

**The cellular, chemical, and molecular response of  
the sponge *Aplysina aerophoba* to grazing**

**Dissertation**

**in fulfilment of the requirements for the degree  
of Doctor in Natural Sciences**

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

at Kiel University

Submitted by

**Yu-Chen Wu**

Kiel, 2019

First examiner: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

Second examiner: Prof. Dr. Martin Wahl

Date of the oral examination: 11<sup>th</sup> December, 2019



## Statutory Declaration

**Declaration according to § 9 (2) of the Doctoral Degree Regulations of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences and the Faculty of Engineering at Christian-Albrechts-Universität zu Kiel from 9 August 2018**

I, Yu-Chen Wu, herewith declare that the PhD thesis entitled “The cellular, chemical, and molecular response of the sponge *Aplysina aerophoba* to grazing” is an original report of my research, has been written by me, has not been submitted for any previous degree or publication, and has been prepared subject to the Rules of Good Scientific Practice of the German Research Foundation. I declare that all my academic degrees have never been withdrawn. The experimental work is almost entirely my own work except where explicitly stated otherwise in the text; the collaborative contributions have been indicated clearly and acknowledged. Due references have been provided on all supporting literatures and resources. Furthermore, I declare that the submitted written (bound) copies of the present thesis and the version submitted on a data carrier are consistent with each other in contents.

Place, Date: \_\_\_\_\_ Signature: \_\_\_\_\_

## Abstract

Sponges (Phylum Porifera) are sessile invertebrates that produce secondary metabolites to defend against predators, competition and bio-fouling. Nevertheless, certain sea slugs (Phylum Mollusca: Class Opisthobranchia) have specialized in grazing on specific sponge species, which leaves the sponge tissue exposed. To date, no study has examined the response of sponges upon grazing. In the present PhD thesis, I investigated the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* which produces brominated alkaloids with antibacterial and deterrence properties against generalist predators. These brominated compounds are enriched in a particular cell type, so-called spherulous cells. However, *A. aerophoba* is the main food source for a specialist grazer – the sea slug *Tylodina perversa* – which tolerates brominated compounds and also exploits them for its own defense. By ways of microscopic technologies, MALDI-imaging MS, and RNA-Seq, I aimed to investigate the cellular processes, the potential role of secondary metabolites, and molecular mechanisms in the response of the sponge to grazing. I hypothesized that grazing can induce signaling pathways for a recruitment of spherulous cells with secondary metabolites. Three treatments were applied: control, grazing, and mechanical damage. Samples were collected 3 hours, 1 day, 3 days, and 6 days after treatment. My results showed that spherulous cells were recruited to the wounded site in a time-dependent manner. MALDI-imaging MS showed that both brominated compounds (aerophobin-2 and aeroplysinin-1) localized usually at the sponge surface and accumulated at the damaged surface upon wounding. The expression of key potential candidate genes for cell migration, wound sealing, and immune response were activated also in a time-dependent manner based on RNA-Seq data. Compared to mechanical damage, grazing triggered a relatively lower degree of stimulus perception, inflammatory response, and oxidative stress, and induced a relatively higher degree of chemical perception, phagocytosis, and mucus production. As spherulous cells are common in many members of the class Demospongiae, the recruitment of defensive cells may also occur in other sponges for protecting these filter-feeders. My PhD thesis contributes to understanding the evolutionary mechanisms in sponges for facing grazing and wounding.

## Zusammenfassung

Schwämme sind sessile Invertebraten, die Sekundärmetaboliten produzieren um sich gegen Feinde, Konkurrenz und das Überwachsenwerden durch Biofilme (sogenanntes „bio-fouling“) zu verteidigen. Bestimmte Meeresschnecken haben sich jedoch als Fraßfeinde auf bestimmte Schwammarten spezialisiert. Bisher gibt es keine Untersuchungen, wie ein Schwamm auf den Befall durch Schnecken als Fraßfeinde reagiert. Im Rahmen meiner Doktorarbeit untersuchte ich den Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba*, der bromierte Alkaloide mit antibakteriellen und abschreckenden Eigenschaften gegen generalistische Feinde produziert. Diese bromierten Verbindungen reichern sich in einem bestimmten Zelltyp, den sogenannten Rosettenzellen, an. *A. aerophoba* ist jedoch auch die Hauptnahrungsquelle für einen spezialisierten Fraßfeind, die Meeresschnecke *Tyrodina perversa*, die bromierte Verbindungen toleriert und diese zur eigenen Abwehr ausnutzt. Mein Ziel im Rahmen meiner Doktorarbeit war es, mittels Mikroskopie, MALDI-Imaging-MS und Transkriptom-Analysen („RNA-Seq“) die zellulären Prozesse, die mögliche Rolle von Sekundärmetaboliten sowie die molekularen Mechanismen des Schwamms nach der Beweidung durch die Schnecke zu untersuchen. Ich stellte die Hypothese auf, dass die Beweidung des Schwamms durch die Schnecke Signalwege für die Rekrutierung von Rosettenzellen mit Sekundärmetaboliten hervorrufen kann. Es wurden drei Behandlungen angewendet: Kontrolle, Beweidung und mechanische Verletzung. Die Proben wurden 3 Stunden, 1 Tag, 3 Tage und 6 Tage nach der Behandlung gesammelt. Meine Ergebnisse zeigten, dass sich die Rosettenzellen und die beiden bromierten Verbindungen Aerophobin-2 and Aeroplysinin-1 zeitabhängig an der verletzten Stelle ansammelten. Potentielle Kandidatengene für Zellmigration, Wundversiegelung und Immunantwort wurden aktiviert. Im Vergleich mit der mechanischen Verletzung löste die Beweidung die Schnecke einen relativ geringen Grad an Reizwahrnehmung, Entzündungsreaktion und oxidativem Stress aus und induzierte einen hohen Grad an chemischer Wahrnehmung, Phagozytose und Schleimproduktion. Da Rosettenzellen bei vielen Schwammarten der Klasse Demospongiae vorkommen, kann die Rekrutierung von Abwehrzellen auch bei anderen Schwämmen zum Schutz dieser filtrierenden Organismen erfolgen. Diese Promotionsarbeit trägt zum Verständnis der evolutiven Mechanismen zwischen sessilen Schwämmen und spezialisierten Fraßfeinden bei.