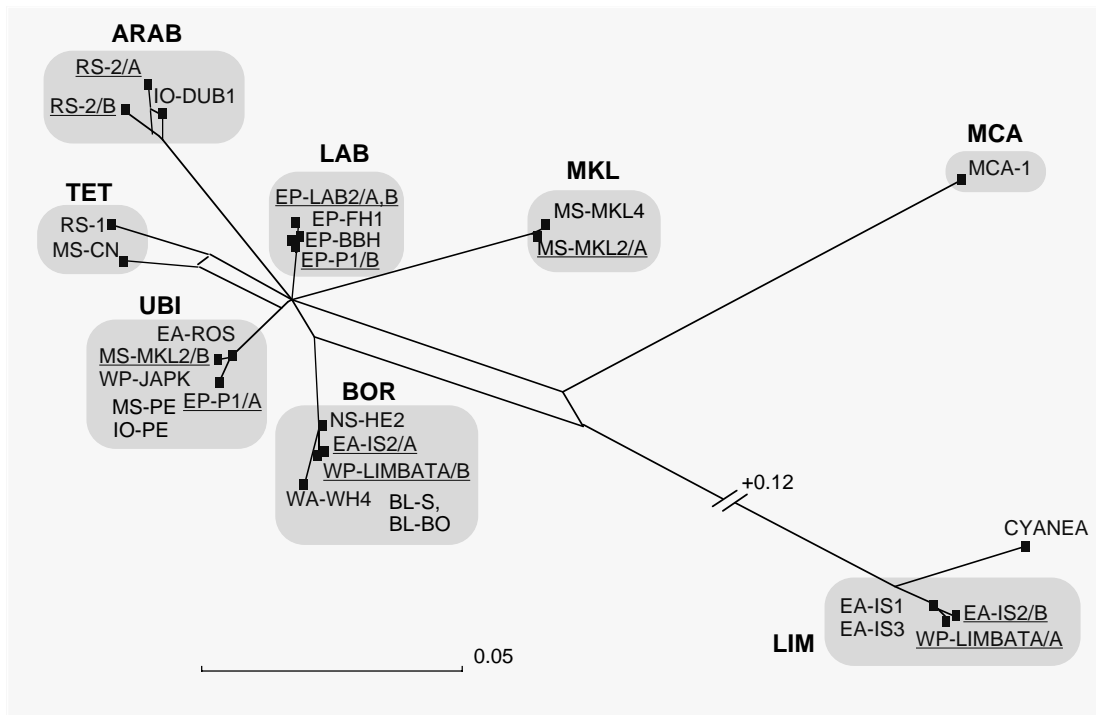


**Abb. 2.3.11** A) NJ-Phylogramm basierend auf HKY+G-Distanzen zwischen 25 Allelen der ITS/5.8S rDNA der Ohrenqualle inklusive der Außengruppe *Cyanea* mit Zuordnung der 8 Linien. B) 50% *Majority Rule*-Konsensuskladogramm nach *Bootstrap*-Analyse aus drei Rekonstruktionsverfahren (Replikate: 1000 NJ/1000 MP/100 ML). Die Linie *BOR* wird durch die parsimonische Analyse gegen *MKL* ausgetauscht (\*). ML-Analyse: HKY+G-Modell,  $-\ln$  Likelihood = 1628.65, TS/TV=0.94,  $\alpha = 0.27$  (heuristische Suche); MP-Analyse: informative Merkmale = 120, *reweighted* nach RC, Baumlänge = 249, CI = 0.86 (*Branch & Bound*).

Jede der 8 Gruppen wird durch die Analysen mindestens einmal zu 100% unterstützt und wird daher als unabhängige evolutionäre Linie bzw. Klade angesprochen. Ein Maximum-Likelihood-Test verweist auf unterschiedliche evolutionäre Raten zwischen Linien ( $-\ln$  Likelihood mit *molecular clock*, 1652.3  $\ll$   $-\ln$  Likelihood ohne *molecular clock*, 1628.65;  $p < 0.01$ ). Über die verwandtschaftlichen Beziehungen der Gruppen untereinander besteht weniger Klarheit. Lediglich die Linien UBI und TET erscheinen in allen Analysen als monophyletische Gruppe. Aufgrund der gering ausgeprägten Kladogenese nahe der Wurzel ist keine eindeutige phylogenetische Struktur zwischen den Linien LAB, ARAB und der Klade TET/UBI erkennbar, ihr Ursprung verschmilzt zu einem Knoten (Polytomie). Die MKL-Linie wird in der parsimonischen Analyse im Austausch gegen die BOR-Linie außerhalb der polytomen Gruppe eingeordnet. Eine mögliche Ursache ist

der Einfluß von homoplasiebehafteten Merkmalen, vor allem der Transitionen. Die stärkere Gewichtung kladistisch eindeutiger Positionen (*RC-reweighting*) mit einem Gesamt-Konsistenzindex von CI = 0.86 zeigt, daß dieser Einfluß vernachlässigbar ist. Die überraschend auftretende enge verwandtschaftliche Beziehung der LIM-Linie zu einer anderen Familie (*Cyaneidae*) läßt auf Genfluß zwischen diesen Taxa schließen. Diese Beobachtung ist gemessen an der systematischen Stellung erstaunlich und wird thematisch in Abschnitt 2.3.4 aufgegriffen.

Die *Split Decomposition*-Analyse (Abb. 2.3.12) bestätigte das Ergebnis einer raschen (an der Wurzel flachen) Kladogenese durch die Form eines sternförmigen Netzwerks. Schwach kompatible (konflikterzeugende) Splits zwischen Taxa können Hinweise auf eine vernetzte Beziehung wie Hybridisierungs- oder Rekombinationsereignisse liefern (Holmes et al. 1999).



**Abb. 2.3.12** *Split Decomposition*-Analyse (K2P-Distanz, Fit = 77.6). Die Kladogenese der 8 Linien ist durch ein sternförmiges Muster gekennzeichnet. Heterozygotie und Hybridisierung zwischen Linien (UBI x MKL, UBI x LAB und BOR x LIM) wird durch Individuen mit unterstrichenen Allelkürzel (A/B) gezeigt. Die Kantenlänge zur LIM-Linie ist um den Betrag von 0.12 verkürzt.

Die gezeigten schwach kompatiblen Splits betreffen - mit Ausnahme des Splits zwischen den Linien TET und UBI - vor allem Individuen mit verschiedenen Allelen. Eine extreme Schwankung bezüglich des Ausmaß der individuellen genetischen Variation wird deutlich. Der Split zwischen den Allelen RS-2/A $\leftrightarrow$ IO-DUB1 innerhalb der Linie ARAB impliziert eine zurückliegende Kreuzung zwischen *Aurelien* des Persischen Golfs und des Roten Meeres, die zur Heterozygotie des Individuums RS-2 führte (Allele A/B). Die hohe Divergenz zwischen beiden Allelen (3.5%) ist möglicherweise bedingt durch ein rekombiniertes Allel A mit einem Allel aus der Golfregion. Alle restlichen 9 heterozygoten Individuen innerhalb einer Linie, wie z. B. EP-LAB2(A/B), das als

Vertreter der morphologisch charakterisierten *A. labiata* (vgl. Tabelle 2.1) namensgebend für die LAB-Linie ist, unterscheiden sich durch maximal zwei Basensubstitutionen. Im Gegensatz dazu sind durch den schwach kompatiblen Split BOR $\leftrightarrow$ LIM Hybridisierungen zwischen genetischen Linien und damit extreme individuelle Variation nachzuweisen. Der Vertreter der morphologisch charakterisierten *A. limbata*, WP-LIMBATA\* (vgl. Tabelle 2.1), weist ebenso wie EA-IS2 jeweils ein Allel beider Linien auf, beide sind also möglicherweise Nachkommen einer Kreuzung der Parentallinien BOR und LIM. Im Vergleich der Linien UBI und LAB (EP-P1) sowie UBI und MKL (MS-MKL2) konnten weitere potentielle Nachkommen einer Linienhybridisierung detektiert werden.

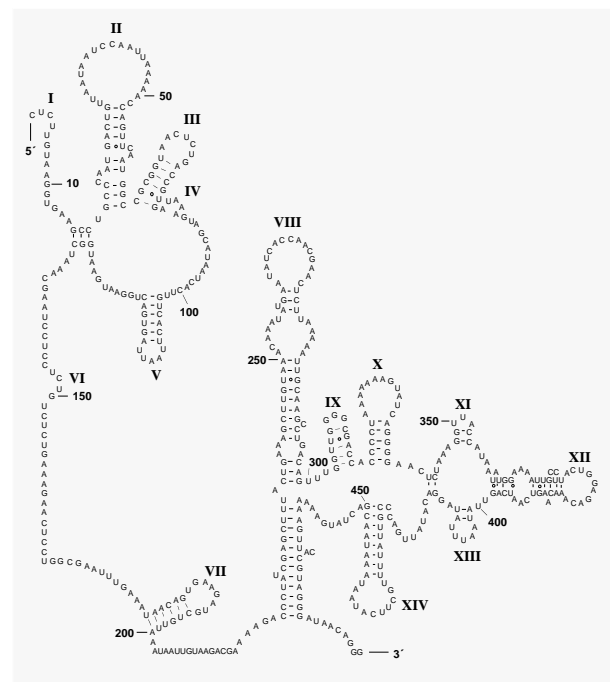
Die Ergebnisse der Kerngenomanalyse zeigen eine tiefgreifende und aufgrund der sternförmigen Baumstruktur womöglich schnelle Diversifizierung in monophyletische Linien im Verlauf der *Aurelia*-Evolution. Obwohl zumindest sporadischer Genfluß durch Linienhybridisierungsereignisse angenommen werden muß ist die genetische Isolation der Linien evident. Der Vergleich mit mitochondrialen Daten wird zeigen, ob dieses Muster einer sternförmigen und gleichzeitig vernetzten Evolution nur in der Genphylogenie der ITS-1/5.8S RNA auftritt, oder ob sich daraus allgemeingültige Aussagen über die Evolution und Speziesphylogenie der Ohrenqualle ableiten lassen.

### 2.3.3. Analyse der 16S rDNA

#### Allgemeine Charakteristika

Die Analyse der 3' terminalen Region des mitochondrialen 16S-rRNA-Gens erfolgte an 66 *Aurelia*-Individuen und dem Außengruppentaxon *Cyanea capillata*. Bei 97% der Proben war die Amplifikation mit Hilfe der *Aurelia*-spezifischen Primer erfolgreich. Der Austausch des *Aurelia*-L-Primers gegen den Cnidaria-L-Primer führte bei den restlichen beiden Proben inklusive *Cyanea* zu einem positiven Resultat. Die Länge der 16S-rDNA-Region liegt bei *Aurelia* in einem Bereich von 477-481 bp. Das homologe Fragment von *Cyanea* weist eine Größe von 489 bp auf. Die Anteile der unterschiedlichen Basen sind homogen über den Datensatz verteilt ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0.001$ ), welcher mit Mittelwerten von 35.4% für Adenin, 18.9% für Cytosin, 19.7% für Guanin und 26% für Thymin typischerweise AT-reich ist. Das Gesamtalignment (Anhang 1.2) ergab eine - durch *Cyanea* verursachte - Verlängerung auf 493 Nukleotidpositionen. Die 16S rDNA-Sequenz eines Nordsee-Individuums wurde nach Gutell et al.

(1994) in ein RNA-Sekundärstrukturmodell überführt (Abb. 2.3.13) und als Basis für das Alignment divergenter Taxa verwendet. Das Strukturmodell zeigt, daß einige ungepaarte *Loop*-Regionen hochvariabel sind (II, VI und VIII), während andere *Loops* zusammen mit konservierten gepaarten Regionen (*Stems*) eine geringere Variation zeigen. Diese Charakterisierung ermöglichte die Zuordnung homoplasiebehafteter Bereiche in den genealogischen Analysen.



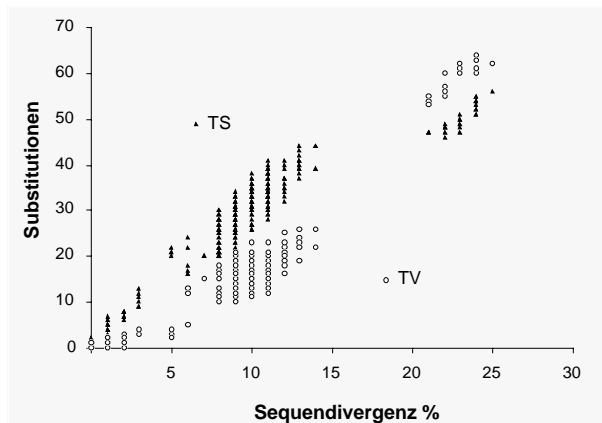
**Abb. 2.3.13** 16S RNA-Sekundärstrukturmodell von *Aurelia* mit Positionsangaben (481 bp). Ungepaarte *Loop*-Regionen sind nummeriert (I-XIV). Watson-Crick-Paarungen sind mit Strichen, G-U-Paarungen mit Kreisen dargestellt.

#### Genetische Diversität

Die 16S-rDNA-Region der Ohrenqualle zeichnet sich durch einen hohen Polymorphiegrad aus. Mit einer Gesamt-Haplotypdiversität von  $h = 0.93$ , ein für schnell evolvierende Genregionen z. B. des mitochondrialen Genoms typischer Wert (Avise et al. 1989), wurden die 66 untersuchten Individuen durch 43 Haplotypen charakterisiert. Auffälligerweise wurden bei zwei Tieren jeweils zwei verschiedene Haplotypen pro Individuum detektiert.

Mitochondrien besitzen ein haploides Genom und sind im allgemeinen in allen Zellen uniform (Moritz et al. 1987). Das Auftreten zweier verschiedener Kopien eines mitochondrialen Gens ist ungewöhnlich. Die genauere Untersuchung dieser beiden Individuen (s. unten und 2.3.4) wird zeigen, welche der beiden möglichen Erklärungen, Insertion des 16S-rRNA-Gens in das Kerngenom oder Heteroplasmie, die wahrscheinlichere ist.

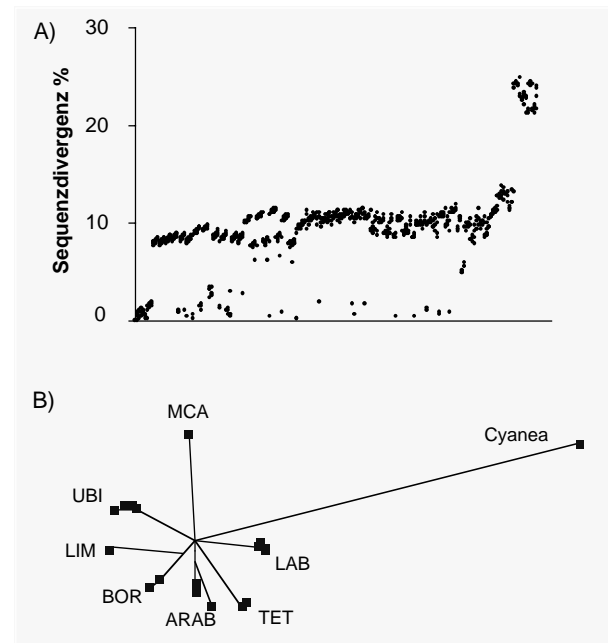
Der Plot der beobachteten Substitutionen gegen die Sequenzdivergenz zeigt im Vergleich zur ITS-Region ein Übergewicht der Transitionen mit einem TS/TV-Verhältnis = 2.18 (Abb. 2.3.14). Die Werte über 20% Divergenz repräsentieren Vergleiche zwischen *Cyanea* und *Aurelia* und erreichen bezüglich der Transitionen eine Sättigung.



**Abb. 2.3.14** Plot der beobachteten Substitutionen des 16S rDNA-Datensatzes gegen die Sequenzdivergenz. Die Werte über 20% repräsentieren Vergleiche zwischen *Aurelia* und *Cyanea*. TS = Transitionen und TV = Transversionen.

Im Bereich unterhalb von 15% Sequenzdivergenz ist keine Sättigung ersichtlich, so daß mit einem geringen negativen Einfluß von homoplasiebefahenen Basenpositionen in den genealogischen Analysen zu rechnen ist. Der Plot der Sequenzdivergenz aller Paarvergleiche (Abb. 2.3.15A) zeigt eine der ITS-Analyse ähnliche Strukturierung. Ein Wertebereich von <3.5% grenzt sich gegen einen distinkten Bereich von 6-14% sowie einen Bereich

von >22% Sequenzdivergenz, der die Vergleiche zwischen *Aurelia* und *Cyanea* enthält, ab. Die Beziehung zwischen repräsentativen - zur ITS-Analyse identischen - Taxa in Form eines ungewurzelten Phylogramms bestätigt diese Struktur (Abb. 2.3.15B). Individuen - respektive deren Haplotypen - die sich nur geringfügig unterscheiden (0-3.5%) werden in Gruppen vereint und denselben genetischen Linien, die auf Kerngenomebene detektiert wurden, zugeordnet, so daß deren Nomenklatur beibehalten wird. Eine Ausnahme betrifft die Individuen der in der Kerngenomanalyse beschriebenen MKL-Linie, welche eine enge Verwandtschaftsbeziehung zur mitochondrialen LIM-Linie zeigen und von dieser 'assimiliert' werden. Im Gegensatz zur Kerngenomanalyse zeigt keines der untersuchten *Aurelia*-Taxa eine engere Beziehung zu *Cyanea* (22-26% Sequenzdivergenz), welche daher in den genealogischen Analysen nicht berücksichtigt wurde.



**Abb. 2.3.15** A) Unkorrigierte Sequenzdivergenzen zwischen allen 16S rDNA-Sequenzen. Die Werte über 20% repräsentieren Vergleiche zwischen *Aurelia* und *Cyanea*. B) Ungewurzeltes NJ-Phylogramm von ausgewählten Vertretern der Ohrenqualle und der Außengruppe *Cyanea*. Das Diagramm zeigt 7 distinkte *Aurelia*-Linien. Die Nomenklatur sowie die Endknotentaxa entsprechen mit Ausnahme der MKL-Linie den Ergebnissen der Kerngenomanalyse (vgl. Abb. 2.3.10).

Die molekulare Varianz der Linien wurde mittels einer AMOVA-Varianzanalyse untersucht (Tabelle 2.8). Durch Gruppierung aller Sequenzen wurde die Gesamtvarianz der Sequenzdivergenzen in drei hierarchische Ebenen unterteilt: zwischen Gattungen (*Aurelia* versus *Cyanea*), zwischen Linien innerhalb Gattungen (UBI, BOR, LIM, LAB, ARAB, TET und MCA) und innerhalb von

Linien. Die größte Variationskomponente von 61.4% beinhaltet die Vergleiche zwischen den Gattungen, gefolgt vom Variationsanteil von 35.2% für die Vergleiche zwischen den Linien. Im Gegensatz dazu ist die Variation zwischen Individuen der gleichen Linie mit 3.4% gering, entsprechend der engen Verwandtschaftsbeziehung dieser Individuen (Abb. 2.3.15B).

**Tabelle 2.8** AMOVA-Varianzanalyse der 16S-Sequenzen (d. f. = Freiheitsgrade, p = Irrtumswahrscheinlichkeit von Varianz und  $F_{ST}$  unter 1000 Permutationen des Datensatzes). Der  $F_{ST}$ -Wert bezieht sich auf den Vergleich der Kategorien zwischen und innerhalb der *Aurelia*-Linien.

| Hierarchiestruktur               | d.f. | p      | Varianzanteil % | $F_{ST}$ |
|----------------------------------|------|--------|-----------------|----------|
| <i>Aurelia</i> vs. <i>Cyanea</i> | 1    | <0.001 | 61.37           | –        |
| Zwischen Linien                  | 6    | <0.001 | 35.19           | 0.9109   |
| Innerhalb Linien                 | 61   | <0.001 | 3.44            |          |

Da sich der Varianzanteil der Ebene zwischen Linien auf die Variation zwischen *Aurelia*-Linien reduziert (*Cyanea* besteht nur aus einem Vertreter) läßt sich der  $F_{ST}$ -Wert als Maß der genetischen Substrukturierung des Taxons *Aurelia* direkt abschätzen (Excoffier et al. 1992; Hudson et al. 1992). Der  $F_{ST}$ -Wert von 0.91 weist auf nahezu vollständige genetische Isolation dieser Linien hin. Unter der Annahme einer globalen *Aurelia*-Metapopulation würde sich aus  $F_{ST}$  der Schätzwert  $Nm$  über die Beziehung  $Nm = 0.5(1/F_{ST}-1)$  (Wright 1951) ableiten lassen, welcher gleich der Anzahl der Migranten pro Generation zwischen den Linien entspricht. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von 5 Migranten pro 100 Generationen wäre der Genfluß zwischen den Linien vernachlässigbar. Das Rechenexempel ist hypothetisch; wie bereits erwähnt (vgl. Tabelle 2.1) existieren für zwei der beschriebenen *Aurelia*-Linien, LAB und LIM, morphologische Befunde, die eine bereits

erfolgte Speziation nicht ausschließen. Es verdeutlicht jedoch, daß *Aurelia* durch die vorliegenden mitochondrialen Sequenzdaten eindeutig in 7 distinkte evolutionäre Linien strukturiert werden kann.

Die Korrektur multipler Substitutionen zur Berechnung der genetischen Distanz basierte auf dem *General Time Reversible*-Modell (GTR, z. B. Yang 1994). Zusätzlich wurde der Anteil invariabler Positionen (I) sowie die unterschiedliche Verteilung variabler Positionen über den Gamma-Parameter ( $\alpha$ ) berücksichtigt (=GTR+I+G-Modell). Dieses Modell beschreibt für jeden der 6 möglichen Substitutionstypen eine spezifische Übergangswahrscheinlichkeit. Der Anteil invariabler Positionen beträgt 0.48 mit  $\alpha = 0.62$ . Diese beiden Parameter I und G, die Positioneffekte berücksichtigen, tragen der größeren Variabilität der *Loops* gegenüber den konservierten *Stems* Rechnung.

**Tabelle 2.9** Mittlere genetische Distanzen (nach Maximum Likelihood GTR+I+G-Modell) von 7 mtDNA-Linien der Ohrenqualle. Die Diagonale beschreibt die Diversität innerhalb von Linien.

|             | <b>BOR</b> | <b>UBI</b> | <b>TET</b> | <b>LAB</b> | <b>ARAB</b> | <b>LIM</b> | <b>MCA</b> |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| <b>BOR</b>  | 0.007      |            |            |            |             |            |            |
| <b>UBI</b>  | 0.132      | 0.005      |            |            |             |            |            |
| <b>TET</b>  | 0.125      | 0.155      | 0.006      |            |             |            |            |
| <b>LAB</b>  | 0.175      | 0.171      | 0.139      | 0.010      |             |            |            |
| <b>ARAB</b> | 0.153      | 0.194      | 0.192      | 0.153      | 0.025       |            |            |
| <b>LIM</b>  | 0.114      | 0.189      | 0.165      | 0.185      | 0.179       | 0.004      |            |
| <b>MCA</b>  | 0.229      | 0.214      | 0.259      | 0.260      | 0.232       | 0.264      | -          |

Die Tabelle 2.9 zeigt die mittleren ML-basierten Distanzwerte zwischen den 7 *Aurelia*-mtDNA-Linien. Auffälligerweise ist die genetische Distanz zwischen den Linien BOR und LIM gegenüber der nc-Analyse von 0.48 (siehe Tabelle 2.7) mit 0.11 ca. 4-fach reduziert. Eine unterschiedliche evolutionäre Historie zwischen beiden Genomen scheint die Differenzierung dieser beiden Linien bestimmt

zu haben. Die Diversität innerhalb von Linien weist im Trend vergleichbare Distanzwerte und Haplotypdiversitäten (Tabelle 2.10) zur nc-Analyse auf. Der Tajima D-Test indiziert über den Vergleich der verschiedenen  $\theta$ -Schätzungen (vgl. 2.3.2) für die Linie BOR ein Abweichen von 'neutraler genetischer Variation' und verweist auf das Wirken von Selektion.

**Tabelle 2.10** Haplotypanzahl und Haplotypdiversität  $h$  der 7 mitochondrialen Linien der Ohrenqualle. Eine Abweichung von 'Neutraler genetischer Variation' (Tajima D-Test) tritt bei der BOR-Linie auf (ns = nicht signifikant).

|                        | <b>BOR</b>        | <b>UBI</b> | <b>TET</b> | <b>LAB</b> | <b>ARAB</b> | <b>LIM</b> | <b>MCA</b> |
|------------------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| Haplotypanzahl N       | 18                | 22         | 2          | 11         | 7           | 5          | 1          |
| Haplotypdiversität $h$ | 0.87              | 0.86       | 1.00       | 0.87       | 0.95        | 0.80       | -          |
| Tajima's D             | -1.86, $p < 0.03$ | ns         | ns         | ns         | ns          | ns         | ns         |

### **Genealogische Analysen**

Die Typisierung der 66 untersuchten *Aurelia*-Individuen zur jeweiligen mtDNA-Linie (Anhang 1.3) erfolgte mittels einer Clusteranalyse. Um eine direkte Vergleichbarkeit zur ncDNA-Analyse zu erhalten wurde der 16S-Datensatz auf die gleichen Individuen (N=19) - inklusive der beiden Taxa mit

zwei verschiedenen Haplotypen - reduziert, so daß 21 Haplotypen in die genealogischen Analysen eingingen. Der Homoplasieanteil variabler *Loop*-Regionen wurde in kladistischen Analysen ermittelt. Die Verwendung aller 493 Merkmale resultierte in 12 parsimonischen Bäumen gleicher Länge (142) mit einem Homoplasieindex von 0.2 (*Branch & Bound*-Suche, *reweighting* nach CI-



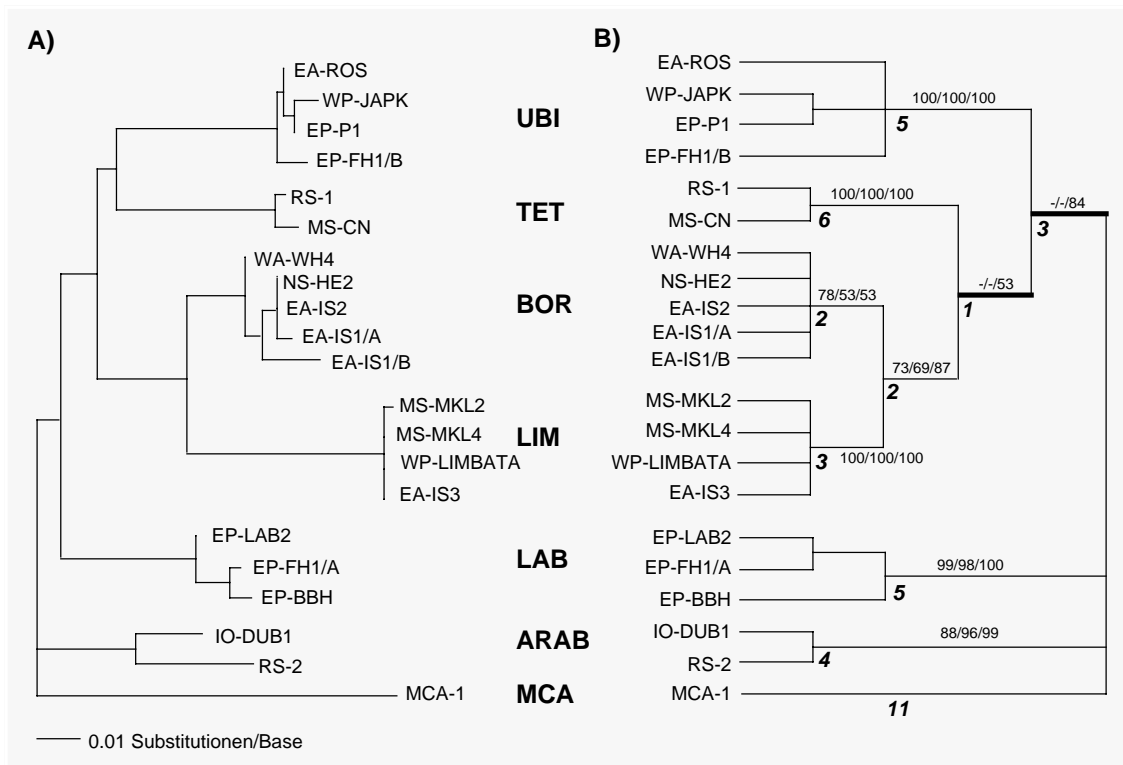
Index). Die Evaluierung der *Loops* führte zum Ausschluß der Regionen II, VI, X-XIV sowie der Positionen 271-291 der Region VIII (siehe Abb. 2.3.13). Die verbleibenden Positionen der Region VIII weisen trotz großer Variabilität 7 kladistisch informative Synapomorphien auf. Der Ausschluß der genannten Regionen führte zu einer Reduzierung auf eine Baumtopologie der Länge 93 mit einem Homoplasieindex von 0.14. Gleichzeitig wurde eine Verringerung der Anzahl an Polytomien (Erhöhung des RI-Indexes) im Rahmen einer *Bootstrap*-Analyse festgestellt. Die Reduktion des 16S-Datensatzes auf die verbleibenden 403 Merkmale kann als Optimierung unter kladistischen Gesichtspunkten verstanden werden und wurde zur Vergleichbarkeit in allen Verwandtschaftsanalysen eingehalten. Eine parsimonische Analyse unter Verwendung ausschließlich der Transversionen zeigte, daß einige Gruppen nicht mehr eindeutig getrennt werden. Daraus folgt, daß die Transitionen ein phylogenetisches Signal beinhalten und noch keine Sättigung bei den beobachteten Sequenzdivergenzen erreicht haben. Die Existenz eines phylogenetischen Signals wurde zudem mittels der *g*-Statistik überprüft. Der Wert von  $g_1 = -0.79$  ( $p < 0.01$ ) zeigt, daß die Baumängen 10000 zufällig gewählter Bäume linkslastig verteilt sind, ein Indiz für die Präsenz eines phylogenetischen Signals (Hillis 1991).

In Abbildung 2.3.16 sind die Verwandtschaftsbeziehungen dargestellt. Für die Neighbor Joining- und Maximum Likelihood-Analysen wurde das *General Time Reversible*-Substitutionsmodell unter Einbeziehung des Gamma-Parameters  $\alpha = 0.15$  verwendet. Die parsimonische Suche basiert auf dem *Branch & Bound*-Algorithmus und *reweighting* nach Konsistenzindex; die Stabilität einzelner Kladen wurde in allen Analysen anhand von *Bootstrap*-Replikaten geprüft. Die Abbildung 2.3.16A zeigt das Phylogramm nach ML-Analyse mit Zuordnung der genetischen Linien, während 2.3.16B ein Konsensus-kladogramm aller drei

Rekonstruktionsmethoden nach *Bootstrap*-Analyse darstellt. Die 7 mtDNA-Linien werden mit Ausnahme von der BOR-Linie, welche eines der beiden Individuen mit zwei Allelen beinhaltet, zu 99-100% durch die *Bootstrap*-Analyse unterstützt. Die internen Verbindungskanten zwischen den Kladen sind relativ zu den kladenspezifischen Ästen kurz (Abb. 2.3.16A), ein zur *nc*-Analyse kongruentes Ergebnis einer potentiell schnellen Kladogenese. Dies führt beispielsweise dazu, daß die - bereits in der *nc*-Analyse gezeigte - Monophylie der Klade UBI/TET im *Bootstrap*-Konsensuskladogramm (Abb. 2.3.16B) nicht mehr unterstützt wird, bzw. durch die parsimonische Analyse in zwei Schwesterngruppen zur Klade BOR/LIM unterteilt wird (die fett gezeichneten Kanten werden durch die MP-Analyse unterstützt, in NJ und MP verschmelzen sie zur Polytomie). Übereinstimmend mit der Analyse des Kerngenoms können die 7 mtDNA-Linien sowohl aufgrund der *Bootstrap*-Analysen als auch durch die Anzahl von 2-11 Synapomorphien pro Klade (im Falle von MCA durch Autapomorphien) als unabhängige evolutionäre Linien angesprochen werden (z. B. Wiley 1981). Zwei Individuen, EP-FH1 und EA-IS1, besitzen jeweils zwei 16S-Allele (A und B, siehe Abb. 2.3.16), die durch mehrfache PCR-Amplifikation verschiedener DNA-Extraktionen, Klonierung der PCR-Produkte und Sequenzierung mehrerer Bakterienklone verifiziert wurden. Überraschenderweise besitzt EP-FH1 Allele zweier verschiedener Linien (LAB und UBI), welches eine *in situ* entstandene Heteroplasmie eines zweiten mtDNA-Allels durch Mutation ausschließt. Unterstellt man die Möglichkeit paternaler mtDNA-Vererbung (Gyllensten et al. 1991) ist EP-FH1 das Resultat einer Linienhybridisierung UBI x LAB, eine Beobachtung, die bereits durch die Kerngenomanalyse bei einem anderen Tier dokumentiert wurde (EP-P1, vgl. Abb. 2.3.12). Das zweite Individuum, EA-IS1, besitzt 2 Allele, die sich trotz großer Diversität in die BOR-Linie

einordnen. Da es sich bei dem Allel 'EA-IS1B' um eine ungewöhnliche Mischform handelt, die eine

potentielle mtDNA-Rekombination nicht ausschließt, wird dieser Fall gesondert in Abschnitt 2.3.4 besprochen.



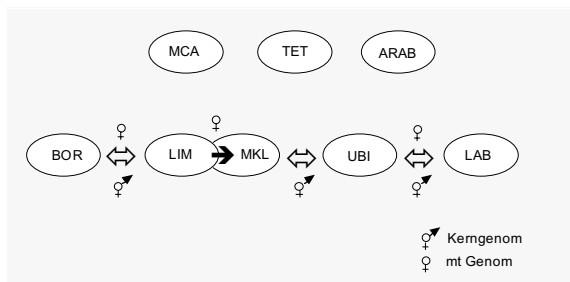
**Abb. 2.3.16** Genealogische Verwandtschaftsbeziehungen von 21 *Aurelia*-16S-Haplotypen mit Zuordnung der genetischen Linien. A) Maximum Likelihood: GTR+G-Substitutionsmodell, -ln Likelihood 1255.44 ( $\alpha = 0.15$ , heuristische Suche, *TBR swapping*). B) *Bootstrap*-Konsensus-kladogramm (50% *Majority Rule*) nach 1000 (MP, NJ) bzw. 100 (ML) Replikaten. Die *Bootstrap*-Werte (%) sind entlang der Kanten in der Reihenfolge NJ/ML/MP angegeben. Die fett gezeichneten Kanten werden nur in der MP-Analyse unterstützt; die Anzahl der Synapomorphien ist unterhalb der Kladenknoten angezeigt (*Acctran optimization*). NJ: GTR+G-Distanz; MP: informative Merkmale=56, *reweighted* nach RC, Länge=93, CI=0.86, RI=0.9, *Branch & Bound*-Suche.

Die Typisierung der untersuchten Individuen zur gleichen nc- und mt-Linie ist mit Ausnahme einiger Hybridindividuen kongruent. Diese Ausnahmen werden vor allem in der monophyletischen Gruppe BOR/LIM deutlich. Die nc-Hybride WP-LIMBATA und EA-IS2 dieser Gruppe finden sich in maternal unterschiedlichen Linien wieder (LIM bzw. BOR). Daneben werden Vertreter der zwei äußerst divergenten nc-Linien MKL und LIM (0.58, vgl. Tab. 2.7) bezüglich des mt-Genoms in

einer maternalen Linie (LIM) vereinigt, eine Beobachtung, die auf Hybridisierung (MKL x LIM) mit Introgression maternalen Gene (mt-Genome) schließen lässt. Beides sind Evidenzen für eine vernetzte evolutive Beziehung und lassen reziproke Hybridisierungsereignisse vermuten.

### 2.3.4 Hybridisierung zwischen Linien

Die hohe Sequenzdivergenz zwischen den *Aurelia*-Linien in beiden untersuchten Genomen, das Fehlen von intermediären Distanzen sowie die Monophylie der Linien lassen einen relativ alten Zeitpunkt der Diversifizierung vermuten. Prozesse wie *lineage sorting* (Persistenz ancestraler Polymorphismen) sollten abgeschlossen sein, so daß die Beobachtung verschiedener Linien-Allele innerhalb eines Individuums auf rezente oder gegenwärtig noch stattfindende Hybridisierungsereignisse zwischen genetischen Linien hinweist. Die wechselseitigen Beziehungen sind in Abbildung 2.3.17 und tabellarisch in Anhang 1.3 zusammengefaßt.



**Abb. 2.3.17** Hybridisierungsmuster zwischen den Linien der Ohrenqualle. Beidseitige Pfeile indizieren eine vernetzte Beziehung auf Ebene des Kerngenoms bzw. von mitochondrialen Allelen (Symbole). Der einseitige Pfeil zeigt die Introgression des mitochondrialen LIM-Genoms in die MKL-Linie an; weitere Erklärungen im Text.

#### Indizien aus dem Kerngenom

Die Häufigkeit der direkt beobachteten F1-Hybride - ohne Berücksichtigung von F2-Rückkreuzungen - ist mit 7% (4 von 54 Individuen) im Rahmen der Kerngenomanalyse beträchtlich groß. Die Hybridisierung LAB x UBI (EP-P1) wird durch Befunde aus dem mt-Genom (EP-FH1) bestätigt. Die zweite Linienhybridisierung UBI x MKL wird durch das Individuum MS-MKL2

angezeigt. Gleichzeitig zeigt die nc-Linie MKL eine unidirektionale Hybridisierung mit der LIM-Linie an. Die Introgression des LIM-mt-Genoms in alle Vertreter der nc-Linie MKL impliziert eine Hybridisierung von Weibchen der LIM-Linie mit Männchen der MKL-Linie. Keiner der MKL-Vertreter weist jedoch ein Allel der nc-Linie LIM auf, so daß zu vermuten ist, daß eine Rückkreuzung der F1-Hybride mit Vertretern der nc-Linie MKL zur Fixierung dieses Allels in der kroatischen Population führte. Die vier Individuen der kroatischen MKL-Linie sind entsprechend als Hybrid-organismen einzuordnen. Ein ähnliches Szenario ist für die Beziehung zwischen der nc-Linie LIM und *Cyanea capillata* zu postulieren. Die große Distanz dieser Linie zu den restlichen *Aurelia*-Gruppen (0.48-0.66), welche durch die mtDNA-Analyse nicht bestätigt wurde, ist vermutlich durch eine Introgression von *Cyanea*-Kern-DNA in die LIM-Linie verursacht. Möglicherweise beschleunigt durch den Prozeß der *concerted evolution* erfolgte die Fixierung dieser ITS-1/5.8S-rDNA Variante in der *Aurelia*-Linie LIM (EA-IS1, EA-IS3 und EA-IS6). Eine Überlagerung dieses Musters durch eine sekundäre Hybridisierung der LIM-Linie mit Vertretern der BOR-Linie wird durch die Individuen WP-LIMBATA und EA-IS2, die jeweils beide Allele aufweisen, angezeigt.

#### Hybridisierung und mitochondriale DNA-Rekombination

Im Rahmen der mtDNA-Analyse zeigten zwei Individuen, EP-FH1 und EA-IS1, Heteroplasmie. EP-FH1 ist nach den oben gezeigten Befunden das Ergebnis einer Linienhybridisierung, bei der paternale und maternale mtDNA-Kopien übertragen wurden. Eines der beiden Allele des Tieres EA-IS1 fügt sich zwanglos innerhalb der BOR-Linie ein, während das andere Allel in den genea-

logischen Analysen intermediär zwischen den Linien BOR und LIM gruppierte. Die *Split Decomposition*-Analyse (Abb. 2.3.18) zeigt einen Konflikt bezüglich dieses Allels EA-IS1/B, welches die beiden Linien netzwerkartig über die Individuen EA-IS3 (LIM) und wahlweise NS-HE2 oder EA-IS2 (BOR) verbindet.



**Abb. 2.3.18** *Split Decomposition*-Analyse von Vertretern der mtDNA-Linien BOR und LIM. Das Allel B des heteroplasmatischen Individuums EA-IS1 zeigt über einen schwach kompatiblen Split eine Verwandtschaftsbeziehung zu beiden Linien, Allel A wird innerhalb der BOR-Linie gruppiert.

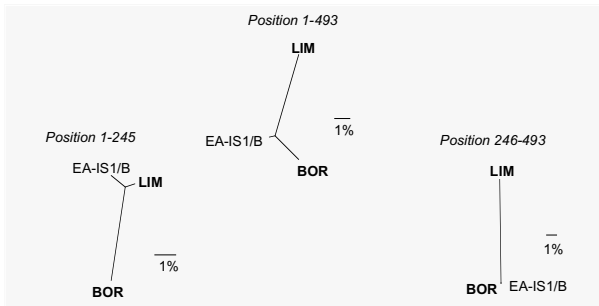
Die Haplotypen NS-HE2, EA-IS3 wurden zusammen mit dem auffällig intermediär gruppierenden Allel EA-IS1/B mittels eines Maximum Likelihood-Tests auf DNA-Rekombination (LARD

V2.2) geprüft. Der Test basiert auf dem Vergleich der Ln-Likelihoods von Sequenzdaten zwischen zwei Parentaltaxa und einem potentiellen F1-Taxon, mit und ohne Berücksichtigung von Rekombination. Unter der Hypothese einer Hybridisierung und Rekombination zwischen den Parentaltaxa NS-HE2 (BOR) und EA-IS3 (LIM) verweist der Test auf einen Rekombinationspunkt links der 16S-Nukleotidposition 246 der Sequenz EA-IS1/B (-Ln Likelihood ohne Rekombination = 841.7; -Ln Likelihood mit Rekombination = 819.3, LR = 22.4). Das Alignment der drei Sequenzen (Abb. 2.3.19) zeigt den Bereich eines potentiellen Rekombinationsortes (R). Am 3'-Ende ist das Allel EA-IS1/B identisch zu NS-HE2 (BOR), während es am 5'-Ende eine Identität von 98.7% zur LIM-Linie (EA-IS3) aufweist. Neben zwei Autapomorphien zeigt diese Region an der Position 32 eine einzige Basenübereinstimmung (von 14 variablen Positionen) mit der BOR-Linie.

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| EA-IS3   | .....C.....A.T...C...G.....T.....A.....             |     |
| EA-IS1/B | .....T.....A.T...C...G.....T.....G.....             | 100 |
| NS-HE2   | .....T.....TCC...T...A.....C.....A.....             |     |
| EA-IS3   | .....T.....AA...T.....T.....T.....                  |     |
| EA-IS1/B | .....T.....AA...C.....T.....T.....                  | 200 |
| NS-HE2   | .....C.....CT...T.....C.....C.....                  |     |
| EA-IS3   | .....G.....T..T.T...A.....TT...T..T.T..T...A.....T  |     |
| EA-IS1/B | .....R.....A.....A.A.A...GA...AC...C..C.C.A...T...C | 300 |
| NS-HE2   | .....A.....A.A.A...GA...AC...C..C.C.A...T...C       |     |
| EA-IS3   | .....T.....TAT.A.C...A.....T.....                   |     |
| EA-IS1/B | .....A...T.....ACC.T.T...G.....C.....               | 400 |
| NS-HE2   | .....A...T.....ACC.T.T...G.....C.....               |     |
| EA-IS3   | .....AC.....A.....G.....                            |     |
| EA-IS1/B | .....TT.....T.....A.....                            | 493 |
| NS-HE2   | .....TT.....T.....A.....                            |     |

**Abb. 2.3.19** 16S rDNA-Alignment der zwei Parentallinien LIM (EA-IS3) und BOR (NS-HE2) sowie eines potentiell rekombinierten Haplotyps (EA-IS1/B). Im Bereich zwischen Position 180 und 245 ist ein möglicher Rekombinationsort lokalisiert (R). Der 3'-gerichtete Bereich ist identisch zu NS-HE2, die 5'-Seite ist zu 98.7% identisch zu EA-IS3.

Die NJ-Analyse der drei Taxa verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Bereichen der 16S-Region (Abb. 2.3.20).

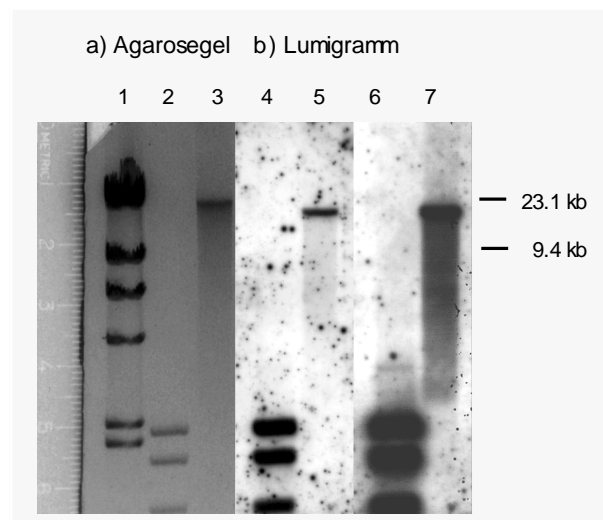


**Abb. 2.3.20** Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Linien BOR (NS-HE2), LIM (EA-IS3) und dem Haplotyp EA-IS1/B auf Basis der 16S rDNA. Die Positionen 1-245 und 246-493 zeigen eine unterschiedliche evolutionäre Beziehung dieses Haplotyps zu den Linien auf.

Unter Einbeziehung aller 493 nt beträgt die Distanz von EA-IS1/B zur BOR-Linie 2.54% und zur LIM-Linie 6.3%. Der Bereich von 1-245 positioniert EA-IS1/B mit 1.2% Sequenzdivergenz zur LIM-Linie, während der Bereich von 246-493 eine Verwandtschaftsbeziehung von 100% zur BOR-Linie aufweist.

Beide Allele des Individuums EA-IS1 wurden als DNA-Sonden gegen dessen gesamtgenomische DNA hybridisiert, um die mögliche Amplifikation eines nukleären Pseudogens als Ursache der Heteroplasmie zu überprüfen. Die Abbildung 2.3.21 zeigt das Ergebnis einer *Southern*-Hybridisierung der Dig-markierten Allelsequenzen EA-IS1/A (Spur 5) und EA-IS1/B (Spur 7) gegen die genomische DNA des Individuums EA-IS1 (Spur 3). Beide Allelsonden verursachen ein Signal auf einer Höhe von ca. 16-18 kb, welche der Größe des mitochondrialen Genoms bei Cnidariern entspricht (Bridge et al. 1992). Ein Signal auf Höhe der gesamtgenomischen Fraktion (ca. 23 kb) ist nicht ersichtlich. Unter stringenten Experimentalbedingungen hybridisierten die beiden heteroplasmatischen Allele demzufolge nicht mit einer

Pseudogen-Kopie des 16S-Gens aus dem Kerngenom (der hohe Signalhintergrund (Spur 4-7) wurde durch die lange Expositionszeit von >24 h der Sonden verursacht). Beide Allele des Individuums EA-IS1 sind nach den gezeigten Befunden als heteroplasmatische Allele der mitochondrialen DNA zu betrachten.



**Abb. 2.3.21** *Southern*-Hybridisierung zweier mitochondrialer Allele des Individuums EA-IS1 gegen dessen gesamtgenomische DNA (Agarosegel a, Spur 3). Die Hybridisierungssignale der Dig-markierten Allele EA-IS1/A (Lumigramm b, Spur 5) und EA-IS1/B (Lumigramm b, Spur 7) befinden sich auf der Höhe von ca. 16-18 kb. Auf Höhe der gesamtgenomischen Fraktion (23kb) wurde kein Hybridisierungssignal detektiert (Spur 1 =  $\lambda$ -HindIII, Spur 2 = Dig-ladder, Spur 4 und 6 = Dig-ladder nach Signaldetektion).

### 2.3.5 Organismische und molekulare Befunde im Kontext

Die genealogischen Rekonstruktionen zeigen im Vergleich zwischen Kern- und mitochondrialem Genom teilweise unterschiedliche Gruppierungen einzelner *Aurelia*-Linien (Templeton-Rangsummentest,  $p = 0.015$  basierend auf der jeweiligen MP-Topologie). Dieser Unterschied begründet sich durch die beobachteten Hybridisierungs- und Introgressionseignisse, die mitunter zur Reduktion einer genetischen Linie führen. Der Ausschluß der Individuen, die eine Linienhybridisierung

anzeigen führte zur Kongruenz der genealogischen Gruppierungen und strenger Korrelation der genetischen Distanzen ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ , Manteltest). Repräsentativ für die molekulargenetischen Ergebnisse werden nachfolgend die mitochondrialen DNA-Daten auf einen Zusammenhang

mit organismischen Befunden der jeweiligen Polypenklone geprüft (Regression-Tabelle 2.11). Als unabhängige Variable diente die numerisch kodierte und standardisierte mitochondriale Linienzugehörigkeit.

**Tabelle 2.11** Regressionsanalyse zwischen organismischen Parametern und der mitochondrialen Linienzugehörigkeit der *Aurelia*-Klone ( $R$  = Korrelationskoeffizient,  $R^2$  = Determinationskoeffizient,  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit).

|                                 | <b>R</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>p</b> |
|---------------------------------|----------|----------------------|----------|
| Polypenwachstumsrate $r^*$      | 0.54     | 0.31                 | = 0.037  |
| Volumen Polyp                   | 0.48     | 0.24                 | = 0.063  |
| KJ-Induktion                    | 0.89     | 0.80                 | < 0.001  |
| Strobilationshäufigkeit Saisons | 0.96     | 0.92                 | < 0.001  |
| Strobilationstemperatur         | 0.96     | 0.93                 | < 0.001  |
| Pigmentierungsgrad Ephyren      | 0.54     | 0.29                 | = 0.038  |
| Beweglichkeit Ephyren           | 0.87     | 0.77                 | < 0.001  |

Während die Wachstumsrate und Größe der Polypen sowie die Färbung der Ephyren nur mäßig mit der Zugehörigkeit einer mtDNA-Linie korrelieren, sind die Häufigkeit und Auslösetemperatur der Strobilation starke Indikatoren für eine Typisierung der genetischen Linien. Eine multiple Regression der Umweltvariablen Wassertemperatur und Breitengrad gegen die mt-Linien der *Aurelia*-Klone zeigt eine hohe Korrelation ( $R = 0.94$ ,  $R^2 = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ) und läßt vermuten, daß die evolutionären Muster und Verwandtschaftsbeziehungen durch extrinsische klimatische Faktoren beeinflusst sind. Die Abbildung 2.3.22 zeigt das Vorkommen der genetischen Linien in Beziehung zu verschiedenen organismischen und geographischen (klimatischen) Faktoren. Die mitochondrialen Linien der Ohrenqualle können folgenden biogeographischen Mustern zugeordnet werden ( $L$  = Breitengrad,  $T$  = Wassertemperatur im Winter):

*LIM* ist circumpolar/boreal verbreitet, die mitochondriale LIM-Linie in Individuen der kroati-

schen Adriaküste erklärt sich durch Hybridisierungsprozesse ( $L > 43^\circ$ ,  $T \leq 4^\circ\text{C}$ )

*BOR* ist im boreal/gemäßigten Atlantik inklusive assoziierter Gewässer (Nord- und Ostsee) sowie dem Schwarzen Meer anzutreffen ( $L$ :  $41^\circ$ - $66^\circ$ ,  $T$ :  $4$ - $8^\circ\text{C}$ )

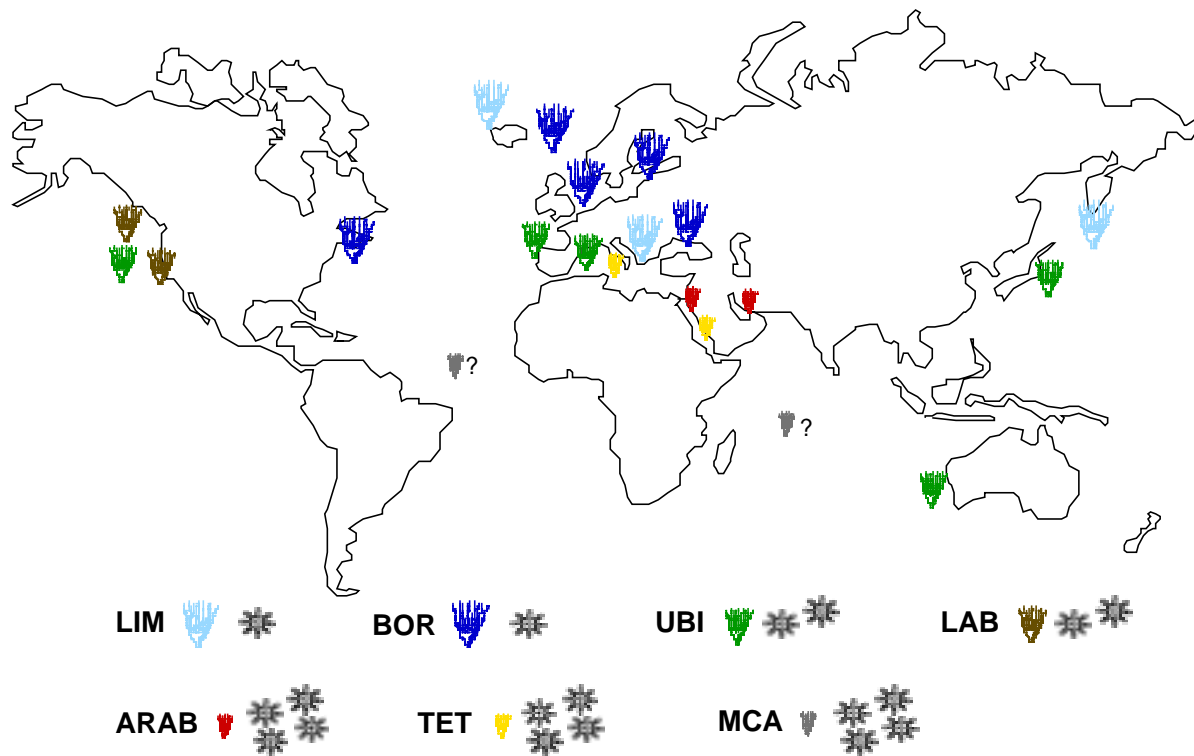
*UBI* besitzt das größte Verbreitungsgebiet und ist global innerhalb der Klimazone des mediterranen Typus auf beiden Hemisphären anzutreffen ( $L$ :  $32^\circ$ - $48^\circ$ ,  $T$ :  $10$ - $17^\circ\text{C}$ )

*LAB* ist regional begrenzt auf die amerikanische Pazifikküste mit mediterranem bis borealem Klima ( $L$ :  $36.6^\circ$ - $48.6^\circ$ ,  $T$ :  $8$ - $12^\circ\text{C}$ )

*TET* ist einer mediterran/tropischen Klimazone zuzuordnen ( $L$ :  $27.5^\circ$ - $43^\circ$ ,  $T$ :  $13$ - $25^\circ\text{C}$ )

*ARAB* ist innerhalb der  $20^\circ\text{C}$  Isotherme verbreitet und somit auf tropische Klimazonen beschränkt ( $L$ :  $25^\circ$ - $29.5^\circ$ ,  $T$ :  $23$ - $25^\circ\text{C}$ )

*MCA*, deren geographischer Ursprung ist ungewiß. Die organismischen Charakteristika des einzigen Vertreters MCA-1 sowie Informationen von P. Mosconie (pers. Mittlg.) lassen ihn tropischen Klimazonen zuordnen.



**Abb. 2.3.22** Geographische Verbreitung aller untersuchten Individuen der Ohrenqualle. Unterschiedliche genetische Linien sind farblich abgesetzt. Zusätzlich werden regionale Unterschiede exemplarisch durch die Polypengröße und die saisonale Strobilationsrate (1 Ephyre = 1 Saison/ Jahresverlauf) gekennzeichnet. Die Herkunft der Linie MCA ist ungewiß (s. Text).

## 2.4 Diskussion

Die weltweite Verbreitung der Ohrenqualle sowie ihre phänotypische Variabilität führten zu einer teilweise widersprüchlichen Nomenklatur und zu unklaren taxonomischen Einteilungen in Populationen, Varietäten, Subspezies oder Arten. Gegenwärtig werden *Aurelia limbata* und *A. labiata* (L. Gershwin, pers. Mittlg.) von der Nominalspezies *A. aurita* abgegrenzt. Die im Rahmen der Dissertation untersuchten Populationen schließen die validen bzw. prospektiven Spezies *A. limbata* und *A. labiata* mit ein und bestätigen ihre molekulare Abgrenzung durch die Charakterisierung der genetisch isolierten Linien LIM und LAB. Die verwandtschaftlichen Analysen der Ohrenqualle befinden sich somit im Kontinuum zwischen Populationsstrukturierung, Speziation und der Divergenz von Arten. Konsequenterweise - nicht

zuletzt begründet durch die Ableitungen aus der Koaleszenztheorie (Kingman 1982, Hudson 1990) und Phylogeographie (Avice 1994) - ist eine Charakterisierung der *Aurelia*-Populationen in Form einer genealogischen Rekonstruktion zwingend.

### 2.4.1 Genetische Differenzierung und Speziation

Die molekulargenetischen Befunde führen auf Grundlage zweier voneinander unabhängiger Genorte und Genome (mtDNA und ncDNA) zum Ergebnis einer tiefgreifenden genetischen Diversifizierung der Ohrenqualle. Eine mögliche Diskrepanz zwischen der Allelgenalogie und der realen Populations- bzw. Spezieshistorie wird durch nicht

abgeschlossenes *lineage sorting* (der Persistenz ancestraler Polymorphismen in divergierenden Populationen) verursacht (Harrison 1991). Da die beiden ribosomalen Genorte der ncDNA und mtDNA zumindest physikalisch nicht gekoppelt vorliegen, wäre ein voneinander unabhängiger Sortierungsprozeß mit dem Resultat von unterschiedlichen Gen-Genealogien zu erwarten (Pamilo & Nei 1988). Das Ausmaß der Strukturierung sowie die Zuordnung der *Aurelia*-Klone zu einzelnen genetischen Linien ist abgesehen von Individuen, die als Linienhybride klassifiziert wurden, in beiden Genomen kongruent. Demzufolge ist der Prozeß von *lineage sorting* abgeschlossen und das Muster der genealogischen Beziehungen als repräsentativ für die Populationshistorien zu interpretieren. Beide Genorte sind gekennzeichnet durch eine 10-20-fach erhöhte Sequenzdivergenz zwischen den Linien im Vergleich zur Variabilität innerhalb von Linien. In den Allelphylogenien wird die große Sequenzdivergenz zwischen den Linien durch Synapo-morphien mit robusten *Bootstrap*-Werten von 98-100% bestätigt. Die Etablierung von Isolationsbarrieren verbunden mit reduziertem bis fehlendem Genfluß zwischen den *Aurelia*-Linien muß postuliert werden, welche zur beobachteten reziproken Monophylie (Avice 1994) führten. Die konkordant strukturierten Genphylogenien von mitochondrialem und nukleärem Genom sind ein Indiz für die Diversifizierung in Arten oder 'Unterarten' (Avice & Ball 1990). Mögliche Mechanismen der Liniendivergenz von *Aurelia* werden entsprechend unter der Hypothese einer stattgefundenen oder ablaufenden Speziation diskutiert.

### **Artdefinition**

Die traditionell weit verbreitete Definition, nach der sich Arten durch die Existenz reproduktiver Isolation abgrenzen lassen (Mayr 1982), gilt für

*Aurelia* nur bedingt. Die nicht selten beobachteten Linien-Hybridisierungen beispielsweise zwischen der Linie BOR und der LIM-Linie zeigen, daß reproduktive Isolationsmechanismen (noch) nicht vollständig etabliert sind. Nach Mayr's (1982) Definition sind diese beiden Linien keine geschlossenen Fortpflanzungsgemeinschaften, also keine Arten. Hingegen kann ein Vertreter der LIM-Linie, WP-LIMBATA\*, aufgrund morphologischer Befunde als Repräsentant der 'guten Art' *A. limbata* geführt werden (Hiroshi Miyake, pers. Mittlg.). Der Konflikt ist offensichtlich. In Ermangelung einer Entscheidungsgrundlage bei z. B. selbst-befruchtenden Zwittern oder hybridisierenden Arten versagt das Konzept der 'biologischen Spezies' und muß durch weitere Kriterien ergänzt werden (z. B. Templeton 1998).

Alternativ werden unter dem Begriff der unabhängigen evolutionären Linie Artdefinitionen nach phylogenetischen Kriterien vorgenommen. Cracraft (1989) integriert Individuen mit gemeinsamen diagnostischen Merkmalen, deren Abstammung auf einen Ancestor zurückgeht, als phylogenetische Spezies. Das *cohesion species*-Konzept (Templeton 1989) berücksichtigt die evolutionären Faktoren Genfluß, genetische Drift und Selektion, die zur Etablierung divergenter evolutionärer Linien führen können. Eine Kohäsionsspezies wird als reproduktive Einheit definiert, deren Grenze genetisch (fehlender Genfluß zu anderen Einheiten) oder demographisch/ökologisch (Fixierung von Merkmalen oder Selektion gemeinsamer Anpassungen) gesetzt wird. Die beschriebenen evolutionären Linien der Ohrenqualle werden beiden Definitionen gerecht. Die 7 mitochondrialen bzw. 8 Linien des Kerngenoms werden durch jeweils 2-11 unzweideutige Synapomorphien charakterisiert, d. h. durch liniendiagnostische Merkmale, deren phylogenetischer Ancestor rekonstruiert wurde. Unter Aspekten der Kohäsionsspezies wird das Fehlen von Genfluß durch die AMOVA-Varianzanalyse der mtDNA ( $F_{ST} = 0.91$ )



gezeigt und durch reziproke Monophylie auf der Ebene beider Genome bestätigt. Die evolutionären Kräfte genetische Drift und/oder Selektion sind an der Etablierung demographisch oder adaptiv bedingter Merkmalsverschiebungen von *cohesion species* beteiligt. Der Einfluß beider Faktoren wird im Folgenden unter dem Kontext möglicher Mechanismen der Speziation diskutiert.

### *Modus der Speziation*

Eine signifikante Abgrenzung der *Aurelia*-Linien nach dem Modus einer geographisch korrelierten Diversifizierung (Bush 1975) konnte nicht festgestellt werden. Dies gilt beispielsweise für die in allen Ozeanen verbreitete UBI-Linie oder die LIM-Linie, deren Vertreter sowohl im Pazifik als auch im Atlantik anzutreffen sind. Das allopatrische Speziationsmodell, nach der die Fragmentation (Vikarianz) einer ancestralen Population zu geographisch getrennten Tochterpopulationen mit der Folge von Differenzierung durch reduzierten Genfluß führt, kann in dieser reinen Form nicht verwendet werden. Dennoch existieren Hinweise für eine geographisch bedingte Separierung beispielsweise bei der lokal auftretenden LAB-Linie an der Pazifikküste Nordamerikas. Eine abgewandelte Form des allopatrischen Modells, der geographischen Partitionierung an der Peripherie der Ursprungspopulation (peripatrisch), ist für die Beziehungen zwischen der Linie UBI sowie TET und ARAB vorstellbar. Danach würde die UBI-Linie eine geographisch weit ausgedehnte, große Ancestralpopulation repräsentieren, die kleinere Tochterpopulationen abspaltete. Die Linien TET und ARAB hätten sich danach an einer subtropisch-tropischen klimatischen Grenze im Mittelmeer/Roten Meer bzw. Persischem Golf etablieren können. Da hierbei morphologische und ökologische Differenzierungen mit einhergingen, z. B. eine Größenreduktion der Polypen und eine höhere

Strobilationsrate, muß unter diesem peripatrischen Modell der divergierenden Selektion (Schluter 1996) eine wichtige Rolle zukommen. In vielen Studien zu allopatrischen Artbildungsprozessen wird die Untersuchung des Einflusses natürlicher Selektion nicht berücksichtigt, genetische Drift und reduzierter Genfluß werden als ausreichend starke Differenzierungsfaktoren erachtet (Übersicht in Orr & Smith 1998). Unter mechanistischen Aspekten kann sehr wohl gezeigt werden, daß die Artbildungsprozesse bei der Ohrenqualle zumindest unter dem Einfluß natürlicher Selektion zu interpretieren sind. Gegen sympatrische oder parasympatrische Speziationsprozesse (Otte & Endler 1989) sprechen sowohl fehlendes Paarungsverhalten (Kramp 1961) als auch die geographisch-klimatischen Verbreitungsmuster der *Aurelia*-Linien. Das gelegentlich syntope Auftreten inklusive vermeintlicher Hybridisierungszonen an der Pazifikküste Mittelkaliforniens (UBI x LAB) und an der Nordküste von Island (LIM x BOR) beruht vermutlich auf Sekundärkontakten. Wie nachfolgend besprochen sind diese im Falle der UBI-Linie an der kalifornischen Küste sogar anthropogenen Ursprungs.

Die Charakterisierung der Artbildung von *Aurelia* anhand geographischer Kriterien ergibt kein eindeutiges Muster. Sympatrische und parasympatrische Modi sind unwahrscheinlich. Allopatrische Diversifizierung kann jedoch nicht ausschließlich unter geographisch verursachter Isolation mit reduziertem Genfluß und Fixierung von Merkmalsunterschieden durch genetische Drift erklärt werden. Ökologische Differenzierung als Voraussetzung für das Wirken von natürlicher Selektion (Schluter 1996; Bridle & Jiggins 2000) sowie die oben erwähnten Prozesse wie Immigration, Sekundärkontakt und Ausbreitungsfähigkeit (*Dispersal*) müssen ebenso berücksichtigt werden. Nachfolgend wird diesen evolutionären Kräften unter mechanistischen Aspekten der Artbildung Rechnung getragen (Templeton 1981).

### *Dispersal*

Die Lebenszyklen vieler mariner Fische und Invertebraten sind gekennzeichnet durch große Populationen und hohe Ausbreitungsfähigkeit der Larven (Palumbi 1994). Oftmals resultiert daraus - verstärkt durch das Fehlen geographischer Barrieren - eine nur schwache genetische Differenzierung von Populationen über große geographische Bereiche (Mayr 1954; Palumbi 1992). Die Artenvielfalt vieler mariner Habitate weist jedoch auf das Auftreten von Faktoren hin, die zur Ausbildung von Populationsstrukturierung führen (Palumbi 1994). Die Ausbreitungsfähigkeit der planktischen Planularlarven von *Aurelia* ist aufgrund der kurzen pelagischen Phase begrenzt. Ethologisch wenig differenzierte Migrationsmuster der Medusen werden aufgrund der Besiedlung von Küstenregionen (Russell 1970) auf passive Strömungsverfrachtungen entlang der Küsten, oder allenfalls lokal beobachtbare Richtungsbewegungen anhand dem Sonnenstand zurückgeführt (Hammer et al. 1994). Die Ausbildung von Populationsstrukturierung wird durch begrenzte Ausbreitungsfähigkeiten begünstigt, sollte jedoch aufgrund von lokalem Genfluß zwischen benachbarten Küstenpopulationen nur auf einer großen geographischen Skala sichtbar werden (Berger 1977). Dieses Muster wird an geographischen Populationen der BOR-Linie (Ost- vs. Westatlantik), der LAB-Linie (Kalifornien vs. Friday Harbor) und der ARAB-Linie (Rotes Meer vs. Persischer Golf) deutlich, bei denen eine entfernungsabhängige genetische Differenzierung (*Isolation by Distance*, Wright 1943) zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu tritt bei der global verbreiteten UBI-Linie keine geographische Differenzierung auf. Weitere Faktoren müssen deshalb für die Artbildung der Ohrenqualle postuliert werden.

### *Selektion und genetische Drift*

Die starke Korrelation zwischen den Umweltfaktoren Breitengrad und Wintermeerestemperatur mit einigen morphologischen Merkmalen (Tabelle 2.5) und zur Differenzierung in genetische Linien ( $R^2 = 0.89$ ) liefert Hinweise für eine ökologisch bedingte Differenzierung bzw. Speziation durch divergente Selektion (Rice & Hostert 1993; Schluter 1996). Höhere geographische Breiten und die damit verbundene Abnahme der winterlichen Wassertemperatur bedingen eine Zunahme der Polypengröße sowie die Abnahme der klonalen Vermehrungs- und Strobilationsrate und der Ephyrenbeweglichkeit. Die Rolle des Klimafaktors Temperatur zur Charakterisierung ökologischer Nischen erscheint evident. Dies wird nicht zuletzt bestätigt durch die hohe Korrelation ( $R^2 = 0.9$ ) zur Auslösetemperatur der Strobila, dem entscheidenden Lebenszyklusstadium zur Initiation der bisexuellen Vermehrung. Phänotypische Variabilität unterliegt dem Einfluß modifikatorischer (nicht heritabler) Umweltfaktoren und der (meist polygenischen) Wirkung genetischer Unterschiede. Die Merkmale Polypengröße und Anzahl Ephyren pro Strobilation illustrieren diese dualistische Wirkung. Polypen der Ostsee unterscheiden sich phänotypisch vor allem in der Größe von Polypenklonen der Nordsee, beide Meeresbecken sind genetisch jedoch nicht differenzierbar (BOR-Linie). In Folge der (natürlichen) hypoosmotischen Hälterung bei 18‰ Salinität vergrößerte sich das Körpervolumen der beiden Ostseeklone BS-BO und BS-K reversibel und führte zur separaten Gruppierung in der Hauptkomponentenanalyse. Eine ähnliche Modifizierbarkeit kann für das Merkmal Ephyrenanzahl pro Strobilation angenommen werden. *Aurelia*-Klone, die durch Kaliumiodid oder Temperaturabsenkung mehrmals zur Strobilation 'gezwungen' wurden, wiesen eine geringere Anzahl an Ephyren gegenüber natürlich strobilierenden Klonen auf. Die in Tabelle 2.11 gezeigten Korrelationen zwischen phänotypischer

und genetischer Variabilität verdeutlichen die Effekte einer Umweltmodifikation. Wachstumsrate und Größe der Polypen sowie die Ephyrenfarbe besitzen mit  $R^2 < 0.35$  nur moderate Korrelationen zur genetischen Linie und unterliegen demzufolge einer starken Umweltbeeinflussung. Hingegen zeigen die Parameter Kaliumiodid-Induzierbarkeit, Strobilationshäufigkeit und Induktionstemperatur sowie die Ephyrenbeweglichkeit eine starke Abhängigkeit zur genetischen Konstitution. Diese Korrelation entspricht den Erwartungen des Speziationsmodells *divergence with gene flow* (Endler 1977; Rice & Hostert 1993), nach dem divergente Selektion eine Abnahme von Genfluß (Etablierung genetischer Linien) und gleichzeitig eine Verstärkung morphologisch/organismischer Differenzierungen verursacht.

Genetische Drift ist unter der Annahme neutraler Evolution die Ursache der genetischen Differenzierung von Populationen (Hartl & Clark 1989). Die Wahrscheinlichkeit, daß ein neu entstandenes mutantes Allel in einer diploiden Population fixiert wird ( $1/2N$ ), ist abhängig von der aktuellen effektiven Populationsgröße. Durch Drift bedingte Differenzierung verläuft deshalb in kleinen Populationen schneller. In kleinen Gründerpopulation, die nur einen Teil der Variation ihrer Anzestralpopulation beinhalten, verstärkt dieser Effekt die Artbildung (Mayr 1954, 1982; Templeton 1981). Wenngleich die relevanten Faktoren bei neutraler Evolution, Populationsgröße und Mutationsrate, für die Ohrenqualle nicht direkt meßbar sind, lassen sich indirekt Aussagen über die synergistische Wirkung von genetischer Drift und natürlicher Selektion ableiten (Barton 1996).

Die Kopplung neutraler Loci mit einem Genort, der natürlicher Selektion ausgesetzt ist, kann zu einer Reduzierung der genetischen Variation des neutralen Locus führen. Die Fixierung eines bestimmten vorteilhaften Allels in einer Populati-

on aufgrund des Wirkens gerichteter Selektion (*selective sweep*) resultiert in der Fixierung eines Allels an dem gekoppelten neutralen Locus (*hitchhiking*, Kaplan et al. 1989). Dieser Prozeß hat zur Folge, daß sich Mutationen am neutralen Locus erst nach dem Zeitpunkt des *selective sweep* akkumulieren können. Eine geringe genetische Variation und das Dominieren von Allelen mit niedriger Frequenz in Populationen bzw. Spezies sind die Konsequenzen (Avice et al. 1988). Der D-Test (Tajima 1989) zeigte für die beiden genetischen Linien UBI ( $D = -2.2$ ) und BOR ( $D = -1.86$ ) ein signifikantes Abweichen von den Erwartungen unter neutraler Evolution. Negative D-Statistikwerte innerhalb einer Population (Linie) sind auf eine Spektrumverschiebung zugunsten von Allelen mit einer niedrigen Frequenz zurückzuführen. Die ubiquitäre UBI-Linie und die im gesamten Nordatlantik anzutreffende BOR-Linie sind die *Aurelia*-Kladen mit der größten geographischen Verbreitung und sollten theoretisch stärker strukturiert sein. Die auffällig geringe Variation innerhalb der UBI- und BOR-Linie an beiden Genorten sowie die erhöhte Anzahl seltener Allele (negative D-Werte) können durch das Zusammenspiel von Selektion und *hitchhiking* erklärt werden. Dabei müßten beide Genorte, 16S rDNA und ITS-1/5.8S rDNA, an DNA-Regionen unter Selektion gekoppelt vorliegen. Die genetische Variation der restlichen *Aurelia*-Linien zeigte keine signifikante Abweichung von 'Neutraler Variation'. Jedoch wurden ausnahmslos negative D-Werte ermittelt, so daß auf analoge Prozesse geschlossen werden kann. Das Nichterreichen des Signifikanzniveaus kann durch die kleinen Stichprobengrößen verursacht sein.

Die genetischen Konsequenzen eines *selective sweep* - Reduzierung der genetischen Variation mit anschließender Akkumulation von Mutationen - sind nicht von dem genetischen Muster einer Populationsexpansion nach einem *bottle neck* zu

unterscheiden (Tajima 1993). Bei alleiniger Wirkung von genetischer Drift in konstanten Populationen sollte die Koaleszenz zweier Linien zu ihrem gemeinsamen Ancestor zeitlich zurückgehend kontinuierlich seltener werden und schließlich in einem einzigen Knoten münden (Slatkin & Hudson 1991). Die meisten Koaleszenzereignisse (Knotenbildungen) sollten konsequenterweise rezent stattgefunden haben. Die Muster der Genealogien von 16S rDNA und ITS-1/5.8S rDNA sind gerade gegenteilig strukturiert. Beide Genphylogenien sind durch eine sternförmige Linien- diversifizierung charakterisiert, bei der die Koaleszenz fast aller Linien nahe der Wurzel liegt. Dieses Muster ist kongruent mit dem Szenario einer Expansion nach einem oder mehreren zurückliegenden *bottle necks* während dem kleine Populationsgrößen vorherrschten und Koaleszenzereignisse wahrscheinlicher erfolgten. Der hohe Grad an Polytomien nahe dem Ursprung und die nicht rekonstruierbare phylogenetische Beziehung zwischen einigen *Aurelia*-Kladen lassen einen starken *bottle neck*-Effekt vermuten, der zur raschen Fixierung unterschiedlicher Genotypen (Linien) führte. Das gleichzeitige Aussterben von Genotypen (Linien) ist möglicherweise die Ursache, daß die phylogenetischen Ursprungsbeziehungen der rezenten genetischen Linien nicht mehr zu rekonstruieren sind.

### ***Concerted evolution***

Nach der Theorie von *concerted evolution* sollte die Homogenisierung von Genfamilien wie tandem-repetitierte ribosomale RNA-Gene *via* Genkonversion und/oder ungleichem *crossing-over* sowohl innerhalb von Individuen als auch zwischen Individuen einer Population oder Spezies zu beobachten sein (Dover 1982; Elder & Turner 1995). Die vergleichsweise geringe genetische Variation innerhalb von *Aurelia*-Linien am ITS-1/5.8S RNA-Locus kann nicht exklusiv auf diesen als *concerted evolution* bezeichneten Prozeß

zurückgeführt werden, da die genetische Strukturierung auf mtDNA-Ebene ein ähnliches Muster aufweist. Die Anzahl polymorpher ribosomaler nc-Allele innerhalb der *Aurelia*-Linien ist vergleichbar mit der Alleldiversität der 16S mtDNA. Die hohe Alleldiversität der LAB-Gruppe wird beispielsweise durch die Existenz eines hochvariablen Mikrosatelliten am 5'-Ende der ITS-1-Region verursacht. Höhere Mutations- als Homogenisierungsraten müssen für die ITS-Region auf Populations- bzw. Linienebene bei *Aurelia* postuliert werden (Ohta & Dover 1983; Schlötterer et al. 1994). Im Gegensatz dazu werden auf Individuenebene die mutationsbedingten neuen Allelvarianten möglicherweise durch intrachromosomalen Austausch homogenisiert (Schlötterer & Tautz 1994). Dies begründet sich im mehrheitlich additiven Muster der beobachteten Allelvarianten eines Individuums, welche sich unmittelbar verschiedenen Individuen bzw. im Fall der Hybriden den Parentallinien zuordnen lassen.

Die unerwartete Hybridisierung zwischen *Aurelia* und *Cyanea capillata* (Abschnitt 2.4.2) führte zur Fixierung eines unmittelbar von *Cyanea* abzuleitenden Allels in Individuen der *Aurelia*-ncLinie LIM (EA-IS1, EA-IS3). Es ist zu vermuten, daß Hybridisierungs- und Rückkreuzungsereignisse mit *Cyanea* äußerst selten, wenn nicht einmalig, auftraten. Eine durch *concerted evolution* verursachte Homogenisierung auf Individuenebene mit nachfolgender schneller Ausbreitung auf Populations- bzw. Speziesebene innerhalb der LIM-Linie muß daher für dieses '*Cyanea*'-Allel postuliert werden.

### **Datierung der *Aurelia*-Radiation**

Beide Allelphylogenien zeigen lange Kanten einzelner Linien im Vergleich zu den Kantenlängen nahe der Wurzel. Dieses Charakteristikum datiert den Zeitpunkt der *Aurelia*-Radiation unter der Annahme neutraler Mutationsanhäufungen weit zurück. Für beide Genorte konnte die Diversifizierung der Linien unter der Hypothese einer konstanten Evolutionsrate (*molecular clock*) mittels Maximum-Likelihood-Test abgelehnt werden. Aus Sicht der Neutraltheorie werden unterschiedliche Generationszeiten oder metabolische Raten (*generation time hypothesis, metabolic rate hypothesis*, Martin & Palumbi 1993; Rand 1994) für diese Abweichungen postuliert. Die Kladen aus warm-tropischen Habitaten, TET, ARAB und MCA sind organismisch durch hohe Ephyrenbeweglichkeit und/oder Strobilationen über das ganze Jahr hinweg charakterisiert (s. Tabelle 2.3). Beide Merkmale sind Indizien für höhere metabolische Raten und verkürzte Generationszeiten und verursachen möglicherweise höhere Substitutionsraten. Der hohe Differenzierungsgrad der MCA-Linie (z. B. 11 Apomorphien in der 16S-Region) und die höhere Haplotypdiversität (mtDNA und ncDNA) und genetische Distanz (ncDNA) innerhalb der Gruppen ARAB und TET belegen die genannten *lineage*-Effekte. Die Datierung des Zeitpunktes der Artaufspaltung von *Aurelia* wird - beeinflusst durch *lineage*-Effekte, mehrmalige Expansionsepisoden, unterschiedliche Adaptationsraten sowie möglicher mtDNA-Rekombination (s. Abschnitt 2.4.4) - eine grobe Schätzung darstellen. Aufgrund der größten geographischen Verbreitung können die Linien BOR und UBI als anzestrale Linien geführt werden. Die jeweils niedrigsten Sequenzdivergenzen zwischen den Kladen BOR und LIM (7.8%) und zwischen UBI und TET (10.2%, vgl. Tabelle 2.9) bezüglich der 16S rDNA liefern konservative Datierungen. Bei Annahme einer Evolutionsrate von 1% paarweiser Divergenz pro Million Jahre

für die 16S-Region (vgl. Cunningham et al. 1992, 0.5% bei Crustacea; Rawson & Hilbish 1995, 0.5%-1% bei *M. edulis*) lassen sich Radiationsergebnisse auf 7.8 bzw. 10.2 Millionen Jahre in das Miozän zurückdatieren. Folglich ist die Radiation der *Aurelia*-Linien entgegen häufig verwendeter Speziationsdatierungen wahrscheinlich nicht auf klimatische und ozeanographische Fluktuationen des Plio-Pleistozäns (z. B. Klicka & Zink 1997) zurückzuführen.

Die historischen Prozesse, die zur Speziation von *Aurelia* geführt haben, sind letztendlich nicht eindeutig zu klären. Das Muster der sternförmigen Kladogenese erfaßt nahezu alle Linien und hinterläßt konkordante Genealogien an beiden Genorten. Dies spricht für *bottle neck*-Effekte, von denen alle Populationen und das gesamte Genom der Ohrenqualle betroffen wurden. Andererseits liefern die ökologischen Differenzierungen Evidenzen für das Wirken von divergenter Selektion. Separierte Gründerpopulationen unterlagen vermutlich gleichzeitig den Folgen von Expansionen und divergenter Selektion. Wiederholte Zyklen von Expansion und Selektion führten schließlich zu der deutlich reduzierten genetischen Variation innerhalb von Linien und zu einer größeren Divergenz zwischen den Linien. Dieses Szenario ist vereinbar mit einem mechanistischen Speziationsmodell bei dem in kleinen Gründerpopulationen die Artbildung sehr rasch erfolgen kann; danach führt die Adaptation weniger Genotypen unter neuen ökologischen Bedingungen zur kompletten genetischen Rekonstitution (Mayr 1954) oder, verstärkt durch eine rasche Expansion der Gründerpopulation, zu einem abrupten Merkmalsübergang (Transillienz; Templeton 1981).

Die Untersuchungen zusätzlicher Populationen auf einer globalen Skala werden die bisherigen Erkenntnisse zu den vorgeschlagenen Mechanismen der *Aurelia*-Speziation komplettieren. Da mit einer Stichprobe von 67 Individuen bereits 8 Spezies

charakterisiert werden konnten, ist die Beschreibung weiterer divergenter genetischer Linien zu erwarten. Möglicherweise lassen sich dann die internen Kladenbeziehungen in einer phylogenetischen Analyse besser rekonstruieren.

#### 2.4.2 Phylogeographie und Hybridisierung

Auf der Basis der vorliegenden Stichprobe weltweiter Populationen ist zu hypothesieren, daß die Linien UBI oder BOR der geographischen Verbreitung einer ursprünglichen *Aurelia*-Population relativ nahe kommen. Nach dem ersten Szenario einer ancestralen UBI-Population hätten sich an der Peripherie einer gemäßigt bis subtropischen Klimazone Spezies in tropischen Klimaten (TET, ARAB, MCA) sowie gemäßigt-borealen (BOR) und boreoarktischen (LIM) Habitaten etablieren können. Die Alternativhypothese einer ursprünglichen BOR-Population, analog einer von Mayer (in Russell 1970) vermuteten borealen Anzestralspezies *A. aurita*, impliziert den Ursprung einer Radiation im Atlantik.

Der LAB-Gruppe an der amerikanischen Pazifikküste kommt unter beiden möglichen Szenarien nicht zuletzt aufgrund der beobachteten Linienhybridisierung eine Sonderrolle zu. In Monterey/Kalifornien wurde ein Individuum der UBI-Linie (EP-PM3) und in Berkley/Kalifornien ein Hybrid-Individuum der mitochondrialen UBI-Linie mit beiden Allelen der nc-Linien UBI und LAB (EP-P1) gesammelt. Verglichen mit der hohen Abundanz der LAB-Linie an der amerikanischen Pazifikküste ist die Allelfrequenz der nc-Linie UBI von 0.11 niedrig. Das seltene Auftreten der UBI-Individuen ist sehr wahrscheinlich mit einer anthropogen verursachten Einschleppung zu begründen. Greenberg et al. (1996) beschrieben auf Basis fixierter Allozym-Unterschiede eine neue Art der Gattung (*Aurelia* sp.) in der Bucht

von San Francisco, die 1988 dort erstmals beobachtet wurde. Morphologische und genetische Ähnlichkeiten dieser Art mit Aurelien aus Japan (Tokio) führten sie auf transozeanische Verfrachtung *via* Schiffsballastwasser zurück. Die genetischen Daten der vorliegenden Untersuchung bestätigen die Abundanz der UBI-Linie rund um die japanische Küste; die von Greenberg et al. (1996) neu beschriebene Art entspricht offenkundig der UBI-Linie. Die Entstehung der lokalen, geographisch separierten LAB-Klade kann im Gegensatz zu den restlichen *Aurelia*-Linien mit einem geographisch/allopatrischen Modus erklärt werden.

#### *Hypothese einer 'Borealinvasion'*

Die Linien BOR und LIM etablierten sich in kühl-gemäßigten und boreoarktischen Habitaten. Am BOR-Klon NS-HE2 konnte experimentell gezeigt werden, daß die Temperatur bei der gerade noch eine Strobilation induziert werden kann 8°C beträgt. Diese Temperatur setzt daher eine ökologische Obergrenze für die Initiation der bisexuellen Vermehrung der BOR-Linie. Die Strobilation der LIM-Linie konnte experimentell nicht untersucht werden, vermutlich wird sie aufgrund des Verbreitungsgebietes ebenfalls durch niedrige Temperaturen induziert. Das Vorkommen von LIM-Genen in der kroatischen Adria sowie von Individuen der BOR-Linie im Schwarzen Meer erscheint biogeographisch und klimatisch zunächst rätselhaft. Die Besiedlung beider Meeresbasins muß über das Mittelmeer erfolgt sein, in dem eine Oberflächenwassertemperatur von 11-12°C im Winter jedoch nicht unterschritten wird (SISMAR). Die BOR-Individuen vom Bosphorus und des Schwarzen Meeres unterscheiden sich von Nord- und Ostseetieren um maximal 2 Basensubstitutionen an beiden Genorten, so daß eine rezente Kolonisierung evident ist. Eine Verfrachtung



bereits in nördlicheren Regionen oder alternativ erst im Mittelmeer stattfand. Ersteres erscheint plausibler, da die Habitatverschiebung durch die erwähnten Hybridmerkmale (relaxierte Strobilationsinduktion) begünstigt worden wäre. Im Zuge der postglazialen Erwärmung und Erhöhung der Meeresspiegel (Herman 1988) entstanden die marinen Bedingungen der Mljet-Seen an der kroatischen Küste, welche durch einige Nachkommen aus MKL x LIM-Rückkreuzungen kolonisiert wurden. Unter den besonderen hydrographischen Bedingungen (stabile Temperaturschichtung mit Minimaltemperaturen unterhalb der Kline) konnten sich die zum Zeitpunkt des Meeresspiegels vor 4200-7000 Jahren außerhalb dominierenden Zooplanktonspezies in den Seen etablieren und rezent erhalten (Benovic et al. 1999). Die *Aurelia*-Hybridspezies in den Seen von Mljet ist als endemische Reliktform eiszeitlich bedingter Habitatverschiebungen und (je nach Hybridisierungsort) Extinktionen zu interpretieren; weder die Hybride noch deren Parentalarten LIM und MKL können derzeit im Mittelmeer nachgewiesen werden.

**Besiedlung des Schwarzen Meer:** Meeresspiegelerhöhungen im Holozän stellten die Verbindung des Mittelmeers mit dem eiszeitlichen Süßwasserbasin des Schwarzen Meeres über den Bosphorus her und etablierten Brackwasserbedingungen (Zenkevitch 1963; Herman 1988). Einige Vertreter der BOR-Linie könnten in der Folge das Schwarze Meer besiedelt haben. Ihre Persistenz verdanken sie den niedrigen winterlichen Wassertemperaturen von 4-8°C (SISMER), welche ausreichend für die Strobilationsinduktion ist. Die BOR-Linie des Schwarzen Meeres ist nach dem Szenario einer 'borealen Invasion' ebenso als postglaziale Reliktform einzuordnen. Ihre Ausbreitung zurück in das Mittelmeer wird durch die dort vorherrschenden hohen Temperaturen von über 11°C verhindert (SISMER). Während des evolutionär kurzen Zeitraumes von weniger als 18000 Jahren konnte

sich keine nennenswerte genetische Differenzierung zur borealen 'Stammform' aus dem nördlichen Atlantik entwickeln. Parallel begründet sich die fehlende genetische Differenzierung der BOR-Populationen der Ostsee durch eine ebenfalls postglaziale Besiedlung der Ostsee, die während der Eiszeiten vereist war (Frenzel et al. 1992).

Die rekonstruierten phylogeographischen Beziehungen illustrieren die Bedeutung der Faktoren Fragmentierung und Sekundärkontakt als Ursache interspezifischer Hybridisierung im Verlauf der jüngeren evolutionären Historie von *Aurelia*. Die relativ häufig beobachtbaren Linienhybridisierungen verdeutlichen, daß die Entstehung reproduktiver Isolationsbarrieren keine zwingende Folge von Speziation ist. Dies zeigt sich besonders am Beispiel der LIM-Linie, die mit Individuen der BOR- und MKL-Linien hybridisierte. Außerdem muß ein Hybridisierungsereignis mit *Cyanea capillata* stattgefunden haben. Die Familien Ulmaridae (mit der Gattung *Aurelia*) und Cyaneidae (Russell 1970) sind entwicklungsgeschichtlich so weit getrennt, daß die Persistenz eines gemeinsamen Allels der ribosomalen ncDNA nahezu ausgeschlossen ist (ungeachtet potentieller Mechanismen zur Erhaltung anzestraler Polymorphismen; Ritland et al. 1993). Die niedrige Sequenzdivergenz von 3.4% zwischen Vertretern der nc-Linie LIM und dem Allel von *C. capillata* erzwingt daher eine rezent stattgefundenene Introgresion in Aurelien der LIM-Linie. Basierend auf einer Schätzung der Evolutionsrate für die ITS/5.8S-Region bei *Drosophila* von 1.2% pro Million Jahre (Schlötterer et al. 1994) wäre dieses Ereignis auf 2.8 Millionen Jahre zurückzudatieren. Dieser Zeitpunkt fällt mit dem ungefähren Beginn der pleistozänen Klimaabkühlung zusammen (Webb & Bartlein 1992), so daß möglicherweise ökologisch bedingte Habitatverschiebungen Sekundärkontakte und Hybridisierung begünstigten.



Die Relaxierung der reproduktiven Isolation einzelner *Aurelia*-Spezies könnte nach dem Modell einer *reticulate evolution* (Grigg 1995) erklärt werden. Korallen-Arten der Gattung *Acropora* evolvieren nach diesem Modell einer vernetzten 'Metaspezies' in alternierender Folge von Separation (Etablierung reproduktiver Isolation) und Fusion (interspezifische Hybridisierung) (Veron 1995; Odorico & Miller 1997). Die Befunde an *Aurelia* zeigen im Gegensatz dazu, daß Hybridisierungen eher opportunistisch in Abhängigkeit von Kontaktmöglichkeiten und mehrheitlich rezent stattfanden. Was immer die vollständige Errichtung präzygotischer Isolationsmechanismen, z. B. Rezeptorerkennung der Gameten (Palumbi 1994) zwischen *Aurelia*-Spezies verhindert, die Artbildungsprozesse scheinen davon unabhängig gewesen zu sein. Vielmehr zeigt das Beispiel von fertilen Rückkreuzungshybriden in den Seen der kroatischen Mljet-Inseln, daß Hybridisierung als Modus einer raschen Speziation (Grant 1981; Ungerer et al. 1998) die Artbildung bei *Aurelia* verstärkt oder eingeleitet haben kann.

### 2.4.3 Taxonomie von *Aurelia*

Die Benennung der molekulargenetisch charakterisierten 7 Spezies (respektive 8 inklusive der Hybridlinie MKL) ist angesichts der 200-jährigen Geschichte variierender und widersprüchlicher taxonomischer Einteilungen der Gattung *Aurelia* nur bedingt möglich. Sie wird durch die unterschiedliche Natur diagnostischer Merkmale erschwert, molekulargenetische und organismische Befunde der Polypen- und Ephyrengeneration einerseits, und morphologische Merkmale der Medusen andererseits. Die kontinuierliche Reduktion der *Aurelia*-Arten von 12 (Mayer 1910), 7 (Kramp 1961), 4 (Thiel 1970) auf derzeit zwei Spezies *A. aurita* und *A. limbata* (Russell 1970) erscheint zum Teil gerechtfertigt, unterschätzt aber

die substantielle genetische Diversität der Ohrenqualle bei weitem. Russell (1970) und Thiel (1970) bezweifeln offensichtlich zu Recht die Validität taxonomischer Merkmale, wie z. B. die Faltung der Mundarmlippen oder den Verzweigungsgrad der Radiärkanäle, die geographische oder altersabhängige Polymorphismen widerspiegeln. Angesichts des Hybridisierungspotentials der Ohrenqualle scheint es sehr wahrscheinlich, daß morphologische und taxonomische Vermischungen auf biologische Ursachen zurückzuführen sind (Kramp 1961 listet beispielsweise Medusen der Mljet-Inseln Kroatiens als *A. aurita*, die nach den gezeigten Befunden Hybridspezies repräsentieren). Folgende taxonomische Schlußfolgerungen sind aus den molekulargenetischen Analysen abzuleiten:

#### *Aurelia aurita* (Linné 1758)

Dieser Speziesbegriff unterlag den gravierendsten Revisionen und umfaßt vermeintlich alle weltweiten Populationen warm-gemäßigter Klimazonen. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist dieses Taxon als einzelne Spezies nicht haltbar. In den von Kramp (1961) beschriebenen Fundorten von *A. aurita* dominieren die europäischen Gewässer des nördlichen Atlantiks inklusive Nord- und Ostsee gefolgt vom Westatlantik (Maine). Diese Gebiete sind deckungsgleich mit dem Verbreitungsspektrum der genetischen Linie BOR. Die restlichen in Kramp (1961) beschriebenen Fundorte erstrecken sich weltweit über alle warmen Gewässer, darunter vor allem um Japan und im Mittelmeer. Dieses Spektrum deckt sich mit dem Vorkommen der in mediterranen Klimaten weltweit ubiquitären UBI-Linie. Offensichtlich sind die beiden genetischen Linien BOR und UBI nach morphologischen Kriterien nicht zu unterscheiden, obwohl ihre Sequenzdivergenz bezüglich beider untersuchten Genorte über 8% beträgt. Ein gemeinsamer phylogenetischer Ancestor konnte nicht rekonstruiert werden. Interessanterweise

wurde die von Lendenfeld (1884) original beschriebene und rund um Südaustralien verbreitete *A. coerulea* später als Varietät der *A. aurita* eingeordnet. Vermutlich handelt es sich bei diesem Taxon ebenfalls um die UBI-Gruppe, deren Vorkommen an der australischen Küste dokumentiert wird (vgl. Abb. 2.3.22). Die klassische *A. aurita* muß nach vorliegenden Befunden systematisch in eine klimatisch boreal-atlantische (BOR) und eine mediterran verbreitete Spezies (UBI) klassifiziert werden.

#### *Aurelia limbata* (Brandt 1838)

Das aus dem Nordwestpazifik stammende Individuum WP-LIMBATA\* zeigt die in der Literatur beschriebenen Merkmale anastomisierender Radialkanäle sowie eines braun gefärbten Schirmrandes. Dieses und weitere Individuen repräsentieren die genetische Linie LIM und damit *A. limbata*. Auf Basis der mtDNA bildet *A. limbata* eine monophyletische Gruppe mit der Linie BOR (atlantische *A. aurita*). Sie besitzt ein hohes Hybridisierungspotential zur atlantischen *A. aurita* und zur MKL-Spezies. Nicht zuletzt fand eine Hybridisierung mit *Cyanea capillata* statt, die zur Introgression von Kern-DNA und möglicherweise weiteren *Cyanea*-Merkmalen führte.

#### *Aurelia labiata* (Chamisso & Eysenhardt 1820)

Die Art *A. labiata* wurde, hauptsächlich aufgrund von Unsicherheiten bezüglich ihrer diagnostischen 16 Schirmrandlappen, aus der aktuellen Literatur verbannt und als Varietät von *A. aurita* oder Farbvariante von *A. limbata* geführt. Claudia Mills und Lisa-Ann Gershwin (pers. Mittlg.) sind im Begriff *A. labiata* als eigenständige Spezies anhand morphologischer Merkmale neu zu beschreiben. Vertreter dieser Morphospezies (PFH-LAB) konnten als eigenständige genetische LAB-Linie identifiziert werden, 84% der untersuchten Individuen zwischen Kalifornien und Washing-

ton/Friday Harbor konnten der LAB-Linie zugewiesen werden. *A. labiata* zeigt weder zu den beiden *A. aurita*-Spezies BOR und UBI noch zu *A. limbata* unmittelbare phylogenetische Beziehungen. Sie ist als stammesgeschichtlich alte, mediterran-boreal verbreitete lokale Art der amerikanischen Pazifikküste zu führen, sie besitzt jedoch Hybridisierungspotential zur mediterranen *A. aurita* (UBI-Linie). Hybridisierungen sind als rezent einzustufen (San Francisco-Bay), die Fertilität der Hybride ist ungewiß.

#### *Aurelia* sp.-MKL

Die MKL-Linie, in den kroatischen Mljet-Inseln als Hybridspezies mit *A. limbata* als maternale Parentalart identifiziert, kann keiner bisherigen taxonomischen Bezeichnung zugeordnet werden. Sie zeigt auffällige Schirmvergrößerungen und Lebenszyklus-Merkmale, welche vermutlich auf ihren Hybridstatus zurückzuführen sind. Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet der anderen Parentalart sollte sich (zumindest während der letzten Eiszeit) mit dem von *A. limbata* überschneiden haben und kann entweder im nördlichen Atlantik bzw. Pazifik oder im Mittelmeer lokalisiert werden.

#### *Aurelia* sp.-ARAB

Die ARAB-Linie wurde als eigenständige Spezies entlang der Arabischen Halbinsel identifiziert und zeigt Merkmale in Morphologie und Lebenszyklus, die als Anpassungen an tropische Klimate zu deuten sind. Von den in Kramp (1961) noch geführten Spezies könnte *A. maldivensis* (Bigelow 1904) aufgrund der Herkunftsbeschreibungen und der pink-violetten Färbung taxonomisch zugeordnet werden; allerdings konnten deren 'vorhangartige' Mundarme aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes der IO-DUB-Meduse (vgl. Abb. 2.3.6) nicht verifiziert werden.

*Aurelia* sp.-TET

Die TET-Linie repräsentiert eine Spezies der mediterranen bis tropischen Klimazone. Da mit lediglich zwei Individuen vom Mittelmeer und Roten Meer eine begrenzte Stichprobe vorliegt, sind Aussagen über deren sonstiges Verbreitungsgebiet und taxonomische Zuordnungen nicht möglich. Nach den genealogischen Befunden bildet die TET-Linie zusammen mit der mediterranen *A. aurita* (UBI) eine monophyletische Gruppe, welches ein Hinweis auf eine ökologische Differenzierung zu wärmeren Klimazonen ist.

*Aurelia* sp.-MCA

Die MCA-Linie wird lediglich durch ein Tier repräsentiert und zeigt den genetisch höchsten Differenzierungsgrad zu den restlichen *Aurelia*-Spezies. Ihre phylogenetische Stellung bleibt unklar, das Verbreitungsgebiet erstreckt sich vermutlich innerhalb tropischer Gewässer (Pascal Mosconie, pers. Mittlg.).

**2.4.4 Mitochondriale DNA-Rekombination**

Das jahrzehnte alte Dogma eines maternalen Vererbungsmodus der mitochondrialen DNA tierischer Organismen läßt die Annahme einer Rekombination von mitochondrialen Genen nicht zu (Moritz et al. 1987; Gyllensten et al. 1991). In neuerer Zeit jedoch wurden Evidenzen zur paternalen Transmission der mtDNA in die Zygote, beispielsweise bei *Mytilus edulis* (Zouros et al. 1994) oder bei Mäusen (Gyllensten et al. 1991; Kaneda et al. 1995) dokumentiert. Die Hypothese einer DNA-Rekombination zwischen väterlichem und mütterlichem mitochondrialen Genom wird gegenwärtig - ungeachtet der ungeklärten molekularen Mechanismen - aufgrund der mehrheitlich indirekten Indizienlage konträr diskutiert. Hagelberg et al. (1999) und Eyre-Walker et al. (1999a)

führen den hohen Homoplasieanteil der mitochondrialen Kontrollregion beim Menschen und der 3. Kodonpositionen des gesamten menschlichen mt-Genoms auf DNA-Rekombination zurück. Ein Jahr später mußten Hagelberg et al. (2000) ihre Ergebnisse dementieren, und Macaulay et al. (1999) bezweifeln die Validität der Daten von Eyre-Walker et al. (1999a). Das begonnene argumentative Wechselspiel zwischen den Autoren (Eyre-Walker et al. 1999b) sowie neue schlüssige Evidenzen von mtDNA-Rekombination bei Mensch und Schimpansen (Awadalla et al. 1999) implizieren weitere zukünftige Debatten (siehe Science 2000, 288, S.1931, u. <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/288/5473/1931a>).

Im Gegensatz zu den bisher beobachteten indirekten Indizien anderer Autoren liefert die nachweisbare chimäre 16S-Allelsequenz B des *Aurelia*-Individuums EA-IS1 direkte Hinweise für eine stattgefunden mitochondriale DNA-Rekombination. Die Weitergabe von Mitochondrien beider Elternteile an die Zygote als unabdingbare Voraussetzung für Rekombination kann außerdem noch an einem weiteren Tier postuliert werden (EP-FH1) und scheint somit kein 'artefaktischer' Einzelfall zu sein. Die Mitochondrien der männlichen Gameten waren demnach keinem Abbau oder Ausdünnungseffekt während der Befruchtung und Embryogenese unterworfen (Shitara et al. 1998). Alternativ könnte die nachweisbare Existenz unterschiedlicher 16S-mtDNA-Kopien durch die Amplifikation eines Pseudogens von ins Kerngenom insertierter mtDNA verursacht werden. Pseudogene sollten keinen strukturellen Zwängen unterworfen sein, so daß die Anreicherung neutraler, zufällig verteilter Mutationen zu erwarten sind (Zhang & Hewitt 1996). Die DNA-Sequenzen der heteroplasmatischen Allele beider *Aurelia*-Individuen verursachen keine Änderung in der 16S RNA-Sekundärstruktur, welches im Widerspruch zur zufallsmäßigen Mutationsanreicherung steht. Zusätzlich sprechen die DNA-Hybridisierungs-

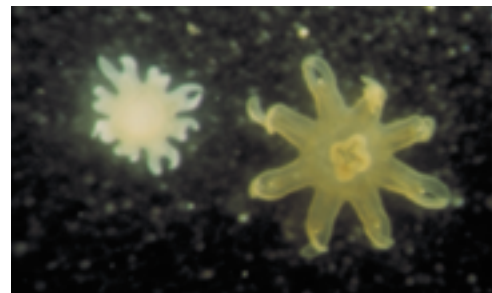
signale beider Allelvarianten des Individuums EA-IS1 gegen das Argument einer Pseudogenamplifikation. Keine der beiden Allelsonden hybridisierte mit einer potentiellen Kopie aus der Fraktion des Kerngenoms (>20 kb), vielmehr befanden sich beide Signale auf Höhe der Fraktion des mitochondrialen Genoms (16-18 kb). Beide Individuen besitzen demzufolge heteroplasmatische 16S rDNA-Varianten. Da die Allele eines Individuums direkt (EP-FH1) - oder indirekt durch Annahme von Rekombination (EA-IS1) - eindeutig unterschiedlichen *Aurelia*-Linien zugeordnet werden können, ist eine *in situ* Entstehung *via* Mutation ausgeschlossen (Lunt et al. 1998). Ein biparentaler Vererbungsmodus muß postuliert werden, der durch den besonderen Fall von nachgewiesenen Linien-hybridisierungen eintreten kann.

Mitochondriale DNA-Rekombination erfordert den physischen Kontakt des mt-Genoms der Eizelle mit dem des Spermiums, welches zumindest beim Menschen bereits während der Befruchtung abgebaut wird (Sutovsky & Schatten 2000). Entsprechend gibt es über die zellulären und molekularen Mechanismen eines DNA-Austausches keine klaren Vorstellungen (Hey 2000). Immerhin existieren die für DNA-Rekombination notwendigen Enzyme in Mitochondrien (Thyagarajan et al. 1996) und Berichte von mitochondrialer Rekombination bei Pflanzen, Pilzen und Einzellern sind keine Seltenheit (Gray 1989). Wallis (1999) wirft die Frage auf, weshalb speziell bei hybridisierenden Spezies keine rekombinierten Hybridgenome der mtDNA zu beobachten sind. Das 16S-mtDNA-Allel EA-IS1/B illustriert unmittelbar auf DNA-Sequenzebene gerade diesen Fall. Die gleichzeitige enge phylogenetische Beziehung dieses Allels zu zwei eindeutig verschiedenen genetischen Linien, BOR und LIM, erfordert ein vorausgegangenes Hybridisierungsereignis, welches durch die Ergebnisse auf Kernebene bestätigt werden kann. Argumentativ könnte angeführt werden, daß

rekombinierte Allele bei heterozygoten DNA-Proben durch PCR-Artefakte generiert werden könnten (Bradley & Hillis 1997). Eine *in vitro*-Entstehung des rekombinanten EA-IS1/B-Allels ist äußerst unwahrscheinlich. Neben dem nicht-rekombinanten Allel EA-IS1/A (BOR-Linie) wurde kein reines LIM-Allel identifiziert, welches die elementare Voraussetzung für eine '*in vitro*-Rekombination' wäre.

Das chimäre 16S-Allel EA-IS1/B ist sehr wahrscheinlich das Ergebnis einer mtDNA-Rekombination. Eine Hybridisierung von Aurelien der LIM- mit der BOR-Linie erzeugte durch Rekombination der beiden Genome den Hybriden (LIM x BOR) vom Typ des Allels B. Vertreter dieser mitochondrialen Hybridlinie LIM x BOR erhielten sich rezent und kreuzten sich beispielsweise mit einem Vertreter der BOR-Linie vom Typ des Allels A. Das Individuum EA-IS1 repräsentiert diesen Kreuzungstyp, durch den die potentielle biparentale Vererbung beider Elterngene erneut illustriert wird.

Sollten die eingangs diesen Abschnittes erwähnten Evidenzen an Hominiden sowie die Befunde von Lunt & Hyman (1997) an einer Nematodenspezies keine Alternativerklärungen zulassen, erhebt sich die Frage ob der Paradigmawechsel 'mitochondrialer DNA-Rekombination nicht durch weitere Tiergruppen und insbesondere aufgrund der vorliegenden Daten durch die Ohrenqualle unterstützt werden kann.



Ephyren der *Aurelia*-Linien BOR (links) und UBI (rechts)

### 3. Molekulare Ökotoxikologie: Etablierung von Biomarkern

#### 3.1 Einleitung

Kontinuierlich wachsende und neuartige Schadstoffbelastungen gegenüber verschiedenen biologischen Organisationsebenen erzwingen den Einsatz spezifischer Methodiken in der ökotoxikologischen Forschung (Clements & Kiffney 1994; Goldberg & Bertine 2000). Klassische Ökotoxizitätstests prüfen die akute Letalwirkung einer Chemikalie sowie die chronische Wirkung auf Lebenszyklusparameter, wie Entwicklung, Wachstum und Fortpflanzung (Übersicht in Römbke & Moltmann 1995). Diese Verfahren erfordern vielfach einen Beobachtungszeitraum von mehreren Wochen, im Falle eines Reproduktionstests die Länge eines Fortpflanzungszyklus. Zusätzlich sind Ringtests zwischen verschiedenen Labors zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse notwendig (Burton et al. 1996). Dagegen indizieren Biomarker Schadefekte durch physiologische, zytologische bis hin zu molekularen Veränderungen innerhalb eines Individuums. Sie sind geeignete Instrumente für die schnelle und sensitive Erfassung chemischer Stressoren von im Freiland vorherrschenden Konzentrationen (McCarthy & Shugart 1990; Depledge & Fossi 1994). Insbesondere in Kombination mit umweltchemischer Analytik ist das Biomarker-konzept für die Untersuchung der Bioverfügbarkeit eines Stoffes ein vielversprechender Ansatz (Peakall 1994). Eine integrative ökotoxikologische Forschung, die unterschiedliche Ebenen von molekularen Prozessen bis hin zu Ökosystemveränderungen berücksichtigt, birgt das Potential einer umfassenden Risikoabschätzung von Umweltschadstoffen (van Gestel & van Brummelen 1996).

Vergleichsweise wenige ökotoxikologische Studien liegen bisher für marine Organismen vor, obwohl sich für die kausalen Beziehungen zwischen Umweltfaktoren und Lebenszyklusparametern bzw. molekularen Reaktionen hier zahlreiche geeignete Modellsysteme finden ließen (z. B. Müller & Müller 1998; Schierwater & Hadry 1998). Insbesondere viele Cnidarier zeichnen sich durch ihre weite Verbreitung, ihre oftmals geringe Größe, ihre bisexuelle und vegetative Vermehrungsfähigkeit sowie durch einfache Laborhaltung aus (Stebbing & Brown 1984). Neben Hydrozoen (Karbe & Dannenberg 1985) wurde als bisher einziger Vertreter der Scyphozoen die Ohrenqualle *Aurelia aurita* auf organismischer Ebene untersucht (Spangenberg 1984). In einer 1986 vom Umweltbundesamt beauftragten Studie zur Etablierung der Ohrenqualle als Testsystem wurde beispielsweise der Einfluß von 4-Nitrophenol auf die vegetative Reproduktionsrate untersucht (Thiel & Jarms 1986). Basierend auf diesen Untersuchungen erscheint die Ohrenqualle vor allem aufgrund ihrer ausgesprochen hohen ökologischen Plastizität geeignet (vgl. Kapitel 2), um kausale Bindeglieder zwischen Umweltstress und genetischen Reaktionen des Organismus aufzuzeigen. Speziell für die Gefahrenabschätzung im subakuten Niedrigdosisbereich besteht nach dem vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 1997 formulierten Programm 'Forschung für die Umwelt' ein Defizit an integrierenden Konzepten. In der vorliegenden Untersuchung soll am Modell der Ohrenqualle ein Verfahren zur Etablierung von Biomarkern vorgestellt werden, welches mittels aktueller molekularbiologischer Techniken die Bereiche klassischer Ökotoxikologie, Zoologie und Genetik verknüpft. Die existierenden Biomarker sind, ebenso wie Endpunkte der klassischen Methoden, spezifisch für bestimmte Stoffgruppen und anhand einzelner Organismen etabliert. Beispielsweise eignen sich das Cytochrom P450-

Enzymsystem oder die ELISA-Immuno-Assays von Vitellogenin für den Nachweis von aromatischen Kohlenwasserstoffen und endokrin wirksamen Substanzen in Fischzell-Linien (Monteverdi & Giulio 1999; Scholz & Segner 1999). Daneben wurden schwermetallinduzierte Metallothioneine aus *Lumbricus*, Fisch- und Insektenpezies isoliert (Stürzenbaum et al. 1998a; Bargelloni et al. 1999; Hensbergen et al. 2000). Auf DNA-Ebene sind neben den Metallothioneinen und DNA-Adduktbildungen (Ericson et al. 1999; Lemoine et al. 2000) vor allem Hitzeschockproteine die häufigsten untersuchten Biomarkergene (Gellner et al. 1992; Koziol et al. 1996). Dies ist vor allem in der langsamen Evolution dieser Streßgene begründet, welche ihre Charakterisierung für viele Organismengruppen ermöglicht (Boorstein et al. 1994).

Am Beispiel von *Aurelia* soll auf Ebene der Gentranskription ein generell verwendbares, modellhaftes Verfahren zur Etablierung molekulargenetischer Biomarker nach folgenden Kriterien entwickelt werden:

- Das Verfahren soll für potentiell jeden tierischen Organismus anwendbar sein, ungeachtet seiner Größe und damit verbundener limitierter Mengen an DNA- oder mRNA-Ausgangsmaterial.
- Das technische Protokoll soll routinemäßig einsetzbar, für jeden Gewebetyp durchführbar und für die sensitive Anwendung einer Freilandindikation geeignet sein.
- Das Potential eines raschen Nachweises von Schadwirkungen und die Verarbeitung großer Stichprobenumfänge soll ausgeschöpft werden.

Um den genannten Kriterien gerecht zu werden, sollen unterschiedliche molekulargenetische Ver-

fahren getestet werden. Mittels einer *in vitro*-Vermehrung der mRNA, respektive cDNA, soll das Problem von limitiert vorliegendem Ausgangsmaterial umgangen werden. Die nachfolgende Isolierung von Biomarkergenen soll mittels PCR-basierter cDNA-Substraktion (z. B. von Stein et al. 1997) sowie alternativer Verfahren *via* degenerierter Primer und *Differential Display* (Liang & Pardee 1992) erreicht werden. Die genetischen Reaktionen nach unterschiedlichen Expositionszeiten und Konzentrationen der Schadstoffe werden mit - in ähnlichen Untersuchungen erfolgreich verwendeten - quantitativen Reverse Transkriptions (RT)-PCR-Methoden ermittelt (z. B. Harms et al. 2000). Cadmiumchlorid, und damit dessen dissoziierende  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen werden repräsentativ für die Gruppe der Schwermetalle gewählt. Ungeachtet der in den letzten Jahren abnehmenden Belastungen (Streit & Winter 1993; Streit 2000) birgt diese Stoffgruppe vor allem durch ihre Persistenz im Sediment von Flußmündungsbereichen sowie ihre Akkumulation in Nahrungsnetzen ein bestehendes Gefährdungspotential für marine Ökosysteme (z. B. Clark 1997). Als zweite Testchemikalie wird die vor allem in Schiffsanstrichen noch legal verarbeitete *Antifouling*-Substanz Tributylzinnchlorid (TBT) eingesetzt. Diese toxisch hochwirksame, für aquatische Organismen besonders gefährliche Substanz mit hoher Wirkungsbreite, z. B. bezüglich der Modifizierung der Geschlechtsausprägung (Bryan & Gibbs 1991), sollte eine möglichst generalisierte genetische Reaktion provozieren.

Die isolierten Gene werden abschließend hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Biomarker unter Freilandbedingungen getestet. Die Projektion der im Labor etablierten Befunde auf spezifische Freilandbedingungen und Habitate, z. B. Flußmündungen und Hafenbecken, sollen gleichzeitig von praktischer Bedeutung für aktuelle Problematiken des Schadstoffeintrages und Verschmutzungsgrades heimischer Gewässer sein.

## 3.2 Material & Methoden

### 3.2.1 Testpolypenklone und Schadstoffapplikation

Für die gesamten Labor- und Freilanduntersuchungen wurden Polyphen des *Aurelia*-Klons EA-ROS verwendet, der sich durch hohe Vermehrungsraten und die Möglichkeit der Strobilationsinduktion durch Temperaturabsenkung auszeichnet (Abb. 3.2.1). Zusätzlich wurde die Expression von Markergenen an den Klonen EP-FH8 und NS-HE2 untersucht.

Die Testsubstanzen waren Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) als Vertreter der Gruppe der Schwermetalle und die Organozinnverbindung Tributylzinnchlorid (TBT). Auf der Grundlage der im Abschnitt 3.1 erwähnten ökotoxikologischen Teststudie an *Aurelia* wurden als Endpunkte einer phänotypisch wirksamen Konzentration die Merkmale Tentakel- und Scapuskontraktion des Polyphen sowie die Deformierung der Ephyrenlarven (gestörte klonale Reproduktion) verwendet. Nach der Ermittlung eines relevanten Konzentrationsintervalls am Polyphenstadium wurden jeweils 20 Polyphen in einem Volumen von 100 mL künstlichem Seewasser (Tropic Marin) zur Strobilationsinduktion bei 15°C gehalten. Mit Beginn der ersten sichtbaren Strobilation wurde dem Testgefäß die Chemikalie zugegeben und phänotypische Veränderungen der Ephyren protokolliert. Nach Ermittlung der Maximalkonzentrationen am Ephyrenstadium erfolgte die Schadstoffapplikation im Rahmen der Biomarkeretablierung an jeweils 20 Polyphen bei der gewohnten Hälterungstemperatur (19-20°C), beginnend bei einer 150-200-fachen Verdünnung, mit den Konzentrationen 20, 100, 500 und 2000  $\mu\text{g/L}$  für  $\text{CdCl}_2$  und 5, 50, 500 und 1000  $\text{ng/L}$  für TBT. Kontrollpolyphen wurden unter identischen Bedingungen ohne Schadstoffzugabe mitgeführt. Nach verschiedenen Zeitintervallen (6-240h) wurden aus Kon-

troll- und Testgefäßen je zwei Polyphen entnommen und deren RNA isoliert.

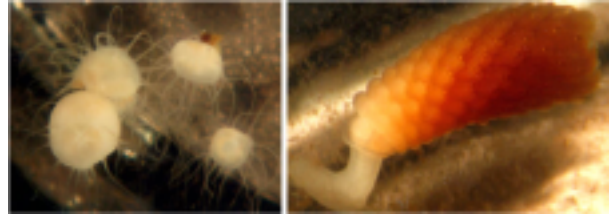


Abb. 3.2.1 Polyphen des Testklons EA-ROS (links) und dessen Strobila (rechts).

### 3.2.2 Molekulargenetische Methoden

#### RNA-Extraktion

Alle Reagenzien und Lösungen wurden mit 0.1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und die Oberflächen falls nötig mit Chloroform/ Hitzebehandlung oder RNase AWAY (Roth) von Ribonukleasen dekontaminiert. Je zwei Polyphen wurden in 1 mL Extraktionspuffer gewaschen (100 mM Tris-HCL pH 5.5, 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS, 50 mM DTT, 1% Betamercaptoethanol in DEPC-ddH<sub>2</sub>O), anschließend in 50  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffer überführt und kurzzeitig bei -40°C gefroren. Während des Auftauens wurden die Polyphen unter Zugabe von 40 U RNase-Inhibitor (RNasin, BM) homogenisiert, mit 5  $\mu\text{L}$  Proteinase K (10 mg/mL) versetzt und 10 min bei 55°C im Wasserbad geschüttelt. Das Gemisch wurde mit Extraktionspuffer und 0.2 M NaAcetat (pH 4.0) auf 100  $\mu\text{L}$  Volumen aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH 5.0) vermischt und 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgte unter Zugabe von einem Volumen Isopropanol für 2h bei -40°C und nachfolgender Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min. Das RNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, in DEPC-ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und einem DNase-Verdau gemäß Herstellerangaben (Gibco, BRL) unterzogen. Die Integrität der 18S und 28S rRNA-

Banden als Qualitätskriterium der Gesamt-RNA wurde auf nicht-denaturierenden Agarosegelen (120 V Spannung) überprüft.

### **Synthese und Amplifikation der cDNA**

Die reverse Transkription der mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen. Für die RT-PCR-Analysen im Rahmen der Biomarkeranwendungen wurden cDNA-Synthesen mittels (dT)<sub>20</sub> Primer, 1 µg RNA und 200 U M-MLV-Reverse Transkriptase (RT) gemäß Herstellerangaben (Gibco BRL) durchgeführt. Alternativ wurde im Rahmen der Entwicklungsphase zur Isolierung von Markergenen die *first strand* cDNA aus den RNAs zweier unbehandelter Kontrollproben und zweier TBT-behandelter Proben (500 ng/L, 24h und 72h Exposition) synthetisiert und anschließend amplifiziert, um genügend Templatmengen für weitere Analysen zu generieren (SMART PCR cDNA-Synthesis Kit, CLONTECH). Hierfür wurden 3 µL Gesamt-RNA (200 ng) mit 1 µM cDNA-Synthesepimer (CDS: 5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>-NN) und 1 µM SMART II-Primer (5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGG G) bei 70°C 2 min denaturiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 2 µL 5 x Puffer, 1 µL 20 mM DTT, 1 µL 10 mM dNTPs und 1 µL (200 U) Super Script II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Gibco BRL) für 1h bei 42°C inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde bei 72°C (7 min) gestoppt und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) auf 50 µL Endvolumen verdünnt. Im Verlauf der Erststrangsynthese wird der SMART II-Primer aufgrund der terminalen Transferaseaktivität der RT an das Ende jedes synthetisierten cDNA-Strangs angehängt. Dadurch wird jede kopierte mRNA-Spezies am 5'-Ende vom SMART II-Primer und am 3'-Ende vom CDS-Primer flankiert.

Mittels des Anchor-Primers, welcher komplementär zum 5'-Ende und invers komplementär zum 3'-Ende ist, wurden 2 µL der verdünnten cDNA-Reaktionen in einem Volumen von 100 µL (1 x PCR-Puffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM Primer, 2 µL Advantage-Polymerasemix, CLONTECH) in einem 9600 PE Thermozykler amplifiziert. Das Temperaturprofil wurde empirisch so ermittelt, daß noch keine Sättigung während der Amplifizierung erreicht wurde: Denaturierung 95°C/1 min, 17 Zyklen mit 95°C/5 sec, 65°C/5 sec und 68°C/6 min.

### **SMART cDNA-Substraktion und Gencharakterisierung**

Die säulengereinigten SMART cDNA-PCR-Produkte (*DNA Cleaning Kit*, GENOMED) wurden einer *Rsa* I-Restriktion unterzogen, um *blunt ends* für die nachfolgende Adapterligation und kürzere Fragmente für eine effiziente Substraktion herzustellen (*PCR-Select cDNA Substraction Kit*, CLONTECH). Die TBT-behandelten Proben wurden gegenüber den Kontrollproben 5-fach verdünnt und in zwei Fraktionen unterteilt. Die beiden TBT-cDNA-Fraktionen wurden jeweils mit Adapterprimer-1 und -2R, 1 x Ligationspuffer und T4 DNA-Ligase nach Herstellerangaben ligiert (CLONTECH). Die anschließende cDNA-Substraktion der TBT-behandelten Probe mit der unbehandelten Kontrollprobe hatte zum Ziel, differentiell exprimierte Transkripte, die ausschließlich oder in höherer Kopienanzahl in der TBT-behandelten Probe auftraten, anzureichern: initial erfolgte eine Hybridisierung der 10-fach höher konzentrierten denaturierten cDNA der unbehandelten Probe (ohne Adaptersequenz) mit der denaturierten cDNA der behandelten Probe für 12h bei 68°C. Diese Inkubation führt zu doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen, die nur auf einer Seite eine Adaptersequenz aufweisen. In der Lösung verbleiben die einzelsträngigen differentiellen cDNA-Transkripte aus der behandelten



Probe für die kein Gegenpart in der unbehandelten Probe existiert. Beide substrahierten cDNA-Hälften ('1' und '2R') werden vermischt, so daß die Hybridmoleküle renaturieren, die am 3'- und 5'-Ende jeweils die Adaptersequenzen '1' und '2R' aufweisen. Diese doppelsträngigen cDNA-Fragmente repräsentieren differentiell exprimierte Gene und können anschließend in einer zwei-stufigen *nested*-PCR nach Herstellerangaben selektiv amplifiziert werden. Die beiden Adapterprimer weisen einen identischen Bereich sowie eine 3'-gerichtete spezifische DNA-Sequenz auf, welches die Amplifizierung mittels eines universalen und mittels zweier spezifischer *nested* PCR-Primer ermöglicht (CLONTECH).

Die PCR-Reaktionen, in denen differentielle Gentranskripte selektiv amplifiziert vorlagen, wurden säulengereinigt (GENOMED), *via* pGEM-T Vektor ligiert (Promega) und in *E. coli*-Bakterien transformiert (vgl. Kapitel 2.2.3). Damit wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt, in der differentiell exprimierte Genfragmente der TBT-behandelten RNA-Probe angereichert vorlagen. Aus einzelnen Bakterienklonen wurde deren cDNA-Insert mittels Digoxigenin-markierter T7- und SP6-Primer amplifiziert und als Hybridisierungssonden gegen die Gesamt-RNA der unbehandelten und TBT-behandelten Polypen verwendet. Da anstatt RNA die korrespondierende amplifizierte SMART cDNA verwendet wird, bezeichnet man dieses Verfahren als *Virtual Northern Blotting*. Das *Screening* von ca. 200 cDNA-Sonden erfolgte über eine Hybridisierung mit jeweils 15 Sonden gegen Nylonmembran geblot-tete SMART cDNA (0.5 µg) einer Kontrollprobe und einer TBT-behandelten Probe unter stringen-ten Bedingungen (*Southern Hybridisierung*, vgl. Kapitel 2.2.3). Die Nylonmembranen konnten nach Entfernen der Sonden mit 0.2 M NaOH, 0.1% SDS, 30 min bei 37°C, mehrmals rehybridi-siert werden. Potentielle Kandidaten aus dem SONDENGEMISCH wurden durch Einzelhybridisie-

rungen gegen SMART cDNA-*dotblots* (1x1 cm Membranstücke in 1.5 mL Eppendorf-Gefäßen) als differentiell exprimierte Gene identifiziert.

cDNA-Klone mit positivem Signal wurden sequenziert und gegebenenfalls *via* 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, Frohmann et al. 1988) unter Verwendung der SMART-Technologie am 5'-Ende vollständig charakterisiert (Matz et al. 1999). Die Gesamt-RNA (200 ng) wurde mittels eines genspezifischen Primers und dem SMART II-Primer revers transkribiert. Die zweimalige *nested* PCR-Amplifizierung der cDNA mittels Anchor-Primer (s. oben) und zweier genspezifischer Primer führte zum doppelsträngigen, 5'-Fragment, welches mit einem 4 bp-*blunt end*-Restriktionsenzym restringiert, kloniert und sequenziert wurde (Promega pGEM-T-*blunt end cloning*, Sambrook et al. 1989).

#### **Alternative Strategien zur Genisolierung**

*Differential Display*: Die *Differential Display*-Methode (DDRT-PCR, Liang & Pardee 1992) wurde nach einem modifizierten Protokoll eingesetzt, um die 3'-Enden differentiell exprimierter Gene zu isolieren (An et al. 1996). Die Gesamt-RNA (200 ng) einer Kontrollprobe und einer jeweils behandelten Probe (500 µg/L CdCl<sub>2</sub>, 1000 ng/L TBT; 12h, 72h und 96h Expositionsdauer) wurde mittels vier biotinmarkierter (dT)<sub>12</sub>-Anchor-Primer (T<sub>12</sub>-MA, -MG, -MT, -MC) umgeschrieben (Gibco BRL). Die RT-PCR-Reaktionen erfolgten nach den in An et al. (1996) beschriebenen Bedingungen unter Verwendung der (dT)<sub>12</sub>-Anchor-Primer in Kombination mit dem 12-mer Primer GAYTGAAARTGY (Y = C, T; R = A, G) sowie mit 30 verschiedenen 10-mer Primern (Kit-AB, -C; Operon Techn.). Die Detektion der DDRT-PCR-Reaktionen erfolgte über eine Auftrennung in Polyacrylamidgelen (4%, DBE-System GATC), Kontakt-*Blotting* auf Nylonmembranen (Pall) und anschließendem Chemilumineszenznachweis der

biotinmarkierten DNA-Fragmente (*SAP Detection Kit*, GATC). Differentiell exprimierte Genfragmente wurden direkt von ausgeschnittenen Membranstücken (1x1 mm) nach 5 min Präinkubation bei 95°C mit identischen DDRT-PCR-Bedingungen reamplifiziert (40 Zyklen 30s/94°C, 30s/40°C und 60s/72°C).

*Degenerierte Primer - Aktin:* Aus einem DNA-Alignment von GenBank-Sequenzen (*Artemia* Ac.-Nr. AJ269579, *Drosophila* K00670, *Xenopus* X03470, *Podocoryne* X69058 und *Hydra* M32364) wurden degenerierte Primer aus einem konservierten Bereich des Gens für Aktin erstellt (F: 5' GGT ATY GCT GAY CGT ATG CA, R: 5' GAG ATC CAC ATY TGT TGG AA). Die Primer flankieren eine Region von 152 bp, welche als Expressionskontrolle und Referenz zur Quantifizierung der cDNA-Transkriptmengen im Rahmen der Biomarkeranwendungen verwendet wurde.

*Degenerierte Primer – HSP70:* Degenerierte Primer am 5'-Ende des Hitzeschockproteins HSP70 wurden basierend auf Borchiellini et al. (1998) verwendet (F: 5'-out GGB ACN ACB TAY TCN TGY GT, F: 5'-in ATH ATY GCY AAY GAN CAR GG; B(GTC), N(GATC), Y(TC), H(ATC), R(AG)). Ein weiterer interner 5'-Primer (F: 5' CAR GCN ACN AAR GAY GCN GG) sowie ein *Reverse-Primer* (R: 5' CRT ANG CNA CNG CYT CRT CNG G), die ein 650 bp-Fragment innerhalb des HSP70-Gens flankieren (Peyretailade et al. 1998), wurden eingesetzt. Mit variablen PCR-Bedingungen (5-50 pmol Primer, 47-60°C *Annealing*) und Primerkombinationen wurde ein HSP70-Fragment der beiden *Aurelia*-Klone EA-ROS und WA-WH4 amplifiziert, kloniert und sequenziert.

### **Semiquantitative RT-PCR**

Charakterisierte Gene wurden unter Schadstoffexposition auf unterschiedliche Expressionsmuster

getestet, um ihre Anwendbarkeit als Biomarker zu verifizieren. Aus den Sequenzdaten der isolierten Gene wurden spezifische Primer hergestellt. Für die Amplifikation der Gen-Fragmente und der nachfolgenden Produkt-Quantifizierung waren zwei Parameter wichtig, 1. die Menge des Ausgangstemplates (cDNA) und 2. die Anzahl der PCR-Zyklen. Um zu gewährleisten, daß jeweils die gleiche cDNA-Menge von Kontroll- und schadstoffbehandelter Probe analysiert wurde, wurden die cDNA-Einsatzmengen aller Experimente über Verdünnungsreihen (0.1-0.5 µL von 20 µL cDNA Reaktionsvolumen) anhand der Produktmenge an amplifiziertem Aktin eingestellt; das Haushaltsgen Aktin sollte in jeder cDNA-Probe in gleicher Kopienzahl vorhanden sein, so daß dessen PCR-Produkt proportional zur Menge an transkribierter mRNA ist. Im Zuge dieses semi-quantitativen Verfahrens ist nicht die absolute Produktmenge einzelner Markergene entscheidend, sondern die relativ zur Aktinexpression transkribierte Menge.

Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde für jedes Genfragment empirisch ermittelt, so daß noch kein Sättigungsplateau erreicht wurde (die Zyklenzahl ab der eine Normalisierung zwischen Kontroll- und behandelter Probe eintrat wurde um 5 Zyklen verkürzt). Somit wurde gewährleistet, daß die amplifizierte Menge proportional zur eingesetzten cDNA-Templatmenge war. Der Standardreaktionsansatz aller RT-PCR-Analysen mit 25 µL Volumen beinhaltete 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dNTPs (BM), 2.5 pmol Primer, 0.5 U Taq Polymerase (Gibco BRL) und 0.1-1 µL cDNA. Die Reaktion erfolgte im 9600 PE Thermozykler bei 2 min/93°C Vordenaaturierung, 23-33 Zyklen jeweils 30s/90°C Denaturierung, 30s/55°-57°C *Annealing*, 40s/72°C Polymerisierung. Die RT-PCR-Reaktionen jeweils verwandter Experimente wurden parallel auf 2%-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, fotografiert und mit 600 dpi gescannt.

### 3.2.3 Datenauswertung

Die isolierten Markergene (siehe Anhang 2) wurden mit GenBank-Daten verglichen und deren Sequenzidentitäten zu bekannten Genen ermittelt.

Die digitalisierten RT-PCR-Agarosebilder wurden zur Quantifizierung der Transkriptmengen mittels eines optisch densitometrischen Verfahrens auf Softwareebene analysiert (NIH Image V 1.61, *public domain* Macintosh Programm unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Die Umsetzung der Bandenintensitäten in quantifizierbare Einheiten erfolgte durch Analyse der Pixeldichte gegenüber dem Agarosegelhintergrund, welcher als Standard zur Kalibrierung der Graustufenwerte verwendet wurde. Die Werte der Pixelanzahl bzw. optischen Dichte wurden graphisch in quantifizierbare Flächeneinheiten umgesetzt. Anschließend wurden die Transkriptmengen der Biomarker mit der jeweiligen Menge an amplifiziertem Aktin relativiert ( $A_{\text{Biomarker}}/A_{\text{Aktin}}$ , A = Flächeneinheit) und das Mengenverhältnis zur Negativkontrolle standardisiert (die Produktmenge der Negativkontrolle erhält hierbei den Wert 1). Die statistische Analyse der Bandenintensitäten erfolgte mittels eines Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (SYSTAT) bei dem auf einen Effekt bezüglich einer bestimmten Schadstoffkonzentration geprüft wurde. Verbundene Stichproben setzen sich jeweils aus den Paarvergleichen Kontrollprobe *versus* behandelte Probe zu unterschiedlichen Expositionszeiten zusammen.

### 3.2.4 Freilandexposition

Die Eignung der im Labor identifizierten Biomarker für eine Freilandindikation von Umweltschadstoffen wurde mittels einer künstlichen Exposition von *Aurelia*-Polypen geprüft. Der Testklon EA-ROS sollte als Vertreter der ubiquitären genetischen Linie UBI (vgl. Kapitel 2) eine

potentiell breite Anpassungsfähigkeit gegenüber variierenden Temperaturen und Salinitäten aufweisen, welche günstige Eigenschaften für das breite Anwendungsspektrum eines Biomarkers sind (Laborversuche bestätigten, daß der EA-ROS-Klon bei Temperaturmaxima von 4°C und 23°C sowie Salinitäten von 15‰ noch keine sichtbaren Streßsymptome zeigten). Da der Testklon nicht aus heimischen Gewässern der Nord- und Ostsee stammte (vgl. Kapitel 2), wurde bei der Polypenexposition ein mit Gaze versehener Behälter verwendet, um eine potentielle Faunenverfälschung zu verhindern. Behälter mit je 20 Polypen wurden in der Nordsee in einem Hafenbecken von Wilhelmshaven, dem "Alten Hafen" in Bremerhaven sowie im Fähr- und Werfthafen von Cuxhaven - an langen Schnüren entsprechend der Tiden-schwankungen befestigt - exponiert. Eine weitere Exposition fand an der Adria in Ancona (Italien) statt; hier wurden Polypen im Jachthafen, an einer Flußmündung sowie zur Kontrolle an einem potentiell unbelasteten Strand ca. 100 m im offenen Wasser exponiert. Die Probenentnahmen erfolgten an allen Expositionsstellen nach 3-14 Tagen je nach den örtlichen Gegebenheiten. Die Polypen wurden lebend ins Labor gebracht, die RNA isoliert und cDNA hergestellt.

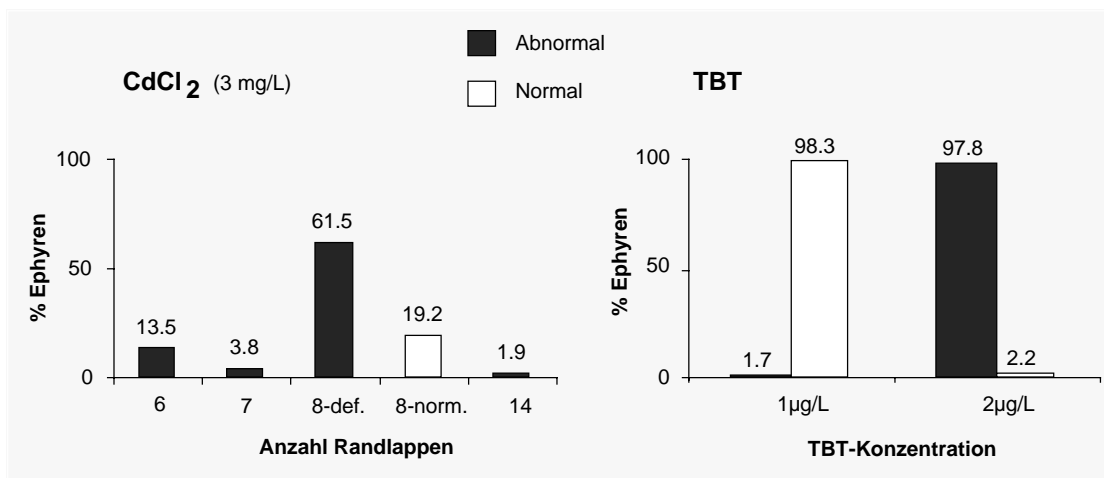
## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Phänotypische Befunde

Die akut toxischen Konzentrationen beider Chemikalien wurden zunächst am Polypenstadium ermittelt. Als phänotypische Meßparameter dienten die Kontraktion der Tentakeln und des gesamten Polypen, die Schnelligkeit der Freißreaktion nach Fütterung mit Artemienlarven sowie der Eintritt von Gewebeerfall (Tod). Die Applikation von CdCl<sub>2</sub> erfolgte in Konzentrationen von 1 mg/L

und 10 mg/L an jeweils 10 Polypen. Die Polypen zeigten bei einer Konzentration von 1 mg/L über einen Zeitraum von 14 Tagen keine phänotypische Veränderung gegenüber Kontrollpolypen. In der Konzentration von 10 mg/L trat nach 72h eine Tentakelkontraktion verbunden mit einer langsamen Freßreaktion, am 6. Tag die Kontraktion des Polypen und am 10. Tag Gewebeerfall ein. Eine TBT-Konzentration von 1 µg/L verursachte bei 10 Testpolypen am 3. Tag eine verlangsamte Freßreaktion sowie während der Gesamtversuchszeit von 20 Tagen eine leichte Tentakelkontraktion. Bei einer Konzentration von 10 µg/L trat nach drei Tagen der Tod der Polypen ein. Nach Bestimmung der akut toxischen Effektkonzentration am Polypen innerhalb eines log<sub>10</sub>-Intervalls wurde ein sublethaler Endpunkt, die Schädigung im Lebenszyklusstadium der Strobila bzw. der Ephyren,

herangezogen. Der Anteil der Ephyrenlarven mit abnormen Randlappen nach Chemikalienexposition diente als Meßparameter (Abb. 3.3.1). Ein signifikanter Effekt trat bei einer CdCl<sub>2</sub>-Konzentration von 3 mg/L nach 10 Tagen Exposition ein ( $\chi^2$ ,  $p < 0.005$ ). 81% der Ephyren zeigten morphologische Abnormalitäten (zahlenmäßige Abweichung von normalerweise 8 Randlappen bzw. deren Deformierung). Während bei der TBT-Konzentration von 1 µg/L nach 14 Tagen noch kein signifikanter Effekt eintrat, zeigte sich bei 2 µg/L eine nahezu vollständige phänotypische Schädigung am Ephyrenstadium. Für die Biomarkercharakterisierung wurden deshalb Konzentrationen unterhalb der LOEC-Werte (*Lowest Observed Effect Concentration*) von ca. 3 mg/L für CdCl<sub>2</sub> und ca. 2 µg/L für TBT untersucht.



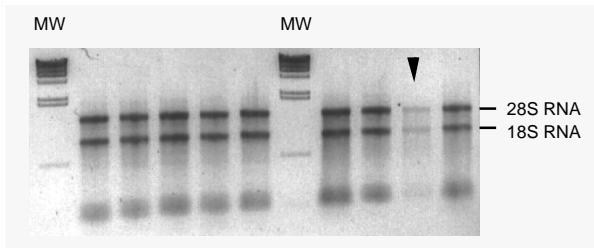
**Abb. 3.3.1** Schädigung der Ephyrenlarven nach Chemikalienexposition. Für CdCl<sub>2</sub> wurde die zahlenmäßige Abweichung von normalerweise 8 Randlappen sowie die Deformierung der Randlappen bei 3 mg/L ermittelt (N = 52). Für die TBT-Exposition wurden zwei Konzentrationen gewählt (1 und 2 µg/L, N = 115 und 67) und der Anteil Ephyren mit deformierten Randlappen bestimmt.

### 3.3.2 Isolierung schadstoffkorrelierter Gene

Übliche Extraktionsmethoden von Gesamt-RNA via Guanidinthiocyanat (Chomczynski & Sacchi 1986) waren bei den *Aurelia*-Polypen erfolglos. Dieses Ergebnis wurde an Polypen eines anderen Scyphozoons (*Cassiopeia sp.*) bestätigt, während

die GTC-Extraktion bei Anthozoen (*Anemonia sp.*) und Hydrozoen (*Eleuthera dichotoma*) erfolgreich war. Der Grund dafür ist unklar, möglicherweise besitzen Scyphopolypen einen höheren zellulären bzw. Ribonukleo-Proteinanteil, da die Proteinase K-Inkubation im SDS-Extraktions-

puffer die RNA-Ausbeute entscheidend beeinflusste. Das empirisch ermittelte RNA-Extraktionsprotokoll stellt bei Verwendung eines RNase-Inhibitors vor allem für geringe Gewebemengen eine Alternative zu den üblichen Methoden dar (Abb. 3.3.2).

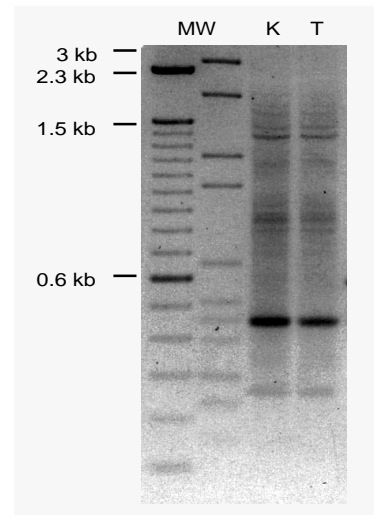


**Abb. 3.3.2** Gesamt-RNA nach Tris/SDS-Extraktion und DNase-Verdau. Jeweils 10% (150 ng) der RNA-Ausbeute von zwei Polypen sind auf nicht-denaturierendem Agarosegel aufgetragen (der Pfeil markiert die RNA-Extraktion aus nur einem Polypen; MW = Molekulargewichtsstandard). Die Qualität der RNA wurde über die Integrität der 28S und 18S rRNA-Banden geprüft.

### Amplifikation der cDNA

Die PCR-Vermehrung der *single strand* cDNAs zweier TBT-behandelter Proben inklusive der Kontrollen hatte zum Ziel, eine ausreichende Menge an Gentranskripten für die nachfolgende Substraktion zu generieren. Entscheidend dabei war die Einstellung der PCR-Zyklusanzahl, da ein *overcycling* respektive das Überschreiten der exponentiellen Vermehrungsphase die Substraktion differentieller Transkripte verhindert hätte. Im vorliegenden Fall lag diese kritische Grenze bei 19 Zyklen, so daß mit dem Reaktionsstopp bei 16 Zyklen das Nichterreichen der Sättigungsphase gewährleistet war (Abb. 3.3.3). Ein maßgebliches Kriterium waren deutlich sichtbare, in der Intensität variierende Banden (gegenüber einem über das gesamte Größenspektrum verteilten 'Schmier' bei Erreichen der PCR-Plateauphase). Die Ausbeute einer 100 µL-Reaktion betrug nach Durchführung aller Reinigungsschritte ca. 2 µg cDNA-Trans-

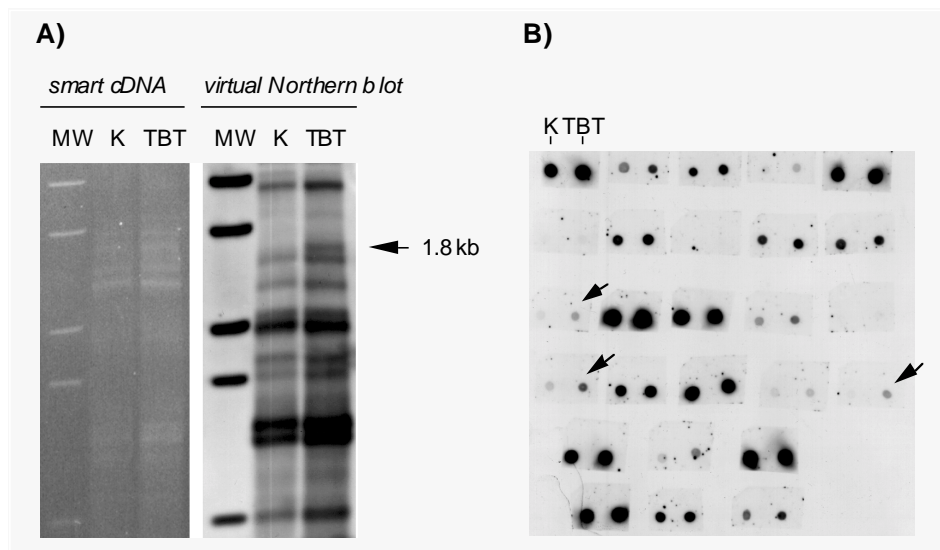
kripte in einem Bereich von 0.2 bis 3 kb. Unabhängig von der Menge an Ausgangsmaterial konnten so cDNA-Substraktionen und sonstige Analyseverfahren, wie z. B. *Northern Blotting*, beliebig oft durch Neusynthese der cDNAs durchgeführt werden.



**Abb. 3.3.3** Amplifizierte cDNA aus Gesamt-RNA-Templat von Kontrollpolypen (K) und TBT-behandelten Polypen (T). Das Größenspektrum der cDNA umfaßt einen Bereich von 0.2 bis 3 kb. Distinkte Banden (abundante Transkripte) verweisen auf noch nicht gesättigte Amplifikationsbedingungen (MW = Größenstandard).

### Isolierte Gene nach PCR-Select cDNA Substraktion

Zufällig ausgewählte Klone der substrahierten cDNA-Bibliothek einer TBT-behandelten Probe (500 ng/L, 72h Exposition) wurden gegen SMART-cDNA einer Kontrolle und der gleichen TBT-behandelten Probe hybridisiert (*Virtual Northern Blotting*). Mittels dieser Verifizierung wurden nach einem *Screening* von 200 cDNA-Klonen vier Gentranskripte ausgewählt, deren Expressionsmenge nach TBT-Exposition der Polypen potentiell aufreguliert wird. Die Abbildung 3.3.4A zeigt repräsentativ einen *Virtual Northern Blot* nach Hybridisierung mit 15 cDNA-Klonen. Ein differentielles Transkript von ca. 1.8 kb Länge zeigt bei der TBT-behandelten Probe ein auf mRNA-Ebene aufreguliertes Gen an.



**Abb. 3.3.4** A) Hybridisierung von 15 cDNA-Klonen der substrahierten cDNA-Bibliothek gegen 0.5 µg amplifizierte SMART-cDNA einer TBT-behandelten Probe (TBT; 500 ng/L, 72h Exposition) und einer Kontrolle (K). Der *Virtual Northern Blot* zeigt ein differentiell exprimiertes Gentranskript der TBT-behandelten Probe bei 1.8 kb (MW = Digmarkierter Größenstandard). B) Einzelhybridisierungen von cDNA-Klonen gegen SMART-cDNA *dot blots*. Jeweils 1.5 µL der amplifizierten cDNA einer Kontrolle (links) und einer TBT-behandelten Probe (rechts) wurden auf Nylonmembranen appliziert. Positive Signalklone mit aufregulierter Transkriptmenge in der TBT-Probe (Pfeile) wurden sequenziert.

Die Identifizierung der entsprechenden cDNA-Kandidaten aus dem Sondengemisch erfolgte durch Einzelhybridisierungen der Klone gegen SMART-cDNA *dot blots* (Abb. 3.3.4B). Jeweils 1.5 µL cDNA der unbehandelten Kontrolle und der TBT-behandelten Probe wurden auf kleinen Membranstückchen gespottet und hybridisiert. Abundante Transkripte mit starkem Signal bei beiden Proben waren relativ häufig vertreten (54%). Einige Klone zeigten kein Signal, während ca. 10% der untersuchten Klone ein gegenüber der Kontrolle stärkeres Hybridisierungssignal bei der TBT-behandelten Probe aufwiesen. Vornehmlich schwach bis moderat abundante Gentranskripte (s. Abb. 3.3.4B) konnten als differentiell exprimiert identifiziert werden. Vier cDNA-Klone (#108, #119, #126 und #135) wurden näher charakterisiert.

#### Klon #108

Ein cDNA-Fragment der Länge von 542 nt (s. Anhang 2.1) mit einem offenem Leseraster von 171 AS zeigte Sequenzübereinstimmungen zur gesamten Aminosäuresequenz einer 16 kDa Proteinuntereinheit des ARP2/3-Proteinkomplexes (*Aktin Related Protein*). Die AS-Sequenzidentitäten (Abb. 3.3.5) betragen 43% zum Mensch (Ac.-Nr. AF017807), 42% zu *Drosophila* (AE003582) und 36% zu *Caenorhabditis* (AF067624). Diese phylogenetisch konservierte Proteinuntereinheit ist zusammen mit anderen Proteinen des ARP2/3-Komplex an Aktinfilamente gebunden und scheint eine Funktion bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts zu haben (Machesky et al. 1997; Welch et al. 1997).

```

Aurelia #108: MSKSA-NTREFRKVDVDFKDEDRFQDDQAEEDQDTGTPSEADIQQLLMSKKNTEALKLLLS 60
Konsensus   MSK+  ++  FRKVDVD++DE++F D++  +  GP E ++  L      T AL+  L
Homo:       MSKNTVSSARFRKVDVDEYDENKVFDEEDGGDGQAGPDEGEVDSCLRQGNMTAALQAALK

Aurelia #108: QAPAGSKNKDRKDKAFELVTRVLTYKASEITAAAKDLNIQETDMLMKYIYRGFAEPSDS 120
Konsensus   P  +K++  KD+A  +V  +VL  ++KA++I  A  +  L+      D+LMKYIY+GF  PSD+
Homo:       NPPINTKSQAVKDRAGSIVLKVLI SFKANDIEKAVQSLDKNGVDLLMKYIYKGFESPSDN

Aurelia #108: YCARILSWHEKVVANGGLGSIIRALADRKT V 151
Konsensus   A  +L  WHEK  +A  GG+GSI+R  L  RKT V
Homo:       SSAMLLQWHEKALAAGGVGSIVRVL TARKTV

```

**Abb. 3.3.5** Alignment der *Aurelia*-Proteinsequenz #108 zur ARP2/3-Untereinheit beim Mensch (151 AS). Die Konsensussequenz zeigt identische sowie chemisch ähnliche Aminosäuren (+). Die Sequenzidentität beträgt 43% zum Menschen.

### Klone #119 und #126

Die Nukleotidsequenzen der Klone #119 (672 nt) und #126 (585 nt) ergeben zusammengesetzt ein Fragment der Länge von 1257 nt (s. Anhang 2.3), welches ein durchgehendes offenes Leseraster von 418 AS aufweist. Die Proteinsequenz ist zu 51% identisch zu einem GTP-bindenden Protein (G-Protein) beim Mensch und umfaßt 66% dieses beim Menschen aus 633 AS bestehenden Proteins (Abb. 3.3.6). Die ersten 80 AS der *Aurelia*-Seq

uenz repräsentieren aufgrund ihrer vergleichsweise hohen Sequenzidentitäten zu Mensch (86%), *Drosophila* (85%) und *Caenorhabditis* (74%) eine konservierte - vermutlich funktionelle - Domäne. G-Proteine wirken gewöhnlich aufgrund ihrer GTPase-Aktivität als Mittler bei der Signalübertragung zwischen membranständigen Rezeptoren und intrazellulären Folgereaktionen, z. B. Erhöhung der cAMP-Konzentration (Alberts 1990).

```

Aurelia: QTYAFTTKSLFVGHMDYKYLRLWQVIDTPGILDHSLEERNTIEMQAITALAHIRAAVLYVMDLSEQC NHSIEEQIALFSNI
Konsens. Q YAF'TTKSLFVGHMDYKYLRLWQV+DTPGILDH LE+RNTIEMQAITALAH+RAAVLYVMDLSEQC H + EQ+ LF NI
Homo:    QPYAFTTKSLFVGHMDYKYLRLWQVVDTPGILDHPLFEDRNTIEMQAITALAHRAAVLYVMDLSEQC GHGLREQLQLFQNI

Aurelia: KPLFTNKPIIVCLNKIDIVAVDDLPEEKKLLDVFNEDGITVI PMSNVTEEGVMAARTDACERLLAHRVEVKMKSKMGMG
Konsens. +PLF NKP+IV NK D+  +L E+ +K+      +G VI S +TEEGV+ +T+AC+RLLAHRVE KMK K+ +
Homo:    RPLFINKPLIIVVANKCDVKRIAE LSEDDQKIF'TDLQSEGFPV IET'STLTEEGVIKVKTEACDRLLAHRVETKMKGNKVNE

Aurelia: IVNRLHVAVPKARGDKERPAF IPEGAVKKGKGMIDKPYKKLQKEYEKELGDDYRFDDKLYVVPD-TEKYDI IPELING
Konsens. ++NRLH+A+P R DKERP F IPEG V + K M+ ++ KK  + E E GDDY D +K + + + +EK+D IPE+ G
Homo:    VLNRLHLAIPTRDDKERPPF IPEGVARRKRME TEESRKKRERDLELEMDDYILDLQKYWDL MNLSEKHDKIPEIWE G

Aurelia: KNIADFIDPEILEKLDALERE EELREGAGVYDEDIDDMDEEEETQKLAEEIRK KKKIRLQENREKRRNYATLPRKASL
Konsens. NIAD+IDP I++KL+ LE+EEELR AG YD  + D E E ++LA++IR+KKK+++ E++EK  +  +PR A
Homo:    HNIADYIDPAIMKLEEELEKEEELR TAAGEYDSVSESEDEEMLEIRQLAKQIREK KKKL ILESKEKNTQG-PRMPRTAKK

Aurelia: RLNKF GKPHKDDDI EGMFNIDGDIDMMDARARSVIRKNRKRKASEQAS--KHESTRP PRDQSGIPDPQKRKVRKLA
Konsens. +  +  ++ M+  D  +  R+RS+ RK ++ ++ +S  + S SR PRD SG+ D K VK K
Homo:    VQRTVLEKEMRSLGVD-MDDKDDAHYAVQARRSR SITRKRKREDSAPPSSVARSGSCSRTPRDVSGLRD-VKMVKKAKTM

Aurelia: KVSQRKMNMYGKAGEADSNDF 418
Konsens. K +Q+KMN GK GEAD + F
Homo:    KNAQKMMNRLGKKGEADRHFV 613

```

**Abb. 3.3.6** Alignment der aus Klon #119 und #126 zusammengesetzten Aminosäuresequenz zu einem GTP-bindenden Protein des Menschen (Ac.-Nr. NP\_036473). Die untersuchte Region von 418 AS ist mit dem Carboxyl-Ende des G-Proteins beim Mensch zu homologisieren und ist bezüglich der ersten 80 AS stark konserviert (Konsens. = Konsensussequenz).

**Klon #135**

Ein cDNA-Fragment der Länge von 470 nt wurde sequenziert und ein offenes Leseraster von 105 Aminosäuren (AS) identifiziert. Der Vergleich mit GenBank-Daten lieferte eine AS-Sequenzidentität zum Carboxyl-Ende folgender Proteine: eines unter oxidativem Streß exprimierten Proteins A 170 in Makrophagen der Maus (Ac.-Nr. JC4978, Ishii et al. 1996), einem mit Proteinkinase C-zeta interagierenden Protein ZIP bei der Ratte (CAA69642, Puls et al. 1997), einem mit Cytokinrezeptor assoziierten Protein EBIAP in Eppstein-Barr-virusinfizierten B-Lymphozyten beim Mensch, einem Protein p62, welches mit einer Tyrosinkinase beim Mensch interagiert (Referenzen in Puls et al. 1997) und einem 'Ref 2 P'-Protein, welches in Zusammenhang mit Virusresistenz bei *Drosophila* gebracht wird (Wayne et al. 1996). Zur vollständigen 5'-Charakterisierung des 1.8 kb großen Gentranskripts (vgl. Abb. 3.3.4A) wurden zwei *nested* Reverse-Primer erstellt und

via 5'-RACE ein cDNA-Fragment von ca. 1.2 kb amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Hae*III restringiert, subkloniert und mittels überlappender DNA-Sequenzierungen inklusive dem Ursprungsklon #135 erfolgreich charakterisiert (1471 nt, s. Anhang 2.2). Die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins beinhaltet 419 AS, wovon 157 AS am N-terminalen Ende und 40 AS am C-terminalen Ende eine Sequenzidentität von 41-50% zu den erwähnten Proteinen aufweisen (Abb. 3.3.7). Der mittlere Teil zeigt keine Übereinstimmung zu einer bekannten Sequenz. Die AS-Positionen 111-146 repräsentieren eine, z. B. bei *Drosophila* neu beschriebene, ZZ-Zinkfinger-Domäne (Ponting et al. 1996). Das für *Aurelia* neu beschriebene Gen scheint nach den Sequenzübereinstimmungen zu anderen Genen ein Protein zu kodieren, welches für Signaltransduktionen in vornehmlich unter Streß stehenden Zellen involviert ist.

```

MALSVKAYLN FEEGNPEIRR FSIEQDVSAS YEYLMKIRR VYPSLLRKNF QLFWRDEEEE LVAFSSDEEL VIALGSSSGD 80
NFRVYIKVQA PSDSTDGATP NQKAKHPGVV CDVCDRGIEG TRFKCLACPD YDLCSGCESK GFHPEHEMLR MRTPNRHDPWH 160
GIWSMVFQGG GRGGPFGRRG HHGRGRHGPR PHCPRFAHHG GPNMHGPPGR GGCRGGFGDP RGAGWYGPWG CHFQSNENNE 240
EKTDKTTQQQ GAEGNPPNPP PYSFEEVFD QVSQAVGQFF NPDQANTWGY SEATQENSNO ERQEKAQKQ EEAGTDNGTA 320
EDAMPQSEA SFIVINKEME ESKESADQNP QSAEPSAPS QSQSRREEE EFERK LNEAI RQMENMGFNN DSGWLTQLLI 400
SKDFDIGKVI DTLQVNGNK 419

```

**Abb. 3.3.7** Aminosäuresequenz des Streßproteins #135 (419 AS). Bereiche im Kasten zeigen eine Sequenzidentität von 41-50% zu bekannten Signaltransduktionsproteinen. Der fett markierte Abschnitt repräsentiert eine ZZ-Zinkfinger-Domäne.

**Differential Display-Fragmente**

Die Abbildung 3.3.8 zeigt beispielhaft ein *Differential Display*-Muster amplifizierter cDNA von TBT-behandelten Polypen (1 µg/L, 72h und 96h Expositionszeit) und zweier unbehandelter Kontrollen. Ein differentiell exprimiertes Fragment wurde mit der Primer-kombination T<sub>(12)</sub>-MC und AB-18

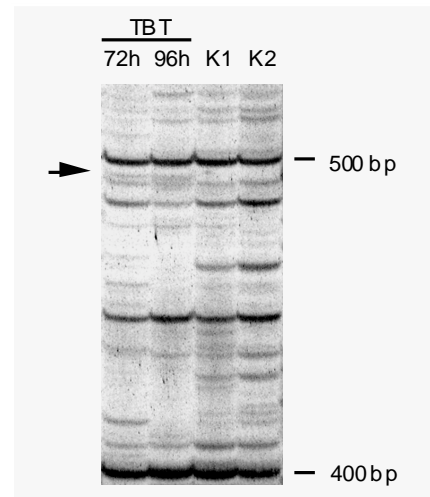
in beiden TBT-Proben generiert. Die DNA-Sequenz des Fragments von 494 nt (s. Anhang 2.4) weist weder kodierende Abschnitte noch Ähnlichkeiten mit GenBank-Einträgen auf und besitzt am 3'-Ende einen zum Oligo-T<sub>(12)</sub> komplementären Poly-A-Abschnitt. Vermutlich handelt es sich um die nicht-translatierte 3'-UTR-Region eines unbekanntens Gens. Mit dem für die Aminosäuren



Cystein (C, Kodon TGY) und Lysin (K, Kodon AAR) in der Abfolge CKC kodierenden degenerierten Primer GAYTGY AARTGY wurde alternativ versucht, in Kombination mit den (dT)<sub>12</sub> Anchorprimern das 3'-Ende von Metallothioneinogenen zu amplifizieren. Da deren Proteine häufig das für die Metallbindung essentielle CKC-Motiv aufweisen, sollten *via Differential Display* von CdCl<sub>2</sub>-behandelten Proben entsprechende Genfragmente aufspürbar sein. Ein DDRT-Fragment der Länge von 320 nt wurde in CdCl<sub>2</sub>-behandelten Proben (500 µg/L, 96h Exposition) identifiziert. Dessen DNA-Sequenz beinhaltet ein offenes Leseraster von 80 AS, zeigt jedoch keine Ähnlichkeiten zu Metallothionein- oder bekannten Genen und wird als nicht näher charakterisierte, potentiell kodierende Sequenz aufgelistet (Anhang 2.5).

**Hitzeschockprotein HSP70**

Die für Cnidaria dokumentierten Streßproteine sind vorwiegend auf Proteinebene untersucht (Black & Bloom 1984; Black et al. 1995; Sharp et al. 1997), während DNA-Sequenzinformation ausschließlich für das Hitzeschockprotein HSP70 vorliegen (Gellner et al. 1992; Borchellini et al. 1998). Dessen phylogenetisch konservierte Aminosäuresequenz ermöglichte die Charakterisierung von 1011 bp für zwei *Aurelia*-Linien *via* degenerierter Primer (s. Anhang 2.6). Die intronlose Region repräsentiert eine Aminosäuresequenz von



**Abb. 3.3.8** *Differential Display*-Muster mit den Primern T<sub>(12)</sub>-MC und AB-18 nach Auftrennung auf 4% Polyacrylamidgel und Kontaktblot auf Nylonmembran. Ein Fragment der Größe von 494 bp (Pfeil) wurde in TBT-behandelten Proben (1 µg/L, 72 und 96h Exposition), nicht aber in unbehandelten Kontrollproben (K) nachgewiesen.

337 nahe dem Amino-Terminus (ATP-bindende Region) des bei *Hydra* 654 AS umfassenden Proteins und weist eine vergleichsweise hohe Sequenzidentität von 81% z. B. zu *Xenopus laevis* auf (Abb. 3.3.9). Die von Genfamilien (HSP70, HSP90, HSP60, etc.) kodierten Hitzeschockproteine sind im Cytosol sowie in Organellen lokalisiert und verhindern als Chaperone u. a. die Denaturierung von Proteinen. Ihre Expression erfolgt entweder konstitutiv oder kann durch Temperaturerhöhung bzw. Chemikalienexposition, wie Schwermetalle oder PCB, induziert werden (Misra et al. 1989; Wiens et al. 1998; Schröder et al. 1999).

|                |   |
|----------------|---|
| <i>Aurelia</i> | NRTTPSYVAFNDNERLIGDAAKNQAAMNPENTIFDAKRLIGRRFDEDTVQADKKHWPFKVTSNAGKPKIQAEYKGESKRF  |
| <i>Xenopus</i> | -----V-----Q--V-----K-NDPV--C-L-----Q-V--E-----VKV-----E-S-                       |
| <i>Aurelia</i> | FPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGEKVTDAVITVPAYFNDSQRHATKDAGAIAGLNLVLRINEPTAAAIAAYGLDKGAKDEKN |
| <i>Xenopus</i> | -----T-----HP-----Q-----VL-----I-----RG-Q-  |
| <i>Aurelia</i> | VLIFDLGGGTFDVSILSIDGGVFEVKATGGDTHLGGEDFDNRVVDHFIKEFKRKHHDISNNKRALRRLRTACEKAKRTL   |
| <i>Xenopus</i> | -----T--D-I-----A-----M-----VE-----KK--GQ-----DR-----                             |
| <i>Aurelia</i> | SSSTQASIEVDLSLFQIDFYSTLTRARFEELNSDFRSTLDTVSKVLKDSKLDKKQIDEIVLVGGSTRIPKIQKMLSEFF   |
| <i>Xenopus</i> | ---S-----I---E---TAI-----L--G--EP-E-A-R-A---S--H-----V--L-QD--                    |
| <i>Aurelia</i> | NGKELCKSINPDEAVAY 337   |
| <i>Xenopus</i> | --R-----  |

**Abb. 3.3.9** Partielle Aminosäuresequenz des HSP70 Hitzeschockproteins des *Aurelia*-Klons EA-ROS (337 AS) nahe der N-terminalen Proteinregion. Die Sequenzidentität zu *Xenopus* beträgt 81% und spiegelt die konservierte Evolution dieses Proteins wider (- = identische AS).

### 3.3.3 Genexpression und Dosis-Wirkungsbeziehungen

#### Spezifikation der verwendeten Biomarker

Die Korrelation zwischen genetischer Reaktion auf Transkriptionsebene und einer Schadstoffexposition unter verschiedenen Konzentrationen wurde

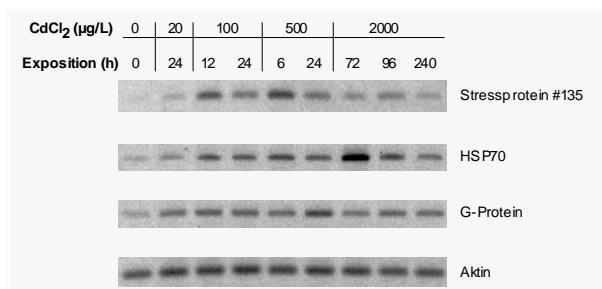
mittels quantitativem RT-PCR-Nachweis des Streßgens #135, dem Gen für das G-Protein sowie dem HSP70-kodierenden Gen untersucht. Die Tabelle 3.1 listet die verwendeten Primer, die Fragment-längen sowie die empirisch ermittelten PCR-Bedingungen (Zyklusanzahl und *Annealing*-Temperaturen) der einzelnen Marker auf.

**Tabelle 3.1** RT-PCR-Charakteristika der Biomarker inklusive der Aktin-Expressionskontrolle.

| Biomarker     | Primer (5'-3')                                       | Fragmentlänge | PCR-Zyklen<br><i>Annealing</i> |
|---------------|--|---------------|--------------------------------|
| Streßgen #135 | F : TGACAATGGAACAGCAGAGG<br>R : AATGAGGAGCTGAGTCAACC | 256 bp        | 27 Zyklen<br>55°C              |
| G-Protein     | F : AACTTGATGCGTTGGAGAGG<br>R : AATGACAGATCGAGCACGAG | 330 bp        | 23 Zyklen<br>55°C              |
| HSP70         | F : GAGACACTCATCTTGGAGGG<br>R : TTGACTTGCAGAGTTCCTTG | 417 bp        | 33 Zyklen<br>57°C              |
| Aktin         | F : GGTATYGCTGAYCGTATGCA<br>R : GAGATCCACATYTGTTGGAA | 152 bp        | 27 Zyklen<br>55°C              |

#### Dosis-Wirkungsbeziehung von Cadmiumchlorid

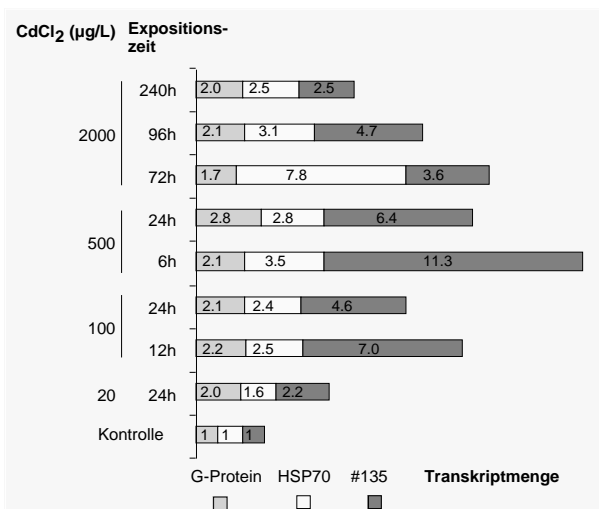
Die Abbildung 3.3.10 zeigt das Ergebnis der quantitativen PCR bei Cadmiumchlorid-Belastung. Die PCR-Produkte der behandelten Proben sind mit ansteigender Dosis-konzentration gegen eine repräsentative Kontrolle (0) aufgetragen. Für die CdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen 100, 500 und 2000 µg/L wurden mehrere Expositionszeiten gewählt.



**Abb. 3.3.10** Quantitative PCR mit den charakterisierten Biomarkern nach CdCl<sub>2</sub>-Exposition von 20, 100, 500 und 2000 µg/L. Als Expressionskontrolle dient das Haushaltsgen Aktin.

Über den Abgleich der Produktmengen mit der Transkriptmenge von Aktin sowie deren Standardisierung mit den Negativkontrollen (Mittelwert der Negativkontrollen = 1) lassen sich folgende Trends aufzeigen (Abb. 3.3.11). Bereits bei der geringsten Dosiskonzentration von 20 µg/L ist eine Transkriptaufregulierung des Streßproteins #135 und des G-Proteins innerhalb von 24 h um das zweifache zu beobachten. Das Hitzeschockgen HSP70 erreicht bei der Maximalkonzentration von 2000 µg/L eine 8-fache Steigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Im mittleren Dosisbereich werden die maximalen Transkriptmengen des Streßgens #135 erreicht.

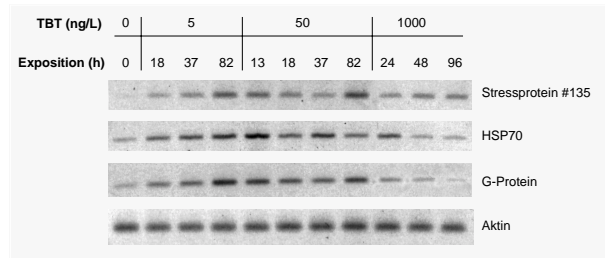
Charakteristisch für das Gen #135 erscheint die sehr schnelle Antwort innerhalb von 6-12h (Faktor 7 bei 100 µg/L und Faktor 11 bei 500 µg/L), verbunden mit einer raschen Abnahme innerhalb von 12-18h. Diese zeitliche Abschwächung ist, wengleich schwächer ausgeprägt, ebenfalls beim HSP70 zu erkennen. Dagegen scheint die Expression des G-Proteins in gleichbleibender Menge im Streßzustand zu erfolgen. Die zeitliche Abregulierung der zyklischen Biomarker #135 und HSP70 im Verlauf der Maximal-konzentration von 2 mg/L läßt vermuten, daß deren molekulares Reaktionspotential nahe der akut toxischen Konzentration abnimmt (vgl. Abb. 3.3.1, morphologische Schädigungen der Ephyren treten bei 3 mg/L auf).



**Abb. 3.3.11** Densitometrisch ermittelte standardisierte Transkriptmengen der drei untersuchten Gene Streßprotein #135, HSP70 und G-Protein nach Exposition von CdCl<sub>2</sub>. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Mengenfaktoren relativ zur durchschnittlichen Transkriptmenge der Kontrollen wieder.

### Dosis-Wirkungsbeziehung von Tributylzinnchlorid

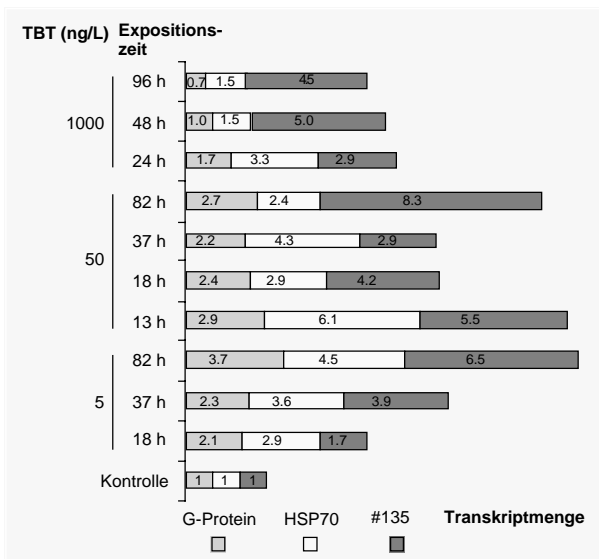
Die PCR-Quantifizierung der genetischen Reaktion gegenüber einer Exposition mit TBT erfolgte bei den Konzentrationen 5, 50 und 1000 ng/L in verschiedenen Zeitabständen inklusive der parallel geführten unbehandelten Kontrollen (Abb. 3.3.12).



**Abb. 3.3.12** Quantitative PCR der Biomarker unter Schadstoffbehandlung mit 5, 50 und 1000 ng/L TBT in verschiedenen Zeitabständen sowie einer repräsentativen Negativkontrolle (0). Die Aktin-Amplifizierung dient als Expressionskontrolle.

Die Standardisierung der Transkriptmengen gegenüber der Aktinexpression und der jeweiligen Expression in den Negativkontrollen läßt eine Aufregulierung aller drei Biomarker bereits bei der niedrigsten TBT-Konzentration erkennen (Abb. 3.3.13). Im Konzentrationsbereich von 5 ng/L ist eine positive lineare Beziehung zwischen den Expressionsmengen und der Expositionszeit zu erkennen. Demgegenüber stehen zweigipflige Expressionsmuster innerhalb eines Zeitraumes von 82h bei der Konzentration von 50 ng/L. Einem raschen Anstieg nach 13h und nachfolgend abgeschwächter Reaktion folgt ein zweites Maximum nach 37h (HSP70) bzw. 82h (#135 und G-Protein). In diesem Effektdosisbereich erfährt die Expression des Streßgens #135 eine maximale Steigerung um Faktor 8 und das Hitzeschockprotein HSP70 eine 6-fache Steigerung gegenüber den Kontrollproben. Analog zum Expressionsmuster bei der Maximalkonzentration von CdCl<sub>2</sub> sind die Transkriptmengen bei der höchsten TBT-Konzentration von 1000 ng/L im Mittel auf relativ niedrigerem Niveau, so daß von einer Abregulation der untersuchten Markergene bei akut toxischen Konzentrationen auszugehen ist (vgl. Abschnitt 3.3.1, eine Tentakelkontraktion der Polypen bzw. Ephyrenschädigung tritt bei 1000-2000 ng/L ein).

Werden ungeachtet der zeitlichen Komponente die Stichproben aus 5 ng/L und 50 ng/L zusammengefaßt, ist ein signifikanter Effekt einer TBT-Belastung von 5-50 ng/L auf die Expression jedes untersuchten Biomarkers abzuleiten (Wilcoxon-Paartest,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ).



**Abb. 3.3.13** Densitometrisch ermittelte standardisierte Transkriptmengen der Gene #135, HSP70 und G-Protein nach Exposition mit TBT. Die Zahlen in den Balken repräsentieren die Mengenfaktoren relativ zur durchschnittlichen Transkriptmenge der Kontrollen.

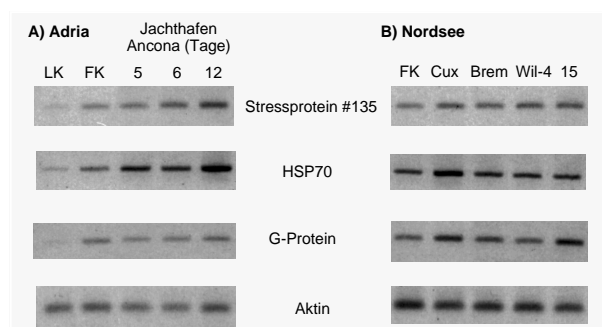
Summiert über alle drei Markergene tritt ein Maximaleffekt bei der niedrigsten Konzentration von 5 ng/L TBT nach 82h auf, welches ein Indiz für das hohe Schädigungspotential dieser Chemikalie ist.

### 3.3.4 Biomarker im Freilandtest

Die unter experimentellen Laborbedingungen untersuchten Biomarker wurden auf deren Anwendbarkeit im Freiland getestet. An potentiell schadstoffbelasteten Habitaten der italienischen Adria wurden Polypen an einer Flußmündung für 3 und 9 Tage sowie im Jachthafen von Ancona 5, 6 und 12 Tage lang exponiert. Negativkontrollen

wurden an einem (potentiell unbelasteten) Badestrand an einer 100 Meter im Meer gelegenen Boje über den gleichen Zeitraum exponiert. Der Transport der Proben ins Labor erfolgte innerhalb von 24h bei ca. 20°C im Testmedium, so daß ein zusätzlicher Streßfaktor - z. B. durch Sauerstoffdefizit oder erhöhte Temperaturen während des Transportes - minimiert oder zumindest bei allen Proben identisch war. Ebenso wurde mit den Proben der Nordseehäfen verfahren. Hier erwies sich die Auswahl eines potentiell unbelasteten Standortes für die Negativkontrollen als schwierig, da die Aussetzung im offenen Meer respektive dem Wattengebiet nicht möglich war. Als Kompromiß wurde ein Ort am äußersten Ende der Elbemündung an dem zum offenen Meer gerichteten Fährhafen von Cuxhaven gewählt.

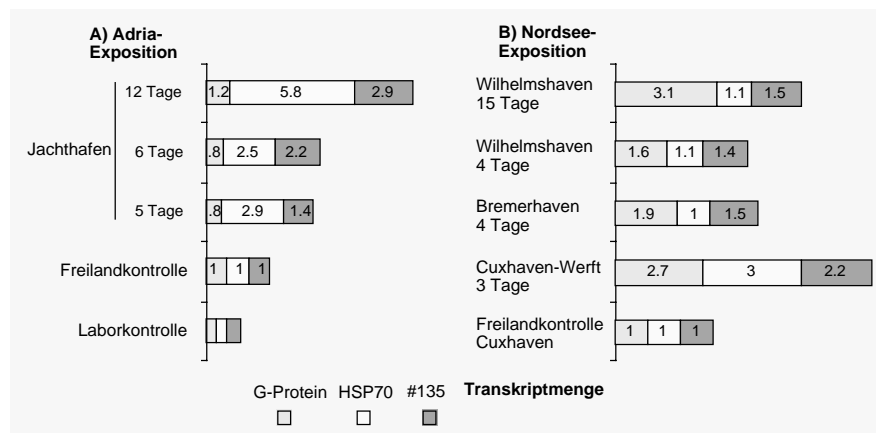
Die Abbildung 3.3.14 zeigt die Ergebnisse der quantitativen PCR für die drei untersuchten Biomarker inklusive der Aktinamplifikate. Gegenüber den Freiland-Negativkontrollen (FK) ist am Beispiel der Exposition im Jachthafen von Ancona eine deutliche, zeitlich korrelierte Zunahme der Gentranskripte des Streßproteins #135 und des HSP70 sichtbar.



**Abb.3.3.14** Quantitative PCR von drei untersuchten Biomarkern und Aktin nach Freilandexposition. A) Exposition im Jachthafen von Ancona (5, 6 und 12 Tage); FK = Freilandkontrolle im Meer, LK = Laborkontrolle. B) Nordsee-Exposition: Cux = Werfthafen von Cuxhaven (3 Tage), Brem = 'Alter Hafen' von Bremerhaven (4 Tage), Wil-4 und 15 = Hafengebiete von Wilhelmshaven (4 und 15 Tage); FK = Freilandkontrolle in Cuxhaven (4 Tage).

Standardisiert durch die korrespondierende Aktinproduktmenge läßt sich - bezogen auf die Freilandkontrollen im offenen Meer - eine maximale Aufregulierung des Gens #135 um Faktor 3 und des HSP70 um Faktor 6 nach 12 Tagen Exposition im Ancona-Jachthafen quantifizieren (Abb. 3.3.15). Bezüglich der Expression des G-Proteingens ist kein Effekt ersichtlich. Auffälligerweise sind die Transkriptmengen der drei Biomarker in den Freilandkontrollen gegenüber einer Negativkontrolle aus dem Labor etwa zweifach erhöht. Dementsprechend sind Laborkontrollen zur Standardisierung von Freilandexperimenten wenig geeignet, der Effekt einer genetischen Reaktion könnte überschätzt werden. Die Diskrepanz zwischen den beiden Kontrollen könnte gleichfalls durch eine schwache Kontamination am

Expositionsort der Freilandkontrolle bedingt sein. Sehr wahrscheinlich trifft dies für die Freilandkontrolle am Beispiel der Nordsee zu. Deren Transkriptmengen sind bezüglich aller Marker gegenüber der Laborkontrolle deutlich erhöht (vgl. Abb. 3.3.14). Entsprechend schwächer ausgeprägt sind die Effekte einer Gen-Aufregulierung an den verschiedenen Expositionsorten. Am deutlichsten sind die Effekte im Werfthafen von Cuxhaven. Eine erhöhte Expression des Streßproteins #135 um Faktor 2 sowie der Transkripte des G-Proteins und HSP70 um Faktor 3 wurden gegenüber der Freilandkontrolle am Fährhafen in Cuxhaven gemessen. Im Hafenbecken von Wilhelmshaven wurde eine zeitabhängige dreifache Effektsteigerung bezüglich des G-Proteins sichtbar.



**Abb. 3.3.15** Transkriptmengen der Gene #135, HSP70 und G-Protein im Freilandexperiment. A) Transkriptmengen nach Exposition im Jachthafen von Ancona/Adria für 5, 6 und 12 Tage. Die Balken repräsentieren die Mengenfaktoren relativ zu den im offenen Meer parallel geführten Freilandkontrollen. Zusätzlich sind die Mengen einer unbehandelten Laborkontrolle gezeigt. B) Transkriptmengen nach Exposition in drei Hafenbecken der Nordsee relativ zu einer Freilandkontrolle am Fährhafen in Cuxhaven (4 Tage exponiert).

Die Freilandbefunde illustrieren - ungeachtet der Schwierigkeit, Kontrollwerte aus unbelasteten Habitaten zu erhalten - das Detektionspotential der untersuchten Biomarker für die Indikation einer Streßreaktion auf molekularer Ebene. Trotz der gegenüber den Laborexperimenten vermutlich geringeren Schadstoffkonzentrationen sind genetische Reaktionen im Freiland sowohl kurzfristig innerhalb von 72h (Werft in Cuxhaven) als auch

nach längerfristigen potentiellen Niedrigbelastungen (Ancona-Jachthafen) nachzuweisen. Die Freilandexposition an einer Flußmündung nahe Ancona, bei der die Transkriptmenge von HSP70 erst nach 9 Tagen auf eine 3-fache Menge anstieg, impliziert ebenfalls das Nachweispotential gegenüber Langzeit-Niedrigbelastungen unter Freilandbedingungen.

**3.3.5 Hitzeschockprotein HSP70 im evolutionären Kontext**

Die beiden untersuchten *Aurelia*-Klone EA-ROS und WA-WH4, welche die genetischen Linien UBI und BOR repräsentieren (vgl. Kapitel 2), unterscheiden sich bezüglich ihrer HSP70-DNA-Sequenz um 6.9% (s. Anhang). Auffälligerweise

sind auf Proteinebene ebenfalls 6.5% der Aminosäuren substituiert (Abb. 3.3.16). Gemessen an der phylogenetischen Konserviertheit dieses Locus werden damit die in Kapitel 2 gezeigten Befunde einer tiefgreifenden genetischen Differenzierung - respektive einer Speziation - zwischen den *Aurelia* Linen UBI und BOR bestätigt.

```
EA-ROS NRTTPSYVAFNDNERLIGDAAKNQAAMPENTIFDAKRLIGRRFDEDTVQADKKHWPFKVTSNAGKPKIQ 70
WA-WH4 -----L-----Q-----S---

EA-ROS AEYKGESKRFFPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGEKVTDAVITVPAYFNDSQRHATKDAGAIAGLNVLRIIN 140
WA-WH4 -T---R-T-----T-----Q-----

EA-ROS EPTAAAIAYGLDKGAKDEKNVLIIFDLGGGTFDVSILSIDGGVFEVKATGGDTHLGGEDFDNRVVDHFIKE 210
WA-WH4 -----RT-----T---I---S-----

EA-ROS FKRKHHHDISNNKRALRRLRTACEKAKRTLSSSTQASIEVDSLFQGIDFYSTLTRARFEELNSDFRSTL 280
WA-WH4 -----QY-----I-----A-----A-----

EA-ROS DTVSKVLKDSKLDKKQIDEIVLVGGSTRIPKIQKMLSEFFNGKELCKSINPDEAVAY 337
WA-WH4 -----M-----RD---D-----
```

**Abb. 3.3.16** HSP70-Aminosäuresequenzen der *Aurelia*-Klone EA-ROS (UBI-Linie) und WA-WH4 (BOR-Linie). Der Anteil unterschiedlicher Aminosäuren beträgt 6.5% (- = identische Aminosäuren).

Aus dem Verhältnis der DNA-Substitutionen, die zum Aminosäureaustausch führen (nicht-synonym) und der Substitutionen die keine Aminosäureänderung verursachen (synonym) lassen sich Aussagen zu den Ursachen der genetischen Variation ableiten. Bei 'Neutraler genetischer Variation' sollten keine Unterschiede bezüglich der Substitutionsraten beider Kategorien auftreten, während unterschiedliche Raten auf das Wirken von Selektion hinweisen (Li & Graur 1991; Golding 1994). Die Tabelle 3.2 zeigt die Verteilung

der DNA-Substitutionen zwischen beiden *Aurelia*-Linien im Vergleich der beiden Kategorien. Unter Berücksichtigung der Degeneriertheit verschiedener Kodonpositionen (Li 1993) wird gezeigt, daß die Substitutionsrate an synonymen Positionen weitaus größer ist. Die Häufigkeit der beobachteten nicht-synonymen Basensubstitutionen an den drei Kodon-positionen wurde gegen eine erwartete Häufigkeitsverteilung unter Annahme des Fehlens von negativer (*purifying*) Selektion getestet (DAMBE, Xia 2000). Die Tabelle 3.3 zeigt die

**Tabelle 3.2** Verteilung der Mutationen und Substitutionsraten (Kimura 2Parameter-korrigiert) an nicht-synonymen und synonymen Nukleotidpositionen des HSP70-Gens der *Aurelia*-Klone EA-ROS und WA-WH4. Die Anzahl möglicher Positionen wird durch die Frequenz der 0-fach, 2-fach und 4-fach degenerierten Kodonpositionen ermittelt (Li 1993).

|                             | nicht-synonyme Positionen | synonyme Positionen |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------|
| Anzahl möglicher Positionen | 780                       | 231                 |
| Mutationen                  | 25                        | 45                  |
| Sequenzdivergenz            | 3.3%                      | 19.5%               |
| Substitutionsrate (K2P)     | 0.035                     | 0.186               |

beobachtete Häufigkeitsverteilung gegen die erwartete Verteilung nach Anpassung an die beobachteten Kodonfrequenzen und dem Transition: Transversion-Verhältnis von 1:2. Die beobachteten Verteilungen unterscheiden sich - vorwiegend an

der zweiten Position - signifikant von der Erwartung ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0.01$ ), so daß von verstärkter negativer Selektion gegen Mutationen der zweiten Kodonpositionen ausgegangen werden kann.

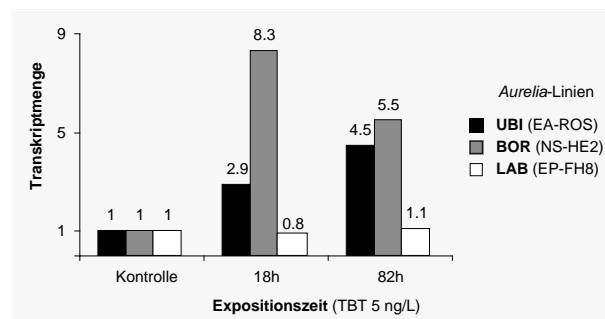
**Tabelle 3.3** Häufigkeit der beobachteten nicht-synonymen Basensubstitutionen an den drei Kodonpositionen der beiden *Aurelia*-HSP70-Gensequenzen im Vergleich zu erwarteten Häufigkeiten bei Fehlen von negativer Selektion.

| Substitutionsanteil | Kodonposition |       |       |
|---------------------|---------------|-------|-------|
|                     | 1             | 2     | 3     |
| Beobachtet          | 55%           | 20%   | 25%   |
| Erwartet            | 40.1%         | 43.8% | 16.1% |

Aus dem DNA-Substitutionsmuster des HSP70-Gens lassen sich indirekte Indizien für das Wirken von Selektion im Vergleich zweier *Aurelia*-Linien ableiten. Dabei bleibt die Frage offen, ob die beobachteten Unterschiede in den Proteinsequenzen in einer veränderten Proteinkinetik resultieren und damit unterschiedliche genetische Reaktionen gegenüber Streßzuständen ermöglichen. Alternativ wurden mögliche Unterschiede auf Ebene der Genexpression untersucht. Für den experimentellen Test wurden dazu Vertreter der evolutionären Linien BOR (NS-HE2) und LAB (EP-FH8) zusätzlich zum bereits untersuchten Vertreter der UBI-Linie (EA-ROS) auf die Regulation der HSP70-Transkriptmengen nach einer Exposition mit 5 ng/L TBT untersucht (Abb. 3.3.17). Während die Transkriptmengen der UBI- und BOR-Vertreter gegenüber den Negativkontrollen nach 82h um den Faktor 4.5-5.5 zunahmen, konnte für die LAB-Linie keine nennenswerte Aufregulierung beobachtet werden. Dies wirft die Frage auf, ob die unterschiedlichen Expressionsmuster der drei *Aurelia*-Linien ( $\chi^2$ ,  $p < 0.01$ ) mit der Anpassung an unterschiedliche (Umwelt-) Streßbedingungen zusammenhängen.

Die Analyse des HSP70-Gens unter evolutionären

Aspekten zeigt, daß eine Übertragbarkeit des HSP70-Biomarkers auf verschiedene taxonomische Einheiten - im Falle der Ohrenqualle für genetische Linien, respektive Spezies - möglich ist. Zudem konnte demonstriert werden, daß die Diversifizierung der *Aurelia*-Linien potentiell unter dem Wirken von negativer Selektion (Tabelle 3.3) bzw. der Selektion von Polymorphismen am Genort des Hitzeschockproteins begleitet wurde. Die unterschiedlichen Muster der HSP70-regulation (Abb. 3.3.17) sind zusätzlich ein Hinweis für die Evolution verschiedener Reaktionsmuster gegenüber variablen Umwelt- bzw. Streßbedingungen und werden in Kapitel 4 diskutiert.



**Abb. 3.3.17** Vergleichende Transkriptmengenregulation des HSP70-Gens der *Aurelia*-Klone EA-ROS, NS-HE2 und EP-FH8 nach Exposition von 5 ng/L TBT über einen Zeitraum von 82h. Die Transkriptmengen der Vertreter von drei Linien sind mit der jeweiligen Aktinexpression und gegen Kontrollen standardisiert.

### 3.4 Diskussion

#### 3.4.1 Molekulare Methoden zur Biomarkerisolierung

Der anthropogen verursachte Eintrag von Fremdstoffen in die Umwelt verläuft oftmals 'unfallartig' und erfordert schnell anzuwendende Meßinstrumentarien für Schadefekte. Da molekulare Veränderungen bezüglich der Konzentration von Stressoren äußerlich sichtbaren Veränderungen - physiologischer oder morphologischer Art - vorausgehen, eignen sich insbesondere molekulargenetische Biomarker für eine rasche Schadstoffindikation auf Individuumebene (Peakall 1994).

Die Wirkung von Fremdstoffen auf Organismen ist abhängig von den biotischen und abiotischen Rahmenbedingungen im jeweiligen Ökosystem und erzwingt möglichst generalisierbare Verfahren zur Isolierung neuer Biomarker für unterschiedlichste Habitats und Organismen. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Generalisierbarkeit der Methode verstärkt Rechnung getragen. So konnte neben einer alternativ entwickelten RNA-Extraktionsmethode vor allem ein Verfahren zur PCR-Amplifikation von cDNA eingesetzt werden, welches geringe Gesamt-RNA-Ausgangsmengen von 50 ng benötigt. Ein potentiell Problem von limitierten Gewebemengen beispielsweise für *Northern Blot*-Nachweisverfahren wird damit umgangen und den von Fossi (1994) aufgestellten Kriterien nicht-destruktiver Biomarker-Verfahren wird entsprochen. Der Isolierung und Anwendung von genetischen Biomarkern bei Kleinstorganismen (Protozoen, Phytoplankton, Zooplankton, z. B. *Daphnia*) - die aufgrund ihrer Abundanz in der Nahrungskette wichtige Zielorganismen ökotoxikologischer Forschung darstellen (z. B. Sauvant et al. 1999) - sind gleichfalls Grenzen genommen. Dem eingangs erwähnten Kriterium einer raschen Verfügbarkeit und Generierung von Biomarkern für

unterschiedliche Stoffgruppen folgend, wurden mehrere Ansätze zur Isolierung von Markergenen (s. unten) bezüglich Zeitaufwand und Effizienz verglichen.

Die genannten Aspekte verdeutlichen die Zielvorgabe einer Methodenetablierung in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zur Entwicklung eines ökotoxikologischen Testsystems, bei dem die statistische Absicherung der Daten gewährleistet sein muß. Ungeachtet fehlender Replikat-Experimente bezüglich der Schadstoffkonzentrationen zu unterschiedlichen Expositionszeiten sind dennoch eindeutige Aussagen zur Eignung der etablierten Biomarker zu treffen. Beispielsweise zeigt der Wilcoxon-Paartest (nach Zusammenfassung der Stichproben von 5 und 50 ng/L TBT in eine Gesamtmenge) einen signifikanten und gleichzeitig konservativ geschätzten Effekt einer TBT-Belastung auf eine genetische Reaktion an. Weiterführende Analysen der Dosis-Wirkungsbeziehungen mittels Replikatexperimenten wären bei der Etablierung als ökotoxikologisches Testsystem bezüglich von Genexpressionsendpunkten vorzunehmen.

#### *Isolierung von Markergenen*

Die Isolation neuer Markergene kann nach zwei Strategien erfolgen; einerseits unter Verwendung der DNA-Sequenzinformation der GenBank für bestimmte, bereits beschriebene Zielgene, und andererseits durch Verwendung molekularer Techniken, die keine Vorabinformation benötigen. Für die Isolierung eines spezifischen Markergens mittels entsprechender PCR-Primer auf Basis homologer GenBank-Sequenzen ist die phylogenetische Konserviertheit dieses Locus erforderlich. Die erfolgreiche Amplifikation des Hitzeschockproteingens HSP70 der Ohrenqualle mittels bekannter degenerierter Primer begründet sich durch deren hoch konservierte Evolution in nahezu allen Organismengruppen (Lindquist & Craig 1988). Im



Gegensatz dazu scheiterte der Versuch, degenierte Primer aus einer Konsensussequenz für Metallothioneingene zu erstellen. Trotz einiger typischer konservierter Domänen, z. B. dem Aminosäuremotiv CKC, ist die Variabilität dieser Gene zwischen verschiedenen Organismengruppen offensichtlich zu groß. Üblicherweise sind zur Charakterisierung von Metallothionein-cDNA entsprechend zeitaufwendige Verfahren wie *Screening* einer cDNA-Bibliothek oder die Isolierung des Proteins notwendig (z. B. Lemoine et al. 2000). Die Suche nach spezifischen Genen bestimmter Organismen ist zusätzlich limitiert durch die Dominanz weniger 'Ziel-Organismen' in der Genetik, was durch folgendes Zahlenbeispiel deutlich wird: von den zum Stand von Juni 2000 vorhandenen 7077491 Einträgen der GenBank entfallen 44% auf den Mensch, 18% auf die Hausmaus und 2% auf *Drosophila* im Gegensatz zu gerade 908 (< 0.02%) DNA/RNA-Einträgen für Cnidaria. Entsprechend gering sind die Chancen, aus Sequenzinformationen der GenBank beispielsweise Primer für ein streßrelevantes Gen eines Cnidariavertreters abzuleiten. Die Isolierung von Markergenen erzwingt daher den Einsatz von Methoden, die ohne Vorab-Sequenzinformation durchgeführt werden können.

Die *Differential Display*-Methode hat seit ihrer Erstbeschreibung (Liang & Pardee 1992) Neuerungen erfahren, die vornehmlich Problemen bezüglich der hohen Frequenz falsch positiver Signale (Sompayrac et al. 1995), Reproduzierbarkeit (Guimaraes et al. 1995), Variationseffekten aufgrund von Taq-Polymerasen und Reaktionsgefäßen (Chen et al. 1994) oder der Verwendung nicht-radioaktiver Nachweisverfahren (Chen & Peck 1996) Rechnung tragen. Ähnliche Probleme traten in der vorliegenden Untersuchung auf. Die stark primerabhängige Reproduzierbarkeit der Bandenmuster sowie häufig fehlgeschlagene Versuche der Reamplifikation differentieller Banden aufgrund der Ko-Migration anderer Frag-

mente erschwerten die Isolierung entsprechender Kandidaten. Ein Hauptnachteil besteht in der Beschränkung auf die nicht-translatierten 3'-Bereiche potentieller Genkandidaten. Die Sequenz des in Abbildung 3.3.8 gezeigten cDNA-Fragments (und anderer) zeigt das Problem auf; um Hinweise auf die Verwendbarkeit des Fragments zu erhalten, ist der Vergleich mit bekannten Genen oder charakteristischen Domänstrukturen auf Basis der Aminosäuresequenz essentiell. Aufwendige 5'-RACE-Amplifikationsverfahren zur Identifizierung der kodierenden Bereiche müßten zusätzlich durchgeführt werden. Der Versuch, mittels eines spezifischen 5'-Primers (Aminosäuremotiv CKC) - analog zum SPR-*Differential Display* (Ikononov & Jacob 1996) - ein Metallothionein der Ohrenqualle zu isolieren, schlug fehl. Ein differentiell exprimiertes Fragment einer mit CdCl<sub>2</sub> behandelten Probe wurde zwar isoliert, jedoch existieren keine weiteren Homologiehinweise der darin enthaltenen 80 Aminosäuren zu streßrelevanten Genen. Isolierte *Differential Display*-Fragmente wurden aufgrund der genannten Eigenheiten für die Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen nicht weiter untersucht.

Im Gegensatz dazu erwies sich das PCR-basierte cDNA-Substraktionsverfahren als effizient. Ein Hauptvorteil besteht in dem direkten Zugriff auf kodierende Abschnitte potentieller Markergene, der unmittelbare Hinweise für deren Verwendung als Biomarker liefern kann. Die Sequenzierung eines einzigen substrahierten cDNA-Klons (#108) führte beispielsweise zur vollständigen Aminosäuresequenz einer Untereinheit des ARP2/3-Komplexes. Das Potential der Methode zur Detektion vollständiger cDNAs ist offensichtlich. Die Substraktionseffizienz, respektive die Quote zwischen echten differentiell transkribierten mRNAs gegenüber falsch positiven Signalen, variiert zwischen 94% (von Stein et al. 1997), 40-60% (Gurskaya et al. 1996) und 5% (CLONTECH

unveröffentlicht). Die über *Virtual Northern Blots* verifizierte Quote von 10% in der vorliegenden Untersuchung liegt damit - wenngleich am unteren Ende - im Bereich bisheriger Erfahrungswerte. Da die amplifizierte SMART cDNA einer schadstoffbehandelten Probe (im vorliegenden Fall 500 ng/L TBT bei 72h Exposition) das Material für die nachfolgenden Substraktionshybridisierungen liefert, trägt die Wahl dieses Konzentrations- und Zeitfensters entscheidend zur Effizienz bei. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen zeigten, daß die Transkriptmengen beispielsweise des Streßproteins #135 bei der TBT-Behandlung mit 1000 ng/L eine zeitliche Abnahme aufwiesen (Abb. 3.3.13). Möglicherweise wurde mit dem initialen Zeitfenster von 72h und der vergleichsweise hohen Schadstoffdosis ein Zeitpunkt gewählt, der nicht dem Maximum der Expression von Streßreaktions-Genen entspricht und somit eine nur moderate Effizienzquote verursachte.

Nicht zuletzt im Vergleich zur *Differential Display*-Methode erwies sich das PCR-Select-Substraktionsprotokoll als robust und zeiteffizient und kann als Methode der Wahl für Untersuchungen an Organismen, für die keine Sequenzinformation existieren, angesehen werden. Die Isolierung von schwermetallinduzierten Genen mittels PCR-Substraktion am Anneliden *Lumbricus rubellus* (Stürzenbaum et al. 1998b) impliziert die generelle Verwendbarkeit der Methode im Rahmen einer ökotoxikologischen Biomarkeretablierung.

### 3.4.2 Biomarkernachweis von Schadwirkungen

Die experimentell verwendeten Chemikalien Cadmiumchlorid und Tributylzinnchlorid erwiesen sich als geeignete Substanzen, Streßreaktionen auf genetischer Ebene zu induzieren. Das akut toxische sowie chronisch schädigende Potential von Schwermetallen wie Cadmium im Zusammenhang

mit deren Persistenz in Sedimenten und der Anreicherung in der Nahrungskette ist hinlänglich bekannt (Prosi & Müller 1987; Clark 1997). Da für die schädigende Wirkung - z. B. die Substitution der für viele Enzyme essentiellen zweiwertigen Metallionen Cu und Zn - der Anteil freier Cd-Ionen entscheidend ist (Streit 2000), muß der Anteil der nicht reaktiven Komplexbindung mit Chlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) bei marinen Organismen bzw. Habitaten berücksichtigt werden. In Meerwasser (36‰) liegen nur etwa 3.5% des Cadmiumgehalts als freie Cd-Ionen vor (Fent 1996a). Der Dosisbereich ab dem genetische Reaktionen der Ohrenqualle beobachtet wurden (20 bzw. 100  $\mu\text{g/L}$   $\text{CdCl}_2$ ; Abb. 3.3.12) entspricht daher einer Effektkonzentration von 0.7 - 3.5  $\mu\text{g/L}$  freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen.

Die Substanz Tributylzinnchlorid ist neben anderen Organozinnverbindungen - bedingt durch das hohe Konzentrierungspotential in der Umwelt (Partikel/Sedimentadsorption) und in der Nahrungskette (Lipophilie) sowie der vielfältigen biochemischen Wirkungen - eine der giftigsten Substanzen für Wasserorganismen. An Schiffsrümpfen >25m legal als *Antifouling*-Farbzusatz verarbeitet und jährlich mit ca. 100 Tonnen die Nordsee belastend (Greenpeace 2000), ist eine Toxizität von TBT an Algen und Austernlarven bereits ab 1-4 ng/L festzustellen (Fent 1996b). Neben der generell proteinschädigenden Wirkung durch Bindung an SH-Gruppen sowie Hemmung der Energiegewinnung durch die Blockierung der mitochondrialen ATP-Synthetase ist vor allem die endokrine Wirkung von herausragender Bedeutung. In weltweit mehr als 100 marinen Schneckenarten, darunter die Wattschnecke (*Hydrobia ulvae*) und die Nordische Purpurschnecke (*Nucella lapillus*), zeigen Weibchen durch TBT ausgelöste Vermännlichungen der Geschlechtsorgane. Dieses Imosexphänomen, erstmals von Gibbs & Brian (1986) entdeckt, wird bereits bei geringsten TBT-Konzentrationen von 5 ng/L induziert (Bryan & Gibbs 1991) und basiert auf der Hemmung der

Aromatase (P450-Monooxygenasesystem), welche die Umwandlung von Testosteron in das weibliche Hormon Östradiol katalysiert.

Der Exkurs über die ökotoxikologische Bedeutung von TBT verdeutlicht dessen umweltpolitisch aktuelle Brisanz. Gleichzeitig verweisen die Wirkmechanismen auf die möglichen molekularen Kausalitäten der in *Aurelia*-Polypen nach TBT-Exposition aufregulierten, mittels PCR-Substraktion identifizierten, Markergene:

*ARP2/3-Proteinkomplex*: Dieser aus sieben Untereinheiten bestehende Proteinkomplex beeinflusst die Stabilisierung von Aktinfilamenten, insbesondere deren Quervernetzung, und ist in Eukaryonten konserviert (*Dictyostelium*, *Homo*, Welch et al. 1997; Machesky et al. 1997; Mullins et al. 1998). Eine mögliche Induktion der 16 kDa-Untereinheit könnte durch die Bindung von TBT an Aktin-Thiolgruppen (SH) verursacht worden sein; die Oxidation dieser SH-Gruppen kann strukturelle Störungen des Zytoskeletts zur Folge haben (Fent 1996a), so daß eine regulierende Induktion aktin-stabilisierender Proteine wie des ARP2/3-Komplex vorstellbar ist.

*GTP-bindendes Protein*: Stimulierende oder inhibierende G-Proteine interagieren mit G-proteingekoppelten Membranrezeptoren. Das Signal eines an den Rezeptor bindenden Liganden, wird durch das (GTP-aktivierte) G-Protein an nachfolgende Enzyme (Adenylatcyclase, Phospholipase C) übermittelt. Dies führt durch Anstieg der Konzentrationen von cAMP und  $Ca^{2+}$  zu zellulären Nachfolgereaktionen (Alberts et al. 1990). Die vielfältigen Wirkmechanismen von TBT - inklusive dessen endokrin wirksamen Potentials - könnten eine Ligandbindung an Membranrezeptoren und die nachfolgend induzierte Aufregulierung des G-Proteins von *Aurelia* mit einschließen. Vermutlich liegt die Hauptwirkung jedoch in der allosterischen Hemmung von Enzy-

men begründet (Fent 1996b), so daß zwischengeschaltete Reaktionswege für die Induktion des G-Proteins verantwortlich sein könnten. Die gleichfalls beobachtete G-Proteininduktion nach  $CdCl_2$ -Exposition spricht für eine generalisierte Reaktionskaskade bei der zellulären Streßantwort. Die genaue Funktionsbeschreibung dieses G-Proteins der Ohrenqualle ist bis dato nicht möglich. Der Vergleich mit GenBank-Daten zeigt die größten Sequenzidentitäten zu einem 1999 beim Menschen neu beschriebenen G-Protein (vgl. Abb. 3.3.6) sowie zu darauf beziehenden G-Proteinen bei *Trypanosoma* (AAF01061, Mai 2000) und *Saccharomyces* (NP\_015232, Juni 2000). Obwohl die experimentellen Hintergründe der genannten GenBank-Einträge nicht näher spezifiziert wurden, scheint die Konserviertheit dieses G-Protein-Typs in Eukaryonten evident (vgl. Abb. 3.3.6 die ersten 80 AS).

*Streßprotein #135*: Das vollständig charakterisierte Gen #135 der Ohrenqualle steht in direktem Zusammenhang mit bei Streß identifizierten Proteinen. Der kausale Zusammenhang zwischen einer TBT-Exposition und der Geninduktion ist aufgrund der verschiedenen Hintergründe, bei denen die homologen Proteine induziert werden, nicht direkt ableitbar (oxidativer Streß, Virusinfektion, Tyrosinkinasebindung, Puls et al. 1997). Die Induktion des homologen Proteins in Mausmakrophagen nach Behandlung mit Agentien, die oxidativen Streß bewirken (Ishii et al. 1996) könnte einen Zusammenhang für die Induktion bei *Aurelia* nach Applikation beider Chemikalien liefern. Eine durch TBT verursachte Hemmung der Elektronentransportketten in den Mitochondrien kann ebenso wie bei Cadmium zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale führen (Hassoun & Stohs 1996). Das #135-Protein scheint vor allem in der Signaltransduktion involviert zu sein, die Existenz einer ZZ-Zinkfinger-Domäne im konservierten N-terminalen Bereich impliziert regulatorische (DNA- oder proteinbindende) Funktionen (vgl.

Ponting et al. 1996). Auffälligerweise zeigt ein mittlerer Sequenzbereich von etwa 600 bp keine Übereinstimmungen mit den am N- und C-terminalen Ende homologen Proteinen. Eine Erklärung wäre alternatives RNA-Spleißen, wonach bei *Aurelia* andere Exonbereiche zur Primärsequenz beitragen. Ein ca. 800 bp umfassendes Intron konnte für die Ohrenqualle am 3'-Ende der kodierenden Region *via* PCR an genomischer DNA nachgewiesen werden, so daß zwei oder mehr Exons vorhanden sind und die Möglichkeit von veränderten Spleiß-Positionen potentiell gegeben ist.

Die in der Ohrenqualle unter (experimentell ausgelösten) Streßsituationen induzierten Gene weisen homologe Äquivalente zu verschiedenen eukaryontischen Organismen, vom Einzeller bis zum Menschen, auf. Die Fähigkeit eines Organismus, auf extreme Umweltbedingungen reagieren oder Streßresistenz erlangen zu können, scheint somit ein Arsenal evolutionär konservierter Geninventarien mit einzuschließen. Bereits die phylogenetisch basal eingestuft Schwämme sind mit vielen für Eumetazoa typischen Proteinen und Abwehrsystemen gegenüber Fremdstoffen ausgestattet (Müller 1997; Müller & Müller 1998). Die Familie der Hitzeschockproteine HSP70 (Chaperon-Proteine mit einem Molekulargewicht von 70-73 kDa) sind ein weiteres Beispiel evolutionär konservierter Streßadaptionmoleküle. Ihr ubiquitäres Vorkommen in nahezu allen Eukaryonten (Craig 1985; Lindquist & Craig 1988) und entsprechendem Homologon in Prokaryonten (dnaK, Morimoto et al. 1994) konnte für die Klasse der Scyphozoa in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Induzierbarkeit des HSP70-Proteins als Biomarker für Temperaturstreß sowie verschiedenen chemischen Agentien wurde in vielen Studien unter Freiland- und Laborbedingungen dokumentiert (Ananthan et al. 1986; Koziol et al. 1996; Sharp et al. 1997; Übersicht in Sanders 1990). Die Transkriptmengen des *Aurelia*-HSP70-

Gens wurden bereits bei niedrigsten Schadstoffkonzentrationen gegenüber den Kontrollen aufreguliert. Das isolierte Gen repräsentiert daher eine induzierbare Variante (von möglicherweise mehreren vorhandenen, auch konstitutiv exprimierten Kognaten der Genfamilie, z. B. Ingolia & Craig 1982) und bestätigt die Induzierbarkeit eines *Aurelia*-HSP70-Proteins unter (Temperatur-) Streßbedingungen (Black & Bloom 1984). Der Zusammenhang zwischen der Geninduktion und den Schadwirkungen bei *Aurelia* besteht vermutlich in der stark proteindenaturierenden Potenz von TBT und Cadmium durch Bindung an Thiol- oder Disulfidbrücken (Fent 1996a; Shimizu et al. 1997). Nicht native, entfaltete Proteine werden von HSP70 Chaperonen ATP-abhängig gebunden und gefaltet und damit zur ursprünglichen Konformation reorganisiert (Gething & Sambrook 1992). Die Induktion von HSP70 nach einer Schadstoffexposition wird durch Befunde zur Cadmiumexposition an Nematoden und Schwämmen (Güven & De Pomerai 1995; Müller et al. 1998) sowie durch TBT-induzierte HSP70-Expression bei Crustacea bestätigt (Oberdorster et al. 1998a).

### ***Dosis-Wirkungsbeziehungen: Labor und Freiland***

Zur Bestimmung der akut- bzw. chronisch toxischen Konzentration beider Chemikalien wurde die Schädigung der Ephyrenlarven als Endpunkt einer gestörten vegetativen Reproduktion verwendet. Für CdCl<sub>2</sub> (10 Tage Exposition, vgl. Abb. 3.3.1) liegt die Konzentration bei der die ersten Effekte gegenüber der Kontrolle beobachtet wurden (LOEC) bei ca. 3 mg/L und entspricht ungefähr Literaturdaten für andere Organismen (z. B. EC<sub>50</sub> *Daphnia magna*: 3.1 mg/L, OEKOPRO-Datenbank). Der LOEC von TBT (14 Tage Exposition) liegt im Bereich zwischen 1-2 µg/L, welcher ebenfalls mit Ergebnissen aus anderen Unter-

suchungen vergleichbar ist (z. B. *Daphnia*: 2.5 µg/L, Oberdorster et al. 1998b). Erste, deutlich sichtbare Induktionen der drei untersuchten Biomarker treten nach 12-stündiger Exposition mit 100 µg/L CdCl<sub>2</sub> auf, welches einer 30-fach niedrigeren LOEC-Konzentration gegenüber der phänotypisch am Ephyrenstadium ermittelten Effektkonzentration von 3000 µg/L entspricht. Die Erniedrigung der LOEC-Konzentration wird am Beispiel von TBT noch drastischer sichtbar. Bereits bei 5 ng/L ist ein, summiert über alle drei Marker sogar maximaler, Induktionseffekt nach einer 82h-Exposition nachzuweisen. Verglichen mit der phänotypisch ermittelten LOEC-Konzentration von 1-2 µg/L ist dies eine 200-400-fache Sensitivitätssteigerung bezüglich der Erfassung erster Reaktionen unter Streßbedingungen.

Der Zusammenhang zwischen den in klassischen Ökotoxizitätstests untersuchten Endpunkten Mortalität, Wachstum und Reproduktion einerseits, und Biomarkern andererseits wird diskutiert (Depledge & Fossi 1994), obwohl kausale Beziehungen oftmals nicht bekannt sind (Depledge & Fossi 1994; Lagadic et al. 1994; Übersicht in van Gestel & van Brummelen 1996). Autorenübergreifend zeigen Biomarker eine 'biologische Reaktion auf Schadexpositionen' und eine 'Abweichung vom normalen bzw. gesunden Zustand eines Individuums zur Streßsituation' an (Peakall 1994). Unter diesem Hintergrund ist die oben angeführte drastische Reduzierung der LOEC-Konzentration bezüglich der beiden eingesetzten Chemikalien ein Indiz dafür, daß die etablierten Biomarker der Ohrenqualle effektive Frühwarnsysteme für den Eintritt in einen physiologisch gestressten Zustand unter subletalen Expositionen darstellen.

Die drei untersuchten Biomarker zeigen im Vergleich der beiden Schadstoffe ähnliche Relationen der Transkriptmengen. Das #135-Gen wird am stärksten aufreguliert (maximal 11-fach bei CdCl<sub>2</sub> und 8-fach bei TBT), gefolgt vom HSP70-Gen

(maximal 8-fach bei CdCl<sub>2</sub> und 6-fach bei TBT) und dem G-Protein (maximal 3- und 4-fach bei CdCl<sub>2</sub> bzw. TBT). Möglicherweise sind ähnliche biochemische Wirkmechanismen die Ursache hierfür. Sowohl Cadmium als auch TBT besitzen stark proteindenaturierende wie auch radikalbildende Eigenschaften. Der bei 100 und 500 µg/L CdCl<sub>2</sub> und 50 ng/L TBT (mittlerer Dosisbereich) bereits nach 6, 12 und 13h beobachtete starke - und teilweise mit zunehmender Expositionszeit wieder abnehmende - Effekt auf die Expression der #135- und HSP70-Gene verweist auf eine dualistische Abhängigkeit der Bildung von Streßproteinen von Schadstoffdosis und Expositionszeit. Dies wird durch die entgegengesetzte, mit der Zeit zunehmenden Expressionsmenge aller drei Biomarker bei der niedrigsten TBT-Belastung bestätigt. Eine ähnliche dosis- und zeitabhängige Expression von Hitzeschockproteinen wird von Schwämmen berichtet; eine maximale 9-fache Induktion wurde bei einer CdCl<sub>2</sub>-Dosis von 1 mg/L nach 12 Stunden beobachtet, während Expositionen bei Konzentrationen von 100 bzw. 10 µg/L erst nach 3-6 Tagen zur erhöhten Expression führten (Schröder et al. 1999). Die Expression des G-Proteins zeigt unterschiedliche Muster im Vergleich der Chemikalien. Während es unter CdCl<sub>2</sub>-Exposition relativ konzentrations- und zeitunabhängig um das 2-3-fache gegenüber den Kontrollen auf-reguliert wird, variiert das Expressionsmuster unter TBT-Wirkung konzentrations- und zeitabhängig (0.7-3.7-fache Erhöhung) und fällt bei der Höchstkonzentration von TBT sogar unter das Level der Negativkontrolle. Die TBT-Wirkung könnte demzufolge in stärkerem Maß aus einer direkten oder metabolitenabhängigen Bindung an Membranrezeptoren resultieren (Induktion einer gesteigerten Bildungsrate von Rezeptoren und gekoppelter G-Proteine).

Auffälligerweise sinken die Expressionsmengen der drei Biomarker bei den Maximalkonzentrationen von 2 mg/L CdCl<sub>2</sub> und 1 µg/L TBT mit

zunehmender Expositionsdauer deutlich ab. Diese Chemikalienkonzentrationen sind nahe der Dosis, bei der phänotypisch sichtbare Schädigungen eintreten (siehe oben). Das im Vergleich 'Biomarker' versus 'Akut-Toxizitätstest' unterschiedlich abgedeckte Spektrum, in dem Schadwirkungen erfasst werden, tritt deutlich zu Tage. Während das Potential von Biomarkern in subletalen Schadkonzentrationen voll zur Geltung kommt (Peakall 1994), nimmt ihre Relevanz bei Überschreiten der Schwelle, ab der molekulare und physiologische Resistenzmechanismen nicht mehr greifen und irreversible Schädigungen eintreten, ab (vgl. Depledge & Fossi 1994). Die Produktion von Hitzeschockproteinen kann als zellulärer Ausnahmezustand im Streßzustand verstanden werden, der durch gleichzeitige Abnahme der Synthese sonstiger Proteine begleitet wird (Lindquist & Craig 1988; Welch 1990; Schlesinger 1994). Dieser maximale Ausnahmezustand wurde vermutlich bei der 2 mg/L CdCl<sub>2</sub>-Dosis, welche mit einer 8-fach gesteigerten HSP70-Expression einhergeht, erreicht. Der Übergang in einen chronischen Ausnahmezustand (240h im Fall von CdCl<sub>2</sub>, bzw. 96h im Fall von TBT) korreliert mit einer Abnahme der Biomarkertranskriptionen und impliziert dadurch das Überschreiten der 'Resistenzschwelle' sowie daraus resultierende beginnende irreparable Schädigungen bei den untersuchten Maximalkonzentrationen. Selye (1956) und Wedemayer et al. (1984) bezeichnen diesen Verlauf als *general adaptation syndrome*, bei dem in einer dreistufigen Folge zunächst die Alarmreaktion einsetzt, die Erlangung von Streßresistenz nachfolgt und schließlich der Zustand der Erschöpfung mit dem Resistenzverlust einhergehen kann.

Die experimentellen Laborbefunde, insbesondere die Expressionsmuster der Biomarker bei niedrigen Schadstoffkonzentrationen, liefern Rückschlüsse zu den Ergebnissen der Freilanduntersuchungen. Die zeitabhängige Aufregulierung des

#135-Gens um Faktor 3 und des HSP70-Gens um Faktor 6 bei der Exposition im Jachthafen von Ancona während 5, 6 und 12 Tagen zeigt ein ähnliches Muster wie bei der experimentellen Exposition bei 5 ng/L TBT (18-82h). Das seit 1989 geltende EU-weite Verbot von TBT-Antifouling-Farben für Boote mit weniger als 25 m Länge, wovon z. B. Yachten betroffen sind, scheint nicht auf eine einheitliche Resonanz bei Bootsbesitzern gestoßen zu sein. Dies zeigt sich beispielsweise bei Messungen im Sediment von Jachthäfen der Nord- und Ostsee, in denen 1994 zum Teil mehr als 1000-fach erhöhte TBT-Kontaminationen gegenüber Grenzwerten auftraten (Schenk 1998). Es ist daher nicht auszuschließen, daß die *Aurelia*-Polypen durch eine TBT-Kontamination im Jachthafen in eine physiologische Streßsituation gerieten. Das Ancona-Beispiel demonstriert die Stärke einer Früherkennung von organismischen (und womöglich ökologischen) Risikopotentialen in kontaminierten Habitaten. Insbesondere in Kombination mit chemischer Rückstandsanalytik sollte der bioverfügbare Anteil von Schadstoffen mit Biomarkern sensitiv nachweisbar sein (McCarthy & Shugart 1990; Peakall 1994; Wangersky 1995). Eine schnelle Biomarkerindikation einer Streßbelastung zeigt das Beispiel des Cuxhavener Werfthafens, in dem die *Aurelia*-Polypen eine erhöhte 2-3-fache Expression aller drei Marker nach 3 Tagen zeigten. Zugleich wird das Problem deutlich, einerseits repräsentative Kontrolleexperimente aus nicht belasteten Habitaten durchzuführen, und andererseits Informationen zum normalen (gesunden) Level eines Biomarkers in Individuen zu erhalten (Benson & Di Giulio 1992; Depledge & Fossi 1994; Ernst & Peterson 1994). Der Grad einer allgemeinen Verschmutzung der Nordsee erreicht mitunter bedenkliche Formen (Johnston et al. 1995). Obwohl die Literaturangaben zur TBT-Kontamination erhebliche Schwankungen aufweisen (Nordsee <10-320 ng/L, Außendeichbereich 28 ng/L, Hafen Bremerhafen 350 ng/L; Referen-

zen in Schenk 1998) werden im Einzugsgebiet menschlicher 'Aktivitäten' durchweg Konzentrationen über der Bestandsgefährdungsgrenze empfindlicher Arten mit Spitzenwerten im Dock- und Werftbereich gemessen. Insofern ist eine Streßbelastung am mutmaßlich weniger kontaminierten Kontrollstandpunkt Fährhafen von Cuxhaven denkbar. Das gegenüber Laborkontrollen erhöhte Expressionslevel dieser 4 Tage exponierten Freilandkontrolle (vgl. Abb. 3.3.14) kann bereits Streß widerspiegeln; die experimentellen Analysen zeigten, daß *Aurelia*-Polypen bereits bei 5 ng/L TBT nach ca. 4 Tagen maximale Biomarkerinduktionen aufwiesen. Gleichwohl bestätigt der gegenüber dieser 'Kontrolle' nach 3 Tagen beobachtete, etwa 3-fache Anstieg der Biomarkerexpression im Werfthafen von Cuxhaven das erhebliche Streßpotential für Wasserorganismen insbesondere im Einzugsbereich von Schiffswartungen. Die *Aurelia*-Expositionen an den Häfen in Bremerhaven und Wilhelmshaven wurden ebenfalls mit der Freilandkontrolle Cuxhaven standardisiert. Entsprechend sind die nur moderaten Induktionen (1-3-fach) möglicherweise nicht repräsentativ für eine 'Abweichung vom Normalzustand', dennoch weist die 3-fach erhöhte Expression des G-Proteins nach 15 Tagen Exposition in Wilhelmshaven auf chronisch wirkende Belastungen hin.

Die genökotoxikologischen Untersuchungen an der Ohrenqualle zeigen exemplarisch das Potential einer Verknüpfung ökotoxikologischer und molekularbiologischer Disziplinen. Insbesondere die einleitend aufgestellten Kriterien einer modellhaften Biomarkeretablierung, 'Übertragbarkeit auf andere Organismen', 'rascher Nachweis von Schadwirkungen' und 'sensitive Freilandindikation' werden durch die vorgestellte Methode aktiv aufgegriffen. Der routinemäßige Einsatz von Biomarkern sollte - parallel zu klassischen Toxizitätstest - eine verbesserte Abschätzung von

Schadstoffeffekten auf Individuen erlauben und eröffnet damit unter Einbeziehung der Auswirkungen auf Lebensgemeinschaften (Calow 1994) letztendlich die Beschreibung von Ökosystemeffekten für zukünftige Forschungsziele (van Gestel & van Brummelen 1996; Karouna-Renier & Zehr 1999; Cajaraville et al. 2000).

## 4. Gesamtdiskussion

Die ökologische Charakterisierung eines Organismus umfaßt verschiedene Ebenen von der individuellen Lebensgeschichte bis hin zur Rolle des Individuums im Ökosystem. Die Daten der vorliegenden Arbeit illustrieren, daß die Beziehungen von Organismen zu ihrer Umwelt durch die Verknüpfung von molekularen Prozessen, organismischen Eigenschaften und Populationsanalysen unter Integration verschiedener Zeitebenen mit umfassendem Informationsgehalt dargestellt werden können.

Die an der Ohrenqualle durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in i) die Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen auf Populations- und Speziesebene und ii) die Untersuchung der Auswirkungen von Umweltstreß auf Individuenebene. Zwangsläufig beinhalten beide Untersuchungsebenen - repräsentiert durch zwei eigenständige Kapitel - spezifische nicht überlappende Befunde, die in den jeweiligen Kapiteln ausführlich diskutiert wurden. Beispielsweise sind die Hinweise zur möglichen Existenz mitochondrialer DNA-Rekombination im Bereich der Grundlagenforschung von Interesse, während der Methodenvergleich im Rahmen einer Biomarkeretablierung von Interesse für die angewandte Umweltforschung ist. Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Untersuchungsebenen an der Ohrenqualle stehen ungeachtet dessen in einem übergreifenden Kontext. Die ökotoxikologische Standardisierung und Etablierung eines Modellorganismus setzt Kenntnisse zu dessen genetischer Variabilität und taxonomischer Einordnung voraus. Sturmbauer et al. (1999) zeigten z. B. bei dem Anneliden *Tubifex*, daß verschiedene genetische Linien eine unterschiedliche Cadmiumresistenz aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten 7-8 distinkte genetische Linien der Ohrenqualle beschrieben werden,

die als Basis für ökotoxikologische Experimente dienen können. Die Identifizierung einer genetischen Linie (UBI) mit einer großen geographischen Verbreitung ermöglichte den Einsatz eines Testklons mit breitem Anwendungsspektrum. *Vice versa* bieten die vergleichenden molekularen Untersuchungen des Biomarkers HSP70 auf Individuenebene mögliche Ableitungen zur Wirkung von Umwelteinflüssen während der evolutionären Diversifizierungsprozesse der *Aurelia*-Linien.

Die Neubelebung von Artbildungshypothesen unter dem Einfluß von ökologischer Differenzierung und Selektion adaptiver Merkmale in der aktuellen Literatur verweisen auf die Bedeutung ökologischer Faktoren im Rahmen von Speziationsprozessen (Schluter 1996; Losos et al. 1997; Lu & Bernatchez 1999; Übersicht in Bridle & Jiggins 2000). Theoretische Modelle zur Ausbildung reproduktiver Isolation postulieren die genetische Assoziation (Pleiotropie, *hitchhiking* und Kopplungsungleichgewicht) von adaptiven Merkmalen wie Größe oder Nahrungspräferenz mit Merkmalen, die assortative Paarung begünstigen (Rice & Hostert 1993; Dieckmann & Doebeli 1999). Die Mehrheit der Speziationsbeispiele unter ökologischer Differenzierung betreffen sympatrische und parasympatrische Differenzierungen (z.B. bei Blattläusen, Via 1999; Lepidopteren, Davison et al. 1999; Stichlingen, Rundle et al. 2000; *ecological character displacement*, Losos 2000). Die genealogischen und phylogeographischen Beziehungen der *Aurelia*-Linien zeigen hingegen, daß deren Diversifizierung unter der Hypothese klimatisch-ökologischer Habitatverschiebungen innerhalb eines allopatrischen Speziationsmodells erklärbar sind. In einer Zusammenfassung der Arthropodenradiation auf den Hawaii-Inseln werden ökologische Verschiebungen zwischen - ähnlich der bei *Aurelia* beobachteten - allo/peripatrischen Populationen als wesentliche Faktoren der Differenzierung diskutiert (Roderick



& Gillespie 1998). Das *divergence with gene flow*-Modell (Rice & Hostert 1993) beschreibt die Speziationsmechanismen der Ohrenqualle recht gut und unterstreicht die mögliche Entstehung von reproduktiver Isolation in Folge von adaptiver divergenter Selektion, trotz der Persistenz von Genfluß bei allopatrischen Populationen. Die Dominanz und Geschwindigkeit mit der ökologische Differenzierungen unter divergenter Selektion auftreten können, wird am Beispiel der in Amerika 'eingeschleppten' *Drosophila subobscura* deutlich. Innerhalb von 20 Jahren vergrößerten sich die Flügelflächen in Korrelation mit zunehmender geographischer Breite (Huey et al. 2000).

Die an der Ohrenqualle erhobenen organismischen und molekularen Daten demonstrieren, daß der Einfluß von Umweltfaktoren auf phänotypische und genetische Differenzierungen mit genealogischen bzw. phylogeographischen Methoden identifizierbar ist. Auf Basis der historischen Information bezüglich dem Wirken von Selektion als wichtigem Faktor während der *Aurelia*-Diversifizierung, erhebt sich die Frage nach möglichen adaptiven Merkmalen. Aus den organismischen Befunden sind variable morphologische Merkmale (Polypengröße) und Lebenszyklusparameter (Strobilationsrate und -induktion) als mögliche adaptive Folgeerscheinungen gegenüber klimatischen Unterschieden abzuleiten. Wie das Beispiel der Polypengröße zeigt, sind bei der Untersuchung von phänotypischen Merkmalen umweltmodifikatorische, nicht genetisch bedingte Varianzen nicht ganz auszuschließen, so daß Merkmale mit kausal erfaßbarer genetischer Basis vorzuziehen sind. Zunehmend werden die Beziehungen von Umweltfaktoren bzw. Stressoren zur genetischen Architektur von Populationen untersucht. So konnte am Beispiel von *T. tubifex* gezeigt werden, daß verschiedene, auf Basis der mitochondrialen 16S rDNA charakterisierte, genetische Linien unterschiedlich starke Resistenz gegenüber simulierten cadmium-kontaminierten Umweltbeein-

trächtigungen aufwiesen (Sturmbauer et al. 1999). Ebenso wurden bodenspezifische Streßfaktoren mit der genetischen Diversität von Mikrosatellitenloci einer Weizenart in Beziehung gebracht (Li et al. 2000). Die Beispiele der Korrelation von bestimmten Genotypen mit Schadeffekten zeigen indirekt über die genetischen Marker (16S rDNA, Mikrosatelliten) das Wirken von Selektion. Die beschriebenen Biomarker der Ohrenqualle können dagegen direkt als adaptive Merkmale angesehen werden.

Ein allgegenwärtiger, alle Organismen in zyklischen und unregelmäßigen Folgen beeinflussender Umweltfaktor ist die Temperatur als Quelle von natürlichem Umweltstreß (z.B. Stanley 1984; Übersicht in Hoffmann & Parsons 1994). Die Induktion von Hitzeschockproteinen in molekularökologischen Untersuchungen an Hydrozoen, Fischen und Ameisen (Bosch et al. 1988; White et al. 1994; Gehring & Wehner 1995) implizieren die evolutionsökologische Bedeutung dieser in Prokaryonten wie Eukaryonten konservierten Gene für die Erlangung von Thermotoleranz. Nach der ersten Charakterisierung von Hitzeschockgenen in *Drosophila melanogaster* (Ritossa 1962; Schlesinger et al. 1982) wurden speziell die HSP70-Proteine aufgrund ihrer Induzierbarkeit neben Temperaturerhöhung durch Fremdchemikalien, Sauerstoffdefizit und Virusinfektionen als universelle Streßreaktionsproteine bezeichnet (Marx 1983; Ananthan et al. 1986). Die genetischen Konsequenzen von Umweltstreß sind daher sowohl auf einer historischen Zeitskala, z. B. durch Nachweis unterschiedlich selektierter HSP-Proteintypen in verschiedenen Temperaturregimes (Coleman et al. 1995), als auch momentan durch deren Biomarkereigenschaften gegenüber Fremdstoffen zu erfassen. Die vergleichenden Expressionsanalysen des Hitzeschockgens HSP70 von drei *Aurelia*-Linien zeigten unterschiedliche Regulationsmuster in Reaktion auf simulierten (TBT) Umweltstreß (vgl. Abb. 3.3.17). Möglicherweise

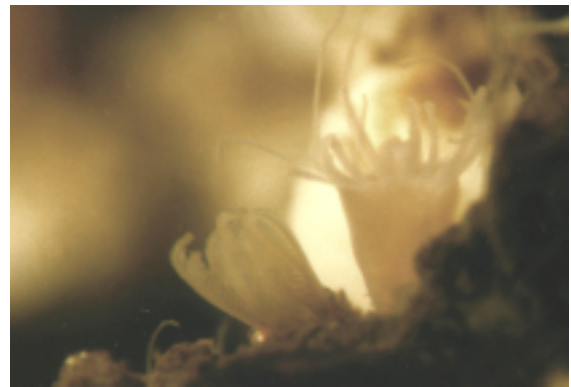
sind unterschiedliche Selektions- (Temperatur-) Regimes daraus abzuleiten. Die stärkere HSP70-Transkriptaufregulierung der beiden Linien UBI und BOR im Vergleich zum Vertreter der LAB-Linie könnte das größere geographische Verbreitungsspektrum dieser beiden Linien und damit Adaptationen gegenüber variabler Temperaturbereiche reflektieren (vgl. *Hydra oligactis* vs. *H. attenuata*, Bosch et al. 1988). Ein stärkeres Indiz für das Wirken von Selektion am HSP70-Genort bietet das Muster der DNA- und Aminosäuresubstitutionen (Tabelle 3.3 und Abb. 3.3.16). Sowohl Selektion gegen nachteilige Mutationen als auch positive Selektion von Polymorphismen im Vergleich von *Aurelia*-Linien können als adaptive 'Fingerabdrücke' im Kontext einer klimatisch bedingten Differenzierung der Ohrenqualle abgeleitet werden.

Aus der Vernetzung historischer und gegenwärtiger Informationen, die sich speziell am Beispiel des HSP70-Biomarkers ablesen lassen, eröffnen sich potentielle zukünftige Anwendungen. Moderne ökologische bzw. ökotoxikologische Forschungsrichtungen orientieren sich zunehmend an Fragen einer Voraussagekraft spezifischer Eigenschaften (chemische Wirkmechanismen, Toxizität, Biomarker, Zielart, 'Standardökosystem') für die zukünftigen Auswirkungen auf Lebensgemeinschaften und natürliche Ökosysteme (z. B. Wangersky 1995; Clements 2000). Unterschiedliche Ansätze beinhalten Biomarkerkorrelationen zur relativen Abundanz von sensitiven und toleranten Fischarten in Flußhabitaten (Theodorakis et al. 2000), die Fokussierung auf Schadstoffgemische mit generellem Einfluß auf marine Organismen (Goldberg & Bertine 2000), die Analyse von Energiefluß zwischen trophischen Ebenen/Nahrungsnetzen in belasteten Habitaten (Carlisle 2000) oder die Zusammensetzung empfindlicher Bakteriengemeinschaften als Indikator für die Stärke anthropogener Stressfaktoren in marinen Habitaten (Ford 2000). Der Biomarker HSP70

könnte ein ähnliches Prognosepotential für Veränderungen auf Populations- und höheren Ebenen besitzen. Die Präsenz dieses Markers in allen Organismen, die Induzierbarkeit unter verschiedensten Stressbedingungen und die an der Ohrenqualle wie auch anderen Organismen erprobte Freilandindikation weisen ihm die Eigenschaft eines universell einsetzbaren Umwelt-Screening-Werkzeuges zu (Karouna & Zehr 1999). Die an der Ohrenqualle gezeigte phänotypische (mRNA-Transkriptionsmenge) wie auch genotypische Plastizität innerhalb gegebener anthropogener und natürlicher selektiver Zwänge wird unterstützt durch Befunde an *Mytilus edulis*, bei der Populationen der Ostsee in Anpassung an Brackwasserbedingungen unterschiedliche HSP70-Expressionsmuster gegenüber hochmarinen Populationen zeigten (Tedengren et al. 1999). Geographische und zeitliche Variationen in Allelfrequenzen könnten adaptive Veränderungen zwischen Populationen unter verschiedenen selektiven Stressbedingungen dokumentieren. Untersuchungen an *Drosophila* korrelieren eine einzige Basensubstitution am temperatur-induzierbaren *hsr-omega*-Gen und dessen Allelfrequenz mit einer klimatisch verursachten Kline (McCull & McKechnie 1999). Die dabei verwendeten Methoden (quantitativer PCR-Nachweis des Allels) würden, übertragen auf den HSP70-Genort etwa der Ohrenqualle, die Verarbeitung großer Stichproben und damit unmittelbar das Screening auf Populationsebene ermöglichen. Die gleichzeitige Analyse mehrerer Organismen mariner Lebensgemeinschaften könnte somit Prognosen auf Ökosystemebene ermöglichen.

Ungeachtet der verbleibenden offenen Fragen - wie Differenzierung der Effekte von natürlichem versus anthropogen verursachtem Stress (z. B. Carlisle 2000) - orientieren sich die an der Ohrenqualle diskutierten Befunde an Zielen zukünftiger moderner Umweltforschung. Die von Sibley et al. (2000) angesprochene Schwäche einer fehlenden

Integration zwischen Endpunkten verschiedener biologischer Organisationsformen in ökologischen Risikoabschätzungen könnte mit der Kombination von Biomarkern und der Genotypisierung von Populationen aktiv aufgegriffen werden. Die Untersuchung der HSP70-Expression in Feldstudien an tropischen Riffkorallen im Zusammenhang mit thermalstreßbedingtem Korallenbleichen (Verlust der Zooxanthellen) verweist auf das Potential zur Überwachung empfindlicher Ökosysteme (Sharp et al. 1997). Da dieser Marker in jedem Organismus zu analysieren ist, eröffnen sich flexible zeitliche Untersuchungsskalen; je kürzer die Generationszeit eines Organismus, desto kürzer sind die Zeiträume, in denen sich die Verschiebung von Allelfrequenzen dokumentieren lassen. In diesem Zusammenhang könnten Untersuchungen der aktuell umstrittenen, möglichen Effekte globaler Klimaveränderungen auf biologische und ökologische Prozesse (Hughes 2000; Forchhammer & Post 2000) mittels des HSP70-Biomarkers denkbar sein.



*Aurelia*-Polyp im natürlichem Habitat

## 5. Zusammenfassung

Organismische Daten und molekulargenetische Marker wurden zur Rekonstruktion der Phylogeographie und Klärung des Artstatus sowie zur Untersuchung der Wirkung von Umweltstress bei der Ohrenqualle *Aurelia* sp. eingesetzt. Die große morphologische und ökologische Plastizität und weltweite Verbreitung der Ohrenqualle verursachte häufige taxonomische Revisionen innerhalb der Gattung *Aurelia*. Derzeit werden auf Basis morphologischer Befunde drei Spezies, *A. aurita*, *A. limbata* und *A. labiata* unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Verwandtschaftsbeziehungen von 67 Individuen aus weltweiten Populationen der Ohrenqualle sowie mögliche Artbildungsprozesse auf Basis nukleärer und mitochondrialer DNA-Sequenzinformationen (ITS-1/5.8S- und 16S ribosomale DNA) untersucht. Morphologische Daten und Lebenszyklusmerkmale wurden zur evolutionären Bewertung ökologischer Differenzierungen erhoben. Die genealogische und phylogeographische Rekonstruktion der *Aurelia*-Individuen führte zu einer konkordanten, sternförmigen Allelphylogenie von 7 (mtDNA) bzw. 8 (ncDNA) genetischen Linien mit Sequenzdivergenzen von 6-14% bzw. 5-32%. Basierend auf phylogenetischen Artkonzepten lassen sich Artbildungsprozesse postulieren und auf ca. 7.8-10.2 Millionen Jahre zurückdatieren. Die starke Korrelation von Umweltfaktoren mit morphologischen Merkmalen und genetischen Linien verweist auf eine ökologisch bedingte Differenzierung (Speziation) durch divergente Selektion. Obwohl Hybridisierung und Introgression zwischen Linien detektiert wurden, erhielten sich stabile evolutionäre Kladen. Habitaterweiterungen, z. B. während der Eiszeit, und Sekundärkontakte zwischen differenzierten Spezies können interspezifischen Genfluß begünstigt haben. Am 16S rDNA-Locus konnten erstmals direkte Hinweise zur Existenz von mitochondrialer DNA-Rekombination bei Tieren gefunden werden.

Die Wirkung von Umweltstress auf Ebene der mRNA-Transkription wurde mittels einer Exposition von *Aurelia*-Polypen mit Umweltchemikalien (Cadmium und Tributylzinnchlorid) untersucht. Aktuelle molekulargenetische Methoden wurden zur Etablierung von Biomarkergenen verwendet und führten zur Isolierung des Hitzeschockproteins HSP70 sowie weiteren stressinduzierten Genen. Drei Biomarker (HSP70, Stressprotein #135 und G-Protein) wurden exemplarisch hinsichtlich der Dosis-Wirkungsbeziehungen mittels quantitativer PCR- und Densitometrieverfahren analysiert. Labor- und Freilanddaten zeigen das sensitive Nachweispotential aller drei Biomarker gegenüber anthropogen verursachtem Umweltstress auf. Das etablierte Verfahren kann auf andere Organismen übertragen werden und verweist auf integrative Konzepte im Rahmen ökologischer und ökotoxikologischer Forschung.

## 6. Summary

Phenotypic and molecular data from the moon jelly, *Aurelia* sp. were used to study the phylogeography, speciation processes, and environmental stress. Mainly because of the high morphological and ecological variability the taxonomy of the genus *Aurelia* has been debated and repeatedly revised. Based on morphological studies three species are currently recognized, *A. aurita*, *A. limbata*, and *A. labiata*. In the present study, nuclear and mitochondrial DNA sequences (ITS-1/5.8S and 16S ribosomal DNA) from 67 specimens sampled on a world-wide scale were analysed to resolve the species issue within the genus *Aurelia*. Phylogeographic patterns and gene flow were estimated to unravel speciation processes. Morphological and life history traits were used to account for ecological differentiation. Genealogical reconstructions revealed star-like allele trees, differentiating 7 (mtDNA) and 8 (ncDNA) genetic lineages with sequence divergences ranging from 6-14% and 5-32%, respectively. Based on phylogenetic species concepts, speciation events can roughly be dated back to 7.8-10.2 MY ago. Strong associations between ecological factors, morphological traits, and genetic lineages indicate ecologically mediated differentiation and speciation processes forced by divergent selection. Hybridization and introgression between lineages were found which did not lead, however, to the disruption of distinct genotypic complexes. Gene flow between differentiating species may be explained by secondary contacts following range expansion during and after ice ages. Data from the *Aurelia* 16S rDNA gene suggest novel and direct evidence for mitochondrial DNA recombination in animals.

Genetic reactions to environmental stress were analysed at the level of mRNA transcription by exposing polyps to chemical stressors (cadmium and tributyltin). Several methods were tested which revealed the characterizations of the heat shock protein HSP70 and other stress-induced biomarker genes. The selected molecular biomarker approach may be transferred also to other study organisms. Three biomarkers (HSP70, stress protein #135, and G-protein) were used to study dose-response relationship for the selected environmental chemicals by means of PCR and densitometric quantification of transcribed mRNAs. Both laboratory and field data illustrate a sensitive biomarker system for the detection of environmental stress. The findings are expected to become important for the future integration of genetic research and applied approaches in ecology and ecotoxicology.

## 7. Literatur

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson. 1990. *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Auflage. VCH-Verlag, Basel.
- An, G., G. Luo, R.W. Veltri & S.M. O'Hara. 1996. Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. *BioTechniques* **20**, 342-346.
- Ananthan, J., A.L. Goldberg & R. Voellmy. 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**, 522-524.
- Arnold, M.L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**, 237-261.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography. The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, London.
- Avise, J.C. & R.M. Ball. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **7**, 45-68.
- Avise, J.C., R.M. Ball & J. Arnold. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol. Biol. Evol.* **5**, 331-344.
- Avise, J.C., B.W. Bowen & T. Lamb. 1989. DNA fingerprints from hypervariable mitochondrial genotypes. *Mol. Biol. Evol.* **6**, 258-269.
- Awadalla, P., A. Eyre-Walker & J. Maynard Smith. 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* **286**, 2524-2525.
- Bandelt, H.-J. & A.W.N. Dress. 1992. Split Decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phyl. Evol.* **1**, 242-252.
- Bargelloni, L., R. Scudiero, E. Parisi, V. Carginale, C. Capasso & T. Patarnello. 1999. Metallothioneins in antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 885-897.
- Barton, N.H. 1996. Natural selection and random genetic drift as causes of evolution on islands. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **351**, 785-795.
- Benovic, A., D. Lucic, V. Onofri, M. Peharda, M. Caric, N. Jasprica & S. Bobanovic-Colic. 1999. Ecological characteristics of the Mljet Island seawater lakes (South Adriatic Sea) with special reference to their resident populations of medusae. *in prep.*
- Benson, W.H. & R.T. DiGiulio. 1992. Biomarkers in hazard assessment of contaminated sediments. In Burton, G.A. (ed), *Sediment Toxicity Assessment*, pp. 241. Lewis CRC Publ., Boca Raton.
- Berger, E.M. 1977. Gene-enzyme variation in three sympatric species of *Littorina*. II. The Roscoff population with a note on the origin of North American *Littorina*. *Biol. Bull.* **153**, 255-264.
- Bigelow, H.B. 1904. *Aurelia maldivensis*. *Bull. Mus. Comp. Zool. at Harvard College* **39**, 261.
- Black, N.A., R. Voellmy & A.M. Szmant. 1995. Heat shock protein induction in *Montastraea faveolata* and *Aiptasia pallida* exposed to elevated temperatures. *Biol. Bull.* **188**, 234-240.
- Black, R.E. & L. Bloom. 1984. Heat shock proteins in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa). *J. Exp. Zool.* **230**, 303-7.
- BMBF, Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie. 1997. Forschung für die Umwelt. Bonn, September 1997.
- Boorstein, W.R., T. Ziegelhoffer & E.A. Craig. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* **38**, 1-17.
- Borchiellini, C., N. Boury-Esnault, J. Vacelet & Y. LeParco. 1998. Phylogenetic analysis of the HSP70 sequences reveals the monophyly of metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 647-655.
- Bosch, T.C., S.M. Krylow, H.R. Bode & R.E. Steele. 1988. Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7927-7931.
- Bradley, R.D. & D.M. Hillis. 1997. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 592-593.
- Brandt. 1838. *Diplocraspedon limbata*.
- Bridge, D., C.W. Cunningham, B. Schierwater, R. DeSalle & L.W. Buss. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8750-8753.
- Bridle, J.R. & C.D. Jiggins. 2000. Adaptive dynamics: is speciation too easy? *Trends Ecol. Evol.* **15**, 225-226.
- Bryan, G.W. & P.E. Gibbs. 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In Newman, M.C. & A.W. McIntosh (eds), *Metal Ecotoxicology*, pp. 323-361. Lewis Publ., Boca Raton.
- Burton, G.A., T.J. Norberg-King, C.G. Ingersoll, D.A. Benoit, G.T. Ankley, P.V. Winger, J. Kubitz, J.M. Lazorchak, M.E. Smith, E. Greer, F.J. Dwyer, D.J. Call, K.E. Day, P. Kennedy & M. Stinson. 1996. Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1335-1343.

- Bush, G.L. 1975. Modes of speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **6**, 339-364.
- Cajaraville, M.P., M.J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete & A. Viarengo. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* **247**, 295-311.
- Calow, P. 1994. Ecotoxicology: what are we trying to protect? *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1549.
- Carlisle, D.M. 2000. Bioenergetic food webs as a means of linking toxicological effects across scales of ecological organization. *J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery* **7**, 155-165.
- Chamisso & Eysenhardt. 1820. *Aurelia labiata*. *Nova Acta phys. med. Leop. Car.* **10**, 358.
- Chen, C.A. & D.J. Miller. 1996. Analysis of ribosomal ITS 1 sequences indicates a deep divergence between morphologically similar *Rhodactis* (Cnidaria: Anthozoa: Corallimorpharia) species from the Caribbean and the Indopacific/Red Sea. *Mar. Biol.* **126**, 423-432.
- Chen, J.J.W. & K. Peck. 1996. Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential bands on membrane. *Nucl. Acids Res.* **24**, 793-794.
- Chen, Z., K. Swisshelm & R. Sager. 1994. A cautionary note on reaction tubes for differential display and cDNA amplification in thermal cycling. *BioTechniques* **16**, 1003-1006.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi. 1986. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156-159.
- Clark, R.B. 1997. *Marine Pollution*. Clarendon Press, Oxford.
- Clements, W.H. 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. *J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery* **7**, 113-116.
- Clements, W.H. & P.M. Kiffney. 1994. Assessing contaminant impacts at higher levels of biological organization. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 357-359.
- Coleman, J.S., S.A. Heckathorn & R.L. Hallberg. 1995. Heat-shock proteins and thermotolerance: linking molecular and ecological perspectives. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 305-306.
- Costello, L.H. & S.P. Colin. 1994. Morphology, fluid motion and predation by the scyphomedusa *Aurelia aurita*. *Mar. Biol.* **121**, 327-334.
- Cracraft, J. 1989. Species as entities of biological theory. In Ruse, M. (ed), *What the Philosophy of Biology is*, pp. 31-52. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Craig, E.A. 1985. The heat-shock response. *Crit. Rev. Biochem.* **18**, 239-280.
- Cronin, T.M. 1988. Evolution of marine climates of the U.S. Atlantic coast during the past four million year. In Shackleton, N.J., R.G. West & D.Q. Owens (eds), *The Past Three Million Years: Evolution of Climatic Variability in the North Atlantic Region*, pp. 327-356. The Royal Society, London.
- Cunningham, C.W., N.W. Blackstone & L.W. Buss. 1992. Evolution of king crabs from hermit crab ancestor. *Nature* **355**, 539-542.
- Cunningham, C.W. & L.W. Buss. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 57-69.
- Davison, A., W.O. McMillan, A.S. Griffin, C.D. Jiggins & J.L. Mallet. 1999. Behavioral and physiological differences between two parapatric *Heliconius* species. *Biotropica* **31**, 661-668.
- Dellaporta, S.L., J. Wood & J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21.
- Depledge, M.H. & M.C. Fossi. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicol.* **3**, 161-172.
- DeSalle, R. & B. Schierwater. 1998. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Dieckmann, U. & M. Doebeli. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* **400**, 354-357.
- Dover, G.A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**, 111-116.
- Elder, J.F.J. & B.J. Turner. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quart. Rev. Biol.* **70**, 297-320.
- Eldredge, N. & J. Cracraft. 1980. *Phylogenetic Patterns and the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.
- Endler, J.A. 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press.
- Ericson, G., E. Noaksson & L. Balk. 1999. DNA adduct formation and persistence in liver and extrahepatic tissues of northern pike (*Esox lucius*) following oral exposure to benzo(a)pyrene, benzo(k)fluoranthene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole. *Mutat. Res.* **427**, 135-145.
- Ernst, W.H.O. & P.J. Peterson. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicol.* **3**, 180-192.
- Excoffier, L., P.E. Smouse & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.

- Eyre-Walker, A., N.H. Smith & J. Maynard Smith. 1999a. How clonal are human mitochondria? *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 477-483.
- Eyre-Walker, A., N.H. Smith & J. Maynard Smith. 1999b. Reply to Macaulay et al. (1999): mitochondrial DNA recombination-reasons to panic. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 2041-2042.
- Fautin, D.G. & J.M. Lowenstein. 1992. Scyphomedusae and their polyps are the same immunologically: implications for systematics. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 13-14.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- Fent, K. 1996a. *Ökotoxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Fent, K. 1996b. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **26**, 1-117.
- Forchhammer, M.C. & E. Post. 2000. Climatic signatures in ecology. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 286.
- Ford, T.E. 2000. Response of marine microbial communities to anthropogenic stress. *J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery* **7**, 75-89.
- Fossi, M.C. 1994. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect* **102**, 49-54.
- France, S.C., P.E. Rosel, J.E. Agenbroad, L.S. Mullineaux & T.D. Kocher. 1996. DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for a two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**, 15-28.
- Frenzel, B., M. Pécsi & A.A. Velichko. 1992. *Atlas of Paleoclimates and Paleoenvironments of the Northern Hemisphere. Late Pleistocene - Holocene*. Geographical Research Institute, Hungarian Academic of Science, Budapest, Stuttgart.
- Frohmann, M.A., M.K. Dush & G.R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Gehring, W.J. & R. Wehner. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2994-2998.
- Gellner, K., G. Praetzel & T.C. Bosch. 1992. Cloning and expression of a heat-inducible hsp70 gene in two species of *Hydra* which differ in their stress response. *Eur. J. Biochem.* **210**, 683-691.
- Gething, M.J. & J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Gibbs, P.E. & G.W. Bryan. 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **66**, 767-777.
- Gillespie, J.H. 1986. Variability of evolutionary rates of DNA. *Genetics* **113**, 1077-1091.
- Goldberg, E.D. & K.K. Bertine. 2000. Beyond the Mussel Watch-new directions for monitoring marine pollution. *Sci. Total Environ.* **247**, 165-174.
- Golding, G.B. 1994. *Non-Neutral Evolution: Theories and Molecular Data*. Chapman & Hall, NY.
- Goldman, N. 1993. Simple diagnostic statistical test of models of DNA substitution. *J. Mol. Evol.* **37**, 650-661.
- Grant, V. 1981. *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.
- Gray, M.W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 25-50.
- Greenberg, N., R.L. Garthwaite & D.C. Potts. 1996. Allozyme and morphological evidence for a newly introduced species of *Aurelia* in San Francisco Bay, California. *Mar. Biol.* **125**, 401-410.
- Greenpeace. 2000. Dauergift TBT (Tributylzinn). Bericht **3/00**, 1-5.
- Grigg, R.W. 1995. Evolution by reticulation. *Science* **269**, 1893-1894.
- Guimaraes, M.J., F. Lee, A. Zlotnik & T. McClanahan. 1995. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1832-1833.
- Gurskaya, N.G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P.D. Siebert, G.L. Khaspekov, K.A. Lukyanov, L.L. Vagner, O.D. Ermolaeva, S.A. Lukyanov & E.D. Sverdlov. 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression and polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* **240**, 90-97.
- Gutell, R.R., M.W. Gray & M.N. Schnare. 1993. Compilation of large subunit (23S- and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3055-3074.
- Gutell, R.R., N. Larsen & C.R. Woese. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Res.* **58**, 10-26.
- Güven, K. & D.I. DePomerai. 1995. Differential expression of the hsp70 proteins in response to heat and cadmium in *Caenorhabditis elegans*. *J. therm. Biol.* **20**, 355-363.
- Gyllenstein, U., D. Wharton, A. Josefsson & A.C. Wilson. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**, 255-257.



- Hagelberg, E., N. Goldman, P. Lio, S. Whelan, W. Schiefenhovel, J.B. Clegg & D.K. Bowden. 1999. Evidence for mitochondrial recombination in a human population of island Melanesia. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 485-492.
- Hagelberg, E., N. Goldman, P. Lio, S. Whelan, W. Schiefenhovel, J.B. Clegg & D.K. Bowden. 2000. Evidence for mitochondrial recombination in a human population of island Melanesia: correction. *Proc. R. Soc. Lond. B*, in press.
- Hammer, W.M., P.P. Hammer & S.W. Strand. 1994. Sun-compass migration by *Aurelia aurita* (Scyphozoa): population retention and reproduction in Saanich Inlet, British Columbia. *Mar. Biol.* **119**, 347-356.
- Harms, C.A., C.A. Ottinger, V.S. Blazer, C.L. Densmore, L.H. Pieper & S. Kennedy-Stoskopf. 2000. Quantitative polymerase chain reaction for transforming growth factor-beta applied to a field study of fish health in Chesapeake Bay tributaries. *Environ. Health Perspect.* **108**, 447-452.
- Harrison, R.G. 1991. Molecular changes at speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**, 281-308.
- Hartl, D.L. & A.G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Assoc., Sunderland, Mass.
- Hasegawa, M., K. Kishino & T. Yano. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**, 160-174.
- Hassoun, E.A. & S.J. Stohs. 1996. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicol.* **112**, 219-226.
- Hensbergen, P.J., M.J. van Velzen, R. Adi Nugroho, M.H. Donker & N.M. van Straalen. 2000. Metallothionein-bond cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* **125**, 17-24.
- Herman, Y. 1988. Paleoenvironments and episodic stagnation of the Eastern Mediterranean during the Brunhes Epoch. *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.* **31**, 106.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**, 247-276.
- Hey, J. 2000. Human mitochondrial DNA recombination: can it be true? *Trends Ecol. Evol.* **15**, 181-182.
- Hillis, D.M. 1991. Discriminating between phylogenetic signal and random noise in DNA sequences. In Miyamoto, M.M. & J. Cracraft (eds), *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*, pp. 278-294. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Hillis, D.M., J.J. Bull, M.E. White, M.R. Badgett & I.J. Molineux. 1993. Experimental approaches to phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**, 90-92.
- Hoffman, A.A. & Parsons, P.A. 1994. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford.
- Holmes, E.C., M. Worobey & A. Rambaut. 1999. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 405-409.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surv. Evol. Biol.* **7**, 1-44.
- Hudson, R.R., M. Slatkin & W.P. Maddison. 1992. Estimation of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* **132**, 583-589.
- Huey, R.B., G.W. Gilchrist, M.L. Carlson, D. Berrigan & L. Serra. 2000. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* **287**, 308-309.
- Hughes, L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.* **15**, 56-61.
- Hull, D.L. 1997. The ideal species concept - and why we can't get it. In Claridge, M.F., H.A. Dawah & M.R. Wilson (eds), *Species: The Units of Biodiversity*, pp. 357-380. Chapman & Hall, New York.
- Huson, D.H. 1998. SplitsTree: a program for analyzing and visualizing evolutionary data. Version 2.4, by huson@mathematik.uni-bielefeld.de, University of Bielefeld.
- Ikonomov, O.C. & M.H. Jacob. 1996. Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate- to low-abundance in a microscopic system. *BioTechniques* **20**, 1030-1042.
- Ingolia, T.D. & E.A. Craig. 1982. *Drosophila* gene related to the major heat shock induced gene is transcribed at normal temperatures and not induced by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2360-2364.
- Ishii, T., T. Yanagawa, T. Kawane, K. Yuki, J. Seita, H. Yoshida & S. Bannai. 1996. Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 456-460.
- Janas, U. & Z. Witek. 1993. The occurrence of medusae in the southern Baltic and their importance in the ecosystem, with emphasis on *Aurelia aurita*. *Oceanologia* **34**, 69-84.
- Johnston, P., M. Verbeck, M. MacGarvin, M. Simmonds, S. Mayer & B. McKay. 1995. The North Sea - invisible decline? *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2**, 170-174.
- Jukes, T. & C. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro, H.N. (ed), *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Academic Press, New York.
- Karbe, L. & Dannenberg, R. 1985. Entwicklung von Testverfahren an marinen Arten für ökotoxikologische Untersuchungen nach dem ChemG, Hydroiden.

- Kaneda, H., J. Hayashi, S. Takahama, C. Taya, K.F. Lindahl & H. Yonekawa. 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4542-4546.
- Kaplan, N.L., R.R. Hudson & C.H. Langley. 1989. The 'hitchhiking effect' revisited. *Genetics* **123**, 887-899.
- Karouna-Renier, N.K. & J.P. Zehr. 1999. Ecological implications of molecular biomarkers: assaying sublethal stress in the midge *Chironomus tentans* using heat shock protein 70 (HSP70) expression. *Hydrobiologia* **401**, 255-264.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kingman, J.F.C. 1982. The coalescent. *Stoch. Proc. Appl.* **13**, 235-248.
- Klicka, J. & R.M. Zink. 1997. The importance of recent Ice Ages in speciation: A failed paradigm. *Science* **277**, 1666-1669.
- Kozioł, C., C. Wagner-Hülsmann, H. Cetkovic, V. Gamulin, M. Kruse, Z. Pancer, H. Schäcke & W.E.G. Müller. 1996. Cloning of the heat-inducible biomarker, the cDNA encoding the 70-kDa heat shock protein, from the marine sponge *Geodia cydonium*: response to natural stressors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **136**, 153-161.
- Kozloff, E.N. 1987. *Marine Invertebrates of the Pacific Northwest*. University of Washington Press, Seattle.
- Kramp, P.L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **40**, 337-342.
- Lagadic, L., T. Caquet & F. Ramade. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicol.* **3**, 193-208.
- Lamarck. 1816. *Aurelia aurita*. *Hist. Anim. sans. Vert.* **2**, 513.
- Lansman, R.A., R.O. Shade, J.F. Shapira & J.C. Avise. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.* **17**, 214-226.
- Lee, S.B. & J.W. Taylor. 1992. Phylogeny of five fungus-like protistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 636-653.
- Lemoine, S., Y. Bigot, D. Sellos, R.P. Cosson & M. Laulier. 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar. Biotechnol.* **2**, 195-203.
- Lendenfeld, v. 1884. *Aurelia coerulea*. *Proc. Linnean Soc.* **9**, 280.
- Li, W.-H. 1993. Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitutions. *J. Mol. Evol.* **36**, 96-99.
- Li, W.-H. & D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Li, Y., T. Fahima, A.B. Korol, J. Peng, M.S. Roder, V. Kirzhner, A. Beiles & E. Nevo. 2000. Microsatellite diversity correlated with ecological-edaphic and genetic factors in three microsites of wild emmer wheat in North Israel. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 851-862.
- Liang, P. & A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-970.
- Lindquist, S. & E.A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- Linné. 1758. *Syst. Nat. ed.*
- Losos, J.B. 2000. Ecological character displacement and the study of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5693-5695.
- Losos, J.B., K.B. Warheit & T.W. Schoener. 1997. Adaptive differentiation following experimental island colonization in *Anolis* lizards. *Nature* **387**, 70-73.
- Lu, G. & L. Bernatchez. 1999. Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*): support for the ecological speciation hypothesis. *Evolution* **53**, 1491-1505.
- Lucas, C. 1996. Population dynamics of *Aurelia aurita* (Scyphozoa) from an isolated brackish lake, with particular reference to sexual reproduction. *J. of Plankton Research* **18**, 987-1007.
- Lucas, C.H. 1994. Biochemical composition of *Aurelia aurita* in relation to age and sexual maturity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **183**, 179-192.
- Lunt, D.H. & B.C. Hyman. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* **387**, 247.
- Lunt, D.H., L.E. Whipple & B.C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **7**, 1441-1455.
- Macauley, V., M. Richards & B. Sykes. 1999. Mitochondrial DNA recombination-no need to panic. *Proc. R. Soc. Lond.* **266**, 2037-2039.
- Machesky, L.M., E. Reeves, F. wientjes, F.J. Mattheyse, A. Grogan, N.F. Totty, A.L. Burlingame, J.J. Hsuan & A.W. Segal. 1997. Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem. J.* **328**, 105-112.

- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.
- Martin, A.P. & S.R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4087-4091.
- Marx, J.L. 1983. Surviving heat shock and other stresses. *Science* **221**, 251-253.
- Matz, M., D. Shagin, E. Bogdanova, O. Britanova, S. Lukyanov, L. Diatchenko & A. Chenchik. 1999. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucl. Acids. Res.* **27**, 1558-1560.
- Mayer, A.G. 1910. The Scyphomedusae. In *Medusae of the World*, pp. 603-630. Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. 1954. Geographic speciation in tropical echinoids. *Evolution* **8**, 1-18.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mayr, E. 1982. Processes of speciation in animals. In Barigozzi, C. (ed), *Mechanisms of Speciation*, pp. 1-19. Alan R. Liss, New York.
- McCarthy, J.F. & L.R. Shugart. 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis CRC Publ., Boca Raton, FL.
- McColl, G. & S.W. McKechnie. 1999. The *Drosophila* heat shock hsr-omega gene: an allele frequency cline detected by quantitative PCR. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1568-1574.
- Misra, S., M. Zafarullah, J. Price-Haughey & L. Gedamu. 1989. Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *Biochem. Biophys. Acta* **1007**, 325-333.
- Miyamoto, M.M. & J. Cracraft. 1991. *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Oxford University Press, Oxford.
- Monteverdi, G.H. & R.T. Giulio. 1999. An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37**, 62-69.
- Morimoto, R.I., A. Tissères & C. Georgopoulos. 1994. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 269-292.
- Müller, W.E.G. 1997. Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from their cDNA analyses from the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell Tissue Res.* **289**, 383-395.
- Müller, W.E.G., R. Batel, M. Lacorn, H. Steinhart, T. Simat, S. Lauenroth, H. Hassanein & H.C. Schröder. 1998. Accumulation of cadmium and zinc in the marine sponge *Suberites domuncula* and its potential consequences on single-strand breaks and on expression of heat-shock protein: a natural field study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **167**, 127-135.
- Müller, W.E.G. & I. Müller. 1998. Sponge cells and tissues in vitro: useful biomarkers of aquatic pollution. In Wells, P.G., K. Lee & C. Blaise (eds), *Microscale Aquatic Toxicology - Advances, Techniques and Practice*, pp. 97-112. Lewis CRC Publ., Boca Raton, FL.
- Mullins, R.D., J.F. Kelleher, J. Xu & T.D. Pollard. 1998. Arp2/3 Complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol. Biol. Cell* **9**, 841-852.
- Oberdorster, E., D. Rittschof & G.A. Leblanc. 1998b. Alteration of (14C)-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 21-25.
- Oberdorster, E., D. Rittschof & P. McClellan-Green. 1998a. Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab, *Callinectes sapidus*. *Aquat. Toxicol.* **41**, 83-100.
- Odorico, D.M. & D.J. Miller. 1997. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 465-473.
- Ohta, T. & G.A. Dover. 1983. Population genetics of multigene families that are dispersed into two or more chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4079-4083.
- Orr, M.R. & T.B. Smith. 1998. Ecology and speciation. *Trends Ecol. Evol.* **13**, 502-506.
- Orti, G., P. Petry, J.I.R. Porto, M. Jegu & A. Meyer. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J. Mol. Evol.* **42**, 169-182.
- Otte, D. & J.A. Endler. 1989. *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Page, R.D.M. & E.C. Holmes. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford.
- Palumbi, S.R. 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends Ecol. Evol.* **7**, 114-117.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**, 547-572.

- Pamilo, P. & M. Nei. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* **5**, 568-583.
- Paterson, H. 1985. The recognition concept of species. In Vrba, E. (ed), *Species and Speciation*, pp. 21-29. Transvaal Museum, Pretoria, South Africa,
- Peakall, D.B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicol.* **3**, 157-60
- Péron & Leseur. 1809. *Aurelia flavidula*. *Annls. Mus. Hist. nat. Paris* **14**, 359.
- Peyretailade, E., V. Broussolle, P. Peyret, G. Méténier, M. Gouy & C.P. Vivarés. 1998. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 683-689.
- Ponting, C.P., D.J. Blake, K.E. Davies, J. Kendrick-Jones & S.W. Winder. 1996. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 11-13.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Prosi, F. & G. Müller. 1987. Bedeutung der Sedimente als Schwermetallfalle; Bioverfügbarkeit und Mobilität von Metallen in Sedimenten in bezug auf den Biotransfer in limnischen Organismen. In Lillelund, K. & et al. (eds), *Bioakkumulation in Nahrungsketten*, pp. 102-115.
- Puls, A., S. Schmidt, F. Grawe & S. Stabel. 1997. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6191-6916.
- Rambaut, A. 1999. LARD, Likelihood Analysis of Recombination in DNA. Vers. 2.2, Oxford University.
- Rand, D.M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 125-131.
- Rawson, P.D. & T.J. Hilbish. 1995. Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 893-901.
- Rice, R.R. & E.E. Hostert. 1993. Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* **47**, 1637-1653.
- Ridley, M. 1996. *Evolution*. Blackwell Science, Cambridge.
- Ritland, C.E., K. Ritland & N.A. Straus. 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 1273-88.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.
- Roderick, G.K. & R.G. Gillespie. 1998. Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Mol. Ecol.* **7**, 519-531.
- Rundle, H.D., L. Nagel, J.W. Boughman & D. Schluter. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science* **287**, 306-308.
- Russell, F.S. 1970. *The Medusae of the British Isles*. Cambridge University Press, New York.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis & H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Sanders, B.M. 1990. Stress proteins: potential as multi-tiered biomarkers. In McCarthy, J.F. & L.R. Shugart (eds), *Biomarkers of Environmental Contamination*, pp. 165-191. Lewis CRC Publ., Boca Raton, FL.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sauvant, M.P., D. Pepin & E.A.D. Piccinni. 1999. *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere* **38**, 1631-1669.
- Schenk, J.M.C. 1998. Belastung von Sedimenten durch Tributylzinn. Land Niedersachsen, Fachgebiet Wasserwesen, Fachbereich Wasser- und Abfallwirtschaft.
- Schierwater, B. & H. Hadrys. 1998. Environmental factors and metagenesis in the hydroid *Eleutheria dichotoma*. *J. Inv. Reprod. Dev.* **34**, 139-148.
- Schlesinger, M.J. 1994. How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatric Res.* **36**, 1-6.
- Schlesinger, M.J., M. Ashburner & A. Tissieres. 1982. *Heat-Shock: From Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schlötterer, C., M.T. Hauser, A. von Haeseler & D. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 513-522.
- Schlötterer, C. & D. Tautz. 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Curr. Biol.* **4**, 777-783.
- Schluter, D. 1996. Ecological causes of adaptive radiation. *Am. Nat.* **148**, 40-64.

- Schneider, G. & G. Behrends. 1994. Population dynamics and the trophic role of *Aurelia aurita* medusae in the Kiel Bight and western Baltic. *J. Mar. Sci.* **51**, 359-367.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN - A software for population genetics data analysis. Version 2.0.
- Scholz, S. & H. Segner. 1999. Induction of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells: concentration-response relationships of four model substances. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**, 252-260.
- Schröder, H.C., H.M. Hassanein, S. Lauenroth, C. Koziol, T.A. Mohamed, M. Lacorn, H. Steinhart, R. Batel & W.E.G. Müller. 1999. Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 47-55.
- Selye, M. 1956. *The stress of life*. McGraw-Hill, New York.
- Sharp, V.A., B.E. Brown & D. Miller. 1997. Heat shock protein (HSP70) expression in the tropical reef coral *Goniopora djiboutiensis*. *J. therm. Biol.* **22**, 11-19.
- Shimizu, M., J.F. Hochadel & M.P. Waalkes. 1997. Effects of glutathione depletion on cadmium-induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblasts. *J. Toxicol. Environ. Health* **51**, 609-621.
- Shitara, H., J.I. Hayashi, S. Takahama, H. Kaneda & H. Yonekawa. 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* **148**, 851-858.
- Sibley, P.K., M.J. Chappel, T.K. George, K.R. Solomon & K. Liber. 2000. Integrating effects of stressors across levels of biological organization: examples using organophosphorus insecticide mixtures in field-level exposures. *J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery* **7**, 117-130.
- Siewing, R. 1985. *Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- SISMER. 1997. Systemes d'Informations Scientifique pour la Mer - MEDATLAS (Mediterranean Hydrological Atlas), <http://www.ifremer.fr/sismer/program/medatlas/>.
- Slatkin, M. & R.R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**, 555-562.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H. and Freeman, San Francisco.
- Sompayrac, L., S. Jane, T.C. Burn, D.G. Tenen & K.J. Danna. 1995. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4738-4739.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spangenberg, D.B. 1967. Iodine induction of metamorphosis in *Aurelia*. *J. Exp. Zool.* **165**,
- Spangenberg, D.B. 1984. Use of the *Aurelia* metamorphosis test system to detect subtle effects of selected hydrocarbons and petroleum oil. *Mar. Environ. Res.* **14**, 281-303.
- Stanley, S.M. 1984. Marine mass extinctions: a dominant role for temperature. In Nitecki, M.H. (ed), *Extinctions*, University of Chicago Press, Chicago.
- Stebbing, A.R.D. & B.E. Brown. 1984. Marine ecotoxicological tests with coelenterates. In *Ecotoxicological testing for the marine environment*, pp. 307-339. State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium.
- Streit, B. 2000. Metalle und Metalloide. In Guderian, R. & G. Gunkel (eds), *Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie*, pp. 398-424. Springer Verlag, Berlin, New York.
- Streit, B. & S. Winter. 1993. Cadmium uptake and compartmental time characteristics in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. *Chemosphere* **26**: 1479-1490.
- Sturmbauer, C., G.B. Opadiya, H. Niederstätter, A. Riedmann & R. Dallinger. 1999. Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 967-974.
- Stürzenbaum, S.R., P. Kille & A.J. Morgan. 1998a. Heavy metal-induced molecular responses in the earthworm, *Lumbricus rubellus* genetic fingerprinting by directed differential display. *Appl. Soil Ecol.* **9**, 495-500.
- Stürzenbaum, S.R., P. Kille & A.J. Morgan. 1998b. Identification of new heavy-metal-responsive biomarkers in the earthworm. In *Advances in Earthworm Ecotoxicology*, pp. 215-224.
- Sullivan, B.K., J.R. Garcia & G. Klein-MacPhee. 1994. Prey selection by the scyphomedusan predator *Aurelia aurita*. *Mar. Biol.* **121**, 335-341.
- Sutovsky, P. & G. Schatten. 2000. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int. Rev. Cytol.* **195**, 1-65.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP\*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods).
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.

- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In Takahata, N. & A.G. Clark (eds), *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, pp. 37-59. Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Tokyo.
- Tamura, K. & M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512-526.
- Tedengren, M., B. Olsson, O. Reimer, D.C. Brown & B.P. Bradley. 1999. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquat. Toxicol.* **48**, 1-12.
- Templeton, A.R. 1981. Mechanisms of speciation - a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **12**, 23-48.
- Templeton, A.R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution* **37**, 221-244.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In Otte, D. & J.A. Endler (eds), *Speciation and its Consequences*, pp. 3-27. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Templeton, A.R. 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. In Schierwater, B., B. Streit, G.P. Wagner & R. DeSalle (eds), *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications.*, pp. 455-477. Birkhäuser, Basel, Boston.
- Templeton, A.R. 1998. The role of molecular genetics in speciation studies. In DeSalle, R. & B. Schierwater (eds), *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*, pp. 131-156. Birkhäuser Verlag, Boston, Berlin.
- Theodorakis, C.W., C.D. Swartz, W.J. Rogers, J.W. Bickham, K.C. Donnelly & S.M. Adams. 2000. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery* **7**, 131-143.
- Thiel, H. & G. Jarms. 1986. Entwicklung von Testverfahren an marinen Arten für ökotoxikologische Untersuchungen nach dem ChemG, *Aurelia*.
- Thiel, M.E. 1970. 2. Buch, Scyphomedusae. In Bronns, H.G. (ed), *Klassen und Ordnungen des Tierreichs, II. Band*, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Thyagarajan, B., R.A. Padua & C. Campbell. 1996. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 27536-27543.
- Tsikhon-Lukanina, E.A., O.G. Reznichenko & T.A. Lukasheva. 1996. Food consumption by scyphistomae of the Jellyfish *Aurelia aurita* in the Black Sea. *Oceanology* **35**, 815-818.
- Ungerer, M.C., J.E. Baird, J. Pan & L.H. Rieseberg. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11757-11762.
- van Gestel, C.A.M. & T.C. van Brummelen. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicol.* **5**, 217-225.
- Van Valen, L.M. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* **25**, 233-239.
- Varley, G.C., G.R. Gradwell & M.P. Hassel. 1980. *Populationsökologie der Insekten*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Veron, J.E.N. 1995. *Corals in Space and Time: The Biogeography and Evolution of the Scleractinia*. University of New South Wales Press, Sydney, Australia.
- Via, S. 1999. Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* **53**, 1446-1457.
- Vogler, A.P. & R. DeSalle. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindella dorsalis*. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 393-405.
- von Stein, O.D., W.-G. Thies & M. Hofmann. 1997. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucl. Acids Res.* **25**, 2598-2602.
- Wallis, G.P. 1999. Do animal mitochondrial genomes recombine? *Trends Ecol. Evol.* **14**, 209-210.
- Wangersky, P.J. 1995. Bioavailability and total content as measures of pollution? *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2**, 132-133.
- Wayne, M.L., D. Contamine & M. Kreitman. 1996. Molecular population genetics of ref(2)P, a locus which confers viral resistance in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 191-199.
- Webb, T. & P.J. Bartlein. 1992. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**, 141-173.
- Wedenmeyer, G.A., D.J. McLeay & C.P. Goodyear. 1984. Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. *Adv. Environ. Sci. Technol.* **16**, 163-195.
- Welch, M.D., A.H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu & T.J. Mitchison. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J. Cell. Biol.* **138**, 375-384.

- Welch, W.J. 1990. Mammalian stress response: cell physiology and biochemistry of stress proteins. In Morimoto, R.I. & A. Tissieres (eds), *The Role of the Stress Response in Biology and Disease*, pp. 223-278. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- White, C.N., L.E. Hightower & R.J. Schultz . 1994. Variation in heat-shock proteins among species of desert fishes (Poeciliidae, *Poeciliopsis*). *Mol. Biol. Evol.* **11**, 106-119.
- Whittemore, A.T. 1993. Species concepts: a reply to Ernst Mayr. *Taxon* **42**, 573-583.
- Wiens, M., C. Koziol, H.M.A. Hassanein, R. Batel, H.C. Schröder & W.E.G. Müller. 1998. Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for polychlorinated biphenyls. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **165**, 247-257.
- Wiley, E.O. 1981. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Wiley, NY.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**, 323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago and London.
- Xia, X. 2000. DAMBE, Data Analysis in Molecular Biology and Evolution, V 4.0.26.
- Yang, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitutions. *J. Mol. Evol.* **39**, 105-111.
- Zenkewitch, L. 1963. *Biology of the Seas of the USSR*. Allen & Unwin, London.
- Zhang, D.-X. & G.M. Hewitt. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 247-251.
- Zouros, E., A.O. Ball, C. Saavedra & K.R. Freeman. 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**, 818.

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Prof. Dr. Bernd Schierwater für die Vergabe und Betreuung des Themas, sowie Prof. Dr. Bruno Streit für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Arbeitsplatzes. Die Gewährung wissenschaftlicher und materieller Freiräume bei der Wahl verschiedenster Arbeitstechniken und Materialien sowie die nicht direktiven Vorgaben bei der Durchführung der Arbeit möchte ich besonders anerkennen. Die Entwicklung einer selbständigen wissenschaftlichen Arbeitsweise wurde dadurch in besonderem Maße gefördert.

Ohne die Bereitstellung von *Aurelia*-Proben hätte die Arbeit in dieser Weise nicht durchgeführt werden können. Hierfür möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerhard Jarms bedanken, der mir außerdem einige seiner Daten zur Morphologie von Ephyren und Polypen zur Verfügung stellte. Weiterhin gilt mein Dank Drs. Allison J. Gong und Claudia Mills für Proben der amerikanischen Pazifikküste, Dr. Adam Benovic für die Proben aus den Mljet-Seen, Ulf Luth vom MPI-Marine Mikrobiologie Bremen für seine Bemühungen im Schwarzen Meer, Drs. Paul Groves und Rob Rippingale bezüglich ihrer 'Aureliagrüße' aus Australien, Carolyn Lehmann für ihre unkomplizierten Dubai-Probensendungen- und Übergaben im Neu-Isenburgener Kempinskyhotel, Drs. Masahiko Sakaguchi und Hiroshi Miyake für Proben aus Japan, Dr. Anna Kristin Danielsdottir vom *Marine Research Institute Iceland* für die Islandproben sowie Pascal Mosconie und Pierre Morniere für ihre freundliche Unterstützung bezüglich der Mittelmeer-*Aurelien*.

Für die Anregungen und Ideenbeiträge während der gesamten Doktorarbeit möchte ich Andrea Ender ein besonderes Danke sagen; ihre praktische, geistige und motivierende Unterstützung ist verbal wenig aufzuwiegen. Für die kritische Durchsicht einiger Kapitel der Arbeit bedanke ich mich bei Klaus Schwenk und Thomas Moser.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ökologie & Evolution möchte ich gleichfalls für die entspannte und lockere Arbeitsumgebung ein Danke sagen. Nicht zuletzt meinen Eltern bin ich für ihre Unterstützung während meiner Ausbildung dankbar.

Diese Arbeit wurde finanziell durch ein Stipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt unterstützt. Vielen Dank!



## Anhang 1. Molekulare Verwandtschaftsanalyse

1.1 ITS-1/5.8S rDNA-Alignment zwischen 8 nc-Linien (jeweils zwei repräsentative Individuen) der Ohrenquelle. Punkte = identische Nukleotide, - = Insertion/Deletion. Die unterschiedlichen DNA-Regionen sind gekennzeichnet.

|              |      | 18S-Gen    |            |            | ITS-1 →    |             |               |
|--------------|------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|
| EA-ROS       | UBI  | TAACAAGGTT | TCCGTAGGTG | AACCTGCGGA | AGGATCATT  | CCGGAAGCTT  | GCAGTTTATG    |
| WP-JAPK      | UBI  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.-..     | .....         |
| WA-WH4       | BOR  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A--A.C    | TACTG.....    |
| NS-HE2       | BOR  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A--A.C    | TACTG.....    |
| MS-MKL2/A    | MKL  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A...-GG   | AT-CA...C     |
| MS-MKL4      | MKL  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A...-GG   | AT-CA...C     |
| EP-FH1       | LAB  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.TGA.G   | T..TG.C...    |
| EP-BBH       | LAB  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.TGA.G   | T..TG.C...    |
| IO-DUB1      | ARAB | .....      | .....      | .....      | .....      | ..AT.GTAC   | A.GA.A---     |
| RS-2/B       | ARAB | .....      | .....      | .....      | G.....     | ..AT.GTAC   | A.GA.AGT--    |
| RS-1         | TET  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.--TAC   | .T.A.GCG.T    |
| MS-CN        | TET  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.--TAC   | .T.A.GCG.T    |
| EA-IS1       | LIM  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.--TAC   | ..G-.AC.CT    |
| WP-LIMBATA/A | LIM  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..A.--TAC   | ..G-.AC.CT    |
| MCA-1        | MCA  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..C....TGG  | ATG.AAGGA.    |
| UBI          |      | -----      | -----      | -----      | --CTGCAAAA | -GCTATTC--  | -----         |
| UBI          |      | .....      | .....      | .....      | .....      | A.....      | .....         |
| BOR          |      | T.....     | .....      | .....      | ..-.ATC.T  | AA.---      | .....         |
| BOR          |      | T.....     | .....TGTTG | GTCTC..... | GA...AC.C  | AA.A.A...   | .....         |
| MKL          |      | .....      | ..ATATTA   | ACTT.....  | .AA..AT... | A.A.T.--    | .....         |
| MKL          |      | .....      | ..ATTATTA  | ACTT.....  | .AA..AT..T | AAA.T.--    | .....         |
| LAB          |      | TCATGT...  | .....GTTG  | TGTCATGTTT | TATGCGC.C  | TATACA.ACA  | TACATACATA    |
| LAB          |      | TCATGT...  | .....GTTG  | TGTCATGTTT | TATGCGC.C  | TATACA.ACA  | TACATACATA    |
| ARAB         |      | .....      | .....      | .....GC    | AA...T.TT  | AA.---      | .....         |
| ARAB         |      | .....      | .....      | .....AT    | AA...T.TT  | AA.---      | .....         |
| TET          |      | GGTGTA...  | .....      | .....AC    | TA.CTACC.T | T..C.....   | .....         |
| TET          |      | GGTGTA...  | .....      | .....AC    | TA.CTACC.T | T..C.....   | .....         |
| LIM          |      | .....      | .GCCGAGTCG | C..AAGGCG. | ..-AAGC.G. | ACAAG.A.C   | .....         |
| LIM          |      | .....      | .GCCGAGTCG | C..AAGGCG. | ..-AAGC.G. | ACAAG.A.C   | .....         |
| MCA          |      | TCG.....   | .....      | .....      | ..GCCTCCTC | CTGC.A--    | .....         |
| UBI          |      | -----      | -----TATT  | CTGTTGAGCG | GATGCT---T | GTCATTCGAT  | AACGAATAAA    |
| UBI          |      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....C      | .....         |
| BOR          |      | .....      | .GCTGC...  | .....T     | A.---      | -CA.C...GC  | .-.....---    |
| BOR          |      | .....      | .GCTGC...  | .....T     | A.---      | -CA.C...GC  | .-.....---    |
| MKL          |      | .....      | .....      | .....      | -----      | ---T....C   | .....CG..     |
| MKL          |      | .....      | .....      | .....TTG-  | -----      | ---T....C   | .....CG..     |
| LAB          |      | CA.....    | .ACTGC...  | .....      | -----      | ---T....C   | -----C        |
| LAB          |      | CATACA...  | .ACTGC...  | .....      | -----      | ---T....C   | -----C        |
| ARAB         |      | .....      | .GCTGC...  | .....      | A.....     | .C.....C    | .....C        |
| ARAB         |      | .....      | .GCTGC...  | .....      | A.....ATT  | .C.....C    | .....C        |
| TET          |      | .....      | .AGAGC...  | .....      | AG...T.-   | .C.....C    | .....-        |
| TET          |      | .....      | .AGAGC...  | .....C.    | AG...T.-   | .C.....C    | .....-        |
| LIM          |      | .....      | ..AAGTAG   | TA..A.---  | -----TGC   | A.GCC.ATG.  | .T.T.TCT.T    |
| LIM          |      | .....      | ..AAGTAG   | TA..A.---  | -----TGC   | A.GCC.ATG.  | .T.T.TCT.T    |
| MCA          |      | .....      | ..GT.A     | G.TGGAT... | T-----     | ----G.AACA  | .C.AGCC..C    |
| UBI          |      | GAATAACCAC | TGTGAAGTTG | TACCTATCAG | TGTGAGGTGG | GCAGAGTGCA  | CA-----       |
| UBI          |      | .....      | .....      | .....T     | .....      | .....       | .....         |
| BOR          |      | -.C.....   | .....T...  | .....A..T  | .....      | .....AT     | .....         |
| BOR          |      | -.C.....   | .....      | .....A..T  | .....      | .....AT     | .....         |
| MKL          |      | -T.AT.T... | .....      | .....G..T  | .....      | .T.....     | .....         |
| MKL          |      | -T.AT.T... | .....      | .....G..T  | .....      | .T.....     | .....         |
| LAB          |      | .....      | .....      | .....T     | .....      | .....G      | .....         |
| LAB          |      | .....      | .....      | .....T     | .....      | .....G      | .....         |
| ARAB         |      | -.C.....   | .....T...  | .....A..T  | .....T     | .....A..... | .....CAAG..   |
| ARAB         |      | -.C.....   | .....      | .....A..T  | .....T     | .....A..... | .....CGAG..   |
| TET          |      | -----      | .....      | .....T     | .....      | .....       | .....         |
| TET          |      | -----      | .....      | .....T     | .....      | .....       | .....         |
| LIM          |      | CT.C.TT... | .....      | .....TG..T | .....      | A.....ACGG  | GGAGCAAGGC    |
| LIM          |      | CT.C.TT... | .....      | .....TG..T | .....      | A.....ACGG  | GGAGCAAGGT    |
| MCA          |      | ATGACTA... | .....C..   | .....A..T  | .....T     | .....       | .....AGCAAGTC |

## Fortsetzung ITS-1/5.8S-Alignment

```

UBI -----T GCGTGTG-TA CGTCTGAGCT TAAATGACGG GCGTTTTCCC ATCGGCCTCA
UBI .....
BOR ..... T.
BOR ..... T.
MKL ..... AT. C.
MKL ..... AT.
LAB ..... T.
LAB ..... T.
ARAB ..... A. .... G. . . T. T. . . . . T. . . . . A G. . . . .
ARAB ...TATGTAC A. .... . . T. T. . . . . T. . . . . A G. ....
TET ..... T. . . . . T. . . . . . . . . . . C.
TET ..... T.
LIM GAAATGCT. . . C. C. -. GT . . . . . T. . . C. . . . G. A. . . . . -. T GC. ....
LIM AAAATGCT. . . C. C. -. GT . . . . . T. . . C. . . . G. A. . . . . -. T GC. ....
MCA TTCTTTCCGA CT. .... C. . . . . T. . . . . A. . . . . C. T G. ....

UBI CATGGAGTTT TTT-----CA TTGTTA----- ATAACCT--- -----GTG T-----AAAA
UBI ..... T. ....
BOR T. .... C. . GC. TAT. TGT . . AC-TAT. T . . . A. A. . . . . C. T - . . . AT. . .
BOR ..... C. . GC. TWT. TGT . . AC-TAT. T . . . MAA. . . . . C. T - . . . A. . C.
MKL ..... GC. TGTGTTT G. T. ATTTTC . . T. A- . . . . . C. T GCTT. . G. T.
MKL ..... GC. TGTGTTT G. T. ATTTTC . . T. A- . . . . . C. T GAT. . . . T.
LAB ..... GC. TAT. . GT . . ---TCTTC . A. . . A. . . . . CCT G. . . . ---T
LAB ..... GC. TAT. . GT . . ---TCTTC . A. . . A. . . . . CCT G. . . . ---T
ARAB ..... GC. CTT. GTT GCAA-TTTTT T. -C. AA. . . . . AAT G. . . AC. TT
ARAB ..... GC. CTT. GTT GCAAATTTTT T. C. AA- . . . . . -AT G. . . AC. TT
TET ..... A GC. TTG. TGT . . ---TTTT C. . . AA. . . . . ACT . . . . ATC. .
TET ..... A GC. TTG. TGT . . ---TTTT C. . . AA. . . . . ACT . . . . GT. .
LIM ..... C. . . . CGT. GTC . -CGA. TAT. . CTGAAAA. . . . . C. T .CTTCCTG. C
LIM ..... C. . . . CGT. GTC . -CGA. TAT. . CTGAAAA. . . . . C. T .CTTCCTG. C
MCA ..... G. . AAC. AG. G. T. GTTTTT CA. . . AAACA AAAAAACAC. T .GCTCAC. .

UBI ATT-ATTCCT GAAAATGGT- ---CAAACCT TTTT----- -----GGT TTGGCTAA--
UBI .....
BOR T. . . T. . . . . TTAT . . TGTGT. A . . CATT. . . . . AGC. CA A. . AAG. T. .
BOR W. . . . . TTAT . . TGTGT. A . . CATT. . . . . AGC. CA A. . AAG. T. .
MKL ..... A . . CT. . A. GT AAT. G. . . G. GC. . TTTAGT GTGTTT. G. T. A. TTA. . . A
MKL ..... A . . CT. . A. GT AAT. G. . . G. GC. . TTTAGT GTGTTT. G. T. A. TTA. . . A
LAB T. . . . . . TC. . AA. . . . G. . . C. . . . TTTATC AAGAAAAA. . . C. T. . . .
LAB T. . . . . . TC. . AA. . . . G. . . C. . . . TT. ATC AAGAAAAA. . . T. . . .
ARAB ..... TC. . AA. A AT. TG. . . C. . . . . ATT AG. . . . A. . . . T. . . AA
ARAB ..... TC. . AT. A AT. TG. . . A . . . . ACTACT AAAG. . . A. . . AT. . . AA
TET C. . . T. . . . . --A. A G. TCT. GCA . . . . . ACT AT. . . . - . . . A. . . .
TET C. . . T. . . . . --A. A GTCG. GCA. A C. . . AC. ACT AT. . . . - . . . A. . . .
LIM T. . GC. G. TG CTGCGA. ACC GACTCTTTGC . GAGCTGGTC GAGCAACTAC . A. --C. . AA
LIM T. . GC. G. TG CTGCGA. ACC GACTCTTTGC . GAGCTGGTC GAGCAACTAC . A. --C. . AA
MCA T. . G. . . . . . TCTA. TCG AGCAGCTG. . CAAGCTGAGC AAGCTGTTTCG A. TCTGTTGA

->ITS-1 5.8S-Gen->
UBI GTCGCAAAAA TGAGATACAA CTTCTAACGG TGGATCTCTT GGCTCGTGCA TCGATGAAGA
UBI . . T. . . . .
BOR . . T- . . . . . A. . . . .
BOR . . T- . . . . . A. . . . .
MKL . . A. A. . . . .
MKL . . T. A. . . . .
LAB . . TA. . . . .
LAB . . TA. . . . .
ARAB AGT. T. . . . .
ARAB AGT. T. . . . .
TET -GTTAC. . . . .
TET -GTTAC. . . . .
LIM A-ACA. . . -- CAT. . G. . . . .
LIM A-ACA. . . -- CAT. . G. . . . .
MCA . AT. G. . . . .

```

## Fortsetzung ITS-1/5.8S-Alignment

```

UBI          ACGCAGCCAG CTGCGATAAG TAGTGTGAAT TGCAGAACTC AGCGAATCAT CGAATCTTTG
UBI          .....
BOR          .....
BOR          .....
MKL          .....
MKL          .....
LAB          .....G.....
LAB          .....
ARAB         .....
ARAB         .....
TET         .....
TET         .....
LIM          .....T.....
LIM          .....T.....
MCA         .....

UBI          AACGCAAATG GCGCTCCCTG GTTCTCCAGG GAGCATGTCT GTCTGAG
UBI          .....
BOR          .....T.....
BOR          .....
MKL          .....
MKL          .....
LAB          .....T.....
LAB          .....T.....
ARAB         .....
ARAB         .....T.....
TET         ...A.....A.....A.....
TET         .....
LIM          .....T.....
LIM          .....T.....
MCA         .....

```

**1.2 16S rDNA-Alignment zwischen 7 mtDNA-Linien (je zwei repräsentative Individuen) der Ohrenqualle.**  
Punkte = identische Nukleotide, - = Insertionen/Deletionen.

```

EA-ROS      UBI      CTCTTGTAAG GTGAAGCCTG CCCAATGACT GCCAATAATC TAATAAAAA- -----TCAG
WP-JAPK     UBI      .....
WA-WH4      BOR      .....TT.....C...T...A.....C...
NS-HE2      BOR      .....TT.....C...T...A.....C...
MS-MKL2     LIM      .....T...T.AA...C...G.....
WP-LIMBATA  LIM      .....T...A-...C.....
EP-FH1/A    LAB      .....G...G...CCC.....
EP-BBH      LAB      .....G...CG...CCC.....
IO-DUB1     ARAB     .....T...CT...CC.....C...
RS-2        ARAB     .....AT...CA...CT.....T...
RS-1        TET      .....T...C...A...CC.....
MS-CN       TET      .....T...C...A...CC.....
MCA-1       MCA      .....T...TT...CT...C...AT.....A

UBI          TTCAATGGCC GCGGTAAGCTC TGACCGTGAT AAAGTAGCAT AATCACTTGT CACTTAATTG
UBI          .....
BOR          .....A
BOR          .....A
LIM          .....T.....A
LIM          .....T.....A
LAB          .....
LAB          .....
ARAB         .....
ARAB         ..T.....
TET         .....
TET         .....
MCA          ..T.....A

```

## Fortsetzung 16S rDNA-Alignment

```

UBI      GTGACTGGAA TGAATGGCTA AACGAATCCT CCTCTGTCTC TGA-AGAAAT CCTGGCAAAT
UBI      .....C.....
BOR      .....A...C...-...G...
BOR      .....A...C...-...G...
LIM      .....AA.....A...T...-...TG...
LIM      .....AA.....A...T...-...TG...
LAB      .....C.....G...T...-...C...
LAB      .....C...C.....G...T...-...C...
ARAB     .....C...TAC.....A...C...-...
ARAB     .....TAC.....A...G...C...-...G...
TET      .....C.....A...C...-...T...
TET      .....C.....A...C...-...T...
MCA      .....A...G...C...-...

UBI      TTGAAATAGC AGTGAAGATG CTGCTAAATA ATTGTAAGAC GAAAAGACCC TATCGAGCTT
UBI      .....G.....
BOR      .....A.....T.....
BOR      .....A.....T.....
LIM      .....A.....T.....
LIM      .....A.....T.....
LAB      .....T.....A.....
LAB      .....T.....A.....
ARAB     .....AT.....AT...G...
ARAB     .....AT.....AT...G...
TET      .....G.....
TET      .....
MCA      .....T...T.....A.....

UBI      TACTGGAATC TTGCAAAGTA ACATAGTTAT TAAAGA-CAA AATTATACAA ATTGCAAGCC
UBI      .....
BOR      .....G...T...CA...T...GAC...C.CC...G...C.CTC.A...
BOR      .....A.G...T...CA...T...GA...C.CCA...G...C.CT.A...
LIM      .....G...T.T.C...TT...-...CTTCA..TG...T..T.TA...A.....T
LIM      .....G...T.T.C...TT...-...CTTCA..TG...T..T.TA...A.....T
LAB      .....A.G...T.T.C.G...T..G.CC...CTG.A..TG...GGCCT.TT...C.....
LAB      .....G...T.T.C.G...T.G.CC...CTG.A...G...GGCCT.TT...C.....
ARAB     .....A.G...T.C.C...T..GCC..A...CT.CA...GG.A.CTA.G...C.....A.
ARAB     .....A.G...T.C.C.T...T..GCC.GA...CT.CA...GG.A..TA...A.....A.
TET      .....A.G...T..CAA...T...C...CCGTAG..G...GC.C.TT...CC.....
TET      .....A.G...T..CAA...T...C...CCGTAG..G...GC.C.TT...CC.....
MCA      .....A.G...T.G.T.T...TT.C..A...CCG...TC...C...A.....

UBI      CGACAGTTTG GTTGGGGCGA CCACCCCTAA AAACGTATCA GGGGAActCT AAAGGCTGTC
UBI      .....G.....
BOR      T.....A.....T.AC.
BOR      T.....A.....T.AC.
LIM      T.....T.....T.TAT
LIM      T.....T.....T.TAT
LAB      .....T.....T.A.T
LAB      .....T.....T.A.T
ARAB     .....G.....T.A.T
ARAB     .....T.A..
TET      T.....T.....T.A..
TET      T.....T.....T.A..
MCA      .....T...C...A.....CT.T

UBI      ATAATATGAA AAACC-GCCT TACTGGAG-A CAAACAAGTC AATCAGTTA- TAATTTA-TA
UBI      .....G.....
BOR      .....G...TT.....
BOR      .....G...TT.....
LIM      .A..C...TT...T...AC...
LIM      .A..C...TT...T...AC...
LAB      C.....GTT.....A.G...
LAB      C.....GTT.....A.G...
ARAB     .....TT.A...T...A...
ARAB     .....T...TT.A...T...A.G...
TET      .C.....TT.....
TET      .C.....TT.....
MCA      .....C...TA.....C...A.G...

```

## Fortsetzung 16S rDNA-Alignment

|      |            |            |              |            |            |            |            |     |
|------|------------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| UBI  | GGACATATTG | ACCCGTTATT | TAGCTTCACA   | ACAAATAACG | ACTATGAAAA | AAGTTACCGT | AGGGATAACA | GGG |
| UBI  | .....      | .....      | .....        | .....      | .....      | .....      | .....      | ... |
| BOR  | .....      | .....      | .T.-...T.    | .T.....    | .....      | .....      | .....      | ... |
| BOR  | .....      | .....      | .T.-...T.    | .T.....    | .....      | .....      | .....      | ... |
| LIM  | .....      | .....      | ...-...TG    | .T.....    | .....      | .....      | .....      | ... |
| LIM  | .....      | .....      | ...-...TG    | .T.....    | .....      | .....      | .....      | ... |
| LAB  | .....      | .....      | .TA-C....    | G.....     | .C.....    | .....      | .....      | ... |
| LAB  | .....      | .....      | .TA-C....    | G.....     | .C.....    | .....      | .....      | ... |
| ARAB | .....      | .....      | .CA-...T.    | .....      | .....      | .....      | .....      | ... |
| ARAB | .....      | .....      | ...-...GT.   | .T.....    | .....      | .....      | .....      | ... |
| TET  | .....      | .....      | .C..T.-C..TG | .T..G....  | .....      | .....      | .....      | ... |
| TET  | .....      | .....      | .C..T.-C..TG | .T..G....  | .....      | .....      | .....      | ... |
| MCA  | .....      | .....      | .CT-...TT.   | .....      | .A..C....  | .....      | .....      | ... |

**1.3** Typisierung der untersuchten *Aurelia*-Individuen (N = 67) zur mitochondrialen (16S rDNA) und nukleären (ITS-1/5.8S rDNA) genetischen Linie. Hell hervorgehobene Individuen sind Linienhybride, das Individuum EA-IS1 besitzt ein rekombiniertes mitochondriales Allel (Kasten). Die nc-Linie LIM weist eine durchschnittliche Sequenzdivergenz von 3.4% zu *Cyanea capillata* auf (- = nicht sequenziert).

| Herkunft     | Individuen | mtDNA          | ncDNA     |
|--------------|------------|----------------|-----------|
| Nordsee      | NS-S       | BOR            | BOR       |
| Nordsee      | NS-HE1     | BOR            | BOR       |
| Nordsee      | NS-HE2     | BOR            | BOR       |
| Ostsee       | BS-BO      | BOR            | BOR       |
| Ostsee       | BS-K       | BOR            | BOR       |
| Ostatlantik  | EA-ROS     | UBI            | UBI       |
| Ostatlantik  | EA-LR      | BOR            | BOR       |
| Nordatlantik | EA-NO      | BOR            | BORxBOR   |
| Nordatlantik | EA-IS1     | <b>BOR/LIM</b> | LIM       |
| Nordatlantik | EA-IS2     | BOR            | BORxLIM   |
| Nordatlantik | EA-IS3     | LIM            | LIM       |
| Nordatlantik | EA-IS4     | BOR            | BORxBOR   |
| Nordatlantik | EA-IS5     | BOR            | BOR       |
| Nordatlantik | EA-IS6     | -              | LIM       |
| Westatlantik | WA-WH4     | BOR            | BOR       |
| Westatlantik | WA-WH5     | BOR            | BOR       |
| Westatlantik | WA-WH6     | BOR            | -         |
| Rotes Meer   | RS-1       | TET            | TET       |
| Rotes Meer   | RS-2       | ARAB           | ARABxARAB |
| Ostpazifik   | EP-LAB1    | LAB            | LABxLAB   |
| Ostpazifik   | EP-LAB2    | LAB            | LABxLAB   |
| Ostpazifik   | EP-FH1     | LAB+UBI        | LAB       |
| Ostpazifik   | EP-FH8     | LAB            | LAB       |
| Ostpazifik   | EP-FH11    | LAB            | LAB       |
| Ostpazifik   | EP-P1      | UBI            | LABxUBI   |
| Ostpazifik   | EP-P15     | LAB            | -         |
| Ostpazifik   | EP-PM1     | LAB            | -         |
| Ostpazifik   | EP-PM3     | UBI            | UBI       |
| Ostpazifik   | EP-PM16    | LAB            | -         |
| Ostpazifik   | EP-BBF     | LAB            | LAB       |
| Ostpazifik   | EP-BBH     | LAB            | LAB       |
| Ostpazifik   | EP-BBJ     | LAB            | LAB       |
| Mittelmeer   | MS-PE1     | UBI            | -         |
| Mittelmeer   | MS-PE2     | UBI            | UBIxUBI   |

|                |            |      |         |
|----------------|------------|------|---------|
| Mittelmeer     | MS-PE3     | UBI  | -       |
| Mittelmeer     | MS-PE4     | UBI  | -       |
| Mittelmeer     | MS-PE5     | UBI  | -       |
| Mittelmeer     | MS-PE6     | UBI  | -       |
| Mittelmeer     | MS-PE7     | UBI  | UBIxUBI |
| Mittelmeer     | MS-LAG     | UBI  | -       |
| Mittelmeer     | MS-CN      | TET  | TET     |
| Mljet Seen     | MS-MKL1    | LIM  | MKL     |
| Mljet Seen     | MS-MKL2    | LIM  | MKLxUBI |
| Mljet Seen     | MS-MKL3    | LIM  | MKL     |
| Mljet Seen     | MS-MKL4    | LIM  | MKL     |
| Schwarzes Meer | BL-S1      | BOR  | BOR     |
| Schwarzes Meer | BL-S2      | BOR  | BOR     |
| Bosporus       | BL-BO1     | BOR  | BOR     |
| Bosporus       | BL-BO2     | BOR  | BOR     |
| Australien     | IO-PE1     | UBI  | UBI     |
| Australien     | IO-PE2     | UBI  | UBI     |
| Australien     | IO-PE3     | UBI  | -       |
| Australien     | IO-PE4     | UBI  | UBIxUBI |
| Australien     | IO-PE-5    | UBI  | UBIxUBI |
| Pers. Golf     | IO-DUB1    | ARAB | ARAB    |
| Pers. Golf     | IO-DUB2    | ARAB | ARAB    |
| Pers. Golf     | IO-DUB3    | ARAB | ARAB    |
| Pers. Golf     | IO-DUB4    | ARAB | ARAB    |
| Pers. Golf     | IO-DUB5    | ARAB | -       |
| Pers. Golf     | IO-DUB6    | ARAB | ARAB    |
| N-W-Pazifik    | WP-LIMBATA | LIM  | LIMxBOR |
| Westpazifik    | WP-JAPF    | UBI  | UBI     |
| Westpazifik    | WP-JAP1    | UBI  | UBIxUBI |
| Westpazifik    | WP-JAPT    | UBI  | -       |
| Westpazifik    | WP-JAPK    | UBI  | UBI     |
| Unbekannt      | MCA-1      | MCA  | MCA     |
| Aquarium       | BERLIN     | UBI  | UBI     |

## Anhang 2. Molekulare Ökotoxikologie

DNA- und Proteinsequenzen isolierter Biomarker der Ohrenqualle (M = Startmethionin, \* = Stoppkodon, UTR = *Untranslated Region*).

2.1 #108 cDNA-Fragment: *ARP2/3-Proteinkomplex-Untereinheit*

```

ACGCGGGGGAGTCAAGAAGCAAAGGCGTAGCAGTAAGGAAAAGCTTCCAAGTCAAGTGTTTTAAAATGTCGAAATCAGCAA
                                                                M S K S A
ATACACGCGAATTCAGGAAGGTAGATGTTGATAAATTTGATGAAGATAGATTCCAGGATGACCAAGCCGAAGAAGAGCAAG
N T R E F R K V D V D K F D E D R F Q D D Q A E E E Q
ATACAGGCCCAAGTGAAGCAGATATTCAACAATTACTAATGTCAAAAAAGAACACTGAAGCATTGAAACTTTTGCTGTCAC
D T G P S E A D I Q Q L L M S K K N T E A L K L L L S
AAGCACCAGCAGGCTCTAAAAACAAAGATAGAAAAGGATAAAGCATTGGAATTGGTCACAAGAGTTCTAACGAATTATAAGG
Q A P A G S K N K D R K D K A F E L V T R V L T N Y K
CAAGTGAATTAAGTCTGCTGCTGCAAAAGATTGAATATACAAGAGACAGATATGTTGATGAAATACATCTACAGGGGATTG
A S E I T A A A K D L N I Q E T D M L M K Y I Y R G F
CTGAGCCAAGTGACAGTTACTGTGCTCGCATTGTCATGGCATGAAAAGGTTGTCGCTAATGGTGGACTTGGCAGTATCA
A E P S D S Y C A R I L S W H E K V V A N G G L G S I
TTGAGCACTTGAGATAGAAAGACTGTCTAATTGACTGTATCACAATCTTTTGT 542 nt
I R A L A D R K T V *

```

2.2 #135 cDNA-Fragment: *oxidatives Streßprotein*

```

TGATGATCGACATACAAAGCAAGAAAAGTAAGCAATCAAAGCAACTGTGAGACGAAACGATGGCATTGTCAGTGAAGGCCT
-----5'-UTR-----M A L S V K A
ACTTGAATTTTGAAGAAGGAAACCCAGAGATTCTCGATCGAGCAAGATGTCAGTGAAGCATTGAGTATTTGA
Y L N F E E G N P E I R R F S I E Q D V S A S Y E E Y L
TGGAGAAAATACGACGAGTATATCCATCGTTGTTGAGGAAAATTTCCAATTGTTTTGGAGAGACGGAAGAAGAGTTGG
M E K I R R V Y P S L L R K N F Q L F W R D E E E E L
TTGCTTCTCAAGTGAAGAATTGGTGTGCTCTTGAAGCTCTTCAGGAGATAATTTCAAGGTCTACATCAAAGTAC
V A F S S D E E L V I A L G S S S G D N F R V Y I K V
AAGCACCAGTGACTCAACAGATGGTGCCACACCAAAACAAAAGCAAAGCACCTGGTGTGTTTGTGATGTCTGTGACA
Q A P S D S T D G A T P N Q K A K H P G V V C D V C D
AAGGAATAGAAGGAACCCGTTTCAAATGCTTGGCATGCCAGATTATGACCTGTGCAGTGGCTGTGAAAGCAAGGGTTTCC
K G I E G T R F K C L A C P D Y D L C S G C E S K G F
ACCCAGAACATGAGATGTTGCGAATGCGTACACCAAAACCGTATCCCTGGCATGGAATATGGAGTATGGTATTTGGTCAAG
H P E H E M L R M R T P N R H P W H G I W S M V F G Q
GAGGAAGAGGTGGTCCATTTGGTAGGAGAGGACACCATGGGAGAGGAAGACATGGCCCAAGACCACATTGCCCTAGATTTG
G G R G G P F G R R G H H G R G R H G P R P H C P R F
CACACCATGGTGGACCAACATGATGGCCACCTGGTAGAGAGGTTGCAGAGGTGTTTGGGGACCCACGTPRGTGCTG
A H H G G P N M H G P P G R G G C R G G F G D P R G A
GATGGTATGGACCTTGGGGATGCCATTTCAAAGCAATGAAAACAATGAAGAGAAAACACTGATAAACTACACAGCAACAGG
G W Y G P W G C H F Q S N E N N E E K T D K T T Q Q Q
GGGCTGAGGGCAACCCTCAAATCCTCCTTACCCATCATTTGAGGAAGTCTTTGATCAGGTGTCACAAGCTGTTGGTC
G A E G N P P N P P Y P S F E E V F D Q V S Q A V G
AGTTCTTCAACCCAGACCAAGCAAACACATGGGGTTACAGTGAAGCCACCAAGAAAACAGCAATCAAGAAAGACAGGAAG
Q F F N P D Q A N T W G Y S E A T Q E N S N Q E R Q E
AAAAAGCAGCAAAGCAAGAGGAGGCTGGTACTGACAATGGAACAGCAGAGGATGCCCAATGCCACAAAGTGAAGCGTCAT
E K A A K Q E E A G T D N G T A E D A P M P Q S E A S
TTATTGTCATTAACAAAGAAATGGAAGAAAAGCAAAGAATCTGCTGACCAAAACCCATCACAATCTGCAGAGCCCAGTGCCC
F I V I N K E M E E S K E S A D Q N P S Q S A E P S A
CAAGCCAATCGCAAAGCAGACGACGAGAGGAAGGAATTTGAACGAAAATTGAACGAGGCAATCAGACAATGGAAAACA
P S Q S Q S R R R E E E E F E R K L N E A I R Q M E N
TGGGATTCAACAATGATAGTGGATGGTTGACTCAGCTCCTCATTTCAAAGGATTTTGATATTGGCAAAGTTATTGATACAT
M G F N N D S G W L T Q L L I S K D F D I G K V I D T
TGCAAGTAAATGAAATAAATAGACTCTTCAAGAGCTACCTATGAGAGCATGACTCTTTCATTTGAACTTGCATCATCAA
L Q V N G N K *-----3'-UTR-----
TTTTGACATTTATATATCATTAATAAAATGCTTTGAACTTTAAATAAAAATAAATACAATACATAAAAGACAAAAAATATT
-----
AAATGCTTTAAGT
-----

```

## Fortsetzung molekulare Biomarker

**2.3 #119/126 cDNA-Fragment: *GTP-Binding-Protein***

ACAGACATACGCCTTCAGACTAAATCACTTTTTCGTTGGACACATGGATTACAAATATTTACGATGGCAAGTGATTGACAC  
 Q T Y A F T T K S L F V G H M D Y K Y L R W Q V I D T  
 CCCTGGAATTCTCGATCATTCTCTTGAAGAAAAGGAATACAATTGAAATGCAGGCCATTACTGCGCTTGCCACATCAGAGC  
 P G I L D H S L E E R N T I E M Q A I T A L A H I R A  
 TGCTGTCTTTATGTAATGGATCTGTGAGAACAAATGCAACCATTCTATAGAAGAACAATTGCGTTGTTTAGCAATATAAA  
 A V L Y V M D L S E Q C N H S I E E Q I A L F S N I K  
 GCCATTGTTTACCAACAAACCAATCATTGTTTGTGTTTGAATAAAAATCGATATTGTTGCGGTAGATGACCTTCTGAAGAGAA  
 P L F T N K P I I V C L N K I D I V A V D D L P E E K  
 GAAGAACTGCTGGATGTTTTTAACGAAGACGGCATTACAGTCATACCAATGAGCAACGTAACCGAAGAAGGAGTTATGGC  
 K K L L D V F N E D G I T V I P M S N V T E E G V M A  
 AGCAAGAACAGACGCTTGTGAAAGACTTCTTGCTCATCGAGTTGAAGTCAAAATGAAGAGCAAAAAGATGGGAGATATTGT  
 A R T T D A C E R L L A H R V E V K M K S K K M G D I V  
 AAACAGATGCATGTTGCTCCCAAAAGCAAGGCGATAAAGAGCACCAGCATTATACCAGAGGGCCGTAAGAA  
 N R L H V A V P K A R G D K E R P A F I P E G A V K K  
 AGGCAAAGGAATGGACATCGATAAGCCTTACAAGAAGCTACAGAAGGAATATGAGAAAGAACTCGGTGATGATTATCGCTT  
 G K G M D I D K P Y K K L Q K E Y E K E L G D D Y R F  
 TGATGATAAGAAATTGTATGTGGTACCAGATACTGAGAAATATGACATCATAACCAGAGTTGATTAATGGCAAGAATATTGC  
 D D K K L Y V V P D T E K Y D I I P E L I N G K N I A  
 AGATTTTCATCGATCCGGAGATATTAGAGAACTTGATGCGTTGGAGAGGAAGAGGAATTGAGAGAAGGAGCGGGGGTGA  
 D F I D P E I L E K L D A L E R E E E L R E G A G V Y  
 TGATGAAGATATTGATGATATGGATTGAGAAGAAGAAACGCAAAAGCTCGCAGAAGAAATTCGAAAGAAAAGAAGAT  
 D E D I D D M D S E E E E T Q K L A E E I R K K K K I  
 CAGGCTTCAAGAGAAGAGAAAAGAAAAGGAATTATGCAACTGCGGAGAAAAGGCGTCTCTCAGGCTGAATAAATT  
 R L Q E N R E K K R R N Y A T L P R R K A S L R L N K F  
 TGGAAAGCTCACAAAGAAAGATGATGACATAGAAAGGATGGAGTTCAACATTGATGGTATCGATATGATGGATGGATCG  
 G K P H K K D D D I E G M E F N I D G D I D M M D A R  
 TGCTCGATCTGTCAATTCGAAAGAATAGAAAAAGAAAGGCGAGTGAGCAAGCAAGCAAGCAGAAAGCACGTCACGTCACC  
 A R S V I R K N R K R K A S E Q A S K H E S T S R P P  
 ACGGATCAGTCTGGTATCTCTGATCCTCAGAAGCGAGTCAAAGTTCGCAAGCTGGCAAAGGTTTCTCAAAGGAAAATGAA  
 R D Q S G I P D P Q K R V K V R K L A K V S Q R K M N  
 TATGTATGGTAAAGCAGGTGAAGCTGACAGTAACGATTTCTG 1257 nt  
 M Y G K A G E A D S N D F

**2.4 Differential Display: cDNA-Fragment mit Primer (dT)<sub>12</sub>-VC und RAPD Primer AB-18 (10-mer)**

CTGGCGTGTGACAGGTGTCATTTTGTAGCCAGTACGCATTTAGTGCCTCTCTTTTTTCAAAGTAAAACCTAAAAATTGAA  
 ATTCCCTTTCCGAACTGCCGTGATATCAGATCACGTGTCTATGCCGTTTCTCAAACCTCTGGTTTCAGGTTCTCTCTAAA  
 TTTTGACTTAGCGAGCTCGTATCTCCCGTGTGGTAGACGATTCTAAAATGCAAGGTATGTGCATTCAAGTTGAAGATG  
 AACAAATATAGCTATGTTTTCGAAAGTCCCAGATATTTTATTGTTTGTGCTTTTATCCAATCAAAGGAAGTACTTTTT  
 GGAGACACCCGATATGGTTACAAGAATTTGGTATCTTTTCAACTCCTGTTTGGTTCTCTCTGATGTTAACAGAGGTGTG  
 GTATTGCAGGCTCTGGTTTCANTTTTCGCACAAACATGAACTTTAAATGCTTGTAACTCCATGAATTTTTTAGTCGATTGG  
 CAAAAAAAAAAAAA 490 nt

**2.5 Differential Display: cDNA-Fragment mit Metallothionein-CKC-Motivprimern**

TGCAAGTGCTCAGGATCGGCGAAATATGCTCATGAAAGCTGCCTACTTCAATGGTTTTTCAAGACGAGACGAAGACGGTGT  
 C K C S G S A K Y A H E S C L L Q W F F K T R R R R C  
 GAATTATGCCTTTCAGAAGTCAATGTGAAGTCTGTTGGGTTCAAACCTTTACAGAAGGTAAGAATAGTTCATCATTTGGTAC  
 E L C L S E V N V K S V G F K P L Q K V R I V H H W Y  
 GACAGTCTTGTATTTTCATATCTTTTCATATTTTCATATTTCAATTTATTAAGGAGGGAGACCCTTCAGCCTAGTGGCTGA  
 D S P C I S Y L F I F S Y F N L L R R E T L Q P S G \*  
 TTTTCAAGGGGGCCCTCCACATAAAAACCTTACAAAATATAGAATCC 289 nt

## Fortsetzung molekulare Biomarker

**2.6 Hitzeschockprotein HSP70: DNA-Alignment der beiden *Aurelia*-Klone WA-WH4 und EA-ROS (- = identische Nukleotide)**

```

WA-WH4: AACAGGACAACACCAAGTTATGTCGCTTTCGACGACAATGAACGACTCATTGGAGATGCAGCCAAGAATCAAG
EA-ROS: -----G-----T-----A-----C-----C-----
WA-WH4: CAGCCATGAATCCCGAGAACACCATTTTCGATGCAAAACGACTGATTGGGCGACGCTTCGACGAGGACACTGT
EA-ROS: ---A-----T-----A-----T-----A-----A-----T-----
WA-WH4: TCTGGCTGACAAGAAACATTGGCCGTTCCAAGTTACAAGTGATGCTGGCAAGTCAAGATTCAAGCTACATAC
EA-ROS: CCA-----T--A-----A-----C-----C-----G-----
WA-WH4: AAAGGGGAGAGGAAGACATTCTTCCCGAAGAAATTTTCATCCATGGTTCTCACGAAGATGAAGGAAACTGCTG
EA-ROS: -----T---CG-----C-----T-----
WA-WH4: AAGCATACCTTGGAGAAAAAGTAACCGATGCAGTTATCACTGTTCTGCCTACTTCAATGACTCTCAGCGACA
EA-ROS: -----C-----T-----A--AA-----
WA-WH4: GGCAACGAAGGATGCAGGGGCAATTGCAGGCCTAAATGTTTTGCGTATAATAAACGAGCCTACAGCTGCAGCA
EA-ROS: T-----A-----T-----C--C-----
WA-WH4: ATTGCTTATGGATTGGACAAGAGAACCAAGGACGAGAAAAATGTGCTCATCTTTGATTTAGGAGGTGGAACAT
EA-ROS: -----G-----G-CG-----C-----
WA-WH4: TCGACGTGTCAATTCTCACCATCGATGGTGGTATTTTTGAAGTGAAATCAACTGGCGGAGACTCATCTTGG
EA-ROS: -T--T-----G-----G-----G-G---T-----
WA-WH4: AGGGGAAGATTTTGACAATCGTGTGTTGATCATTTCATCAAAGAATTCAAACGAAAGCATCATCAATACATC
EA-ROS: -----TG-----
WA-WH4: AGTAATAATAAAAGAGCAATTCGAAGATTGAGAACAGCATGTGAGAAAGCAAAGAGAACCCTTTCATCAGCAA
EA-ROS: --C-----C-----T-----
WA-WH4: CGCAAGCCAGTATTGAAGTCGACTCACTTTTCCAAGGCATTGACTTCTATTCAACTTTGACAAGAGCAGGATT
EA-ROS: -----C-----T-----
WA-WH4: CGAAGAACTCAATGCAGACTTTTTCCGAAGCACATTGGACTGTGAGCAAAGTTCTGAAAGATTCAAAGCTG
EA-ROS: -----CT---T-----G-----
WA-WH4: GACAAGAAACAGATTGATGAAATTGTGATGGTTGGAGGTTGACAAGAATCCCTAAAATACAGAAAATGCTGA
EA-ROS: ----A-----C-----G-----
WA-WH4: GAGATTTCTTCAATGACAAGGAACTCTGCAAGTCAATCAACCCTGACGAAGCGGTAGCCTAT
EA-ROS: -T--A-----G-----T---C-----C-----G--C

```