

**Lokalisierung und molekulare Charakterisierung eines
Pederin produzierenden Endosymbionten der Gattung
Pseudomonas aus dem Kurzflügler *Paederus riparius*
(Coleoptera: Staphylinidae)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Matthias Kador

aus Kulmbach

Bayreuth, im September 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 678: „Ökologische Bedeutung von Wirk- und Signalstoffen bei Insekten - von der Struktur zur Funktion“.

Promotionsgesuch eingereicht am: 03. September 2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 14. Dezember 2007

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Konrad Dettner (Erstgutachter)

Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitzender)

Prof. Dr. Ewald Komor

Prof. Dr. Harold L. Drake

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juli 2004 bis September 2007 und wurde am Lehrstuhl für Tierökologie II der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Konrad Dettner angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
ABKÜRZUNGEN.....	XIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 ALLGEMEINE ÜBERSICHT.....	1
1.2 DIE FAMILIE DER STAPHYLINIDAE: EINE KURZÜBERSICHT.....	9
1.3 DER <i>PSEUDOMONAS</i> ÄHNLICHE <i>PAEDERUS</i> -ENDOSYMBIONT.....	12
1.4 DER NATURSTOFF PEDERIN.....	15
1.5 ZIELSETZUNG.....	20
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 SAMMELSTELLEN DER <i>PAEDERUS</i> -KÄFER.....	21
2.2 BESTIMMUNG DER GESAMMELTEN EXEMPLARE.....	22
2.3 HALTUNG UND ZUCHT IM LABOR.....	23
2.4 FOTOGRAFIE.....	23
2.5 LICHT- UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	24
2.5.1 Fluoreszenz-Filtersätze.....	24
2.5.2 Fluoreszenz-Farbstoffe.....	24
2.6 KONFOKALMIKROSKOPIE (CLSM).....	25
2.7 ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	25
2.8 BAKTERIELLE NÄHRMEDIEN.....	25
2.8.1 Verfestigte komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien.....	26
2.8.1.1 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien.....	27
2.8.1.1.01 BHI-Agar.....	27
2.8.1.1.02 BHI-Agar mit verschiedenen Supplementen.....	27
2.8.1.1.03 BHI-Agar mit Tellurit.....	27
2.8.1.1.04 BHI-Agar mit Supplementen und Tellurit.....	27
2.8.1.1.05 BHI-Agar mit Penicillin G.....	28

2.8.1.1.06	BHI-Agar mit Penicillin G und Tellurit.....	28
2.8.1.1.07	Mac Conkey-Agar (ohne Salz).....	28
2.8.1.1.08	Malachitgrün-Agar.....	28
2.8.1.1.09	Pseudomonas-Isolations-Agar.....	28
2.8.1.1.10	Pseudomonas-Isolations-Agar mit Penicillin G und Tellurit.....	28
2.8.1.1.11	Pseudomonas-Isolations-Agar mit CNA-Supplement.....	29
2.8.1.1.12	Pseudomonas-Isolations-Agar mit CFC-Supplement.....	29
2.8.1.2	Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Fertignährböden.....	29
2.8.1.2.01	Columbia-Agar mit 5% Schafblut.....	29
2.8.1.2.02	Columbia-III-Agar mit 5% Schafblut.....	29
2.8.1.2.03	EMB-Agar (Eosin-Methylenblau-Agar).....	29
2.8.1.2.04	Herz-Infusion-Agar mit 5% Schafblut.....	30
2.8.1.2.05	Pseudosel-Agar (Cetrimid-Agar).....	30
2.8.1.2.06	Schokoladenagar (Kochblutagar).....	30
2.8.1.3	Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen.....	30
2.8.1.3.01	Pepton-Salz-Agar.....	30
2.8.1.3.02	Pseudomonas Indigofera Medium.....	30
2.8.1.4	Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte.....	31
2.8.1.4.01	Mehlkäfer-Extrakt-Agar.....	31
2.8.1.4.02	<i>Paederus</i> -Extrakt 2-Agar.....	31
2.8.1.4.03	Pepton-Salz-Agar mit Suppline 1/2/3.....	31
2.8.1.4.04	Pepton-Salz-Agar mit <i>Paederus</i> -Extrakt 1.....	31
2.8.1.5	Verfestigte komplexe Nährböden für Anaerobier: Fertignährböden.....	31
2.8.1.5.01	Brucella-Agar mit Hemin und Vitamin K1.....	31
2.8.1.5.02	Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafblut.....	32
2.8.1.5.03	Schaedler-KV-Agar mit 5% Schafblut.....	32
2.8.1.5.04	Wilkins Chalgren Anaerobier-Agar.....	32
2.8.1.6	Verfestigte synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen.....	32
2.8.1.6.01	Glucose-Mineralsalz-Agar.....	32
2.8.1.6.02	VL 55-Agar.....	32
2.8.2	Flüssige komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien.....	33
2.8.2.1	Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien.....	33
2.8.2.1.01	BHI-Bouillon.....	33
2.8.2.1.02	BHI-Bouillon mit Tellurit.....	33

2.8.2.1.03	Cetrimid-Bouillon (Pseudomonas-selektiv-Bouillon).....	33
2.8.2.1.04	Malachitgrün-Bouillon.....	33
2.8.2.2	Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen.....	34
2.8.2.2.01	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-(HPG)-Nährlösung.....	34
2.8.2.2.02	Nährbouillon.....	34
2.8.2.2.03	Pepton-Salz-Lösung.....	34
2.8.2.3	Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte.....	34
2.8.2.3.01	Pepton-Salz-Lösung mit Suppline1/2/3.....	34
2.8.2.4	Flüssige synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen.....	35
2.8.2.4.01	Glucose-Mineralsalz-Nährlösung.....	35
2.8.2.4.02	VL 55-Nährlösung.....	35
2.8.3	Medienzusätze und Stammlösungen.....	35
2.8.3.1	Komplexe und synthetische Medienzusätze: Eigenrezepte.....	35
2.8.3.1.01	Mehlkäfer-Extrakt.....	35
2.8.3.1.02	<i>Paederus</i> -Extrakt 1.....	36
2.8.3.1.03	<i>Paederus</i> -Extrakt 2.....	36
2.8.3.1.04	Suppline 1/2/3: Zusatz für Pepton-Salz-Agar.....	36
2.8.3.2	Komplexe und synthetische Medienzusätze: Pulverzusätze.....	36
2.8.3.2.01	D22 Insect Medium.....	36
2.8.3.3	Stammlösungen: selbst abgewogen.....	36
2.8.3.3.01	Kaliumtellurit-Stammlösung.....	36
2.8.3.3.02	Penicillin G-Stammlösung.....	37
2.8.3.3.03	Selenit-Wolframat-Stammlösung.....	37
2.8.3.3.04	Spurenelementstammlösung.....	37
2.8.3.3.05	Vitamin-Stammlösung 1.....	37
2.8.3.3.06	Vitamin-Stammlösung 2.....	37
2.8.3.4	Stammlösungen: Eigenrezepte.....	37
2.8.3.4.01	Prolin-Stammlösung.....	37
2.8.3.4.02	Trehalose-Stammlösung.....	37
2.8.3.4.03	Vitamin-Stammlösung 3.....	38
2.9	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	38
2.9.1	Kultivierungsversuche des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	38
2.9.1.1	Käfer-Homogenisate.....	38
2.9.1.2	Ei-Homogenisate.....	39

2.9.2	Herstellen von Verdünnungsreihen zur Anreicherung des Endosymbionten....	40
2.9.3	Ausstrichverfahren zur Isolierung von Bakterienkolonien.....	41
2.9.4	Bestimmung eines geeigneten Anreicherungsmediums.....	41
2.9.5	Aminopeptidase-Test.....	42
2.9.6	Katalase-Test.....	42
2.9.7	Oxidase-Test.....	43
2.9.8	Äußere Kompartimentierung von <i>Paederus riparius</i> -Weibchen.....	43
2.9.9	Innere Kompartimentierung von <i>Paederus riparius</i> -Weibchen.....	44
2.9.10	Kompartimentierung des weiblichen Geschlechtstrakts.....	46
2.9.11	Mikrotomie (Semi-Dünnschnitt-Technik).....	47
2.9.11.1	Paraffin-Einbettung.....	48
2.9.11.2	UNICRYL-(Kunstharz)-Einbettung.....	49
2.9.11.3	Methylenblau-Färbung.....	50
2.9.12	Isolierung des vermuteten Endosymbionten.....	51
2.9.13	Geißelfärbung nach KODAKA et al.....	52
2.10	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	53
2.10.1	Extraktion von DNA-Material.....	53
2.10.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	53
2.10.2.1	Diagnostische-PCR.....	53
2.10.2.2	16S-PCR.....	54
2.10.2.3	Touch-Down-PCR.....	54
2.10.2.4	PCR-Reaktionsmix.....	55
2.10.2.5	Verwendete PCR-Primer und PCR-Programme.....	56
2.10.3	Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	58
2.10.4	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).....	59
2.10.5	Agarose-Gelelektrophorese (Überprüfung von PCR-Produkten).....	60
2.10.6	DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruch-Methode).....	61
2.10.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	63
2.10.7.1	Sonden-Design.....	63
2.10.7.2	Sonden-Evaluierung.....	64
2.10.7.3	Helfer-Sonde (Kompetitor-Oligonucleotid).....	67
2.10.7.4	Dissoziationskurven der Endosymbionten- und Kompetitor-Sonde.....	67
2.10.7.5	Verwendete Lösungen.....	68
2.10.7.5.01	Natriumphosphat-Stammlösungen.....	69

2.10.7.5.02	3xPhosphate-buffered Saline (3xPBS).....	69
2.10.7.5.03	4% Paraformaldehydlösung (4% PFA).....	69
2.10.7.5.04	1xPBS/96% Ethanol (PBS/EtOH).....	69
2.10.7.5.05	1 M Tris-HCl, pH 8,0.....	69
2.10.7.5.06	5 M NaCl.....	69
2.10.7.5.07	Formamid, deionisiert.....	69
2.10.7.5.08	steriles Wasser.....	69
2.10.7.5.09	10% Natriumdodecylsulfat (10% SDS).....	69
2.10.7.5.10	0,5 M EDTA.....	69
2.10.7.5.11	4',6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI).....	69
2.10.7.5.12	Hybridisierungspuffer.....	69
2.10.7.5.13	Waschpuffer.....	70
2.10.7.5.14	NaCl- und EDTA-Volumina im Waschpuffer.....	70
3.	ERGEBNISSE.....	71
3.1	ENDOSYMBIONTISCHE ANREICHERUNGSMEDIEN.....	71
3.2	IDENTIFIZIERTE BAKTERIEN AUS DEN KULTIVIERUNGS- EXPERIMENTEN.....	73
3.3	ÄUSSERE KOMPARTIMENTIERUNG VON <i>PAEDERUS RIPARIUS</i> - WEIBCHEN.....	76
3.4	INNERE KOMPARTIMENTIERUNG VON <i>PAEDERUS RIPARIUS</i> - WEIBCHEN.....	77
3.5	UNTERSUCHUNG DES WEIBLICHEN GESCHLECHTSTRAKTS.....	78
3.5.1	Kompartimentierung des weiblichen Geschlechtstrakts.....	78
3.5.2	DAPI-Färbung der einzelnen Kompartimente.....	80
3.5.3	Molekulare Untersuchung der einzelnen Kompartimente.....	81
3.6	MIKROTOMIE.....	81
3.6.1	Paraffin-Schnitte.....	81
3.6.2	UNICRYL-Schnitte.....	82
3.6.2.1	Methylenblau-Färbung von vertikalen Schnitten des Abdomens.....	82
3.6.2.2	Methylenblau-Färbung von horizontalen Schnitten des Abdomens.....	84
3.7	FLUORESZENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (FISH).....	86
3.7.1	Sonden-Design.....	86
3.7.2	Sonden-Evaluierung.....	89

3.7.2.1	Dissoziationskurven 1.....	89
3.7.2.2	Dissoziationskurven 2.....	91
3.7.3	Sonden-Sequenzen.....	93
3.7.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) mit UNICRYL-Schnitten.....	94
3.7.4.1	Hybridisierte Querschnitte von <i>Paederus riparius</i> -Abdomina.....	94
3.7.4.2	Hybridisierte Längsschnitte von <i>Paederus riparius</i> -Abdomina.....	98
3.7.4.3	Hybridisierte Dünnschnitte von <i>Paederus riparius</i> -Eiern.....	100
3.8	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON <i>PAEDERUS RIPARIUS</i> -EIERN.....	103
3.9	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES AUSFÜHRGANGS VON <i>PAEDERUS RIPARIUS</i>	106
3.10	MECHANISCHE ISOLIERUNG DES <i>PAEDERUS</i> -ENDOSYMBIONTEN.....	108
3.10.1	Lichtmikroskopische Untersuchung im Phasenkontrast.....	109
3.10.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit Pae444Cy3/cPae444.....	109
3.10.3	Enzym-Tests (Aminopeptidase, Katalase, Oxidase).....	110
3.10.4	Überprüfung der Beweglichkeit.....	111
3.11	DNA-EXTRAKTION VON ENDOSYMBIONTEN-ZELLEN.....	113
3.11.1	Amplifikation der 16S ribosomalen DNA.....	113
3.11.2	Sequenzierung der 16S ribosomalen DNA.....	114
3.11.3	RFLP-Analyse der 16S ribosomalen DNA.....	116
3.11.4	Nachweis von Nitrit- und N ₂ O-Reduktase-Gensequenzen.....	119
4.	DISKUSSION.....	120
4.1	KULTIVIERUNG DES <i>PAEDERUS</i> -ENDOSYMBIONTEN.....	120
4.1.1	Anreicherung des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	120
4.1.2	Nährmedien zur Kultivierung des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	121
4.1.3	Isolierte Mikroorganismen aus <i>Paederus riparius</i> -Weibchen.....	124
4.2	LOKALISIERUNG DES <i>PAEDERUS</i> -ENDOSYMBIONTEN.....	125
4.2.1	Unterbringung des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	126
4.2.2	Weitergabe des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	128
4.2.3	Regulation des endosymbiontischen Wachstums.....	132
4.3	ISOLIERUNG DES <i>PAEDERUS</i> -ENDOSYMBIONTEN.....	136
4.3.1	Bisherige Erkenntnisse zur Physiologie und Phylogenie des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	136

4.3.2	Neue Erkenntnisse zur Physiologie und Phylogenie des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	138
4.3.2.1	Zur Morphologie und Beweglichkeit des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	138
4.3.2.2	Zum Stoffwechsel des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	140
4.3.2.3	Zur Phylogenie des <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	142
4.4	ÖKOLOGISCHE BEDEUTUNG DES POLYKETIDS PEDERIN.....	144
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	146
6.	SUMMARY.....	148
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	150
	ANHANG.....	i
	DANKSAGUNG	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Graphische Darstellung der dekadisch beschriebenen Arten- und Gattungszahlen von Kurzflüglern.....	9
Abb. 2: Zeichnungen von <i>Paederus riparius</i> , <i>Emus hirtus</i> , <i>Ocypus olens</i>	10
Abb. 3: Habitus von <i>Paederus riparius</i>	11
Abb. 4: Stammbaum der Staphylinidae	12
Abb. 5: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kolonie.....	13
Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum, der das Verwandtschaftsverhältnis des <i>Paederus</i> -Endosymbionten zu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> zeigt.....	15
Abb. 7: Chemische Strukturformeln von Pederin, Pseudopederin und Pederon.....	17
Abb. 8: Chemische Strukturformel von Mycalamid A.....	17
Abb. 9: Chemische Strukturformel von Onnamid A.....	17
Abb.10: Chemische Strukturformel des Pederin-Typs.....	18
Abb.11: Chemische Strukturformel des Mycalamid-Typs.....	18
Abb.12: Kartenausschnitt von Nordbayern mit Sammelstellen.....	21
Abb.13 A, B: Männliche und weibliche Abdominalspitze von <i>Paederus riparius</i>	22
Abb.14: Schematische Skizze eines Kurzflüglers mit den zwei bei <i>Paederus riparius</i> durchgeführten Schnittrihen.....	44
Abb.15: Schematische Skizze von <i>Paederus riparius</i> mit Lage der inneren Organe.....	45
Abb.16: Herauspräparierter weiblicher Geschlechtsapparat von <i>Paederus riparius</i>	46
Abb.17: Schematische Darstellung der Sequenzierung nach Sanger.....	62
Abb.18: Verteilung der Proben auf den diagnostischen Objektträgern 1.....	66
Abb.19: Verteilung der Proben auf den diagnostischen Objektträgern 2.....	68
Abb.20: Elektrophoretische Auftrennung des mit KS1F/KS1R amplifizierten 157 Basenpaare langen Teilstücks der <i>ped</i> -Gene.....	72
Abb.21 A, B: BHI-Agar-Platten mit typischem bakteriellen Erscheinungsbild.....	73
Abb.21 C, D: Columbia-Blutagar-Platten, die mit Ei-Homogenisat und Käfer-Homogenisat beimpft wurden.....	74
Abb.22 A-D: Mikroskopierte Bakterien-Isolate.....	75
Abb.23 A, B: Reinkultur von <i>Bacillus</i> sp. auf BHI-Agar und auf BHI-Agar mit Tellurit-Zusatz.....	75
Abb.24: Schematische Skizze eines Kurzflüglers mit den zwei bei <i>Paederus riparius</i> durchgeführten Schnittrihen und das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese.....	76

Abb.25 A: Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate der fünf untersuchten Käfer-Kompartimente.....	77
Abb.25 B: Unbekannte Drüse aus dem Abdominalbereich von weiblichen <i>Paederus riparius</i>	78
Abb.26 A-C: Unbekannte Drüse aus dem Abdominalbereich von weiblichen <i>Paederus riparius</i>	79
Abb.27 A, B: Anhangsdrüse und morphologisch einheitliche Bakterienkolonie im DAPI-Fluoreszenzmodus.....	80
Abb.28: Gelelektrophoretische Auswertung der molekularen Untersuchung der Kompartimente des Geschlechtsapparats.....	81
Abb.29 A: Mit Methylenblau-Lösung angefärbter abdominaler Querschnitt eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens.....	82
Abb.29 B-E: Schnittfolge von mit Methylenblau-Lösung angefärbten abdominalen Querschnitten eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens.....	83
Abb.30 A: Mit Methylenblau-Lösung angefärbter abdominaler Längsschnitt eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens.....	84
Abb.30 B: Schnittfolge von mit Methylenblau-Lösung angefärbten abdominalen Längsschnitten eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens.....	84
Abb.30 C-E: 100-1000-fache Vergrößerung angeschnittener Anhangsdrüsen in einem abdominalen Längsschnitt.....	85
Abb.31: Ausschnitt der von Probe Design vorgeschlagenen potentiellen Zielsequenzen und den entsprechenden Sondensequenzen.....	86
Abb.32: Ausschnitt der mit PROBE MATCH berechneten Spezifität der ausgewählten Sonde gegenüber der Zielsequenz des Endosymbionten von <i>Paederus riparius</i>	87
Abb.33: Verteilung relativer Fluoreszenzintensitäten von Oligonucleotid-Sonden auf einem 16S rRNA-Sekundärstruktur-Model.....	88
Abb.34: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444, EUB338I/II/III und NON338, die mit fixierten Zellen des <i>Paederus</i> -Endosymbionten bestimmt wurden.....	89
Abb.35: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444, EUB338I/II/III und NON338, die mit fixierten Zellen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bestimmt wurden.....	90
Abb.36: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3, cPae444Cy3 und cPae444Cy3/Pae444, die mit fixierten Zellen des <i>Paederus</i> -Endosymbionten bestimmt wurden.....	91

Abb.37: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3, cPae444Cy3 und Pae444Cy3/cPae444, die mit fixierten Zellen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bestimmt wurden.....	92
Abb.38: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3 und cPae444Cy3, die mit fixierten Zellen von <i>Escherichia coli</i> bestimmt wurden.....	93
Abb.39 A: Abdominaler Querschnitt eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens im Cy3-Fluoreszenz-Modus.....	94
Abb.39 B-E: Schnittfolge aus dem Bereich des 5. bis 7. Abdominal-Segments von mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten abdominalen Querschnitten eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens im Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenzmodus.....	95
Abb.39 F, G Schnittfolge aus dem Bereich des 7. und 8. Abdominal-Segments von mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten abdominalen Querschnitten eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens im Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenzmodus.....	96
Abb.40 A: Mit Methylenblau-Lösung angefärbter Bereich des Ausführgangs, in den die beiden Anhangsdrüsen münden.....	96
Abb.40 B-D: Mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierte Dünnschnitte weiblicher <i>Paederus riparius</i> in dem Bereich des Ausführgangs, in den die beiden Anhangsdrüsen münden....	97
Abb.41 A: Abdominaler Längsschnitt eines <i>Paederus riparius</i> -Weibchens im Cy3-Fluoreszenz-Modus.....	98
Abb.41 B-D: Mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierte Längsschnitte weiblicher <i>Paederus riparius</i> im Bereich des 6. Abdominal-Segments bei verschiedenen Vergrößerungen.....	99
Abb.42 A: Ei-Dünnschnitt unter Cy3-Fluoreszenz.....	100
Abb.42 B, C: Schnittfolge, welche die die Eischale bedeckende Schicht mit den Endosymbionten im Cy3-Modus zeigt.....	101
Abb.43: Konfokal-mikroskopische Aufnahme von Ei-Dünnschnitten im Cy3-Modus.....	102
Abb.44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines abgelegten, zwei Tage alten <i>Paederus riparius</i> -Eies.....	103
Abb.45: 500- bzw. 800-fache Vergrößerung eines <i>Paederus riparius</i> -Eies unter dem Rasterelektronenmikroskop.....	104
Abb.46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines aus dem Ovariengang herauspräparierten Eies von <i>Paederus riparius</i>	104
Abb.47 A, B: 500-fache Vergrößerung von zwei <i>Paederus riparius</i> -Eiern unterschiedlicher Entwicklungszeit unter dem Rasterelektronenmikroskop.....	105
Abb.48 A: Mündungsbereich der Anhangsdrüsen unter dem Lichtmikroskop.....	106

Abb.48 B-E: 160- bis 800-fache Vergrößerung horizontal aufpräparierter Ausführungsgänge verschiedener <i>Paederus riparius</i> -Weibchen unter dem Rasterelektronenmikroskop.....	107
Abb.49: Horizontal aufpräparierter Ausführungsgang im Vergleich zur granulösen, die Eischale umgebenden Schicht eines abgelegten Eies bei gleicher Vergrößerung.....	108
Abb.50: 1000-fache Vergrößerung des aus den Anhangsdrüsen von weiblichen <i>Paederus riparius</i> isolierten Endosymbionten im Phasenkontrast.....	109
Abb.51: 1000-fache Vergrößerung des mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten Endosymbionten im Cy3- bzw. DAPI-Modus.....	110
Abb.52: 1000-fache Vergrößerung des nach KODAKA et al. (1982) angefärbten <i>Paederus</i> -Endosymbionten.....	111
Abb.53 A: Negativkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahme des <i>Paederus</i> -Endosymbionten bei 12.000-facher Vergrößerung.....	112
Abb.53 B: Negativkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahme des <i>Paederus</i> -Endosymbionten bei 17.500-facher bzw. 40.000-facher Vergrößerung.....	113
Abb.54: Elektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten 16S-PCR-Amplifikate der beiden isolierten Endosymbiontenkulturen und deren Konzentrationsdiagramme.....	114
Abb.55: Entschlüsselte Basensequenz der 16S rDNA des von <i>Paederus riparius</i> isolierten Endosymbionten.....	115
Abb.56: Entschlüsselte Basensequenz der 16S rDNA des von <i>Paederus sabeus</i> isolierten Endosymbionten.....	115
Abb.57 A: Virtuelle Schnittstellen von Bsh1236I, MboI und RsaI auf der von Kellner veröffentlichten 16S rDNA-Sequenz des Endosymbionten von <i>Paederus riparius</i>	116
Abb.57 B: Mit Bsh1236I virtuell und in vitro erzeugte Schnittmuster der 16S rDNAs der beiden Endosymbionten von <i>Paederus riparius</i> und <i>P. sabeus</i>	117
Abb.57 C, D: Mit MboI bzw. RsaI virtuell und in vitro erzeugte Schnittmuster der 16S rDNAs der beiden Endosymbionten von <i>Paederus riparius</i> und <i>P. sabeus</i>	118
Abb.58: Elektrophoretische Auftrennung amplifizierter potentieller Teilsequenzen der PSnosZ-, nosZ-, nirK- und nirS-Gene.....	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Fluoreszenz-Filtersätze.....	24
Tab. 2: Verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe.....	24
Tab. 3: Reagenzien für die Herstellung des Beizmittels und der Farbstofflösung zur Geißelfärbung nach KODAKA et al.....	52
Tab. 4: Bestandteile eines PCR-Reaktionsansatzes und dafür benötigte Volumina.....	55
Tab. 5: Sequenz, Position und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer.....	56
Tab. 6 A: PCR-Programme zur Durchführung der Diagnostischen-PCR und der 16S-PCR.....	57
Tab. 6 B: PCR-Programme zur Durchführung der Touch-Down-PCR.....	58
Tab. 7: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Erkennungssequenzen auf der DNA.....	59
Tab. 8: Sequenz und Position der verwendeten, mit IRD700/800 markierten Sequenzier- Primer.....	61
Tab. 9: Verwendete Cy3-markierte Gensonden.....	65
Tab.10 A: Molekulare Detektion des <i>Paederus</i> -Endosymbionten in Käfer-Homogenisat/ Ei-Homogenisat in den Flüssigmedien Pepton-Salz-Lösung und Pepton-Salz-Lösung mit Suppline1/2/3.....	71
Tab.10 B: Molekulare Detektion des <i>Paederus</i> -Endosymbionten in Käfer-Homogenisat/ Ei-Homogenisat in den Flüssigmedien BHI-Bouillon, BHI-Bouillon mit Tellurit, Cetri- mid-Bouillon, Malachitgrün-Bouillon, HPG-Nährlösung, Nährbouillon, Glucose- Mineralsalz-Nährlösung und VL 55-Nährlösung.....	72
Tab.11: Prozentuale Ähnlichkeit der 16S rDNA-Sequenzen der Isolate im Vergleich zu veröffentlichten 16S-Sequenzen und der 16S-Sequenz des Endosymbionten.....	74
Tab.12: Sequenz und Bindungsstelle der konstruierten Endosymbionten-Sonde und des Kompetitors.....	93

Abkürzungen

aqua bidest	bidestilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
bp	base pairs (DNA-Basenpaare)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymintriphosphat
ddATP	Didesoxy-Adenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxy-Cytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxy-Guanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxy-Thymintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
etc.	et cetera (und so weiter)
g	Gramm
l	Liter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
„M“	„Marker“ (DNA-Leiter für den Fragmentvergleich bei der Gelelektrophorese)
M	Mol
Mbp	Millionen Basenpaare
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm

µg	Mikrogramm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
16S-rRNA	16S-ribosomale Ribonucleinsäure
s.l.	sensu lato (im weiteren Sinne)
s.str.	sensu stricto (im engeren Sinne)
T	Temperatur
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	α, α, α-Tris(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit (Aktivitätseinheit bei Enzymen)
V	Volt
v. a.	vor allem
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
v. l. n. r.	von links nach rechts
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Übersicht

Insekten gehören zu den erfolgreichsten Tieren auf der Erde. Durch ihre Artenvielfalt - ca. 80% aller Tierarten sind Insekten - übertreffen sie alle übrigen Lebensformen zusammen, nicht zuletzt auch hinsichtlich ihrer Biomasse. Neben fast allen bekannten terrestrischen Ökosystemen findet man sie im Süßwasser ebenso wie in der Luft. Einige wenige der über eine Million bekannten Arten haben es sogar geschafft, sich in marinen Lebensräumen anzusiedeln (CAMPBELL, 2000). Der Schlüssel zu diesem Erfolg könnte neben dem effektiven Bauplan bzw. der variablen Anatomie sein, dass es vielen Insekten gelungen ist, in unterschiedlichster Art und Weise Wechselbeziehungen mit zahlreichen anderen Organismengruppen einzugehen. Vergesellschaftungen mit Pilzen, Protozoen oder Bakterien lassen sich z. B. bei ca. 30% aller Insektenarten finden, was auch schon der Zoologe Paul Buchner (1886-1978) feststellen konnte. Er erkannte früh, dass der überwiegende Teil aller Arthropoden mit endosymbiontischen Mikroorganismen assoziiert ist (DETTNER, 2003). Dabei scheinen bestimmte Insektenarten, wie Käfer (Coleoptera), Hautflügler (Hymenoptera), Schaben (Blattaria) oder Blattläuse (Homoptera), in besonderer Weise zur Ausbildung solcher als Symbiosen bezeichneten Wechselbeziehungen befähigt zu sein (BUCHNER, 1965). Der Begriff Symbiose (vom Griechischen „symbioun“: zusammenleben) wurde 1879 vom deutschen Botaniker Anton de Bary in die Biologie eingeführt. Er sollte die dauerhafte Verbindung zwischen zwei oder mehreren ausdrücklich verschiedenen Lebewesen mindestens während eines Teils ihres Lebenszyklus beschreiben (GIL et al., 2004). Dabei sah de Bary den Parasitismus ausdrücklich als eine Form der Symbiose an, obwohl es sich nach der Meinung der meisten Forscher nur dann um eine echte Symbiose handelt, wenn beide Partner von der Verbindung profitieren. Es ist jedoch nicht immer einfach zu sehen, ob es sich um eine vorteilhafte, neutrale oder schwach aggressive Verbindung handelt. Mittlerweile ist der Begriff der Symbiose mit dem des Mutualismus gleichgestellt und grenzt sich damit deutlich gegenüber dem des neutralen Kommensalismus und dem des aggressiven Parasitismus ab (SCHWEMMLER, 1989).

Die erste jemals beschriebene symbiontische Interaktion zwischen Insekten und Bakterien war die Symbiose von Ameisen mit Enterobakterien (BLOCHMANN, 1892; SAUER et al., 2000). Derartige Gemeinschaften zwischen Eukaryoten und Prokaryoten dienen in erster

Linie der Nahrungsergänzung der Tiere und haben maßgeblich zu dem außergewöhnlichen stammesgeschichtlichen Erfolg dieser großen Organismengruppe beigetragen, indem sie ihnen die Erschließung neuer Nahrungsquellen und ökologischer Nischen ermöglichten. Sie spielen aber auch eine Rolle bei deren Fortpflanzung und Verteidigung. Viele dieser Endosymbionten beherbergenden Insekten nehmen Zeit ihres Lebens schwer abbaubare pflanzliche Substanzen, wie Cellulose oder Pflanzensäfte, aber auch schwer aufzuschließende Substrate, wie z. B. Blut von Wirbeltieren und in Federn oder Haaren enthaltenes Keratin, auf (DETTNER, 2003). Daher finden sich solche Symbiosen hauptsächlich in Insekten, die sich im Laufe der Evolution an diese speziellen Nahrungsquellen angepasst haben, in denen lebensnotwendige Nährstoffe, wie Vitamine (Blut) oder essentielle Aminosäuren (Pflanzensaft), Mangelware sind (BUCHNER, 1965). Die Bedeutung dieser Endosymbionten für ihre Wirtsinsekten ist nur in wenigen Fällen gut erforscht, und auch deren Übertragung auf die Wirtsnachkommen konnte erst vereinzelt aufgeklärt werden. Als herausragende Beispiele hierfür lassen sich die bereits oben genannte Symbiose zwischen *Camponotus*-Ameisen und Bakterien der Gattung *Blochmannia*, Gemeinschaften zwischen Blattläusen und Bakterien der Gattung *Buchnera* sowie Wechselbeziehungen zwischen Tsetse-Fliegen und Bakterien der Gattung *Wigglesworthia* aufführen (ZIENTZ et al., 2004; WERNEGREEN, 2002). Hierbei handelt es sich um streng obligate Symbiosen von intrazellulär lebenden Mikroorganismen, in denen ein Partner ohne den anderen sehr schlecht bzw. nicht leben kann. Diese Endosymbionten bezeichnet man auch als primäre oder P-Symbionten, die zur γ -Unterklasse der Proteobakterien gehören und als nächste Verwandte *Escherichia coli* und ähnliche Enterobacteriaceae haben. Sie kommen in spezialisierten Wirtszellen, den so genannten Myceto- oder Bakteriocyten, vor und werden ausschließlich vertikal auf die Nachkommenschaft übertragen (DOUGLAS, 1998). Diese Symbionten beherbergenden Zellen sind in der Lage, organähnliche Strukturen zu bilden, und sind häufig mit dem Mitteldarm ihrer Wirte assoziiert. Ein extremes Beispiel für eine intrazelluläre Symbiose stellen in Bakteriocyten von Mehlkäfern lebende β -Proteobakterien dar, die ihrerseits wiederum intrazelluläre Bakterien der γ -Unterklasse der Proteobakterien beherbergen (VON DOHLEN et al., 2001).

Daneben gibt es noch die sekundären oder S-Symbionten, die man nicht nur in diesen spezialisierten Zellen findet, sondern auch in Drüsen, im Darmgewebe oder der Hämolymphe (BAUMANN et al., 2000). Auch sie werden gewöhnlich auf maternalem Wege weitergegeben, können aber auch horizontal von Wirt zu Wirt vererbt werden (AKSOY et al., 1997; RUSSELL et al., 2003), was auf eine evolutionär noch sehr junge Verbindung mit ihren

„Gastgebern“ hindeutet. Im Gegensatz zu den P-Symbionten sind die S-Symbionten für das Überleben ihrer Wirte nicht essentiell und können häufig *in vitro* kultiviert werden. Die Bedeutung für ihre Wirte reicht in der Literatur von negativen Effekten, wie eingeschränktes Wachstum und Fortpflanzung, bis hin zu positiven Auswirkungen, wie z. B. Schutz vor Hitzeschäden (CHEN et al., 2000; MONTLLOR et al., 2002) oder Widerstand gegenüber natürlichen Feinden (OLIVER et al., 2003; FERRARI et al., 2004).

Um derartige Beziehungen entschlüsseln zu können, ist es unerlässlich, den Endosymbionten von seinem Insekten-Wirt zu isolieren. Dies kann durch die Verabreichung von geeigneten Antibiotika oder durch die Injektion von bestimmten Enzymen erreicht werden. Den symbiontenfreien Wirt nennt man auch aposymbiontisch. Bei einigen Insekten kann dieser Zustand durch eine bloße Erhöhung der Umgebungstemperatur erreicht werden, wodurch der Symbiont im Wirtsinsekt, welches selbst unversehrt bleibt, abgetötet wird. Haben die Wirte ihre Endosymbionten verloren, sind sie physiologisch meist stark geschädigt, und es zeigt sich generell eine sehr hohe Mortalität. In den meisten Fällen kann diese Schädigung durch die Verabreichung von bestimmten Supplementen, wie Vitaminen, Aminosäuren oder Steroiden, welche die Nahrung der aposymbiontischen Wirte komplettieren, aufgehoben werden. Hieraus ergibt sich der Schluss, dass die Symbionten ihren Wirtsinsekten Ergänzungsstoffe liefern, um deren einseitige Nahrung auszugleichen, was die große Bedeutung der Endosymbionten für ihre Wirte in stoffwechselphysiologischer Hinsicht offenbart. Auch andere Stoffe, wie z. B. Semiochemikalien (zwischen Organismen wirkende Botenstoffe) oder Antibiotika, können von den Symbionten bereitgestellt werden. Dabei zeigt sich, dass das Vorhandensein von bestimmten Mikroorganismen für manche Insekten-Wirte sogar von Nachteil sein kann, wenn diese aus dem Nahrungssubstrat ihrer Wirte bestimmte flüchtige Stoffwechselprodukte herstellen, die als so genannte Kairomone Prädatoren anlocken können (DETTNER, 2003).

Untersuchungen von obligaten Endosymbiosen mit Insekten waren in der Vergangenheit für intensive experimentelle Analysen nahezu unmöglich. Erst durch das Aufkommen moderner biochemischer und molekulargenetischer Methoden konnten in den letzten Jahren neue Wege beschritten werden, die faszinierende Einblicke in diese noch fremde Welt mit ihren zahllosen Lebensgemeinschaften ermöglichen.

Neben den zahlreichen fakultativ symbiontischen Mikroorganismen aus diesen Insekten, die sich zu einem großen Teil auf künstlichen Nährmedien kultivieren lassen, steigt kontinuierlich die Zahl derer, die erst mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden entdeckt und phylogenetisch eingeordnet werden konnten und die sich nur sehr schlecht bzw. nicht

kultivieren lassen. Man geht davon aus, dass alle bisher beschriebenen Bakterienarten, welche mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden isoliert werden konnten, nur die Spitze des Eisberges darstellen. Untersuchungen zufolge sind weit weniger als 1% der vermuteten Gesamtartenzahl der Bakterien, die auf eine Million geschätzt wird (PRAKTIKUMSSKRIPT ÖKOLOGISCHE MIKROBIOLOGIE, 2004), beschrieben.

Einer dieser nicht kultivierbaren Vertreter ist ein vor wenigen Jahren in Kurzflüglern der Gattung *Paederus* s. l. (s. l.: Untergattungen *Paederus* und *Paederidus*) molekularbiologisch nachgewiesenes gramnegatives Bakterium, dessen nächster Verwandter das γ -Proteobakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist (KELLNER, 2001). Man weiß von der Bakterienfamilie der Pseudomonaden, dass sie sehr häufig als Endosymbionten in vielen verschiedenen Arten von Insekten anzutreffen ist (KAPATRAL et al., 2000). Dieses auch als *Paederus*-Endosymbiont oder „*Pseudomonas paederii*“ klassifizierte Bakterium kommt ausschließlich in weiblichen *Paederus*-Käfern vor, die in ihrer Hämolymphe und verschiedenen Kompartimenten das toxische Amid Pederin enthalten. Diese Weibchen werden als „+“-Weibchen bezeichnet und sind in der Lage, Pederin fortwährend selbst zu synthetisieren. Es kommt bei ihnen in einer maximalen Konzentration von bis zu 20 $\mu\text{g}/\text{Tier}$ vor (KELLNER, 1994). In allen männlichen und einem bestimmten Prozentsatz weiblicher Käfer lässt sich Pederin jedoch nur in verschwindend geringen Konzentrationen finden. Diese ca. 10% der Weibchen werden auch als „-“-Weibchen bezeichnet. Sie sind nicht wie die zur Pederin-Synthese befähigten „+“-Weibchen in der Lage, den Giftstoff kontinuierlich über die Eier an ihre Nachkommenschaft weiterzugeben. Bei den Larven dient der Naturstoff in erster Linie dazu, diese vor Prädatoren, wie Spinnen, zu schützen (KELLNER, 2000). Generell entfaltet Pederin eine cytotoxische Wirkung und besitzt Antitumoraktivität, was auf eine Blockierung der Proteinbiosynthese am Ribosom und eine Hemmung der Mitose (PAVAN, 1982) zurückzuführen ist. Diese beiden Aspekte machen das Pederin für die medizinische Forschung zu einem äußerst interessanten Untersuchungsobjekt.

Das Toxin Pederin galt über 30 Jahre lang als einzigartig in der Natur, da es bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich aus terrestrischen Käfern der Gattung *Paederus* s. l. isoliert werden konnte. Erst ab dem Jahr 1988 wurden aus marinen Schwämmen Stoffe mit analogem Bau und ähnlicher Wirkweise extrahiert (PERRY et al., 1988; SAKEMI et al., 1988). Es wurde schon lange vermutet, dass die wahren Wirkstoffproduzenten medizinisch interessanter Naturstoffe, wie komplexer Polyketide (DETTNER, 1993) oder nichtribosomaler Peptide, die typischerweise aus Mikroorganismen isoliert werden, meist nicht die Tiere selbst, sondern speziell angepasste, mit ihnen in Symbiose lebende Bakterien sind (PIEL, 2004). Diese

Annahme konnte damit bestärkt werden, dass zum einen viele der bis heute entdeckten Naturstoffe bakteriellen Stoffwechselprodukten sehr ähnlich sind und zum anderen identische bzw. fast identische Naturstoffe in nicht annähernd miteinander verwandten Tiergruppen gefunden werden, die allesamt bakteriellen Ursprungs sind (z. B. Tetrodotoxin).

Ob nun bestimmte Bakterien für die Synthese des Pederins verantwortlich sein könnten, versuchte man im Falle der *Paederus*-Käfer mit Hilfe spezieller Fütterungsversuche aufzuklären. Dabei wurden Larven, die von „-“-Weibchen stammten mit Eiern von „+“-Weibchen gefüttert. Diese Larven waren dann als adulte Weibchen in der Lage, Pederin in großen Mengen kontinuierlich zu produzieren. Die spätere Produktionsfähigkeit von Pederin blieb jedoch aus, wenn die Eier der „+“-Weibchen vorher äußerlich mit bestimmten Antibiotika oder mit Hitze oder Kälte behandelt wurden (KELLNER, 2001). Durch diese Beobachtungen wurde die ursprüngliche Annahme, dass die weiblichen Käfer selbst für die Synthese dieses Stoffes verantwortlich sind, praktisch widerlegt. Gleichzeitig unterstützten sie die Vermutung, dass es sich bei dem eigentlichen Produzenten des Polyketids Pederin um ein noch nicht identifiziertes, endosymbiontisch in den Käfern lebendes Bakterium handeln musste.

Den entscheidenden Beweis für das tatsächliche Vorhandensein dieses bis dato unbekanntes bakteriellen Pederin-Produzenten lieferten Untersuchungen der aus „+“-Weibchen isolierten DNA. Dabei wurde nach bestimmten Polyketidsynthese-Genen (PKS-Gene) gesucht, welche für die Synthese des Pederins verantwortlich sein könnten und demzufolge auch nur in den zur Naturstoffsynthese befähigten Individuen vorkommen sollten. Ein Genombereich aus acht Genen (*ped*-Cluster), der ausschließlich in den „+“-Weibchen gefunden wurde und der sich auf einer ca. 72 kb großen, so genannten „genomischen“ oder „Symbiose-Insel“ befand, konnte schließlich mittels Sequenzierung entschlüsselt und als Pederinsynthese-Maschinerie identifiziert werden (PIEL, 2002). Weitere Untersuchungen dieses Genombereichs und angrenzender Abschnitte zeigten schließlich auch, dass die Pederin-Gene nicht aus dem Genom des Käfers stammen konnten, sondern bakteriellen Ursprungs waren und - bis auf jene - denen des opportunistischen Pathogens *Pseudomonas aeruginosa* täuschend ähnelten. Eine weitere Analyse der Gendaten ergab, dass die *ped*-Region beiderseits von Transposase-Pseudogenen begrenzt wird, was auf deren Insertion ins endosymbiontische Genom während eines Transpositionereignisses hindeutet. Dies bedeutet, dass die PKS-Gene mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch horizontalen Gentransfer von einem anderen Bakterium in einen frei lebenden Vorfahren des *Paederus*-Endosymbionten übertragen worden sind. Derartige DNA-Bereiche können in bezeichnender

Weise die Stoffwechsel- und Besiedlungsfähigkeiten der Bakterien verstärken und erlauben eine bakterielle Evolution in Quantensprüngen (PIEL et al., 2004).

Das Vorhandensein eines höchst mobilen genomischen Elements, welches symbiose-relevante Gene enthält, könnte erklären, warum Pederin ähnliche Metabolite weit verbreitet aus nicht miteinander verwandten Tieren isoliert werden konnten, die in den unterschiedlichsten Umgebungen leben. Diese „beweglichen symbiontischen Inseln“ könnten durch die Infektion mit Phagen oder durch andere Mechanismen zwischen verschiedenen Bakterien übertragen worden sein und sie zu symbiontisch kompetenten Bakterien gemacht haben. Im Falle des *Paederus*-Endosymbionten hat eine derartige „Symbiose-Insel“ ihre Mobilitätsrolle offensichtlich aufgrund des Verlustes bestimmter Gene eingebüßt und scheint nun ein fester Bestandteil des symbiontischen Genoms zu sein. Ebenso konnten diese „stabilisierten Inseln“ bei mehreren Pathogenen beobachtet werden. Es wird angenommen, dass sie das Ergebnis eines adaptiven Vorgangs sind, während dessen die „Insel“ nicht essentielle Gene beseitigt, um schließlich ein fester Bestandteil des Kern-Genoms zu werden (HACKER & KAPER, 2000). Bis auf das *ped*-Cluster und ein *ter*-Cluster (siehe unten) weist der Abbau fast aller „Insel-Gene“ im *Paederus*-Symbionten auf einen ähnlichen Mechanismus hin. Der Erwerb der auf dieser „Insel“ sitzenden PKS-Gene könnte ein wichtiger Schlüsselschritt in der Evolution dieses ungewöhnlichen Mutualismus zwischen Kurzflügelkäfern der Gattung *Paederus* s. l. und dem Pederin produzierenden, *Pseudomonas* ähnlichen Bakterium gewesen sein (PIEL et al., 2004; PIEL, 2005). Das Vorkommen von Pederin ausschließlich bei der Gattung *Paederus* s. l. zeigt, dass diese Naturstoff-Symbiose wesentlich jünger ist als die eingangs schon erwähnte, familiendeckende Wechselbeziehung zwischen *Buchnera*-Bakterien und Blattläusen, die sich offenbar vor über 200 Millionen Jahren gebildet hat und in deren Verlauf sich eine drastische Reduktion des Symbiontengenoms aufgrund der intrazellulären Lebensweise vollzogen hat (BAUMANN et al., 1995). P-Symbionten, die eine sehr alte Verbindung mit ihren Wirten pflegen, charakterisieren sich in der Regel durch ein kleines Genom und einen G+C-Gehalt von weniger als 30%. P-Symbionten hingegen, die eine sehr junge Verbindung mit ihren Wirten pflegen (und auch S-Symbionten), zeichnen sich durch intermediäre Genomgrößen und G+C Prozentsätze bezüglich älterer P-Symbionten und frei lebender Verwandter aus (HEDDI et al., 1998; DALE & MAUDLIN, 1999; MOYA et al., 2002).

Dass es sich bei der Pederin-Symbiose um eine neuere Entstehung handelt, spiegelt sich in der Tatsache wider, dass diese Beziehung eher unbeständig und nicht obligat ist, da ungefähr 10% der *Paederus*-Weibchen in der Natur symbiontenfrei sind (KELLNER & DETTNER,

1995; KELLNER, 1999). Ein Vergleich der Genomgrößen des *Buchnera*- und des *Paederus*-Endosymbionten mit denen ihrer frei lebenden nächsten Verwandten, *Escherichia coli* (4,6 Mbp) (BLATTNER et al., 1997) bzw. *Pseudomonas aeruginosa* (6,3 Mbp) (STOVER et al. 2000), bestätigt dies zusätzlich. Dabei zeigt sich, dass das *Buchnera*-Genom mit ca. 640 kb siebenmal kleiner ist als das von *E. coli* (SHIGENOBU et al., 2000; TAMAS et al., 2002; VAN HAM et al., 2003), jedoch das *Paederus*-Endosymbiont-Genom mit ca. 4-5 Mbp (PIEL, schriftl. Mitt.) nur ca. eineinhalbmals kleiner ist als das von *P. aeruginosa*. Auch der für den *Paederus*-Endosymbionten relativ hohe G+C-Gehalt von ca. 55% (PIEL, schriftl. Mitt.) im Gegensatz zu dem sehr geringen G+C Prozentsatz von ca. 26% bei *Buchnera* (SHIGENOBU et al., 2000; TAMAS et al., 2002; VAN HAM et al., 2003) zeigt, dass es sich bei der Pederin-Symbiose um eine sehr junge Beziehung handelt, die bei den Käfern wahrscheinlich erst innerhalb des Tribus entstanden ist. Wendet man darauf die „molecular clock-Hypothese“ an, lässt sich eine Aufspaltung des Symbionten bei der Gattung *Paederus* s. l. berechnen, die vor ca. 16,5 Millionen Jahren stattgefunden hat (PIEL, schriftl. Mitt.). Diese Hypothese wird in der Genetik benutzt, um den Zeitpunkt der Aufspaltung zweier Arten von einem gemeinsamen Vorfahren zu bestimmen und die Evolutionsdauer abzuschätzen.

Neben den *ped*-Synthesegenen enthüllte die Sequenzierung der „Symbiose-Insel“ das Vorhandensein einer zweiten, ebenfalls nicht in *Pseudomonas aeruginosa* vorkommenden Region. Dabei handelt es sich um ein funktionsfähiges Tellurit-Resistenz-Operon (*ter*-Cluster) (PIEL et al., 2004). Beispiele für eine derartige Resistenz gegenüber dem toxischen Schwermetall Tellur sind für eine Vielzahl von Pathogenen bekannt, und man nutzt diese Eigenschaft, um pathogene Bakterien selektiv zu isolieren (TAYLOR, 1999). Obwohl bis heute fast nichts über die eigentliche Rolle bekannt ist, die diese Resistenz-Gene bei der bakteriellen Fitness spielen, konnte gezeigt werden, dass *ter*-Cluster auch Resistenz gegen Bakteriophagen und Bakteriocine (antibakterielle Proteine) verleihen können (WHELAN et al., 1995). Zudem wird angenommen, dass diese Cluster die Zelle vor Verteidigungsreaktionen ihrer Wirte mittels eines unspezifischen Mechanismus schützen. Die sequenzierte *ter*-Region des *Paederus*-Endosymbionten könnte dessen Überleben in ähnlicher Art und Weise fördern.

Obwohl viele endosymbiontische Bakterien eine drastische Reduktion ihres Genoms erfahren haben, kodieren einige konservierte Gene für essentielle endosymbiontische Faktoren, von denen man annimmt, dass sie in pathogenen Bakterien virulenzassoziiert auftreten (GOEBEL & GROSS, 2001). Diese für bestimmte Virulenzfaktoren kodierenden Gene befinden sich bei vielen pathogenen Bakterien auf so genannten „Pathogenitäts-Inseln“,

die in der gleichen Weise wie das *ped*-Cluster bei den *Paederus*-Symbionten durch horizontalen Gentransfer erworben wurden. Es scheint, dass mutualistische Endosymbionten aus parasitären Bakterien als abgeschwächte Pathogene hervorgegangen sind und umgekehrt. Diese Annahmen werden durch phylogenetische und vergleichende genomische Analysen gestützt (EWALD, 1987). In einem bestimmten Stadium der Wechselbeziehung wurden manche dieser Virulenzfaktoren sogar nützlich bzw. unverzichtbar für die Verbindung, und aus den ehemals schädigenden Bakterien entstanden höchst nützliche Mitbewohner. Sie verschafften ihren Wirten durch die Produktion zusätzlicher Stoffe, so genannter sekundärer Metabolite, einen enormen Fitnessvorteil.

Dies zeigt sich besonders am Beispiel der Pederin-Familie, die hinsichtlich ihres Vorkommens in rezenten Spezies derzeit 36 Mitglieder aus acht verschiedenen Tiergattungen umfasst (NARQUIZIAN & KOCIENSKI, 2000; SIMPSON et al. 2000; VUONG et al., 2001; PAUL et al., 2002) und mit dem Polyketid Pederin und dessen Derivat Pseudopederin und Pederon den einzigen terrestrischen Vertreter aus Käfern der Gattung *Paederus* s. l. stellt. Alle übrigen Mitglieder dieser interessanten Naturstoff-Familie konnten bislang ausschließlich aus marinen Lebensräumen isoliert werden.

Die schon erwähnte cytotoxische Wirkung und Antitumoraktivität von Pederin und dessen marinen Verwandten ist in der medizinischen Forschung wohlbekannt. Viele dieser pharmakologisch aktiven Stoffe gelten als potentielle Medikamente der Zukunft im Kampf gegen Krebs und Infektionskrankheiten. Sie lassen sich jedoch nur sehr selten in größeren Mengen gewinnen, da bis heute noch nicht ein einziges dieser Naturstoff produzierenden Bakterien erfolgreich von seinem Wirt isoliert und kultiviert werden konnte. Eine Produktion dieser viel versprechenden Arzneimittel-Kandidaten in ökologisch nachhaltiger Weise und theoretisch unbegrenzter Menge ist daher noch nicht möglich. Deshalb ist es von immenser Bedeutung, sich diesen komplexen symbiontischen Systemen mit molekularen Methoden zu nähern, um so deren Funktion und biologische Bedeutung entschlüsseln zu können. Die Entwicklung exakt abgestimmter bakterieller Kultivierungssysteme oder die heterologe Expression symbiontischer Biosynthesegene in kompetenten, leicht zu kultivierenden Bakterien könnte letztlich zu einer Lösung des momentan noch bestehenden Versorgungsproblems mit fast allen dieser Arzneimittel-Kandidaten führen.

Mit dem Pederin produzierenden Endosymbionten ist man diesem Ziel ein gutes Stück näher gekommen. Der Produzent des pharmakologisch aktiven Naturstoffes ist der erste Vertreter einer mutualistischen Insekt-Bakterium-Beziehung, bei dem es gelungen ist, dessen

vermutete Biosynthesegene erfolgreich zu klonieren und für den zur weiteren Forschung in naher Zukunft umfangreiche genetische Daten zur Verfügung stehen (PIEL, 2004).

1.2 Die Familie der Staphylinidae: eine Kurzübersicht

Als der schwedische Wissenschaftler Carl Nilsson Linnaeus (Carl von Linné) 1758 die Beschreibung der ersten 19 Staphyliniden-Arten veröffentlichte, war ihm sicherlich nicht bewusst, dass die Erforschung dieser Käfer-Familie fast 250 Jahre später zur Beschreibung von weit über 47000 Arten führen sollte (THAYER, 2005).

Die folgende Abbildung (**Abb. 1**) zeigt dekadisch, wie sich die Beschreibung der Staphyliniden-Gattungs- und -Artenzahlen weltweit von den Anfängen Carl von Linnés bis in die heutige Zeit explosionsartig entwickelt hat, und man geht davon aus, dass mehr als 75% aller tropischen Arten noch nicht beschrieben sind (FRANK & THOMAS, 2005).

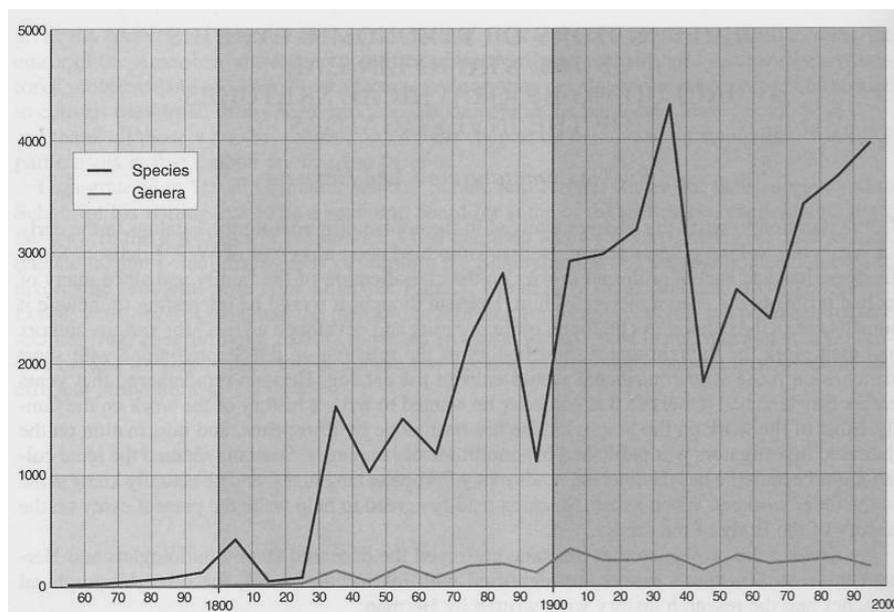


Abb. 1: Graphische Darstellung der dekadisch beschriebenen Arten- und Gattungszahlen von Kurzflüglern zwischen 1758 und 1999 (nach HERMAN, 2001).

Die Staphylinidae (Coleoptera) gehören zur Unterordnung der polyphagen Käfer. Sie stellen bei uns in Mitteleuropa mit ihren fast 2000 beschriebenen Arten die artenreichste

Käferfamilie dar (FREUDE et al., 1964). Man kann sie leicht an ihren stark verkürzten Flügeldecken, den Elytren, erkennen (siehe **Abb. 2** und **3**).

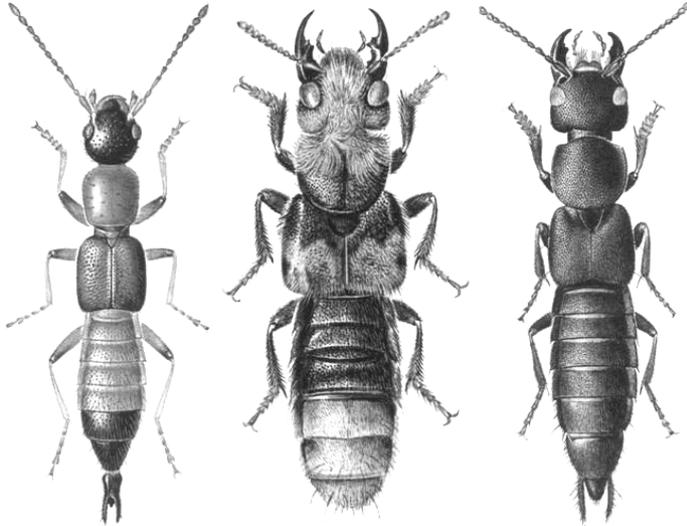


Abb. 2: v. l. n. r.: *Paederus riparius*, *Emus hirtus*, *Ocypus olens* (nach HARDE & SEVERA, 2006).

Diese lassen den größten Teil des Hinterleibs unbedeckt, mindestens jedoch 4-5 Tergite. Damit haben die Vertreter dieser Familie letztlich das wieder aufgegeben, was den evolutiven Fortschritt der Käfer allgemein stark begünstigt hat, nämlich die zu Elytren umgebildeten Vorderflügel, die in Verbindung mit der übrigen starken Panzerung des Körpers den Käfern einen sehr guten Schutz, insbesondere des Abdomens, lieferten. Dieser Umstand macht die meisten Kurzflügler stärker anfällig gegenüber Angriffen durch Räuber (aber auch gegenüber Austrocknung) als ihre übrige Käferverwandtschaft. Es ist daher nicht verwunderlich, dass man Staphyliniden in fast allen feuchten Gegenden auf der Erde finden kann. Mit ihrem beweglichen Abdomen können sie in Lückensystemen aller Art vorkommen. Das sind Kleinstlebensräume, die sich z. B. unter Baumrinde, in Pilzen oder auch zwischen Bodenpartikeln finden (DETTNER, 1991); aber auch Dung und Aas gehören zu ihren Lebensräumen. Ihre Verbreitung in Trockengebieten ist dabei auf feuchte Mikrohabitate begrenzt. Einige Arten kommen ausschließlich an den Küsten der Ozeane vor, obwohl es dort bei Flut zu Überschwemmungen kommen kann. Andere haben sich an ein Leben als Mitbewohner in Ameisen- oder Termitenkolonien angepasst, und einige Arten leben sogar in den Nestern von Säugetieren, um dort Floh- und Fliegenlarven jagen zu können (ARNETT & THOMAS, 2001).

Als Räuber von Insekten und verschiedenen anderen Invertebraten gehen Kurzflügler im Boden, unter Steinen und zwischen abgestorbenem Pflanzenmaterial dem Beutejagen nach.

Um sich zwischen den Bodenpartikeln gut bewegen zu können, haben diese Insekten einen lang gestreckten Habitus - 0,5 mm (einige Aleocharinae und Pselaphine) bis 50 mm (einige Staphylininae) lang; die meisten sind 2-8 mm lang (THAYER, 2005) - mit stark verkürzten Flügeldecken entwickelt. Diese Kurzelytrigkeit brachte neben der Gefahr einer schnellen Austrocknung den weiteren Nachteil eines völlig ungeschützten Abdomens gegenüber potentiellen Fressfeinden mit sich. Deshalb entwickelten viele Arten unabhängig voneinander Wehrdrüsen (ARAUJO, 1978; DETTNER, 1983, 1993; FRANK & KANAMITSU, 1987). Bei Vertretern der Kurzflügler-Gattung *Paederus* s. l. (Unterfamilie Paederinae; Coleoptera) (siehe **Abb. 3**) konnten derartige Pygidialdrüsen nicht nachgewiesen werden.



Abb. 3: Habitus von *Paederus riparius* (nach O. Borosnowa; <http://photo.bov.com.ru>).

Es wurde allerdings eine abdominale Komplexdrüse beschrieben (HERMAN, 1981), die andere Vertreter der Staphylinidae nicht besitzen (DETTNER, 1993). Die biologische Bedeutung dieser Drüse für die Käfer liegt höchstwahrscheinlich in der Speicherung und Externalisierung des toxischen Amids Pederin begründet, welches den Tieren zur chemischen Abwehr von Prädatoren (hauptsächlich Spinnen) dient (GREBE, 2007; siehe auch **1.4**).

Innerhalb der weltweit mehr als 47000 Staphyliniden-Arten sind die Paederinae als eine der insgesamt 31 Unterfamilien mit 225 Gattungen vertreten, die sich aus 5962 Arten zusammensetzen (HERMAN, 2001). Eine dieser 225 Gattungen ist die Gattung *Paederus* s. l., von der es weltweit mehr als 600 beschriebene Arten gibt (FRANK, 1988). Die meisten dieser Spezies leben bevorzugt an sandigen Ufern und sind im Durchschnitt 7-13 mm lang. Kopf und Abdominalspitze sind typischerweise schwarz, Thorax und Abdominalbasis orange, und sie besitzen blau- bis grünmetallische Elytren. Einige Arten sind ganz schwarz mit metallisch glänzenden Elytren, andere sind komplett orange gefärbt (FRANK & KANAMITSU, 1987).

Der in **Abb. 4** dargestellte Stammbaum aller 31 Unterfamilien zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Staphylinidae und die Stellung der Paederinae als Schwestergruppe der Staphylininae mit ihren knapp 6000 Arten weltweit.

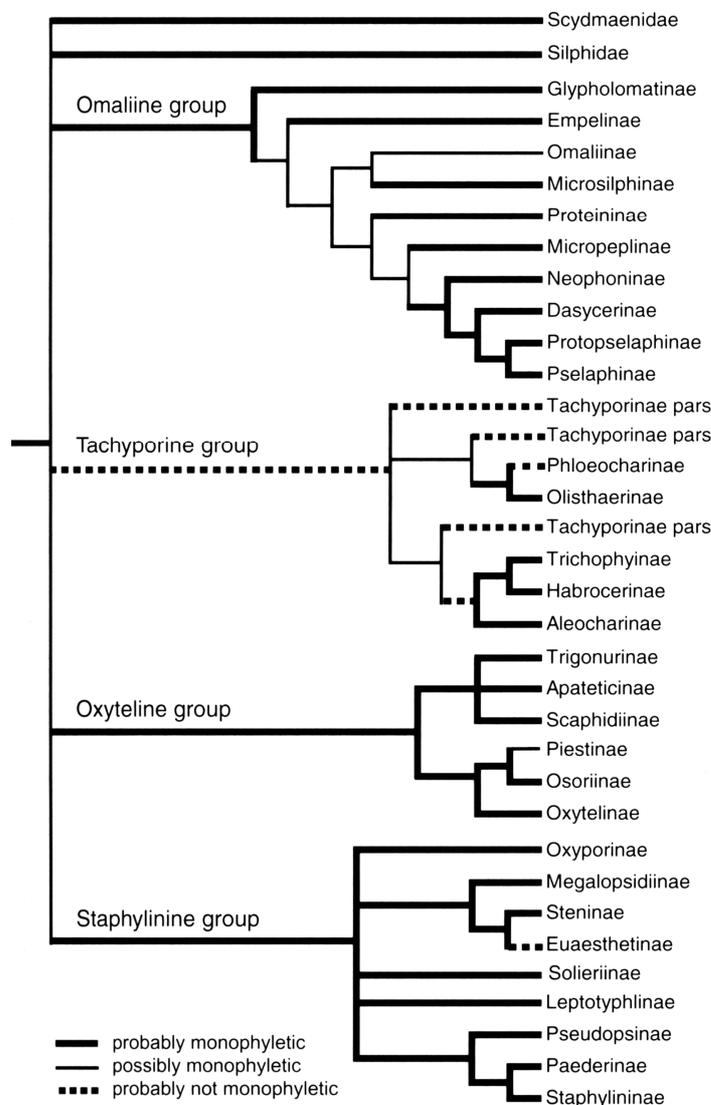


Abb. 4: Staphyliniden-Stammbaum: nach LAWRENCE & NEWTON (1982, 1995), ASHE & NEWTON (1993), WELCH (1993), NEWTON & THAYER (1995), HANSEN (1997a).

1.3 Der *Pseudomonas* ähnliche *Paederus*-Endosymbiont

Pseudomonaden sind ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die in Umgebungen, wie Wasser, Boden, Pflanzen, Menschen, Tieren, Krankenhäusern oder Insekten, gefunden werden können (KAPATRAL et al., 2000). Sie gehören alle zum Reich der Proteobakterien (MADIGAN et al., 2002). Pseudomonaden haben sehr einfache Nährstoffanforderungen und besitzen die bemerkenswerte Eigenschaft, verschiedenste organische Verbindungen für ihre

Energiegewinnung zu nutzen. Sie wachsen bei neutralen pH-Werten und bei Temperaturen im mesophilen Bereich (mittleres Temperaturoptimum), der sich von ca. 5°C im Minimum bis ca. 50°C im Maximum erstrecken kann. Pseudomonaden sind gramnegative, polar begeißelte (einzelne oder multiple Geißeln) Stäbchen, die ca. 1-5 µm lang, ca. 0,5-1 µm breit und sehr beweglich sind (KAPATRAL et al., 2000) und keine Dauerstadien (Sporen) bilden. Sie besitzen einen respiratorischen Stoffwechsel und sind daher obligat aerob. Wenige *Pseudomonas*-Spezies sind in der Lage, unter Sauerstoffausschluss (anaerob) zu wachsen. Dabei verwenden einige von ihnen anaerob Nitrat als Elektronenakzeptor, andere Arginin anaerob als Energiequelle (MADIGAN et al., 2002).

Manche Pseudomonaden produzieren wasserlösliche Pigmente, die blau-grün fluoreszieren, wenn sie ultravioletter Strahlung ausgesetzt werden (KAPATRAL et al., 2000). Aus dieser fluoreszierenden Gruppe stammt auch die pathogene Art *Pseudomonas aeruginosa* (siehe **Abb. 5**). Dieses Bakterium gehört zur fluoreszierenden γ -Untergruppe der Proteobakterien.

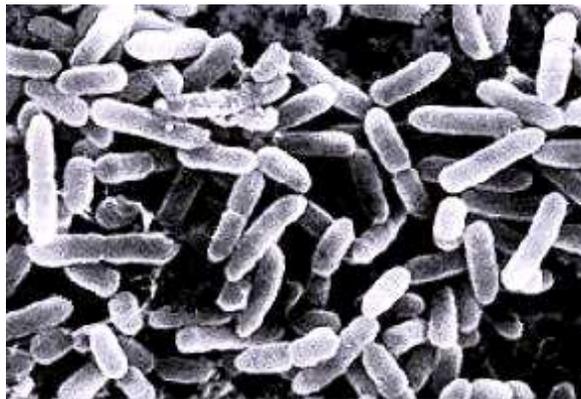


Abb. 5: *Pseudomonas aeruginosa*-Kolonie; nach James A. Sullivan; <http://www.cellsalive.com/cover3.htm>.

Pseudomonas aeruginosa ist kein obligat pathogenes Bakterium, sondern scheint vielmehr opportunistisch veranlagt zu sein. Es kommt neben Umgebungen, wie im Wasser, im Boden oder der Vegetation, auch in der Krankenhausumwelt vor und kann dort schwere Infektionen bei Personen auslösen, deren Immunabwehr durch bestehende Krankheiten, wie Mukoviszidose (cystische Fibrose), oder infolge von Operationen (Intensivpatienten) geschwächt ist (GOVAN & DERETIC, 1996). Zudem kann *Pseudomonas aeruginosa* auch schwere Infektionen in Insekten- (JANDER et al., 2000), Nematoden- (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999) und Pflanzenwirten (RAHME et al., 1995; SILO-SUH et al., 2002) verursachen. Die Kompetenz von *P. aeruginosa*, die verschiedenartigsten, teilweise tödlichen Infektionen

zu verursachen, liegt in einem Arsenal an Virulenzfaktoren und zahlreichen Verteidigungsmechanismen begründet. Die Virulenz dieses Bakteriums ist abhängig von einer großen Anzahl von zellassozierten und extrazellulären Faktoren. Deren Expression wird durch so genannte „quorum sensing“-Systeme (cell-to-cell signaling systems) gesteuert und erlaubt so eine koordinierte, zelldichte-abhängige Produktion dieser Faktoren (PASSADOR & IGLEWSKI, 1995). Wie viele andere Bakterien ist auch *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage, eine extrazelluläre polymere Matrix, einen so genannten Biofilm, zu produzieren (COSTERTON et al., 1995), der es in der Natur vor feindlichen Umweltbedingungen schützen soll (COSTERTON & STEWART, 2000). *P. aeruginosa*-Zellen, die in einen Biofilm eingebettet sind, zeigen eine charakteristisch höhere Resistenz gegenüber der Immunantwort ihres Wirtes und antimikrobiellen Behandlungen als „biofilmfreie“ Zellen (COSTERTON et al., 1999; SINGH et al., 2000; DRENKARD & AUSUBEL, 2002).

Das Pathogen ist natürlicherweise gegenüber vielen Antibiotika resistent. Diese medizinisch relevante Eigenschaft verleiht ihm ein Plasmid, das mehrere Gene zur Detoxikation dieser Antibiotika trägt (MADIGAN et al., 2002). Auf diesem Plasmid befinden sich zudem Gene, die für eine Schwermetall-Resistenz (Quecksilber) kodieren.

Ein ähnliches Resistenz-Gen gegen ein bestimmtes Schwermetall findet sich direkt neben einer „Symbiose-Insel“ (PIEL et al., 2004) des mit *Pseudomonas aeruginosa* sehr nahe verwandten, aber noch nicht kultivierbaren *Paederus*-Endosymbionten (siehe auch 1.1). Die Resistenz richtet sich hierbei gegen das Metall Tellur, welches z. B. in der Salzverbindung Kaliumtellurit (K_2TeO_3) enthalten ist. Diese Eigenschaft könnte für eine mögliche Selektivierung auf einem K_2TeO_3 -haltigen Medium ausgenutzt werden. Die genaue Funktion dieser als *ter*-Gene (PIEL et al., 2004) bezeichneten Resistenz-Gene ist noch nicht genau geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die Resistenz gegen diese giftigen Salzverbindungen nur eine sekundäre Eigenschaft darstellt, da Tellurit-Salze in der Natur sehr selten sind (TAYLOR, 1999). Um die Funktionalität des *ter*-Clusters zu überprüfen, wurde dieses mit Hilfe eines Vektors in *Escherichia coli* transformiert. Die erhaltenen bakteriellen Klone wurden anschließend auf einem K_2TeO_3 -haltigen Medium (500 $\mu\text{g/ml}$) ausgebracht. Klone, die den Vektor mit den *ter*-Genen enthielten, wurden resistent und konnten auf dem Schwermetall-Medium wachsen. Die Bakterienkolonien sind dabei schwarz, was auf eine intrazelluläre Kristallbildung elementaren Tellurs zurückzuführen ist (TAYLOR, 1999). Kontroll-Klone, die nur den leeren Vektor enthielten, waren nicht in der Lage, auf diesen Tellurit-Medien zu wachsen. Damit war zwar die Funktionalität dieser *ter*-Gene bestätigt, jedoch nicht, ob eine Expression durch den Endosymbionten selbst erfolgt.

Wie ließ sich der unbekannte, nicht kultivierbare Endosymbiont nun phylogenetisch einordnen? Der Abgleich der von KELLNER (2001) entschlüsselten endosymbiontischen 16S rDNA-Sequenz mit verschiedenen Datenbanken ergab das unten als Stammbaum aufgeführte Verwandtschaftsverhältnis des *Paederus*-Endosymbionten (siehe **Abb. 6**). Eine sehr nahe Verwandtschaft zu *Pseudomonas aeruginosa* geht daraus deutlich hervor.

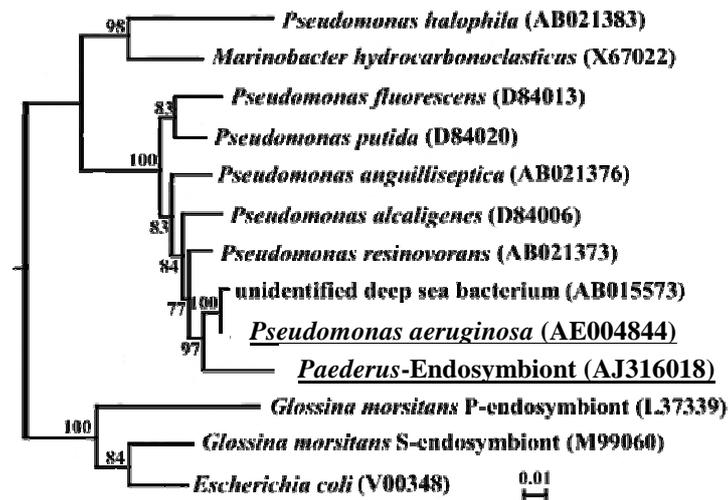


Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum, in den der *Paederus*-Endosymbiont sowie mit ihm verwandte Spezies anhand ihrer 16S rDNA-Sequenzen eingegliedert wurden (verändert nach KELLNER, 2001).

Um ein Vorhandensein des *Paederus*-Symbionten auf molekularer Ebene eindeutig beweisen zu können, wurden spezifische PCR-Primer konstruiert. Diese Oligonucleotide, KS1F/KS1R (PIEL, 2002), sind komplementär zu einer einzigartigen Basensequenz des entschlüsselten Pederinsynthese-Clusters und dienen der Amplifizierung eines exakt 157 Basenpaare langen Abschnitts. Dessen Nachweis mittels Gelelektrophorese detektiert den Endosymbionten eindeutig.

1.4 Der Naturstoff Pederin

Die toxische Wirkung des aus *Paederus*-Käfern stammenden Naturstoffs Pederin war schon vor über 1200 Jahren in der chinesischen Medizin bekannt (FRANK & KANAMITSU, 1987). Im Jahre 739 wurde von Ch'en ein Insekt namens „*ch'ing yao ch'ung*“ beschrieben, welches ein starkes Gift enthielt. Gründe für eine Gleichstellung dieses Insektes mit dem Kurzflügler

Paederus fuscipes lieferten Mitte des 20. Jahrhunderts CHOU (1957) und KONISHI & ITO (1973).

Da schon sehr lange bekannt war, dass die Familie der Ölkäfer (Coleoptera: Meloidae) das Toxin Cantharidin enthält, glaubten einige Autoren (z. B. GÖLDI, 1913; ROBERTS & TONKING, 1935), dass es sich bei dem *Paederus*-Toxin ebenfalls um Cantharidin handelte. Versuche, den Giftstoff aus *Paederus* zu isolieren und dessen Wirkweise zu untersuchen, führten zu dem sich später als falsch herausstellenden Ergebnis, dass es sich dabei um Cantharidin oder eine sehr ähnliche Substanz handeln musste (WADA, 1926; TAKASAKI, 1933, 1934; GENEVRAY et al., 1934; CASTELLI 1935b). Auch ITO (1934b) entdeckte, dass die chemischen Eigenschaften des *Paederus*-Giftes denen des Cantharidins sehr ähnlich sind, sich jedoch die klinischen und histologischen Eigenschaften wesentlich unterschieden. Aufgrund dieser Unterschiede nannte er den Giftstoff Pederidin. Den Namen Pederin trägt das Käfergift seit 1953, nachdem Kristalle davon aus dem Kurzflügler *Paederus fuscipes* aufgereinigt werden konnten (PAVAN & BO, 1953). Die chemische Struktur dieses Amids (siehe **Abb. 7 A**) mit der Summenformel $C_{25}H_{45}O_9N$ (QUILICO et al., 1961) konnte erst Jahre später aufgeklärt werden (CARDANI et al., 1965a, b, 1966, 1968; MATSUMOTO et al., 1964, 1968; FURUSAKI et al., 1968; BONAMARTINI CORRADI et al., 1971) ebenso wie seine chemische Charakterisierung, für die ungefähr 25 Millionen Exemplare (ca. 100 kg) der Art *Paederus fuscipes* benötigt wurden (PAVAN & VALCURONE DAZZINI, 1971).

Pederin stellt bis heute das am kompliziertesten gebaute Käfergift außerhalb der Proteine dar (PAVAN, 1975; MEINWALD, 1977; DETTNER, 1991) mit stark cytotoxischen Eigenschaften [Hemmung der Proteinbiosynthese in Eukaryotenzellen (BLUNT et al., 1990)]. Es wirkt als Kontaktgift, wobei es sogar die Wirkung des Parathions (E 605) weit übersteigt (BETTINI, 1958). Zudem gilt der Naturstoff als bis zu 75mal stärker als Cobragift (ARNETT & THOMAS, 2001). Pederin gehört zur Gruppe der Polyketide, die als Derivate der Essigsäure auch Acetogenine genannt werden und eine der größten Naturstoffklassen überhaupt mit zahlreichen biologisch aktiven Vertretern darstellen.

Das giftige Amid ist im gesamten Körper von *Paederus* s. l. verteilt, wobei sich eine hauptsächliche Anhäufung in der Hämolymphe der „+“-Weibchen findet (PAWLOWSKY & STEIN, 1927; GENEVRAY et al., 1934; ITO, 1934a; PAVAN, 1963), die den Stoff auf ihre Nachkommenschaft übertragen (KELLNER & DETTNER, 1995). In den Käfern wurden neben dem Pederin noch zwei weitere Amide mit sehr ähnlicher Struktur und analoger Wirkweise gefunden. Es handelt sich dabei um die beiden Pederin-Derivate Pseudopederin

($C_{24}H_{43}O_9N$) (QUILICO et al., 1961) (siehe **Abb. 7 B**) und Pederon ($C_{25}H_{44}O_9N$) (CARDANI et al., 1967) (siehe **Abb. 7 C**).

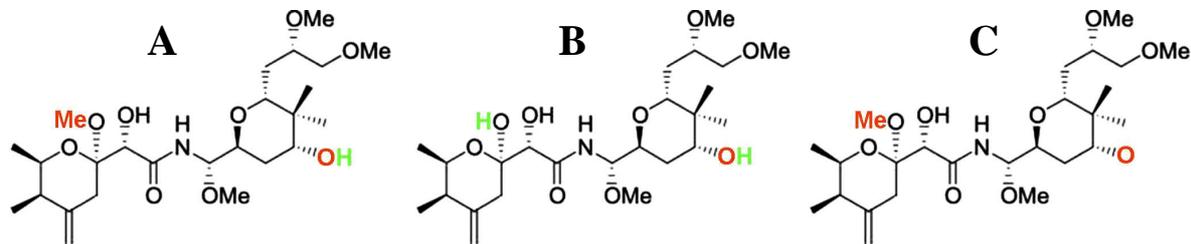


Abb. 7 A, B, C: chemische Strukturformeln: Pederin (A), Pseudopederin (B), Pederon (C) (verändert nach PIEL, 2004).

Diese strukturell ungewöhnlichen Verbindungen galten über 30 Jahre lang als einzigartig in der Natur, bis 1988 aus neuseeländischen Schwämmen der Gattung *Mycale* und japanischen Schwämmen der Gattung *Theonella* Amide mit analogem Bau und ähnlicher Wirkweise isoliert wurden: Mycalamid A (siehe **Abb. 8**) und Onnamid A (siehe **Abb. 9**) (PERRY et al., 1988; SAKEMI et al., 1988).

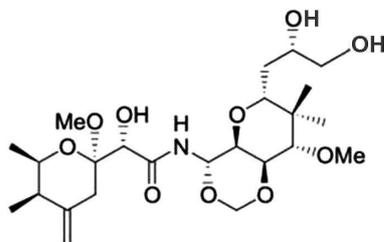


Abb. 8: Strukturformel von Mycalamid A (nach PIEL, 2004).

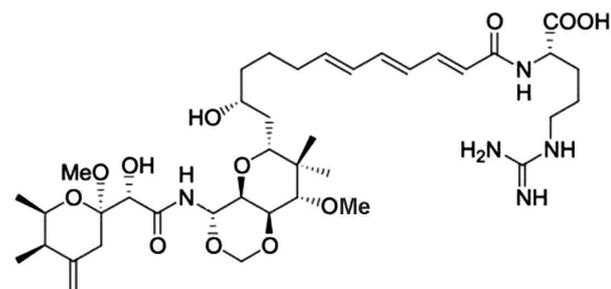


Abb. 9: Strukturformel von Onnamid A (nach PIEL, 2004).

Seitdem wurde aus Schwämmen dieser und anderer Gattungen eine große Anzahl weiterer, sehr ähnlicher Verbindungen isoliert (PERRY et al., 1990; FUSETANI et al., 1992; MATSUNAGA et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1993). Diese Gruppe der Pederin ähnlichen Substanzen besteht aus zahlreichen Mitgliedern mit ebenfalls starkem Antitumor und antiviralen Aktivitäten (PERRY et al., 1990; NARQUIZIAN & KOCIENSKI, 2000), die bisher ausschließlich in terrestrischen Käfern und marinen Schwämmen gefunden werden konnten. Pederin selbst kommt dabei ausnahmslos in den *Paederus*-Käfern vor, alle anderen

Vertreter finden sich in marinen Schwämmen. Bis heute gehören 36 Mitglieder zur Pederin-Familie, die allesamt fast identische Kernregionen mit verschiedenen Polyketid- oder Aminosäureresten besitzen (PIEL, 2005). Alle diese Verbindungen werden nach ihrer Grundstruktur in zwei Gruppen eingeteilt: den Pederin-Typ (siehe **Abb. 10**) und den Mycalamid-Typ (siehe **Abb. 11**), der einen zusätzlichen Ringschluss aufweist.

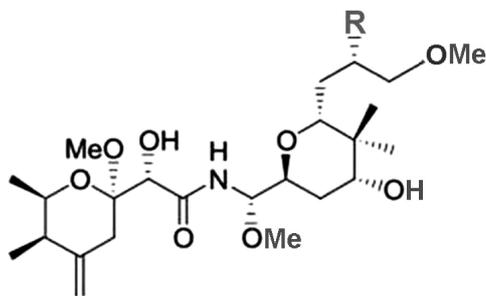


Abb. 10: Pederin-Typ (nach PIEL, 2004).

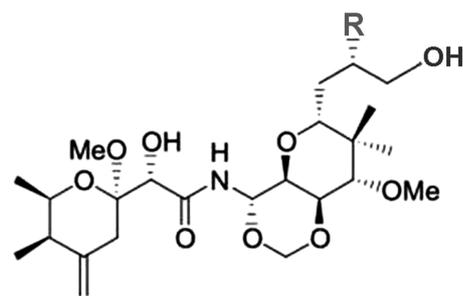


Abb. 11: Mycalamid-Typ (nach PIEL, 2004).

Zum Pederin-Typ gehören dabei Onnamid D und E, zum Mycalamid-Typ Mycalamid B, Onnamid A-C und Theopederin A-E.

CIFERRI et al. (1968) konnte schon früh zeigen, dass die Resistenz bzw. die Empfindlichkeit von Zellen im Falle des Pederins eine charakteristische Eigenschaft der Ribosomen und nicht der an der Verlängerung der Peptidkette beteiligten Enzyme darstellt. Dabei wird, wie auch bei allen anderen Mitgliedern dieser Naturstofffamilie, die Proteinbiosynthese durch die 80S-Ribosomen der Eukaryoten [70S-Ribosomen der Prokaryoten werden nicht beeinflusst (CIFERRI et al., 1968)] blockiert, indem die Translokation der m-RNA am Ribosom während der Elongation der Peptidkette verhindert wird (VÁZQUEZ, 1979). Die daraus resultierende wachstumshemmende Wirkung des Pederins auf Säugerzellen beinhaltet auch die schon erwähnte Antitumorwirkung, die letztlich auf eine Hemmung der Mitose zurückzuführen ist (PAVAN, 1963; SOLDATI et al., 1966). Sekundär kann eine Hemmung der DNA-Synthese beobachtet werden (BREGA et al., 1968).

Da alle Vertreter der Pederin-Familie eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und auch ihre biologische Aktivität ähnlich stark ausgeprägt ist (Antitumor und antivirale Wirkung, hohe Cytotoxizität: je nach Verbindung können unterschiedliche Abstufungen in der jeweiligen Reaktion beobachtet werden), nahm man an, dass ihre potente Wirksamkeit einem allen Mitgliedern gemeinsamen „aktiven Zentrum“ zugrunde liegt. Ein zwischen den beiden Sechsringen zentral liegendes Molekülteil, die α -Hydroxyamidoacetal-Gruppe, konnte

von THOMPSON et al. (1992) als Hauptbestandteil für die biologische Aktivität der verschiedenen Metabolite identifiziert werden.

Die hohe Cytotoxizität des Pederins kann beim Menschen gravierende Entzündungen auslösen (MATSUNAGA et al., 1992; THOMPSON et al., 1992), wenn es zum Kontakt mit der Hämolymphe der *Paederus*-Käfer kommt. Diese Hautirritation, in deren Verlauf es zur Rötung, Bläschenbildung und schließlich zur Abschuppung der Haut kommt (THÉODORIDÈS, 1950b), wird auch als *Paederus*- bzw. Streifendermatitis (*Dermatitis linearis*) bezeichnet (ITO, 1932; EARLE, 1949). Sie wurde nach der Streifenform benannt, die sich bildet, wenn die Käfer auf der menschlichen Haut zerquetscht und danach weggewischt werden (SENDUR et al., 1999). Neueren Untersuchungen zufolge genügt ein bloßes Anfassen bzw. leichtes Drücken der Käfer, um in Kontakt mit dem giftigen Amid zu gelangen (DETTNER, 2007; GREBE, 2007). Das Pederin wird dabei über eine ventral zwischen Sternit 3 und 4 gelegene exokrine Komplexdrüse (KELLNER & DETTNER, 1992) abgegeben, in der es zur potentiellen Abwehr von Prädatoren gespeichert wird. Gelangt das Gift in die Augen, kann es zu einer schwerwiegenden Entzündung der Bindehaut (*Konjunktivitis*) kommen, deren Verlauf mit einer starken Schwellung einhergeht (DE LEON, 1952). Aufgrund dieser Symptomatik ist die Krankheit auch unter Namen, wie „Dracula“, „Nairobi-eye“ oder „night burn“ bekannt. Bis diese Symptome nach einem Kontakt auftreten, vergehen meist 24 Stunden (GELMETTI & GRIMALT, 1993); nach sieben bis zehn Tagen heilen sie komplikationslos ab. Diese beiden Krankheitsformen (*Paederus*-Dermatitis und *Paederus*-Konjunktivitis) treten vor allem in Regionen mit heißem Klima, wie z. B. in den Tropen, auf und können auch von den Eiern, den Larven oder den Puppen der Käfer ausgelöst werden, sofern diese Pederin enthalten. Dies geschieht dann, wenn die Käfer zu bestimmten Jahreszeiten in unglaublich großer Anzahl auftreten (COUPPIE et al., 1992; TODD et al., 1996; SENDUR et al., 1999). Diese aus Millionen von Käfern bestehenden Epidemien haben schon zur Evakuierung ganzer Dörfer und Siedlungen geführt (PENCHENIER et al., 1994; TODD et al., 1996) und gelten interessanterweise auch als drei der zehn biblischen Plagen, in denen die Ägypter zuerst unter Insektenschwärmen und anschließend unter schmerzhafter Blasenbildung der Haut litten (NORTON & LYONS, 2002).

Die physiologische Bedeutung des Pederins für die *Paederus*-Käfer liegt in erster Linie in einer Abschreckfunktion begründet, die sie vor potentiellen Fressfeinden schützt. Aufgrund seiner Säurelabilität dürfte sich das Toxin weniger gegen Wirbeltiere richten, da es im Magen sofort durch Salzsäure zersetzt wird, sondern vermutlich gegen Insekten-Prädatoren. KELLNER & DETTNER (1996) konnten zeigen, dass *Paederus*-Larven, die Pederin

enthalten, von zahlreichen angreifenden Wolfsspinnen-Spezies verschmäht werden. Eine mögliche weitere Funktion dieses Naturstoffes wäre ein Schutz vor pathogenen Eukaryoten (DETTNER, 1993), wie z. B. Insekten befallenden Pilzen. Dies ließe sich mit den cytotoxischen Eigenschaften des Pederins gegenüber den verschiedensten eukaryotischen Zellen erklären, was auch *in vitro* beobachtet werden konnte (PAVAN, 1982).

1.5 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung eines Pederin produzierenden, in weiblichen Käfern der Gattung *Paederus* s. l. lebenden Endosymbionten. Als Versuchsart wurde dabei *Paederus riparius* gewählt, ein sehr häufig vorkommender Vertreter dieser Kurzflügler-Gattung, der zudem leicht im Labor gehalten werden kann.

Dabei sollte mit verschiedenen mikrobiologischen und molekularen Methoden versucht werden, den Symbionten in seinem Wirt exakt zu lokalisieren, diesen vom Insekt zu isolieren, um ihn schließlich außerhalb des Käfers kultivieren zu können, und dessen Übertragungsweg auf die Nachkommenschaft zu entschlüsseln.

Da die Übertragung des *Paederus*-Endosymbionten rein vertikal erfolgt (auf maternalem Wege), sollten darüber hinaus histologische Untersuchungen an den weiblichen Käfern und deren Eiern durchgeführt werden. Unter Zuhilfenahme von Methoden, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einigen Färbetechniken, der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und verschiedenen mikroskopischen Techniken, sollten Käfer und Eier über Serien-Schnitte nach den Bakterien durchmustert werden. Die bisher noch nicht erforschte räumliche Organisation der Endosymbionten im Wirtsinneren sowie deren Physiologie, sollten somit näher beleuchtet bzw. aufgeklärt werden, auch in Hinsicht auf deren Weitergabe an die Eier der Käfer.

Schließlich sollte durch gezielte Mikropräparations- und Sektions-Techniken versucht werden, den Pederin-Produzenten in Reinform zu isolieren, um damit ein geeignetes Kultivierungssystem entwickeln zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Sammelstellen der *Paederus*-Käfer

Die für die Charakterisierung des *Paederus*-Endosymbionten benötigten Exemplare der Art *Paederus riparius* wurden allesamt im Freiland bei Speichersdorf, ca. 20 Kilometer östlich von Bayreuth (Grenze zur Oberpfalz) in der Schilfzone eines verlandeten Teichs, mit einem Exhaustor gesammelt. Als beste Periode zum Sammeln erwies sich dabei die Zeit von Anfang Juni bis Ende Oktober.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 12) zeigt den Fundort von *Paederus riparius* mit einigen der Fundstellen, an denen kontinuierlich sehr viele Exemplare gefunden werden konnten, so dass sich deren Beschaffung ausschließlich auf diesen Ort beschränkte.

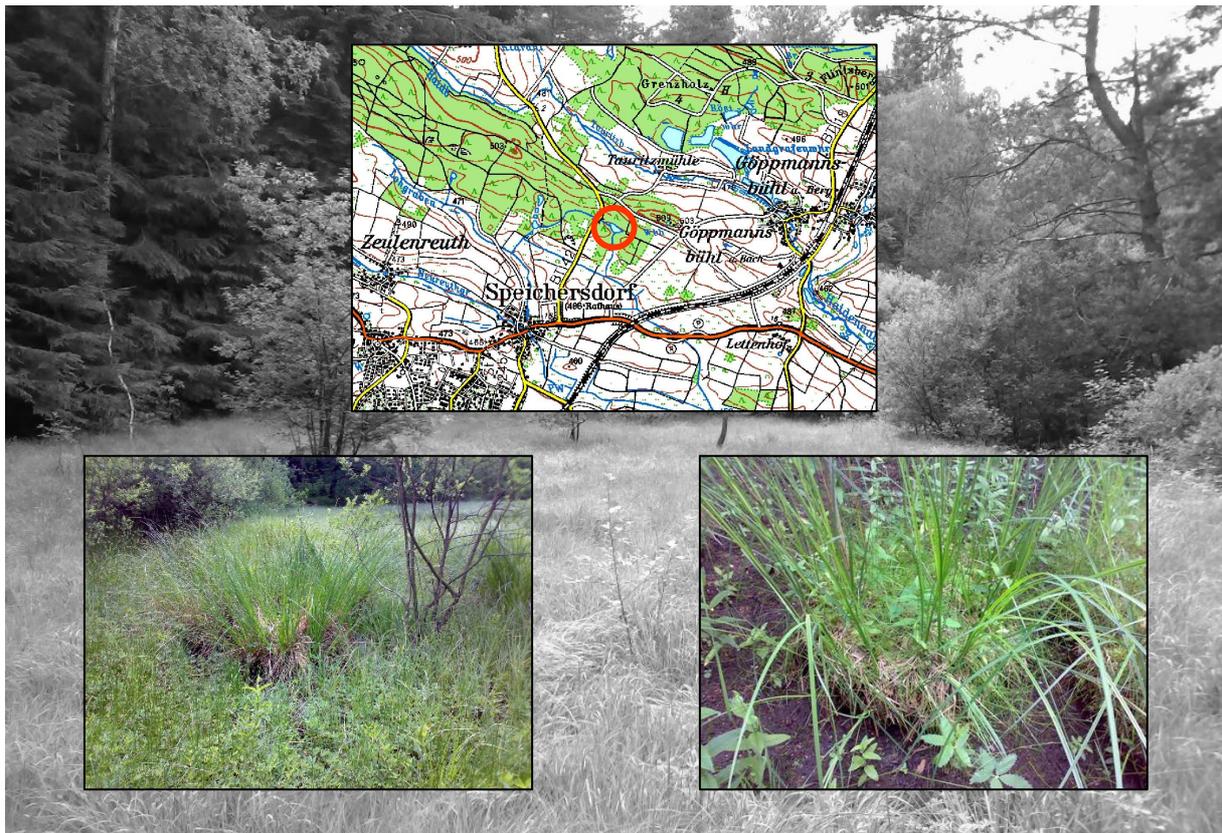


Abb. 12: Kartenausschnitt von Nordbayern (östlich von Bayreuth) mit gekennzeichnete Sammelstelle (roter Kreis) und Bilder des Fundorts. Koordinaten: 49°53'03.17"N/11°47'44.56"O.

2.2 Bestimmung der gesammelten Exemplare

Die Informationen über die Verbreitung und die Ökologie von *Paederus riparius* wurde aus der Literatur von BERNHAUER & SCHUBERT (1912), HORION (1965), BOHÁČ (1985) und KOCH (1989) entnommen.

Zunächst wurden die Käfer unter einem Binokular lebend bis zur Art bestimmt, wobei ein Bestimmungsschlüssel nach FREUDE et al., 1964 verwendet wurde. Dies bestätigte, dass an oben beschriebenem Sammelort ausschließlich Exemplare der Art *Paederus riparius* gefunden wurden. Männchen und Weibchen konnten anhand der speziellen Form von Sternit VIII unterschieden werden, welches beim Männchen U-förmig ausgeschnitten ist (siehe **Abb. 13 A**). Dem Weibchen fehlt dieser spezielle Ausschnitt (siehe **Abb. 13 B**). Bei entsprechender Übung sind die beiden Geschlechter auch leicht mit bloßem Auge unterscheidbar, und zwar anhand der unterschiedlichen Stellung und Länge der Cerci. Während die Cerci der Männchen leicht V-förmig auseinander stehen und etwas kürzer sind, verlaufen die der Weibchen eng parallel und sind etwas länger.

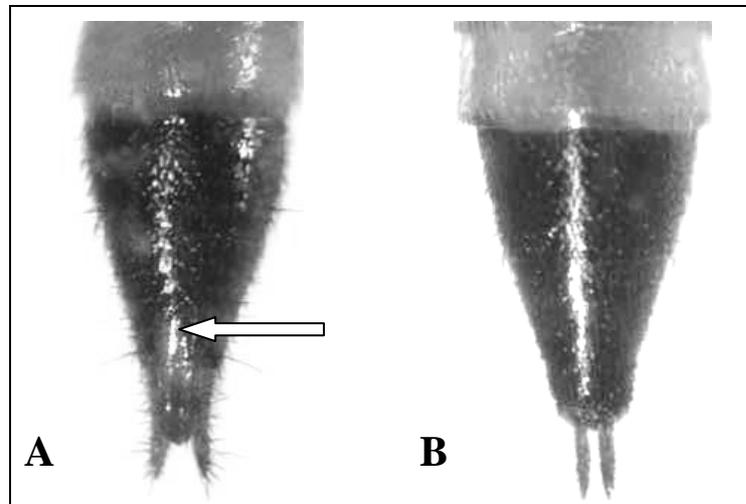


Abb. 13 A, B: Abdominalspitzen von *Paederus riparius* in 40-facher Vergrößerung. Links (A): Sternit VIII des Männchens, mit charakteristischer Einbuchtung (Pfeil) und V-förmigen Cerci. Rechts (B): Sternit VIII des Weibchens, ohne Einbuchtung und mit parallel liegenden, längeren Cerci.

2.3 Haltung und Zucht im Labor

Die im Freiland gefangenen *Paederus riparius* wurden pärenchenweise in Plastikpetrischalen (8,5 cm Durchmesser) gehalten, die mit zusammengefaltetem feuchten Zellstoff, der für die Ei-Ablage und als Versteck für die Käfer dienen sollte, ausgelegt waren. Dieser wurde bei zu großer Verschmutzung durch die Käfer oder bei einsetzendem Schimmelpilz-Wachstum durch frischen Zellstoff erneuert. Zweimal wöchentlich wurden die gefangenen Kurzflügler mit einer stummelflügeligen Mutante von *Drosophila melanogaster* gefüttert und der Zellstoff mit einer Wasser-Sprühflasche angefeuchtet. Der für *Paederus* s. l. von PICKEL (1940) und RAMÍREZ (1966) beschriebene Kannibalismus konnte bei der Laborhaltung von *Paederus riparius* auch bei längerem Ausbleiben der Fütterung nur in ganz seltenen Fällen beobachtet werden - z. B. dann, wenn einer der beiden Partner „kränkelte“.

Die Petrischalen mit den Käfern wurden kontinuierlich in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen bei 20°C mit 15 Stunden Licht und 9 Stunden Dunkelheit aufbewahrt. Während der Wintermonate (November bis März) wurden sie in einer Kälte-Klimakammer bei 10°C mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gehalten, um möglichst naturnahe Bedingungen zu schaffen.

Eier, die von den Käfern in den gefalteten Zellstoff gelegt worden sind, wurden mit einer Federstahlpinzette entnommen und für weitere Untersuchungen mit 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) (siehe 2.10.7.4) fixiert und anschließend in PBS/Ethanol (siehe 2.10.7.4) eingefroren, für die Kultivierungsexperimente gesammelt oder mit Goldstaub bedampft und für elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet.

2.4 Fotografie

Zur Dokumentation von mikroskopischen und makroskopischen Ergebnissen standen am Lehrstuhl zwei digitale Kameras vom Typ Olympus zur Verfügung. Es handelte sich dabei zum einen um die Spiegelreflexkamera „E330“ mit 7,5 Megapixeln und zum anderen um das Modell „Camedia C 5050“ mit 5 Megapixeln. Die beiden Kameras konnten über einen Verbindungstabus, der an die Optik von Mikroskop und Binokular angeschraubt wurde, leicht ausgetauscht werden. Aufnahmen am Raster- und am Transmissionselektronenmikroskop wurden am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie gemacht. Die Bilder am REM entstanden mit spezieller Software, die ein sofortiges digitales Abspeichern des ausgewählten

Bildbereichs ermöglichte. Im Falle des TEM wurden von den ausgewählten Bereichen am Bildschirm Negative erstellt, die dann mittels eines Scanners (Hewlett Packard) digitalisiert wurden.

2.5 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Licht- bzw. fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden am lehrstuhleigenen Fluoreszenzmikroskop (Olympus C-35AD-4) durchgeführt. Bakterienzellen wurden dabei immer bei einer 1000-fachen Vergrößerung mit Immersionsöl (Roth, Deutschland) betrachtet. Die Größe der Bakterien wurde mit Hilfe eines Okularmikrometers bestimmt, welches zuvor mit einem Objektmikrometer geeicht wurde.

2.5.1 Fluoreszenz-Filtersätze

Für das Arbeiten im Fluoreszenzmodus des Mikroskops wurden zwei verschiedene Filtersätze verwendet, die in der nachfolgenden Tabelle (**Tab. 1**) aufgelistet sind.

Tab. 1: Verwendete Fluoreszenz-Filtersätze.

Filtersatz	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter	Anwendung
02 (Zeiss)	G 365	FT 395	LP 420	DAPI
Cy3-HQ	HQ 545/30	LP 570	HQ 610/75	Cy3

2.5.2 Fluoreszenz-Farbstoffe

In **Tab. 2** sind die fluoreszierenden Farbstoffe aufgelistet, die bei der Untersuchung von Gewebeproben und Eiern verwendet wurden.

Tab. 2: Verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe.

Bezeichnung des Fluorochroms	Kürzel	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	DAPI	365 nm	418 nm
5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester	Cy3	554 nm	570 nm

2.6 Konfokalmikroskopie/CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)

Zur Darstellung von sehr dicken oder unebenen Gewebeschnitten wurde ein konfokales Lasermikroskop der Marke Leica (TCSSP2) am Lehrstuhl für Genetik verwendet. Bei dieser Technik rastert ein Laserstrahl punktweise ein Objekt, wobei er in der Fokusebene der zu mikroskopierenden Probe maximal fokussiert ist.

Durch die Aufzeichnung mehrerer „Schnitte“ in verschiedenen Fokusebenen erhielt man eine Schichtung, aus der mit Hilfe spezieller Hard- und Software zur Steuerung der Signalerfassung, -auswertung, -darstellung und -archivierung eine dreidimensionale Rekonstruktion von ausgewählten Bereichen der untersuchten Gewebedünnschnitte errechnet wurde. Diese konnten anschließend digital dokumentiert werden.

2.7 Elektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie mit Hilfe von Frau Rita Grotjahn durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Geräte benutzt: zum einen ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der Marke Zeiss (EM 902A) zur Darstellung von Bakterienzellen, zum anderen ein Rasterelektronenmikroskop (REM) der Marke Philips (FEI XL 30 ESEM), das zur Darstellung von Gewebeproben und Eiern der Käfer verwendet wurde. Die zu untersuchenden Proben erfuhren vor ihrer Untersuchung eine spezielle Behandlung. Im Falle des TEM wurde eine so genannte Negativkontrastierung des Probenmaterials mit einer Uranyl-Acetat-Lösung (2% w/v, pH 4,8) durchgeführt, um eine stärkere Streuung der Atome und somit eine Kontrasterhöhung zu erzielen. Proben für das REM wurden in einer speziellen Unterdruckkammer (Sputter-Coater) bei konstanten Bedingungen mit Goldstaub bedampft, nachdem sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe vollständig entwässert worden waren.

2.8 Bakterielle Nährmedien

Sämtliche feste und flüssige, selbstangerührte Nährmedien, Zusätze und Stammlösungen (siehe **2.8.1-2.8.3**) für bakterielle Kultivierungsexperimente wurden unter oxischen Bedingungen an einer Laborbank mit VE-Wasser hergestellt. Dazu wurden die einzelnen

Bestandteile auf einer Laborwaage abgewogen und anschließend in hitze- und druckresistente Glasflaschen abgefüllt. Eine Verfestigung der Nährmedien konnte durch die Zugabe von Agar (meist 15 g/l) erreicht werden, der, nachdem er durch den sich anschließenden Autoklaviervorgang aufgeschmolzen war, beim Abkühlen die Medien erstarren ließ. Das Gießen von Platten erfolgte erst, nachdem die frisch autoklavierten Medien auf ca. 60°C abgekühlt waren.

Die mit Nährmedien, Flüssigmedien oder Stammlösungen befüllten Glasflaschen und Reagenzgläser wurden kurz nach ihrer Herstellung bei 121°C und 1 bar Überdruck für 25 Minuten autoklaviert. Hitzelabile Verbindungen (siehe **2.8.3.3** und **2.8.3.4**) wurden sterilfiltriert (Cellulose-Acetatfilter, Porendurchmesser 0,22 µm, ROTH, Deutschland) und den auf ca. 50-55°C abgekühlten Medien zugegeben.

Zusätzlich zu den Trockennährmedien und einigen selbst entwickelten Medien wurde auch eine ganze Reihe klinischer Fertignährböden (siehe **2.9.2**) für die endosymbiontischen Isolierungs- und Kultivierungsversuche eingesetzt. Diese sofort gebrauchsfähigen Agarplatten in Einwegpetrischalen wurden von der Firma BD Diagnostics in Packungen zu 20 Stück bezogen. Sie konnten für mehrere Monate im Kühlschrank gelagert werden.

2.8.1 Verfestigte komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien

Ein synthetischer Nährboden besteht immer aus chemisch exakt definierten Bestandteilen in bekannter Konzentration. Komplexnährböden enthalten ein oder mehrere organische Bestandteile, deren chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist. Dabei handelt es sich meist um schlecht definierte Naturprodukte, wie Pepton, Fleischextrakt oder Hefeextrakt. Für die Zusammenstellung eines komplexen Nährmediums werden meist sehr viel weniger Bestandteile benötigt als für ein chemisch definiertes Medium, da in den oben genannten Naturprodukten alle organischen und anorganischen Nährstoffe enthalten sind, die von den verschiedensten Mikroorganismen zum Wachsen benötigt werden. Komplexe Nährböden finden daher bevorzugt Anwendung, wenn es darum geht, sehr anspruchsvolle Bakterien zu kultivieren bzw. sehr viele verschiedene Organismen gleichzeitig zum Wachstum zu bringen und hohe Wachstumsraten zu erzielen. Sie kommen gewöhnlich dann zum Einsatz, wenn Mikroorganismen kultiviert werden sollen, deren Nährstoffansprüche noch nicht genau bekannt sind. Enthalten diese Nährmedien bestimmte Zusätze, die eine Veränderung des Mediums oder der Kolonien zur Folge haben, spricht man von Differentialnährböden. Solche Verbindungen können spezifische Substrate, Farbstoffe oder Antibiotika sein, die nur von

bestimmten Bakteriengruppen umgesetzt werden und somit deren Identifizierung erlauben. Gleichzeitig wird durch diese Zusätze die Entwicklung anderer Gruppen gehemmt. Der Triphenylmethanfarbstoff Brilliantgrün beispielsweise hemmt in geeignet hoher Konzentration das Wachstum von grampositiven Bakterien, hat aber keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung von gramnegativen Mikroorganismen.

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten flüssigen und festen Nährmedien komplexer und synthetischer Art. Da bis heute nur sehr wenig über die Nährstoffansprüche des *Paederus*-Endosymbionten bekannt ist, wurden bis auf einige wenige synthetische Nährböden ausschließlich Komplexnährmedien verwendet.

Für die vollständige Zusammensetzung der im Folgenden aufgeführten Medien, Zusätze und Stammlösungen (**2.8.1-2.8.3**) siehe Anhang 1.

2.8.1.1 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien

2.8.1.1.01 BHI-Agar (Hirn-Herz-Infusionsagar) (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 5,5 und 7,4

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung einer großen Anzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien.

2.8.1.1.02 BHI-Agar mit verschiedenen Supplementen

(Fluka, Deutschland)

Beschreibung siehe **2.8.1.1.01**

2.8.1.1.03 BHI-Agar mit Tellurit

(Fluka, Deutschland)

pH = 5,5 und 7,4

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.1.1.04 BHI-Agar mit Supplementen und Tellurit

(Fluka, Deutschland)

Beschreibung siehe **2.8.1.1.03**

2.8.1.1.05 **BHI-Agar mit Penicillin G**

(Fluka, Deutschland)

pH = 5,5 und 7,4

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Mikroorganismen. Penicillin G hemmt das Wachstum von grampositiven Bakterien.

2.8.1.1.06 **BHI-Agar mit Penicillin G und Tellurit**

(Fluka, Deutschland)

pH = 5,5 und 7,4

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen, tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.1.1.07 **Mac Conkey-Agar (ohne Salz)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,4

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Mikroorganismen.

2.8.1.1.08 **Malachitgrün-Agar** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.1.1.09 **Pseudomonas-Isolations-Agar** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas* spp..

2.8.1.1.10 **Pseudomonas-Isolations-Agar mit Penicillin G und Tellurit**

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von tellurit-resistenten *Pseudomonas* spp.. Penicillin G soll ein mögliches Wachstum von grampositiven Bakterien unterdrücken.

2.8.1.1.11 Pseudomonas-Isolations-Agar mit CNA-Supplement**(Cetrimid-Nalidixinsäure-Agar-Supplement)**

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.**2.8.1.1.12 Pseudomonas-Isolations-Agar mit CFC-Supplement****(Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin Selektiv-Supplement)**

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von Pseudomonas-Spezies.**2.8.1.2 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Fertignährböden****2.8.1.2.01 Columbia-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)**

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchslosen und anspruchsvollen Bakterien.**2.8.1.2.02 Columbia-III-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)**

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchslosen und anspruchsvollen Bakterien.**2.8.1.2.03 EMB-Agar (Eosin-Methylenblau-Agar) (Fertignährboden)**

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,1

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Bakterien. Die beiden Farbstoffe, Eosin Y und Methylenblau inhibieren dabei weitestgehend das Wachstum von grampositiven Mikroorganismen.

2.8.1.2.04 Herz-Infusion-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,4

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von vielen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen.

2.8.1.2.05 Pseudosel-Agar (Cetrimid-Agar) (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,2

Selektivmedium zur Isolierung und Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas* spp..

2.8.1.2.06 Schokoladenagar (Kochblutagar) (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung anspruchsvoller grampositiver und gramnegativer Bakterien.

2.8.1.3 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen**2.8.1.3.01 Pepton-Salz-Agar** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung anspruchsvoller Bakterien, das dem Verlust sehr empfindlicher Zellen beim Überimpfen vorbeugen soll.

2.8.1.3.02 Pseudomonas Indigofera Medium (selbst abgewogen)

(<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000365.html>)

pH = 7,2

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas* spp..

2.8.1.4 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte

2.8.1.4.01 **Mehlkäfer-Extrakt-Agar** (Eigenrezept)

pH = 7,2

Mehlkäfer-Extrakt

siehe **2.8.3.1**

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen, in Insekten lebenden Mikroorganismen.

2.8.1.4.02 ***Paederus*-Extrakt 2-Agar** (Eigenrezept)

pH = 7,2

Paederus riparius-Extrakt

siehe **2.8.3.1**

Selektivmedium speziell zur Isolierung und Kultivierung des sehr anspruchsvollen, in *Paederus*-Käfern lebenden Endosymbionten.

2.8.1.4.03 **Pepton-Salz-Agar mit Suppline1/2/3** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Suppline1/2/3

siehe **2.8.3.1**

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung sehr anspruchsvoller, gramnegativer Bakterien.

2.8.1.4.04 **Pepton-Salz-Agar mit *Paederus*-Extrakt 1** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Paederus-Extrakt 1

siehe **2.8.3.1**

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen, in *Paederus*-Kurzflüglern lebenden Mikroorganismen.

2.8.1.5 Verfestigte komplexe Nährböden für Anaerobier: Fertignährböden

2.8.1.5.01 **Brucella-Agar mit Hemin und Vitamin K1** (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,0

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anaeroben Bakterien.

2.8.1.5.02 Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,6

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen Anaerobiern

2.8.1.5.03 Schaedler-KV-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,6

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen gramnegativen anaeroben Mikroorganismen.

2.8.1.5.04 Wilkins Chalgren Anaerobier-Agar (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,1

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anaeroben Bakterien.

2.8.1.6 Verfestigte synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen**2.8.1.6.01 Glucose-Mineralsalz-Agar** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Spurenelement-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 1,0 ml/l
Synthetisches Universalmedium für die Isolierung und Kultivierung einer Vielzahl von Bakterien, die keine Wachstumsfaktoren benötigen.

2.8.1.6.02 VL 55-Agar (selbst abgewogen)

(nach SANGWAN et al., 2004)

pH = 7,2

Selenit-Wolframat-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 2,0 ml/l
Spurenelement-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 2,0 ml/l
Vitamin-Stammlösung 1 (siehe **2.8.3.3**) 2,0 ml/l
Vitamin-Stammlösung 2 (siehe **2.8.3.3**) 6,0 ml/l
Synthetisches Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung sehr anspruchsvoller Mikroorganismen.

2.8.2 Flüssige komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien

Erläuterung siehe **2.8.1**.

2.8.2.1 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien (zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.1.01 **BHI-Bouillon (Hirn-Herz-Bouillon)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,4

Universal-Bouillon zur Anreicherung und Kultivierung von anspruchsvollen Bakterien.

2.8.2.1.02 **BHI-Bouillon mit Tellurit**

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,4

Kaliumtellurit-Stammlösung

siehe **2.8.3.3**

Selektiv-Bouillon zur Anreicherung von tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.2.1.03 **Cetrimid-Bouillon (Pseudomonas-selektiv-Bouillon)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,3

Selektiv-Bouillon zur Isolierung und Anreicherung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.2.1.04 **Malachitgrün-Bouillon** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Selektiv-Bouillon zur Anreicherung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.2.2 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen (zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.2.01 **Hefeextrakt-Pepton-Glucose-(HPG)-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Universal-Bouillon zur Anreicherung anspruchsvoller Mikroorganismen.

2.8.2.2.02 **Nährbouillon** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Universal-Bouillon zur Anreicherung nicht sehr anspruchsvoller Mikroorganismen.

2.8.2.2.03 **Pepton-Salz-Lösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Universal-Lösung zum Dispergieren und Verdünnen von Bakterien; mit sehr geringer Zellverlustrate.

2.8.2.3 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte (zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.3.01 **Pepton-Salz-Lösung mit Suppline1/2/3** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Suppline1/2/3

siehe **2.8.3.1**

Selektiv-Lösung zur Anreicherung und Kultivierung sehr anspruchsvoller, gramnegativer Bakterien.

2.8.2.4 Flüssige synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen (zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.4.01 **Glucose-Mineralsalz-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3) 1,0 ml/l

Synthetische Nährlösung für die Anreicherung einer Vielzahl von Bakterien, die keine Wachstumsfaktoren benötigen.

2.8.2.4.02 **VL 55-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach SANGWAN et al., 2004)

pH = 7,2

Selenit-Wolframat-Stammlösung (siehe 2.8.3.3) 1,0 ml/l

Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3) 1,0 ml/l

Vitamin-Stammlösung 1 (siehe 2.8.3.3) 1,0 ml/l

Vitamin-Stammlösung 2 (siehe 2.8.3.3) 3,0 ml/l

Synthetische Nährlösung zur Isolierung und Kultivierung von sehr anspruchsvollen Bakterien.

2.8.3 Medienzusätze und Stammlösungen

2.8.3.1 Komplexe und synthetische Medienzusätze: Eigenrezepte

2.8.3.1.01 **Mehlkäfer-Extrakt** (Eigenrezept)

Labormörser

Mehlkäferlarven 100 Stück

Saline (0,85% w/v) 300,0 ml

Die Mehlkäferlarven wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Keramikmörser zu einem feinen Pulver zerrieben, welches in Saline mit einem Wirbelmischer resuspendiert wurde. Anschließend fand eine Zentrifugation der erhaltenen Suspension für 20 Minuten bei 13000 Umdrehungen statt, um darin enthaltene Chitinpanzerreste, Fettrückstände und Bakterienzellen zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde sterilfiltriert.

2.8.3.1.02 ***Paederus*-Extrakt 1** (Eigenrezept)

Labormörser	
<i>Paederus riparius</i> -Weibchen	10 Stück
Saline (0,85% w/v)	10,0 ml
Selbe Vorgehensweise, wie unter 2.8.3.1.01 beschrieben.	

2.8.3.1.03 ***Paederus*-Extrakt 2** (Eigenrezept)

Labormörser	
Abdomina von <i>Paederus riparius</i> -Weibchen	300 Stück
VE-Wasser	300,0 ml
Selbe Vorgehensweise, wie unter 2.8.3.1.01 beschrieben. Anstelle von Saline wurde hier VE-Wasser benutzt.	

2.8.3.1.04 **Suppline 1/2/3: Zusatz für Pepton-Salz-Agar** (Eigenrezept)

Fleischextrakt	3/5/10,0 g/l
Hefeextrakt	3/5/10,0 g/l
Pepton aus Fleisch, peptisch	5/7,5/10,0 g/l
Pepton aus Casein, tryptisch	5/10/15,0 g/l
Brilliantgrün	0,02 g/l
Prolin-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	0,5/1/2,0 ml/l
Trehalose-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	6/12/20,0 ml/l
Vitamin-Stammlösung 3 (1/3/5x) (siehe 2.8.3.4)	6,0 ml/l

2.8.3.2 Komplexe und synthetische Medienzusätze: Pulverzusätze2.8.3.2.01 **D22 Insect Medium (synthetischer Zusatz)** (Pulver)

(United States Biological, USA)

2.8.3.3 Stammlösungen: selbst abgewogen2.8.3.3.01 **Kaliumtellurit-Stammlösung: 10 ml (100 mg/ml)** (selbst abgewogen)

Selektive Hemmstofflösung, die das Wachstum von allen Bakterien, die im Gegensatz zum *Paederus*-Endosymbionten und einigen anderen Mikroorganismen kein Tellurit-Resistenzgen besitzen, hemmt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert.

2.8.3.3.02 Penicillin G-Stammlösung: 50 ml (10 mg/ml) (selbst abgewogen)

Selektive Hemmstofflösung, die das Wachstum von grampositiven Bakterien hemmt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert.

2.8.3.3.03 Selenit-Wolframat-Stammlösung (selbst abgewogen)

(nach WIDDEL, 1980)

2.8.3.3.04 Spurenelementstammlösung (selbst abgewogen)

(nach TSCHECH und PFENNIG, 1984)

2.8.3.3.05 Vitamin-Stammlösung 1 (selbst abgewogen)

(nach PFENNIG, 1978)

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

2.8.3.3.06 Vitamin-Stammlösung 2 (selbst abgewogen)

(nach BALCH et al, 1979)

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

2.8.3.4 Stammlösungen: Eigenrezepte**2.8.3.4.01 Prolin-Stammlösung: 10 ml (50 mg/ml)** (Eigenrezept)

Endkonzentration im Medium

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 1 25,0 µg/ml

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 2 50,0 µg/ml

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 3 100,0 µg/ml

Die Prolinkonzentration z. B. in der Hämolymphe von Schwarzkäfern beträgt ca. 500 µg/ml (KAISER, 2002).

2.8.3.4.02 Trehalose-Stammlösung: 20 ml (0,5 g/ml) (Eigenrezept)

Endkonzentration im Medium

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 1 3,0 mg/ml

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 2 6,0 mg/ml

Pepton-Salz-Agar mit Suppline 3 10,0 mg/ml

Die Trehalosekonzentration z. B. in der Hämolymphe von Tabakswärmern beträgt ca. 20 mg/ml (DETTNER, 2003).

2.8.3.4.03 **Vitamin-Stammlösung 3 (1/2,5/5x konzentriert)** (Eigenrezept)

(PIEL, mündl. Mitt.)

Biotin 4/10/20,0 mg/l

Nicotinsäure 40/100/200,0 mg/l

Ca-D(+)-Pantothenat 10/25/50,0 mg/l

Ersten Genomanalysen zu Folge, ist der *Paederus*-Endosymbiont nicht in der Lage, die drei aufgeführten Vitamine selbst zu synthetisieren. Um die Nährstoffanforderungen für den Symbionten möglichst genau zu treffen, wurde die Vitaminlösung in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

Durch unterschiedliche pH-Werte, die Zugabe der verschiedensten komplexen und synthetischen Stoffe und anderer Supplemente in die festen und flüssigen Medien, wurden weitestgehend käferähnliche physiologische Bedingungen geschaffen, die eine Kultivierung des *Paederus*-Endosymbionten außerhalb seines Wirts erlauben sollten.

2.9 Mikrobiologische Methoden

TEIL A: KULTIVIERUNG

2.9.1 Kultivierungsversuche des *Paederus*-Endosymbionten

2.9.1.1 Käfer-Homogenisate

Vor dem Beginn der Arbeit wurden, soweit möglich, alle Arbeitsgeräte und Gefäße autoklaviert sowie die Sterilbank mit reinem Alkohol gesäubert, um höchstmögliche Sterilität zu gewährleisten. Um den *Paederus*-Endosymbionten kultivieren zu können, wurden Homogenisate aus ganzen Käfern hergestellt.

Dafür wurden 20 *Paederus riparius*-Weibchen mit sterilem Millipore-Wasser 3x gewaschen, um bei den späteren Kultivierungsexperimenten eine Kontamination durch Bakterien auf der Körperoberfläche der Käfer möglichst auszuschließen. Nach der äußeren

Sterilisation wurden die *Paederus*-Weibchen in 20 ml einer sterilen Pepton-Salz-Lösung (siehe 2.8.2.2.03) mit einem Labormixer zerkleinert (die phosphatgepufferte Lösung wird zum Verdünnen von Bakterien universell verwendet, da in ihr für die Dauer von mindestens einer Stunde keine oder nur sehr geringe Zellverluste auftreten). Das entstandene Homogenisat wurde schließlich 5x für 1 Minute bei höchster Stufe auf einem Wirbelmischer (Vortex Genie 2; Bender & Hobein AG, Schweiz) durchmischt, bevor man darin enthaltene Schwebeteilchen (z. B. Chitinpanzerreste) für ca. 10 Minuten sedimentieren ließ. Aus dem fast schwebstofffreien Überstand dieser Bakterien-Lösung wurden verschiedene Verdünnungsreihen (siehe 2.9.2) zur gezielten Anreicherung des *Paederus*-Endosymbionten hergestellt.

2.9.1.2 Ei-Homogenisate

Analog zu den Käferhomogenisaten wurden Suspensionen von *Paederus riparius*-Eiern hergestellt, da bekannt ist, dass der Endosymbiont über die Eioberfläche auf die Nachkommenschaft übertragen wird (KELLNER, 2001). Das Volumen der Ei-Suspension war allerdings aufgrund des Größenunterschiedes der Eier im Verhältnis zu den Käfern deutlich geringer. So konnte theoretisch davon ausgegangen werden, dass beide Homogenisate in etwa die gleiche Endosymbiontendichte aufwiesen.

Es wurden 100 Eier, die von verschiedenen Weibchen stammten, über einen Zeitraum von 5 Tagen gesammelt. Bis zur Herstellung des Homogenisats lagerten die Eier in einer 20°C-Klimakammer in Gewebekulturschalen (35x10 mm), die mit feuchtem Zellstoff ausgelegt waren, um einer Austrocknung vorzubeugen. Im Gegensatz zu den Käfern wurden die Eier vor ihrer Homogenisierung nicht in sterilem Millipore-Wasser - zur groben Sterilisierung der Oberfläche - ausgeschüttelt, um ein Abwaschen des Endosymbionten von der Eioberfläche zu verhindern. Die Eier wurden nun in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in 500 µl einer Pepton-Salz-Lösung mit einem sterilen Micropistill zerrieben. Am Pistill anhaftende Ei-Reste wurden vorsichtig mit steriler Pepton-Salz-Lösung in das Reaktionsgefäß hineingewaschen, bis ein Volumen von 2 ml erreicht war. Schließlich wurde die Ei-Lösung für 5x 1 Minute auf einem Wirbelmischer bei höchster Stufe durchmischt und verschiedene Verdünnungsreihen zur gezielten Anreicherung des Endosymbionten hergestellt.

2.9.2 Herstellen von Verdünnungsreihen zur Anreicherung des Endosymbionten

Alle Verdünnungsreihen, die mit Käferhomogenisat beimpft wurden, bestanden aus neun 27 ml-Glas-Kulturröhrchen, in die jeweils 9,0 ml des entsprechenden Anreicherungsmediums (alle unter **2.8.2** aufgeführten Flüssigmedien) eingefüllt wurden. Die Röhrchen wurden anschließend mit Aluminiumkappen verschlossen und autoklaviert. Verdünnungsreihen hingegen, die mit Ei-Homogenisat beimpft wurden, bestanden aus neun sterilen 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die mit 0,9 ml des entsprechenden sterilen Flüssigmediums befüllt wurden (siehe **2.8.2**).

Die Verdünnung beider Homogenisate erfolgte in 1:10er Schritten. Dabei wurden im Falle des Käferhomogenisats (siehe **2.9.1**) 1,0 ml mit einer sterilen Pipettenspitze in das erste Kulturröhrchen mit 9,0 ml Anreicherungslösung überführt, welches dann auf einem Wirbelmischer ca. 30 Sekunden lang gut durchmischt wurde (Verdünnungsstufe 10^{-1}). Aus diesem Röhrchen (10^{-1}) wurden erneut 1,0 ml steril entnommen, in das nächste Kulturröhrchen überführt und wieder gut durchmischt (Verdünnungsstufe 10^{-2}). In dieser Weise wurde so lange fortgefahren, bis schließlich die Verdünnungsstufe 10^{-9} erreicht war. Analog wurde mit dem Ei-Homogenisat verfahren. Das Volumen lag hier jedoch eine Zehnerpotenz niedriger.

Von allen Verdünnungsstufen der beiden mit Käfer- bzw. Ei-Homogenisat beimpften Pepton-Salz-Verdünnungsreihen (anschließend für weitere Untersuchungen zusammen mit allen anderen Verdünnungsreihen bei 37°C inkubiert; siehe **2.9.4**) wurden sofort 100 µl auf alle unter Punkt **2.8.1** als Universalmedium aufgeführten Plattenmedien aufgebracht. Die Suspension wurde anschließend mit einem Drigalsky-Spatel, welcher zuvor abgeflammt wurde, mit kreisenden Bewegungen vorsichtig in das jeweilige Medium eingearbeitet. Alle diese Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die mit dem Bakterienmaterial beimpften Platten wurden anschließend in einen Inkubationsschrank gestellt und bei 37°C für 24-72 Stunden - je nach Zellwachstum - bebrütet. Beimpfte Medien für Anaerobier wurden in einem Anaerobentopf unter Sauerstoffausschluss ebenfalls bei 37°C für 24-72 Stunden inkubiert. Von bewachsenen Platten (aerob und anaerob) wurden optisch unterschiedliche Kolonien (Farbe und Struktur der Kolonien, Zellmorphologie) einer jeden Verdünnungsstufe auf frischen, geviertelten Platten des entsprechenden Mediums vereinzelt. Nach einer erneuten Bebrütungsdauer von 24-72 Stunden bei 37°C wurden die gewachsenen, vereinzelt Kolonien auf alle unter **2.8.1** aufgeführten hemmstoffhaltigen Selektivmedien überimpft, die anschließend wiederum bei

37°C für 24-72 Stunden inkubiert wurden. Gewachsene, unterschiedliche Kolonien der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden schließlich wieder auf frischen, sich entsprechenden, geviertelten Platten ausgestrichen und abermals bei 37°C für 24-72 Stunden bebrütet. Mit dem Wachstum von Bakterien-Kolonien auf den tellurithaltigen Nährmedien wäre zudem ein weiteres Selektivitätskriterium zur Kultivierung des mit *Pseudomonas aeruginosa* sehr nah verwandten *Paederus*-Endosymbionten gegeben.

Die Gram-Eigenschaften aller gewachsenen, vereinzelt Kolonien wurden zusätzlich, unabhängig von der Gram-Selektivität der verschiedenen Medien, mit Hilfe des Aminopeptidase-Tests (siehe **2.9.5**) bestimmt. Zusätzlich wurde mit zwei weiteren Tests das Vorhandensein bestimmter Enzyme überprüft (siehe **2.9.6** und **2.9.7**). Alle mit den drei Test-Sets positiv getesteten Bakterien-Kulturen wurden anschließend, wie alle anderen isolierten Reinkulturen, mittels Diagnostischer-PCR (siehe **2.10.2.1**) untersucht. Dabei wurden sämtliche vereinzelt Kolonien, die nicht sofort untersucht werden konnten, mindestens einmal die Woche auf frische, geviertelte Platten mit dem jeweils entsprechenden Medium überimpft und bei 37°C inkubiert.

2.9.3 Ausstrichverfahren zur Isolierung von Bakterienkolonien

Die auf den verschiedenen Medien gewachsenen Kolonien, die sich in Farbe, Struktur und Morphologie unterschieden und somit für eine Vereinzeltung geeignet waren, wurden mit Hilfe des Verdünnungsausstrichs isoliert. Dabei wurde eine kleine Menge an Zellmaterial mit einer sterilen Platinimpföse von den Mischplatten isoliert und mit Hilfe des fraktionierten Drei-Impfösen-Ausstrich-Verfahrens (Ausglühen der Impföse nach jeder Strichserie) auf die verschiedenen Agar-Medien ausgestrichen. Im Idealfall gelangten spätestens bei den letzten Strichen nur noch einzelne Zellen in genügend weiten Abständen auf die Agaroberfläche, die bei der sich anschließenden Bebrütung zu isoliert liegenden Einzelkolonien heranwachsen konnten. Somit wurde sichergestellt, dass alle Kolonien, die aus den unterschiedlichen Verdünnungsstufen gewonnen werden konnten, für nachfolgende Untersuchungen in Form von Reinkulturen zur Verfügung standen.

2.9.4 Bestimmung eines geeigneten Anreicherungsmediums

Um herauszufinden, welches der verwendeten Flüssigmedien am besten für eine selektive Anreicherung des Endosymbionten geeignet wäre, wurden von jeder Verdünnungsstufe aller

Verdünnungsreihen nach eintägiger Bebrütungsdauer und nochmaligem sorgfältigen Durchmischen mit dem Wirbelmischer 1,0 ml Probe der Käfer- bzw. 0,1 ml Probe der Ei-Homogenisate mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Diese waren mit der jeweiligen Verdünnungsstufe und einem Kürzel des verwendeten Anreicherungsmediums gekennzeichnet und blieben bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C eingefroren. Die Probenentnahme wurde nach 5, 10 und 20 Tagen wiederholt, um ein mögliches Wachstum des *Paederus*-Symbionten verfolgen zu können. Dazwischen wurden sämtliche Verdünnungsreihen im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Alle fünf entnommenen Proben jeder Verdünnungsstufe einer jeden Verdünnungsreihe wurden schließlich mit Hilfe der diagnostischen PCR (siehe **2.10.2.1**) auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht, um herauszufinden, welche der eingesetzten Anreicherungsmedien die beste Nährstoffgrundlage für den Endosymbionten darstellte. Bei einem geeigneten Anreicherungsmedium sollte ein Vorhandensein des Symbionten auch in einer sehr hohen Verdünnungsstufe nachweisbar sein, da sich nach dem Verdünnen des *Paederus*-Homogenisats in den höchsten Verdünnungsstufen nur noch einzelne Endosymbiontenzellen befinden sollten, die in einem physiologisch ungeeigneten Medium nicht mehr vermehrungsfähig wären.

2.9.5 Aminopeptidase-Test

In der Mikrobiologie gilt dieser Test als sicherste Analyse-Methode zur Identifizierung der bakteriellen Gram-Eigenschaften und wurde daher - auch aufgrund seiner einfachen und schnellen Anwendbarkeit - der Methode der Gram-Färbung vorgezogen. Er dient dem Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase, ein in der Bakterienzellhülle lokalisiertes Enzym, das in relevanter Aktivität praktisch nur bei gramnegativen Mikroorganismen vorkommt.

Der Nachweis dieses Enzyms von aus *Paederus riparius* isolierten Mikroorganismen mit den Bactident Aminopeptidase-Teststäbchen (Merck, Deutschland) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.9.6 Katalase-Test

Der Katalase-Test ist ein weiterer Enzym-Test, der das Wasserstoffperoxid-spaltende Enzym Katalase nachweisen soll. Dieses Enzym kommt unter anderem bei allen

Pseudomonaden und Enterobakterien vor und spaltet Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2).

Dazu wurde eine 10%-ige H_2O_2 -Lösung (aus einer 30%-igen) durch Verdünnen mit VE-Wasser hergestellt. Anschließend wurde etwas Zellmaterial von allen Reinkulturen, die von *Paederus*-Weibchen isoliert werden konnten, auf einen sauberen Objektträger aufgebracht und mit einem Tropfen der verdünnten H_2O_2 -Lösung überschichtet. Eine unmittelbar danach einsetzende Gasentwicklung (O_2) zeigte das Vorhandensein des Enzyms Katalase an.

2.9.7 Oxidase-Test

Dieser Test dient der Unterscheidung von Enterobacteriaceen und Pseudomonaden. Er besitzt große diagnostische Bedeutung, da Vertreter beider Familien gramnegative, bewegliche, Katalase-positive Stäbchen darstellen. Der Oxidase-Test wurde durchgeführt, da alle Vertreter der Pseudomonaden die Enzyme der Atmungskette besitzen, unter anderem das Enzym Cytochromoxidase, welches mit diesem Test nachgewiesen werden kann. Dieses spezielle Enzym fehlt allen Vertretern der Enterobakterien.

Der Nachweis der Cytochromoxidase von aus *Paederus riparius* isolierten Mikroorganismen mit den Bactident Oxidase-Teststreifen (Merck, Deutschland) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

TEIL B: LOKALISIERUNG

2.9.8 Äußere Kompartimentierung von *Paederus riparius*-Weibchen

Um den Endosymbionten exakt in *Paederus riparius* lokalisieren zu können, wurden die Käfer als erstes, nachdem sie zwischendurch immer wieder in flüssigen Stickstoff getaucht wurden, mit einem scharfen Skalpell unter einem Binokular bei zehnfacher Vergrößerung in einzelne Teile zerlegt.

In der nachfolgenden Abbildung (**Abb. 14**) ist diese Kompartimentierung schematisch wiedergegeben.

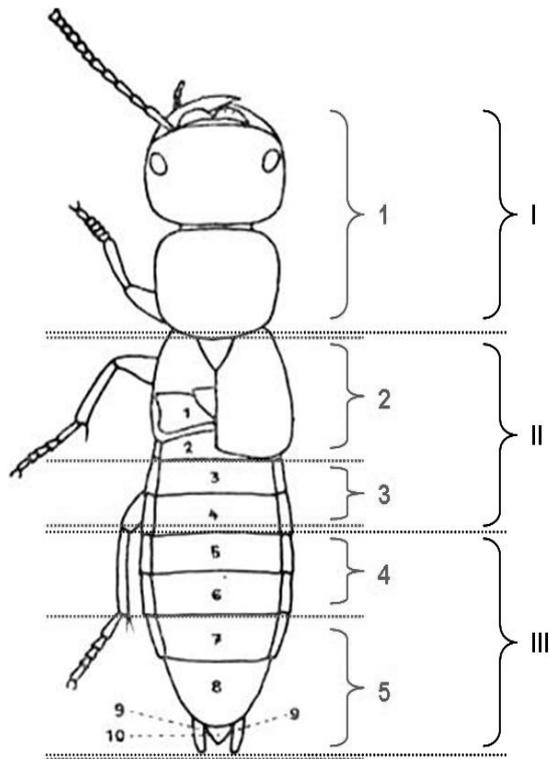


Abb. 14: Schematische Skizze eines Kurzflüglers mit den zwei bei *Paederus riparius* durchgeführten Schnittreihen. Geschwungene Klammern mit dahinter stehenden Zahlen stellen die verschiedenen Kompartimente dar, die auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht wurden. Zwischen den Klammern liegen die mit gestrichelten Linien markierten Schnittstellen.

Jedes einzelne Kompartiment (die Beine wurden dabei zusammen mit Kompartiment 2 bzw. II untersucht) wurde anschließend in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Zugabe von Flüssig-Stickstoff mit einem Micropistill zu einem feinen Pulver zerrieben und in 50 µl PCR-Wasser aufgenommen. Um eine möglichst homogene Lösung zu erhalten, wurde die Suspension auf einem Wirbelmischer bei niedriger Stufe sorgfältig durchmischt. Danach wurde kurz abzentrifugiert, um kleine, an der Wand des Reaktionsgefäßes anhaftende Rückstände wieder in Lösung zu bringen. Insgesamt wurden fünf dieser Schnittreihen aus zehn Käfer-Weibchen angefertigt, die anschließend mittels Diagnostischer-PCR (siehe 2.10.2.1) auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht wurden.

2.9.9 Innere Kompartimentierung von *Paederus riparius*-Weibchen

Ausgehend von den Ergebnissen der äußeren Kompartimentierung wurde eine Sektion des Abdomens der *Paederus*-Weibchen durchgeführt. Die Käfer wurden zum Abtöten für ca. 10 Minuten bei -20°C eingefroren und anschließend unter einem Binokular bei 20-40-facher Vergrößerung präpariert.

Zu Beginn wurde das Abdomen mit einem scharfen Skalpell direkt hinter den Elytren abgetrennt und in einigen Tropfen sterilem Millipore-Wasser auf einem Glasobjektträger

aufgenommen. Mit zwei Dumont-Pinzetten (INOX. 5; Spitzendurchmesser: 0,025 mm x 0,005 mm) wurden anschließend, dorsal von der Schnittstelle beginnend, die Tergite entfernt und der abdominale Darmtrakt mit Unterstützung von zwei speziellen Microfederscheren (Spitzendurchmesser: 0,15 mm, gerade Klingen und 0,1 mm, Klingen um 90° gewinkelt; Fine Science Tools, Deutschland) herauspräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in 100%igem Ethanol gelagert. Danach wurden die abdominalen Sternite entfernt und die zwischen Sternit III und IV ausmündende exokrine Komplexdrüse vorsichtig herauspräpariert. Sie wurde bis zur weiteren Untersuchung ebenfalls in 100%igem Ethanol aufbewahrt. Schließlich wurden eine noch nicht beschriebene Drüse, die seitlich das komplette Abdomen durchzieht und im letzten Segment mündet, der Großteil des Fettkörpers und der komplette weibliche Geschlechtstrakt mit Hilfe des Micropräparierbestecks entfernt und in Ethanol gegeben. Während der Sektion wurde das aufpräparierte Abdomen immer wieder mit sterilem Millipore-Wasser überschichtet und aufschwimmende Fett- und Gewebereste mit einem Stück Zellstoff vorsichtig aufgesogen.

Sich entsprechende Kompartimente von jeweils fünf *Paederus riparius*-Weibchen wurden schließlich in sterilen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 50 µl PCR-Wasser vereinigt, mit einer Microfederschere möglichst fein zerschnitten und das erhaltene Homogenisat anschließend mittels Diagnostischer-PCR (siehe 2.10.2.1) auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht. Nachfolgende Abbildung (Abb. 15) zeigt schematisch die innere Organisation der entfernten Kompartimente und die eingezeichnete Schnittstelle.

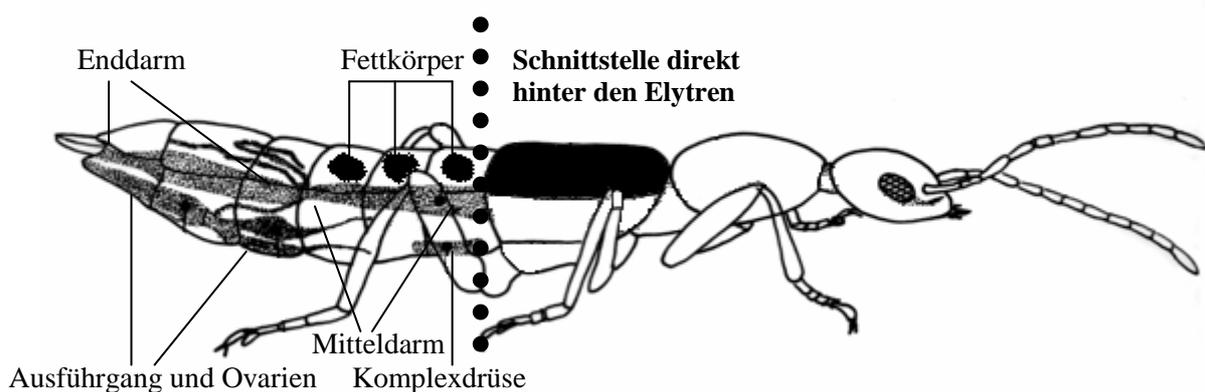


Abb. 15: Schematische Skizze von *Paederus riparius* mit gekennzeichneter Schnittstelle direkt hinter den Elytren (gekennzeichnete gepunktete Linie) und der ungefähren inneren Anordnung der herauspräparierten Kompartimente. Es fehlt die seitlich auf Höhe des Mittel- und Enddarms verlaufende, im letzten Segment mündende, unbeschriebene Drüse.

2.9.10 Kompartimentierung des weiblichen Geschlechtstrakts

Da der *Paederus*-Endosymbiont sich bei seiner Weitergabe an die Nachkommenschaft auf und/oder in den Eiern befindet, wurde zusätzlich eine Kompartimentierung des kompletten weiblichen Geschlechtstrakts (siehe **Abb. 16**) durchgeführt.

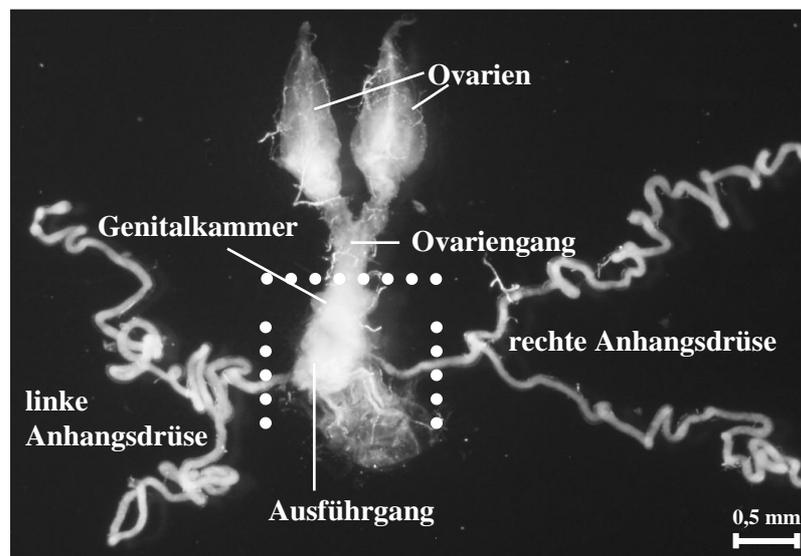


Abb. 16: Herauspräparierter weiblicher Geschlechtsapparat von *Paederus riparius*. Weiß gestrichelte Linien stellen die Schnittpunkte mit dem Skalpell dar.

Dies sollte Aufschluss über ein mögliches Vorhandensein des Endosymbionten in den einzelnen Kompartimenten und dessen Organisation darin geben. Insgesamt wurden fünf Geschlechtsapparate von *Paederus riparius*-Weibchen mit dem Skalpell in die folgenden vier Kompartimente zerteilt: Ovarien und Ovariengang, linke Anhangsdrüse, rechte Anhangsdrüse, Genitalkammer und Ausführgang. Die entsprechenden Teile wurden schließlich in sterilen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 50 µl PCR-Wasser vereinigt, mit einer Microfederschere möglichst fein zerschnitten und nach einer 5-minütigen Ultraschallbehandlung auf einem Wirbelmischer gut durchgemischt. Bis zu ihrer Untersuchung mittels Diagnostischer-PCR (siehe **2.10.2.1**) blieben die Proben bei -20°C eingefroren.

Von zehn zusätzlich herauspräparierten Geschlechtsapparaten wurden fünf vor ihrer Kompartimentierung in einer 4%igen PFA-Lösung (siehe **2.10.7.4**) für ca. 60 Minuten bei 4°C fixiert, um beim Schneiden mit dem Skalpell die In-Vivo-Organisation möglichst nicht zu verändern. Die einzelnen Teile wurden anschließend auf Adhäsions-Glasobjektträgern (SuperFrost Ultra Plus; Menzel, Deutschland) mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI

überschichtet (10-20 μ l, je nach Größe des Objekts) und für 10-15 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Nucleinsäurefarbstoff wurde nun mit Millipore-Wasser vorsichtig abgespült, und es wurden Quetschpräparate aus den einzelnen Kompartimenten hergestellt. Diese wurden anschließend bei verschiedenen Vergrößerungen im 100-fachen Phasenkontrast- und im DAPI-Fluoreszenzmodus betrachtet und digital dokumentiert.

Die fünf verbliebenen Geschlechtsapparate wurden in sterilem VE-Wasser mit einer Microfederschere vorsichtig horizontal aufpräpariert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe vollständig entwässert. Die Proben wurden anschließend auf Messingobjektträger aufgebracht, mit Goldstaub bedampft und im Rasterelektronenmikroskop untersucht, um Aufschluss über den Übertragungsweg des Endosymbionten auf die Eier zu erhalten (siehe **3.9**).

2.9.11 Mikrotomie (Semi-Dünnschnitt-Technik)

Um die in **Abb. 15** grob dargestellte innere Organisation der Kompartimente in Situ exakt bestimmen zu können, wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica Jung RM2035) Semi-Dünnschnitte des weiblichen Abdomens hergestellt. Ausgehend davon erfolgte in erster Linie eine exakte Lokalisierung des *Paederus*-Endosymbionten mit Hilfe von histologischen (Methylenblau-Färbung; siehe **2.9.11.3**) und nucleinsäurespezifischen Färbetechniken (DAPI-Färbung, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH); siehe **2.10.7**). Zusätzlich wurden Dünnschnitte von *Paederus riparius*-Eiern angefertigt, um die Organisation des Endosymbionten auf der Ei-Oberfläche und/oder im Ei-Inneren aufklären zu können.

Bevor man jedoch die Käferabdomina bzw. die Eier mit dem Mikrotom schneiden konnte, mussten die Proben fixiert und anschließend entwässert werden. Als Fixierungsreagenz wurde eiskalte 4%ige PFA-Lösung (siehe **2.10.7.4**) verwendet, in der frisch abgetötete Weibchen (10 Minuten Einfrieren bei -20°C) bzw. Eier für mindestens zwei Tage bei 4°C fixiert wurden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Käfer bzw. die Eier in der Fixierlösung (pro Käfer bzw. 10 Eier: 1,5 ml Fixierlösung in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß) vollständig untertauchten, um eine effektive Fixierung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben 2x mit phosphatgepufferter Saline (1x PBS, siehe **2.10.7.4**) gewaschen und den Weibchen das Abdomen mit einem Skalpell abgetrennt. Die fixierten Proben mussten nun in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30-, 50-, 85-, 95- und 100% Ethanol) entwässert werden, wobei die Verweildauer in jeder Konzentrationsstufe ca. 30 Minuten betrug. Um die fixierten und entwässerten Proben schließlich mit dem Mikrotom schneiden zu können,

mussten sie in ein spezielles Medium eingebettet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei verschiedene Medien mit unterschiedlichem Härtegrad verwendet: Paraffin und das Kunstharz UNICRYL (Plano GmbH, Deutschland). Für das Schneiden von ausgehärteten Paraffinblöcken wurde ein spezielles Einweg-Rasiermesser in den Halteschlitten des Mikrotoms eingespannt. Schnitt man jedoch UNICRYL-Harzblöcke, musste ein sehr hartes, mit gewinkelttem Schliff versehenes Messer vom Typ D eingespannt werden. Bei der Benutzung beider Klingen wurde am Mikrotom ein Schnittwinkel von 0° eingestellt, mit dem ein optimales Schnittergebnis erzielt werden konnte.

2.9.11.1 Paraffin-Einbettung

Für die Einbettung in Paraffin mussten die vollständig entwässerten Proben zuerst mit Hilfe des Intermediums Roticlear (Roth, Deutschland) ethanolfrei gemacht werden. Dies geschah über eine Ethanol-Roticlear-Reihe (je 1,5 ml in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen) mit den Mischverhältnissen Ethanol:Roticlear 3:1, 1:1 und 1:3. Die Verweildauer in jeder Konzentrationsstufe betrug dabei ca. 60 Minuten, bevor die Proben über Nacht in reinem Roticlear bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Am nächsten Tag schloss sich die Infiltrierung der Proben mit flüssigem Paraffin in einem 50 ml-Becherglas bei 60°C im Wärmeschrank an, wobei nach sechs Stunden das alte Paraffin (enthielt Reste von Roticlear) gegen neues ausgetauscht wurde, um eine 100%ige Sättigung zu erzielen. Die Proben wurden schließlich über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert, bevor sie in speziell dafür vorgesehene, blockähnliche Gummiformen gegeben wurden, die mit flüssigem Paraffin halb gefüllt waren. Die Proben wurden dabei mit einer Pinzette am oberen Ende der Form so angeordnet, dass die Seite, die zuerst geschnitten werden sollte nach vorne zeigte. Anschließend wurden die Förmchen vorsichtig mit weiterem Paraffin befüllt, bis es die Proben ca. 5 mm überragte. Nachdem die Blöcke bei Raumtemperatur ausgehärtet waren, wurden sie aus den Formen gelöst und das Paraffin mit einem Skalpell so weit entfernt, dass die eingegossenen Objekte nur noch von einem ca. 1-2 mm dicken Paraffinrand umgeben waren. Die ungetrimmte Seite der Blöcke wurde anschließend mit einem über der Bunsenbrennerflamme erhitzten Spatel bis zum Schmelzen des Paraffins erwärmt und durch Andrücken auf einem Holzklötzchen befestigt.

Mit dem Mikrotom wurden nun Querschnitte des kompletten Abdomens bzw. der Eier von 5-8 μm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel vom Mikrotommesser abgenommen und auf Glasobjektträger aufgebracht, die mit mehreren Tropfen VE-Wasser

versehen und auf einem 40°C heißen Wärmetisch vorgewärmt waren. Durch das warme Wasser breiteten sich faltige oder eingerollte Schnitte schnell aus. Nachdem das Wasser unter den Schnitten komplett verdunstet war, wurden die Objektträger über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert, um eine sichere Adhäsion zu gewährleisten.

Für die sich anschließenden Färbetechniken musste das Paraffin wieder aus den Schnitten entfernt werden. Dazu wurden die Glasobjektträger in einer Trogkammer mit Roticlear überschichtet und bei 60°C für ca. 20 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Abschließend erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100-, 85-, 50% Ethanol) für jeweils 10 Minuten, bevor die Objektträger an der Luft getrocknet wurden.

2.9.11.2 UNICRYL-(Kunstharz)-Einbettung

Bei UNICRYL handelt es sich um ein Acrylharz, welches für den universellen Einsatz in der Licht- und Elektronenmikroskopie entwickelt wurde. Die Vorteile des Harzes liegen sowohl in der Erhaltung der Gewebestrukturen als auch in der spezifischen Schneidcharakteristik begründet. Makromoleküle, Proteine und Nukleinsäuren liegen an der Oberfläche der Schnitte für das anschließende Färben offen, was dadurch zustande kommt, dass der Schnitt vor der Kante des Messers vom Harzblock abgespalten wird. UNICRYL besitzt zudem hervorragende Polymerisationseigenschaften, wodurch ein gleichmäßiges Eindringen des Harzes in das Proben-Gewebe gefördert wird. UNICRYL kann durch Wärme oder UV-Bestrahlung polymerisiert werden. Dabei wird die Schneideigenschaft des Harzes von der Aushärtegeschwindigkeit bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde UNICRYL durch Wärmepolymerisation ausgehärtet, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde. Die Polymerisation wurde im Falle der Abdomina in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt, die während des Prozesses verschlossen wurden, um ein Entweichen schädlicher Dämpfe zu vermeiden. Die abgetrennten Abdomina wurden dazu mit der angeschnittenen Seite auf dem Boden der Reaktionsgefäße zum Stehen gebracht und vorsichtig mit dem flüssigen Harzmedium überschichtet. Analog dazu wurden die Eier in 0,2 ml-PCR-Tubes auf dem Boden platziert, bevor sie mit dem Einbettmedium überschichtet wurden. Um einen zu starken Temperaturanstieg während der exothermen Polymerisations-Reaktion im Wärmeschrank (60°C) zu vermeiden, wurden die Reaktionsgefäße in einen Aluminiumblock gesteckt, der die überschüssige Wärme ableiten sollte.

Nach dem vollständigen Aushärten des UNICRYLS wurden die Reaktionsgefäße seitlich mit einem Skalpell aufgeschnitten und die Harzblöcke herausgedrückt. Anschließend wurde mit einer Diamantfräse (Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung ein möglichst kleines quadratisches Schnittfeld um die eingebettete Probe herum erzeugt. Die zugeschliffenen Harz-Proben wurden schließlich mit einer Heißklebepistole auf dafür vorgesehene Holzblöckchen aufgeklebt und konnten nun mit dem Mikrotom geschnitten werden, wobei die Dicke bei Quer- und Längsschnitten von Käferabdomina 3 μm , bei Querschnitten von Eiern 5 μm betrug. Die Schnitte wurden anschließend mit einer spitzen Pinzette vorsichtig von der Schnittfläche des Messers abgenommen und auf spezielle, teflonbeschichtete Objektträger mit acht ausgesparten Feldern (\varnothing 6 mm; Roth, Deutschland) aufgebracht. Jede Kammer des Objektträgers wurde zuvor mit einem Tropfen VE-Wasser versehen, der dann auf einem Wärmetisch bei 55°C vorgewärmt wurde. Unebene oder eingerollte Schnitte konnten sich dadurch schnell wieder ausbreiten. Durch die besondere Adhäsionswirkung des Glases, konnte sogar auf ein Aufbringen spezieller Haftstoffe oder Proteinbeschichtungen zum Anhaften der Gewebeschnitte verzichtet werden. Nachdem die Schnitte vollständig auf den Objektträgern angetrocknet waren, konnten sie für die verschiedenen Färbetechniken verwendet werden.

2.9.11.3 Methylenblau-Färbung

Um nun ein genaues Bild von der inneren Organisation der Kompartimente im Abdomen der Weibchen zu erhalten, wurde je eine Serie von Semi-Dünnschnitten aus der Paraffin- und der UNICRYL-Einbettung mit Methylenblaulösung (Fluka, Deutschland) angefärbt. Dazu wurde jeder Schnitt auf den Objektträgern mit einem Tropfen der Färbelösung überschichtet und bei Raumtemperatur für ca. 12 Minuten inkubiert. Um möglichst wenig Methylenblaulösung verwerfen zu müssen, wurden die aufgebrachten Tropfen mit einer Glaspipette abgesaugt und für die nächste Färbung wiederverwendet. Auf den Proben verbliebene Färbelösung wurde mit VE-Wasser über einem Spülbecken so lange abgespült, bis keine blauen Farbwolken mehr abgingen. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und digital dokumentiert.

Alle anderen angefertigten Schnittserien von Abdomina und Eiern wurden ausschließlich mit Nucleinsäure-Färbetechniken (DAPI, FISH; siehe **2.10.7**) untersucht, die eine exakte

Lokalisierung des *Paederus*-Endosymbionten in den histologischen Schnittpräparaten in situ erzielen sollten.

TEIL C: ISOLIERUNG

2.9.12 Isolierung des vermuteten Endosymbionten

Nach ersten frühen mikroskopischen Auswertungen von abdominalen Semi-Dünnschnitten und einigen Quetschpräparaten von Kompartimenten des Geschlechtsapparats konnte aus den Anhangsdrüsen frisch präparierter *Paederus riparius*-Weibchen ein in sehr großer Anzahl vorkommendes Bakterium mechanisch isoliert werden. Dazu wurde der komplette Geschlechtsapparat unversehrt aus den Weibchen herauspräpariert (Vorgehensweise siehe **2.9.9**) und der ihn umgebende Fettkörper und umspannende Tracheenäste vollständig entfernt. Anschließend wurde der „gesäuberte“ Geschlechtstrakt vorsichtig mit einer Pinzette in einige frische Tropfen steriles Millipore-Wasser überführt. Mit einer Microfederschere wurden nun die linke und rechte Anhangsdrüse abgetrennt und an mehreren, eng beieinander liegenden Stellen eingeschnitten. Die in Form von kleinen weißen Wölkchen austretende Masse wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in Volumina von jeweils 10 µl vorsichtig aufgesogen und in einem sterilen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt. Von beiden Anhangsdrüsen eines Geschlechtstrakts konnte auf diese Weise bis zu 100 µl Flüssigkeit mit Bakterienmaterial gesammelt werden, die bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert wurde. Insgesamt wurden die Anhangsdrüsen von 12 Weibchen eingeschnitten (Gesamtvolumen: 1,1 ml).

Zur Überprüfung, ob es sich bei der in den Anhangsdrüsen gefundenen Bakterienpopulation um den *Paederus*-Endosymbionten handelte, wurde die Bakterien-Flüssigkeit schließlich mit Hilfe der diagnostischen PCR (siehe **2.10.2.1**) untersucht. Zudem wurde sie mit verschiedenen Färbetechniken (Nucleinsäurefärbung (DAPI, FISH), siehe **2.10.7**; Geißelfärbung, siehe **2.9.13**) mikroskopisch untersucht (Lichtmikroskop: 100x Phasenkontrast, Fluoreszenzmodus, siehe **2.5**; Transmissions-Elektronenmikroskop, siehe **2.7**) und Bakteriengruppen-spezifischen Tests (Aminopeptidase-, Katalase- und Oxidase-Test; siehe **2.9.5-2.9.7**) unterzogen. Schließlich erfolgte eine DNA-Extraktion aus der Bakterien-Suspension. Die daraus erhaltene, aufgereinigte DNA wurde als Matrize für die 16S-PCR (siehe **2.10.2.2**) und die Touch-Down-PCR (siehe **2.10.2.3**) eingesetzt.

2.9.13 Geißelfärbung nach KODAKA et al. (1982)

Da es sich bei der Gruppe der Pseudomonaden um bewegliche Bakterien mit einer polaren Begeißelung (eine oder mehrere Geißeln) handelt und der *Paederus*-Endosymbiont sehr nah verwandt ist mit *Pseudomonas aeruginosa*, wurde mit einem speziellen Färbeverfahren versucht, möglicherweise vorhandene Geißeln des Endosymbionten mikroskopisch sichtbar zu machen.

Dazu wurde die aus den Anhangsdrüsen isolierte Bakterienpopulation (siehe **2.9.10**) mit Hilfe dieser Methode untersucht. Für die Herstellung der fertigen Färbelösung wurden eine Beizmittellösung und eine Farbstofflösung (siehe **Tab. 3**) im Verhältnis 1:10 gemischt.

Tab. 3: Reagenzien für die Herstellung des Beizmittels und der Farbstofflösung zur Geißelfärbung nach KODAKA et al. (1982).

Lösung A: Beizmittel	
Tannin (Gerbsäure)	10,0 g
5%ige wässrige Phenollösung (5,0 g Phenol in 100 ml VE-Wasser)	50,0 ml
gesättigte wässrige Alaunlösung (ca. 60 g/l)	50,0 ml
Lösung B: Farbstofflösung	
gesättigte Kristallviolettstammlösung in Ethanol (96%)	10,0 ml
Lösungen A und B werden miteinander gemischt. Die gebrauchsfertige Lösung muss nicht filtriert werden und ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.	

Auf einen Glasobjektträger wurden nun zwei getrennte Tropfen VE-Wasser gegeben, in deren Oberflächenmitte nacheinander die Schnittfläche einer frisch abgetrennten Anhangsdrüse vorsichtig eingetaucht wurde, so dass sich die Bakterienzellen auf der Tropfenoberfläche verteilen konnten. Bevor der Objektträger mit Färbelösung überschichtet wurde, ließ man die Tropfen bei Raumtemperatur eintrocknen. Nach einer Einwirkzeit von ca. 5 Minuten wurden sowohl die Vorder- als auch die Rückseite des Objektträgers mit Leitungswasser für 2-3 Minuten gründlich abgespült und luftgetrocknet. Die Proben wurden anschließend lichtmikroskopisch bei einer 1000-fachen Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl betrachtet und digital dokumentiert.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Extraktion von DNA-Material

DNA wurde ausschließlich aus Bakterienkolonien isoliert, welche Reinkulturen darstellten. Kolonien, die auf tellurithaltigen Medien wuchsen, wurden vor einer DNA-Isolierung auf das entsprechende, telluritfreie Medium überimpft, um Kontaminationen durch das in den Bakterienzellen eingelagerte elementare Tellur zu vermeiden. Die Extraktion wurde dabei mit dem DNA-Isolations-Kit „DNeasy Tissue Kit“ (Qiagen, Deutschland) durchgeführt, wobei nach dem Protokoll „Isolation of Total DNA from Animal Tissues“ verfahren wurde. Die Extraktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mitte der 1980er Jahre wurde mit der Polymerase-Kettenreaktion von Kary Mullis eine Methode entwickelt, die eine spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten aus komplexen Nucleinsäure-Gemischen ermöglichte. Da die Primer bestimmen, welche DNA-Sequenz amplifiziert wird, ist es nicht nötig, das gewünschte DNA-Segment aus dem Ausgangsmaterial zu isolieren, bevor die PCR-Reaktion gestartet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei verschiedenen PCR-Methoden gearbeitet - die Diagnostische-PCR (siehe **2.10.2.1**), die 16S-PCR (siehe **2.10.2.2**) und die Touch-Down-PCR (siehe **2.10.2.3**).

2.10.2.1 Diagnostische-PCR

Die Diagnostische-PCR dient ausschließlich dem Nachweis eines ganz bestimmten Bakteriums. Dabei wird das Vorhandensein der Mikroorganismen durch die Amplifikation einer einzigartigen Basensequenz, die sich auf einem ausgewählten Zielgen befindet, zuverlässig detektiert - im Falle des *Paederus*-Endosymbionten ist dies eine einzigartige, 157 Basenpaare lange Abfolge auf den Pederin-Synthesegenen, deren Amplifikation das Vorhandensein des Endosymbionten zuverlässig anzeigt.

Bei allen Untersuchungen von Gewebeproben, die aus den Lokalisierungs- und Isolierungsexperimenten stammten, wurde Gewebehomogenisat als Matrizen-DNA im PCR-Ansatz eingesetzt. Im Falle von isolierten Reinkulturen aus den Kultivierungsexperimenten

wurde mit der Spitze eines sterilen Zahnstochers von jeder zu untersuchenden Kolonie eine geringe Menge an Bakterienmaterial abgenommen und direkt in den fertigen PCR-Ansatz überführt (Direkt-PCR).

2.10.2.2 16S-PCR

Diese PCR-Methode basiert auf der Amplifikation der 16S rRNA-Gene, deren Analyse heute eine anerkannte Methode zur Einordnung einer Art in den universellen Stammbaum des Lebens und zur Ermittlung der nächst verwandten Arten darstellt. Die rRNA-Moleküle gelten daher als ideale molekulare Chronometer, mit deren Hilfe sich verwandtschaftliche Beziehungen unter allen Organismen rekonstruieren lassen.

Von einigen ausgewählten Reinkulturen aus den Kultivierungsexperimenten wurden die vollständigen 16S rRNA-Gene (1,5 kb) amplifiziert, um Ausgangsmaterial für eine Sequenzierung zu erhalten. Mit dieser DNA erfolgte schließlich ein phylogenetischer Vergleich mit dem Endosymbionten, dessen 16S rRNA-Sequenz bereits entschlüsselt und veröffentlicht wurde (KELLNER, 2001). Für die Untersuchungen wurde außerdem aufgereinigte DNA aus den Anhangsdrüsen von *Paederus riparius*- und *Paederus sabeus*-Weibchen (leben ausschließlich auf dem afrikanischen Kontinent) als Matrize eingesetzt.

2.10.2.3 Touch-Down-PCR

Unter den Pseudomonaden gibt es auch einige Vertreter, die unter anoxischen oder mikroaerophilen Bedingungen zur Denitrifizierung befähigt sind, wie z. B. *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* (STANIER et al., 1966). Da der *Paederus*-Endosymbiont sehr nah verwandt ist mit *Pseudomonas aeruginosa*, wurde mit der hier beschriebenen PCR-Methode das Vorhandensein von spezifischen Enzymen, die an der bakteriellen Denitrifikation beteiligt sind, überprüft. Dies sollte für zukünftige Kultivierungs-Experimente zusätzlich mögliche Wachstumsbedingungen und Nährstoffanforderungen des Endosymbionten entschlüsseln.

Für die Amplifikation von Teilsequenzen der N₂O- (*nosZ*: 1,0 kb) und Nitrit- (*nirK*: 0,5 kb; *nirS*: 0,9 kb) Reduktase-Gene wurde zur Erhöhung der Spezifität jeweils eine so genannte Touch-Down-PCR durchgeführt. Bei dieser PCR-Methode wird die Annealing-Temperatur zunächst deutlich höher eingestellt, als die ermittelte Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Bei jedem Zyklus wird anschließend die Temperatur um eine konstante

°C-Zahl erniedrigt, bis die für die jeweils eingesetzten Primer optimale Annealing-Temperatur erreicht ist (siehe **2.10.2.7**).

Als Matrize für die Denitrifikanten-Primer diente hierbei aus den Anhangsdrüsen von *Paederus riparius*-Weibchen aufgereinigte DNA. Zum Vergleich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitanalysiert. Dabei handelte es sich um aufgereinigte DNA von *Pseudomonas aeruginosa* (fähig zur Denitrifikation) und *Escherichia coli*.

2.10.2.4 PCR-Reaktionsmix

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem T1-Thermocycler (Biometra, Deutschland) jeweils in 50 µl Reaktionsansätzen mit dem Taq DNA Polymerase Kit (1000 U; Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Dabei bestand ein Reaktionsansatz aus den in der folgenden Tabelle (**Tab. 4**) aufgeführten Einzelbestandteilen:

Tab. 4: Bestandteile eines PCR-Reaktionsansatzes und dafür benötigte Volumina.

PCR-Wasser (sterilfiltriertes, autoklaviertes Millipore-Wasser)	* 20,8 µl
5x Q-Solution	10,0 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl
dNTP Mix (2 mM)	5,0 µl
Primer F (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer R (10 pmol/µl)	2,5 µl
Taq (5 U)	0,2 µl
Gewebehomogenisat/aufgereinigte DNA	** 4,0 µl

für die Reinkultur-Untersuchungen wurden eingesetzt: * 24,8 µl; ** Zahnstoher-Spitze einer Reinkultur

In der Regel wurden 10-15 PCR-Ansätze gleichzeitig angesetzt. Hierbei war es von großem Vorteil, zunächst einen Mastermix aus allen oben aufgeführten Grundbestandteilen (bis auf die Matrizen-DNA) in der angegebenen Reihenfolge herzustellen. Bei x Ansätzen wurde dazu die (x+1)-fache Menge der oben aufgeführten Lösungen in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und dort gut gemischt. Für die Amplifizierung wurden schließlich jeweils 46 µl dieses Mastermixes in ein PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) vorgelegt und anschließend mit der Matrizen-DNA versehen. Bei Untersuchungen von Reinkulturen aus den Kultivierungsexperimenten wurden 50 µl Mastermix vorgelegt, da die Matrizen-DNA nicht

als 4 µl wässrige Lösung zugegeben wurde und daher der PCR-Wasser-Anteil um 4 µl erhöht wurde.

2.10.2.5 Verwendete PCR-Primer und PCR-Programme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden zur Amplifikation von Teilstücken der Pederin-Synthese-, der Nitrit- und N₂O-Reduktase-Gene und der vollständigen 16S rRNA-Gene eingesetzt und sind in **Tab. 5** aufgeführt.

Tab. 5: Sequenz, Position und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer. Vorwärts gerichtete Primer sind mit F (Forward) gekennzeichnet, rückwärts gerichtete mit einem R (Reverse).

Primer	Sequenz (5'-3')	T _m (°C) ¹	Ziel-Gen	Position	Referenz
KS1F	TGG CAT CGT GGG GAA AGG CTG	64	<i>ped</i> -Cluster, <i>Paederus</i> - Endosymbiont	Pederin- Gene	PIEL, 2002
KS1R	GGC GCA GGT GCT GAC ACG C	65	<i>ped</i> -Cluster, <i>Paederus</i> - Endosymbiont	Pederin- Gene	PIEL, 2002
GM3F	AGA GTT TGA TCM TGG C	46-48	16S rRNA, Bacteria	8-23 ²	MUYZER et al., 1995
GM4R	TAC CTT GTT ACG ACT T	44	16S rRNA, Bacteria	1492-1507 ²	MUYZER et al., 1995
nosZ661F	CGG CTG GGG GCT GAC CAA	57	<i>nosZ</i> , universell	661-678 ³	SCALA et al., 1999
nosZ1773R	ATR TCG ATC ARC TGB TCG TT ⁸	46-52	<i>nosZ</i> , universell	1753-1773 ³	SCALA et al., 1999
PsNosZ175F	TTC ATC AAC GAC AAG GCC	48	<i>nosZ</i> , Pseudomonaden	783-800 ³	SCALA et al., 1999
PsNosZ1144R	CGG TGG GCA GGA AGC GGT	57	<i>nosZ</i> , Pseudomonaden	1720-1738 ³	SCALA et al., 1999
nirK1F	GGM ATG GTK CCS TGG CA ⁶⁹	54-58	<i>nirK</i> , universell	526-542 ⁴	BRAKER et al., 1998
nirK5R	GCC TCG ATC AGR TTR TGG	54-58	<i>nirK</i> , universell	1023-1040 ⁴	BRAKER et al., 1998

nirS1F	CCT AYT GGC CGC CRC ART ¹⁰	56-62	<i>nirS</i> , universell	763-780 ⁵	BRAKER et al., 1998
nirS6R	CGT TGA ACT TRC CGG T	48-50	<i>nirS</i> , universell	1638-1653 ⁵	BRAKER et al., 1998

¹Schmelzpunkt berechnet nach $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)^\circ C$ (SUGGS et al., 1981); ²bezogen auf das 16S rRNA-Gen von *E. coli* (BROSIUS et al., 1978); ³bezogen auf das *nosZ*-Gen von *Pseudomonas stutzeri* (SCALA et al., 1999); ⁴bezogen auf das *nirK*-Gen von *Alcaligenes faecalis* (BRAKER et al., 1998); ⁵bezogen auf das *nirS*-Gen von *Pseudomonas stutzeri* (BRAKER et al., 1998); ⁶K = T, U oder G; ⁷M = C oder A; ⁸R = A oder G; ⁹S = C oder G; ¹⁰Y = C, T oder U.

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Deutschland) synthetisiert. Zur Herstellung einer Stammlösung mit einem Lösungsvolumen von 100 pmol/µl wurden diese mit PCR-Wasser verdünnt. Die Konzentration der fertigen Arbeitslösung betrug schließlich 10 pmol/µl und wurde durch eine weitere, zehnfache Verdünnung mit PCR-Wasser erreicht. Primer-Stamm- bzw. Arbeitslösungen wurden bei -20°C gelagert. Sämtliche Arbeitsschritte bei der Herstellung von PCR-Ansätzen erfolgten unter Verwendung von sterilen Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen und fanden auf Eis statt.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme für die Durchführung der diagnostischen PCR, der 16S-PCR und der Touch-Down-PCR sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 6 A, B) zusammengefasst.

Tab. 6 A: PCR-Programme zur Durchführung der diagnostischen PCR und der 16S-PCR.

#	Primer (Programmname)	KS1F/KS1R (MK-2)		GM3F/GM4R (AK-6)	
		T (°C)	Zeit (min.)	T (°C)	Zeit (min.)
1	Anfangs- Denaturierung	96	5	94	3
2	Denaturierung	96	½	94	½
3	Annealing	57	½	50	2
4	Elongation	72	1	72	1
5	Zyklus: Schritt 2-4	35x		33x	
6	End-Elongation			72	10
7	Ende	4	∞	4	∞

Tab. 6 B: PCR-Programme zur Durchführung der Touch-Down-PCR.

#	Primer (Programmname)	nosZ661F/ nosZ1773R (MK-NOS)		PsNosZ175F/ PsNosZ1144R (MK-PSNOS)		nirK1F/nirK5R nirS1F/nirS6R (MK-NIRKNIRS)	
		T (°C)	Zeit (min.)	T (°C)	Zeit (min.)	T (°C)	Zeit (min.)
1	Anfangs- Denaturierung	94	5	94	5	94	5
2	Denaturierung	94	1	94	1	94	1
3	Annealing	60	1	63	1	56	1
4	Elongation	72	3	72	3	72	3
5	Zyklus: Schritt 2-4 (touch-down)	8x; Annealing- Temperatur wird um je 0,5°C abgesenkt		10x; Annealing- Temperatur wird um je 0,5°C abgesenkt		10x; Annealing- Temperatur wird um je 0,5°C abgesenkt	
6	Denaturierung	94	1	94	1	94	1
7	Annealing	56	1	58	1	51	1
8	Elongation	72	3	72	3	72	3
9	Zyklus: Schritt 6-8	27 x		27 x		20 x	
10	End-Elongation	72	5	72	5	72	5
11	Ende	4	∞	4	∞	4	∞

2.10.3 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

DNA-Amplifikate der 16S-PCR wurden vor den sich anschließenden Untersuchungen (siehe **2.10.4** und **2.10.6**) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt, um im Ansatz vorhandene niedermolekulare Moleküle und die für deren Amplifikation eingesetzten Primer abzutrennen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zusätzlich wurde die DNA-Konzentration der 16S-PCR-Amplifikate vor ihrer weiteren Untersuchung bestimmt. Dazu wurden die aufgereinigten Proben einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe **2.10.5**) unterzogen und sichtbar gemacht. Anhand der bekannten DNA-Konzentration eines auf dem Agarosegel mitgelaufenen DNA-Standards konnte die Konzentration in der DNA-Probe abgeschätzt werden. Eine wesentlich genauere und zudem Material und Zeit sparende Methode stellte die Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop-Spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop, USA) dar, der ein Probenvolumen von 1 µl DNA-Lösung innerhalb von 10 Sekunden analysieren konnte.

2.10.4 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Mit dem Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus lassen sich sehr nah verwandte Organismen auf molekularer Ebene unterscheiden. Aufgrund unterschiedlicher DNA-Sequenzen ergeben sich durch den Einsatz von spezifischen Enzymen, so genannten Restriktionsendonucleasen, verschiedene Schnittmuster. Unterschiedliche Restriktionsendonuclease-Schnittstellen haben zur Folge, dass sich die entstehenden Fragmente in ihrer Länge unterscheiden. Dabei kann die Länge eines Restriktionsfragments durch Mutationen auf der DNA beeinflusst werden, bei der eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym entsteht oder verloren geht. Beim so genannten PCR-RFLP wird zunächst ein bestimmter DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert und die gebildeten DNA-Fragmente anschließend mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen verdaut, bevor das Schnittmuster mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann. Die Übereinstimmung bzw. der Unterschied der sichtbar gemachten Schnittmuster wird genutzt, um einzelne Arten voneinander zu unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine RFLP-Analyse der 16S rDNA des *Paederus*-Endosymbionten durchgeführt. Diese spezielle Form des RFLP wird auch als „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA) bezeichnet. Dabei wurden die aus den Anhangsdrüsen amplifizierten und aufgereinigten 16S rRNA-Gene des Endosymbionten von *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* und die aufgereinigten 16S rRNA-Gene von *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida* mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (siehe **Tab. 7**) nach den Angaben des Herstellers (Fermentas, Deutschland) für 4 Stunden verdaut.

Tab. 7: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Erkennungssequenzen auf der DNA.

Restriktionsenzym (Quelle)	tetramere palindrome Erkennungssequenz auf der DNA
Bsh1236I (aus <i>Bacillus sphaericus</i>)	5'...C G ↓ C G...3' 3'...G C ↑ G C...5'
MboI (aus <i>Moraxella bovis</i>)	5'...↓G A T C...3' 3'...C T A G↑...5'
RsaI (aus <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>)	5'...G T ↓ A C...3' 3'...C A ↑ T G...5'

Zunächst wurde mit dem Onlinetool DistinctiEnz (<http://www.biorcgld.org/public/home.php>) ein virtueller RFLP mit den bereits von

KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenzen des Endosymbionten von *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* durchgeführt. Die virtuell erzeugten Schnittmuster wurden anschließend mit den in vitro erhaltenen Fragmenten, die auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht wurden, verglichen. Dies sollte der Überprüfung der von KELLNER (2001) veröffentlichten endosymbiontischen Sequenzen dienen und bestätigen, dass es sich bei den aus *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* isolierten Endosymbionten phylogenetisch betrachtet um eine einzige Art handelt. Eine Überprüfung erschien in erster Linie deshalb sinnvoll zu sein, da beide *Paederus*-Arten auf voneinander getrennten Kontinenten beheimatet sind und deshalb eine Aufspaltung des Endosymbionten aus evolutionärer Sicht in verschiedene, eigenständige Arten bereits stattgefunden haben kann.

2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese (Überprüfung von PCR-Produkten)

Um PCR-Produkte qualitativ überprüfen zu können, wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden, je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente, verschiedene Agarose-Konzentrationen eingesetzt. Die Agarose-Konzentration der Gele für die Überprüfung von Amplifikaten der Diagnostischen PCR betrug stets 1,5%. Im Falle von Amplifikaten der 16S- und der Touch-Down-PCR betrug sie 1% und für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bei RFLP-Analysen 2%.

Für die Herstellung eines Gels wurden in allen Fällen 50 ml 1x TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,3) und die entsprechende Menge Agarose (0,5 g; 0,75 g; 1,0 g/NEEO, Ultra-Qualität; Roth, Deutschland) benötigt. Das Agarose-Puffer-Gemisch wurde anschließend in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis sich eine klare, schlierenfreie Lösung bildete, und mit 2 µl einer 1%-igen Ethidiumbromid-Lösung (Roth, Deutschland) versehen. Das Gel wurde schließlich in eine vorbereitete Form gegossen und nach seinem Erstarren in eine Elektrophorese-Kammer mit so viel 1xTBE-Puffer gegeben, dass es vollständig eintauchte.

Auf einem Stück Parafilm wurden nun entsprechend der Anzahl der aufzutrennenden PCR-Amplifikate jeweils 2 µl 6x Orange Loading Dye Solution (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,15% Orange G; 0,03% Xylene Cyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA; Fermentas, Deutschland) vorgelegt und mit je 5 µl DNA-Probe vermischt. Anschließend wurde jede vorbereitete Probe vorsichtig in eine freie Kammer des Gels pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Im Falle der 1%igen und 2%igen Gele betrug die Laufzeit stets 100 bzw. 120 Minuten bei 80 Volt und 400 mA, bei den 1,5%igen Gelen 60 Minuten bei 90 Volt und 400 mA. Als DNA-

Längenstandards wurden O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder (Konz: 100 ng/μl; Fermentas, Deutschland), O'RangeRuler™ 1kb DNA Ladder (Konz: 100 ng/μl; Fermentas, Deutschland) und Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (Konz: 500 ng/μl; Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde jedes Gel in einer Transiluminations-Kammer unter UV-Licht mit einer Spezialkamera dokumentiert und am Computer endbearbeitet.

2.10.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruch-Methode)

Eine DNA-Sequenzierung nach Sanger entspricht im Prinzip einer PCR mit nur einem Primer. Da bei dieser Methode ebenfalls mit verschiedenen Temperaturzyklen gearbeitet wird, spricht man vom so genannten Cycle-Sequencing.

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit (Amersham, Deutschland) an einem LiCOR-Sequencer (Long Readir L4200L-2G). Die zu sequenzierenden DNA-Proben, die von ausgewählten Reinkulturen aus den Kultivierungsexperimenten stammten, wurden dabei mit je zwei unterschiedlich fluoreszierenden Sequenzier-Primern (07F/1507R: 5'-IRD700/800-markiert; siehe **Tab. 8**) in je vier Ansätzen mit den modifizierten Nucleotiden inkubiert und anschließend auf ein Polyacrylamid-Sequenziergel (Millipore-Wasser, 26 ml; Harnstoff, 16,8 g; 50 % Long Ranger Gel, 3,2 ml; 10xTBE-Puffer, 4,0 ml) aufgetragen. Das eingesetzte Volumen war dabei abhängig von der Konzentration der jeweiligen Proben-DNA.

Tab. 8: Sequenz und Position der verwendeten, mit IRD700/800 markierten Sequenzier-Primer.

Sequenzier-Primer	Sequenz (5'-IRD700/800.....-3')	Position
GM3F	AGA GTT TGA TCM TGG C	8-23
GM4R	TAC CTT GTT ACG ACT T	1492-1507

Das Gemisch der erhaltenen DNA-Fragmente wurde nun elektrophoretisch über 12 Stunden (45°C, 2800 Volt, 40mA, 95 W) aufgetrennt. Durch die Verwendung der IRD700/800-markierten Primer konnten die entstandenen Banden mittels eines computergesteuerten Lasers zur Fluoreszenz angeregt und detektiert werden. Zur Entschlüsselung der unbekannt Sequenz einer jeden Probe wurden die unterschiedlichen Lauflängen der Banden aus den vier Ansätzen miteinander verglichen und daraus mit Hilfe des Programms e-Seq V2.0 die Sequenz des Vorwärts- und des Rückwärtsstrangs bestimmt. Die eigentliche Analyse der 16S

rRNA-Gene erfolgte schließlich mit den beiden Programmen PreGap4 und Gap4 aus dem Softwarepaket Staden Package. Dabei wurden die Sequenzen des Vorwärts- und des Rückwärtsstranges quasi übereinander gelegt und nach der Eliminierung von Sequenzierfehlern zu einem so genannten Consensus-Strang zusammengefügt. Die so erhaltene vollständige Sequenz wurde nun an eine öffentliche Datenbank übermittelt (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), wo ein Abgleich mit bereits entschlüsselten Sequenzen erfolgen konnte. Alternativ dazu wurden die aus den Anhangsdrüsen von *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* amplifizierten 16S rDNA-Proben des Endosymbionten von der Firma MWG-Biotech AG (Deutschland) mit den Primern GM3F und GM4R sequenziert. Sämtliche Schritte zur Probenvorbereitung sowie das Gießen und der Einbau des Sequenziergels in den LiCOR-Sequencer fanden nach den Angaben des Herstellers am Lehrstuhl für Pflanzensystematik statt und wurden größtenteils von Frau Andrea Kirpal durchgeführt. In der folgenden Abbildung (Abb. 17) ist der Ablauf einer Sequenzierreaktion nach Sanger schematisch dargestellt.

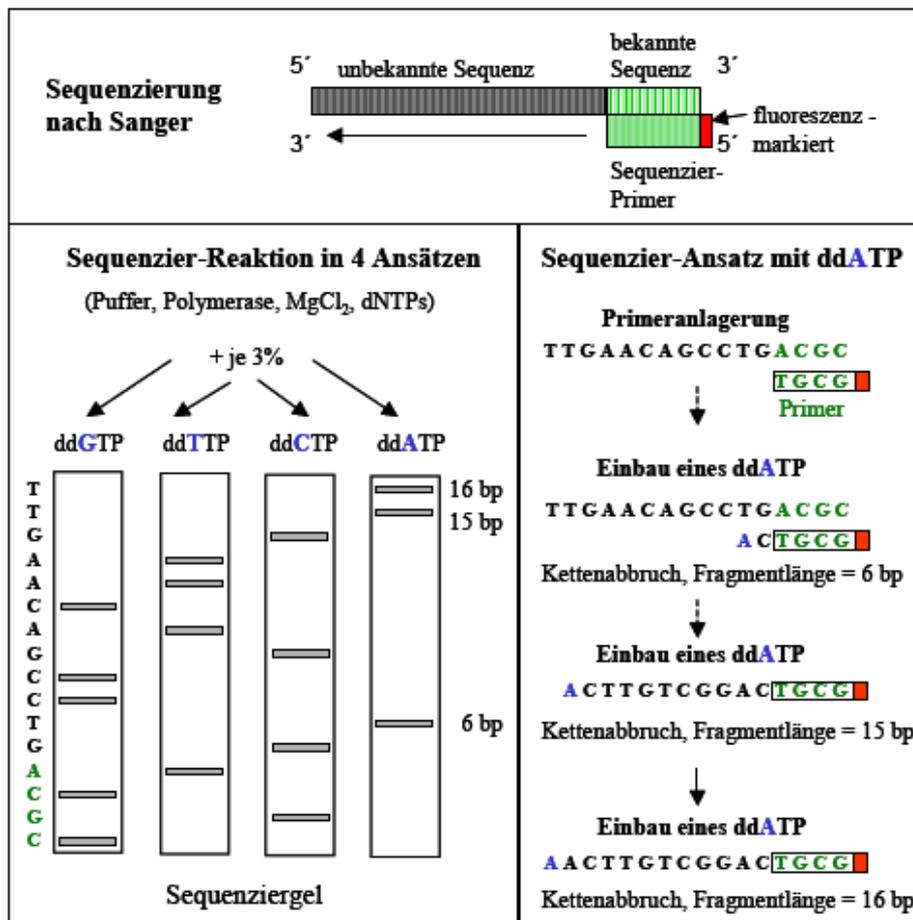


Abb. 17: Schematische Darstellung der Sequenzierung nach Sanger.

2.10.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurde Ende der 80er Jahre zum ersten Mal von GIOVANNONI et al. (1988) und AMANN et al. (1990) beschrieben und gilt seitdem als Durchbruch in der mikrobiellen Ökologie. Es handelt sich bei dieser Methode um eine spezifische Nucleinsäure-Färbetechnik, mit deren Hilfe fixierte ganze Zellen durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Oligonucleotid-Sonden mikroskopisch lokalisiert und identifiziert werden können. Dabei bietet die FISH die Möglichkeit einer Charakterisierung von Bakterien bestimmter phylogenetischer Gruppen, ohne diese vorher kultivieren zu müssen. Diese Spezifität beruht auf der besonderen Organisation der ribosomalen RNA. Durch vergleichende Sequenzanalysen lassen sich auf der 16S-Untereinheit der Ribosomen kurze Bereiche (15-25 Nucleotide lang) ermitteln, die auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen entweder konserviert oder einzigartig sind und so die Identifizierung von der Art bis hin zur Domäne erlauben. Diese als Signatursequenzen bezeichneten Bereiche auf der 16S rRNA dienen als komplementäre Zielsequenz für fluoreszenzmarkierte Oligonucleotid-Sonden, welche spezifisch mit diesen Sequenzen hybridisieren.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotid-Sonden - bis auf zwei (siehe **2.10.7.3/4**) - waren an ihrem 5'-Ende mit dem Sulfoindocyanin-Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3',3'-tetramethylindolocarboocyanin-N-hydroxysuccinimidester) markiert und wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Deutschland) synthetisiert. Zur Herstellung einer Stammlösung mit einem Lösungsvolumen von 100 pmol/ μ l wurden die Sonden mit PCR-Wasser verdünnt. Die Konzentration der fertigen Arbeitslösung betrug 50 ng/ μ l. Sonden-Stamm- bzw. Arbeitslösungen wurden bei -20°C gelagert.

Sämtliche Arbeitsschritte bei der Herstellung erfolgten unter Verwendung von sterilen Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen und fanden im leicht abgedunkelten Raum auf Eis statt.

2.10.7.1 Sonden-Design

Um den *Paederus*-Endosymbionten in Semi-Dünnschnitten von Eiern und Abdomina weiblicher *Paederus riparius* bzw. in Quetschpräparaten des weiblichen Geschlechtstrakts eindeutig mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung lokalisieren zu können, musste als erstes eine für den Endosymbionten spezifische Gensonde entwickelt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von Dr. Marcus Horn am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie mit dem Programm Probe Design aus dem Softwarepaket ARB (<http://www.arb-home.de>). Die Aufgabe dieses

Programms besteht in der Auswahl einer Oligonucleotid-Sequenz, die zu einem bestimmten Bereich einer Zielsequenz komplementär ist und mindestens eine Basenfehlpaarung (mismatch) in demselben Bereich aller anderen Sequenzen, den so genannten Nicht-Zielsequenzen, aufweist. Dazu berechnete Probe Design, ausgehend von der 16S ribosomalen DNA-Sequenz des Endosymbionten von *Paederus riparius* (KELLNER, 2001), mehrere potentielle Zielsequenzen über die ARB-Datenbank, von denen die entsprechenden reversen Komplemente potentielle Sondensequenzen darstellten. Die jeweiligen Zielsequenzen wurden nun zur weiteren Analyse mit dem Unterprogramm PROBE MATCH auf ihre vermutete Spezifität hin untersucht. Dabei wurden sie mit allen anderen Sequenzen aus der ARB-Datenbank verglichen und auf das Vorhandensein von mismatches hin untersucht. Um nun eine der von Probe Design vorgeschlagenen Sonden als geeignete auszuwählen, musste darauf geachtet werden, dass diese im Vergleich zu allen Nicht-Zielsequenzen immer eine oder mehrere Fehlbasen aufwies, die idealerweise in der Mitte des Zielstranges lokalisiert waren. Die destabilisierenden Effekte auf eine mögliche Fehl-Hybridisierung mit Nicht-Zielsequenzen konnten so maximiert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der überprüft werden musste, war die ribosomale Zugänglichkeit der auszuwählenden Sonde, die einen limitierenden Faktor der FISH darstellen kann. Dabei wurde ein von FUCHS et al. (1998) beschriebenes 16S rRNA-Sekundärstruktur-Modell über die Verteilung relativer Fluoreszenzintensitäten von Oligonucleotid-Sonden bei *E. coli* als grober Anhaltspunkt für die nähere Auswahl benutzt. Vom Programm vorgeschlagene Sonden, deren Hybridisierungsstellen in Bereichen mit sehr geringer Zugänglichkeit (unter 10%) und somit relativer Fluoreszenzintensität lagen, wurden deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Anschließend musste die Spezifität der ausgewählten Sonde gegenüber allen öffentlich verfügbaren DNA-Sequenzen überprüft und bestätigt werden, wofür das Onlinetool BLASTN (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet wurde.

Die Sonde wurde schließlich, gemäß der allgemeinen Kurzschrift-Nomenklatur, nach der mit drei Buchstaben abgekürzten Ziel-Gruppe (in diesem Fall der *Paederus*-Endosymbiont) und der Hybridisierungsstelle auf der Zielsequenz benannt - Pae444.

2.10.7.2 Sonden-Evaluierung

Nachdem mit Pae444 eine endosymbionten-spezifische Sonde mit Probe Design entwickelt war und synthetisiert wurde, musste diese in vitro auf ihre Spezifität hin überprüft werden.

Die Sonde musste dazu mit Reinkulturen der Zielorganismen und Nicht-Zielorganismen (die mit den wenigsten mismatches zur Sondensequenz) hybridisiert werden. In der vorliegenden Arbeit geschah dies mit aus Anhangsdrüsen isolierten Endosymbionten-Zellen (siehe **2.9.12**) und einer Reinkultur von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM50071), die freundlicherweise von Dr. Dilip Gadkari zur Verfügung gestellt wurde, bei unterschiedlichen Stringenzen (Veränderung der Formamidkonzentration im Hybridisierungsansatz).

Dazu wurden spezielle, teflonbeschichtete Adhäsiv-Glasobjektträger verwendet. Nachdem die Proben in 4%igem PFA bei 4°C für ca. eine Stunde fixiert waren (1 Teil Flüssigkultur + 3 Teile PFA-Lösung), wurden sie 2x in 1xPBS gewaschen und in PBS/Ethanol [1 Teil 1xPBS + 1 Teil eiskaltes Ethanol (96%)] endfixiert. Von den fixierten Proben wurden anschließend jeweils 10 µl pro Aussparung auf die Objektträger aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit an der Luft getrocknet war, wurden die aufgebrachten Proben durch Eintauchen in eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 80%, 96% Ethanol: jeweils 3 Minuten) dehydratisiert.

Um nun die Spezifität der Endosymbionten-Sonde zu ermitteln, wurde diese bei verschiedenen Stringenzen (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% Formamidkonzentration im Hybridisierungsansatz) mit den Proben hybridisiert. Dabei wurden die Proben zusätzlich mit einer Mischung aus drei Sonden im Verhältnis 1:1:1 (EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III), zur vollständigen Erfassung aller Bacteria und einer Negativkontrolle-Sonde (NON338) bei den verschiedenen Stringenzen hybridisiert. Die folgende Tabelle (**Tab. 9**) zeigt eine Übersicht der verwendeten Cy3-markierten Oligonucleotid-Sonden.

Tab. 9: Verwendete Cy3-markierte Sonden.

Sonde	Sequenz (5'-3')	Bindungsstelle	Ziel-Gruppe	Referenz
EUB338-I	GCTGCCTCCC GTAGGAGT	16S, 338-355	Domäne Bacteria	AMANN et al., 1990
EUB338-II	GCAGCCACCC GTAGGTGT	16S, 338-355	EUB- Planctomycetes u. a.	DAIMS et al., 1999
EUB338-III	GCTGCCACCC GTAGGTGT	16S, 338-355	EUB- Verrucomicrobia	DAIMS et al., 1999
NON338	ACTCCTACGG GAGGCAGC	---	Negativkontrolle	MANZ et al., 1992

Die Verteilung der Proben und Sonden auf den diagnostischen Objektträgern ist in der folgenden Abbildung (**Abb. 18**) schematisch wiedergegeben. Dabei wurde für jede Formamidkonzentration ein neuer Objektträger benutzt (insgesamt neun Objektträger).

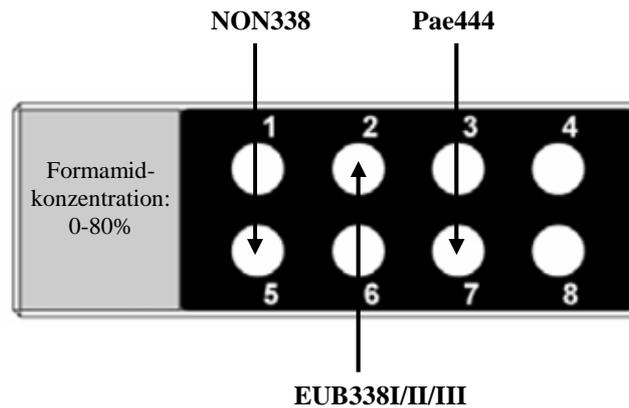


Abb. 18: Verteilung der Proben auf den diagnostischen Objektträgern. Felder 1-3 wurden mit fixierten, aus Anhangsdrüsen isolierten Endosymbionten-Zellen und Felder 5-7 mit fixierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* beschickt und mit den drei Sonden hybridisiert.

Jede Probe wurde nun mit je 9 µl Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0-80% Formamid, deionisiert; autoklaviertes Millipore-Wasser ad 2 ml; 0,01% SDS) und 1 µl Sonde überschichtet. Nun wurden die Objektträger vorsichtig in ein steriles, mit Zellstoff ausgelegtes 50 ml-Zentrifugenröhrchen (VWR, Deutschland) gegeben, wobei der Zellstoff mit dem restlichen Hybridisierungspuffer überschüttet wurde. Die Hybridisierung fand anschließend in einem Wärmeschrank bei konstanten 46°C für mindestens 2 Stunden statt. Währenddessen wurde der Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 3,5-900 mM NaCl; 1,75-5 mM EDTA; autoklaviertes Millipore-Wasser ad 50 ml; 0,01% SDS) in 50 ml-Zentrifugenröhrchen hergestellt und im Wasserbad auf 48°C vorgewärmt.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Hybridisierungsröhrchen geöffnet und das Hybridisierungspuffer-Sondengemisch von den Objektträgern mit wenig vorgewärmtem Waschpuffer abgespült. Die Objektträger wurden rasch in die Waschpuffer-Gefäße überführt, für 15 Minuten im Wasserbad bei 48°C gewaschen und anschließend vorsichtig mit Millipore-Wasser abgespült und luftgetrocknet.

Nun wurden pro hybridisiertem Probenfeld 10 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml) aufgetragen und die Objektträger für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wurden sie mit reichlich Millipore-Wasser abgespült, mit etwas Ethanol (70%) nachgewaschen und luftgetrocknet. Um die hybridisierten Zellen vor dem Ausbleichen zu schützen, wurden die Objektträger mit einem dünnen Film des Mounting-Mediums Vectashield (AXXORA, Deutschland) überschichtet und mit einem Deckglas (24x60 mm; Roth, Deutschland) abgedeckt.

Die Hybridisierung von Semi-Dünnschnitten der weiblichen Abdomina und Eier von *Paederus riparius* mit der Endosymbionten-Sonde erfolgte nach genau derselben Vorgehensweise. Im Falle der UNICRYL-Dünnschnitte wurde jedoch der Entwässerungsschritt nach dem Aufbringen der Proben in einer Ethanolreihe und das Spülen mit 70%igem Ethanol nach dem DAPI-Färbeschritt weggelassen, da sich die Schnitte nach Kontakt mit dem Alkohol einrollten und vom Objektträger ablösten.

Um nun die optimale Formamidkonzentration für die Sonde zu ermitteln, wurde die Fluoreszenzintensität von hybridisierten Zellen des Endosymbionten und *Pseudomonas aeruginosa* für jede Stringenz (0-80% Formamid) miteinander verglichen. Dies erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und den Filtersätzen 02 und Cy3-HQ (siehe 2.5) bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl. Als optimale Stringenz wurde dabei die höchste Formamid-Konzentration gewählt, bei der gerade noch ein spezifisches Hybridisierungssignal verzeichnet werden konnte. Dabei lag der Spielraum der spezifischen Hybridisierungs-Stringenz zwischen der niedrigsten Formamidkonzentration, bei der der Nicht-Zielorganismus *Pseudomonas aeruginosa* keine Cy3-Fluoreszenz mehr zeigte, und der optimalen Stringenz für die Endosymbionten-Sonde (siehe 2.10.7.4).

Die anschließende Dokumentation der hybridisierten Proben erfolgte mit den unter 2.4 beschriebenen Digitalkameras.

2.10.7.3 Helfer-Sonde (Kompetitor-Oligonucleotid)

Um die Spezifität der Endosymbionten-Sonde zu erhöhen, wurde zusätzlich eine so genannte Kompetitor-Sonde (cPae444) synthetisiert, die komplementär zur Nicht-Zielsequenz von *Pseudomonas aeruginosa* war und keine Fluoreszenzfarbstoff-Markierung am 5'-Ende aufwies. Durch den zusätzlichen Einsatz dieses unmarkierten Helfer-Oligonucleotids sollte eine unspezifische Hybridisierung der endosymbionten-spezifischen Sonde an die Nicht-Zielsequenz - und damit ein unspezifisches Fluoreszenz-Signal - verhindert werden.

Für ihren Einsatz wurde die Kompetitor-Sonde mit der Endosymbionten-Sonde im Verhältnis 1:1 gemischt.

2.10.7.4 Dissoziationskurven der Endosymbionten- und Kompetitor-Sonde

Um nun die optimalen Hybridisierungsbedingungen für die neu konstruierte Endosymbionten-Sonde (Pae444) und ihre Kompetitor-Sonde (cPae444) zu ermitteln, wurden

fixierte Zellen des Symbionten (Gewinnung siehe **2.9.12**) und von *Pseudomonas aeruginosa* mit verschiedenen Kombinationen der beiden Sonden (siehe **Abb. 19**) unter ansteigender Stringenz (0-80% Formamid) hybridisiert (Vorgehensweise siehe **2.10.7.2**). Als Negativkontrolle wurden fixierte Zellen von *Escherichia coli* unter denselben Bedingungen mithybridisiert.

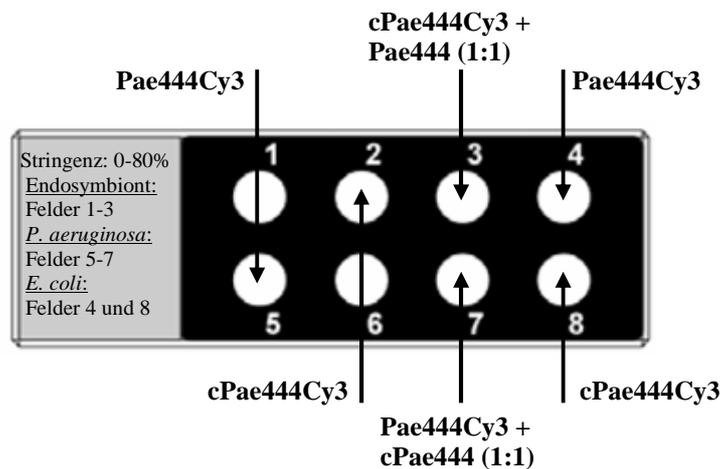


Abb. 19: Verteilung der Proben auf den neun diagnostischen Objektträgern. Felder 1-3 wurden mit fixierten, aus Anhangsdrüsen isolierten Endosymbionten-Zellen, Felder 5-7 mit fixierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* und Felder 4 und 8 mit fixierten Zellen von *Escherichia coli* beschickt und mit den zwei Sonden hybridisiert.

Nun wurden auf jedem der acht Felder für jede Formamidkonzentration mindestens 300 hybridisierte Zellen von willkürlich ausgewählten Bereichen (1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl) ausgezählt und ins Verhältnis mit DAPI-fluoreszierenden Zellen der entsprechenden Bereiche gesetzt. Anhand der errechneten Durchschnittswerte für jede Stringenz konnte schließlich die optimale Hybridisierungstemperatur (50% der Sonde sind dissoziiert) für die Endosymbionten-Sonde erhalten werden.

2.10.7.5 Verwendete Lösungen

Für die vollständige Zusammensetzung der im Folgenden aufgeführten Lösungen, die für die FISH benötigt wurden, siehe Anhang 2.

2.10.7.5.01 Natriumphosphat-Stammlösungen

1 M NaH_2PO_4 ; 1 M Na_2HPO_4 ; 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (NaPi), pH 7,4; VE-Wasser

2.10.7.5.02 3xPhosphate-buffered Saline (3xPBS)

NaCl; 0,1 M NaPi, pH 7,4; VE-Wasser

2.10.7.5.03 4% Paraformaldehydlösung (4% PFA)

PFA; 3x PBS; VE-Wasser

2.10.7.5.04 1xPBS/96% Ethanol (PBS/EtOH)

1xPBS; Ethanol (96%)

2.10.7.5.05 1 M Tris-HCl, pH 8,0

Tris; HCl konz.; VE-Wasser

2.10.7.5.06 5 M NaCl

NaCl; VE-Wasser

2.10.7.5.07 Formamid, deionisiert**2.10.7.5.08 steriles Wasser**

Millipore-Wasser

2.10.7.5.09 10% Natriumdodecylsulfat (10% SDS)

SDS; HCl konz.; VE-Wasser

2.10.7.5.10 0,5 M EDTA

EDTA; NaOH-Pellets; VE-Wasser

2.10.7.5.11 4',6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)

DAPI; Millipore-Wasser

2.10.7.5.12 Hybridisierungspuffer

NaCl; Tris-HCl, pH 8,0; Formamid; Millipore-Wasser; SDS

2.10.7.5.13 Waschpuffer

Tris-HCl, pH 8,0; NaCl; EDTA; Millipore-Wasser; SDS

2.10.7.5.14 NaCl- und EDTA-Volumina im Waschpuffer

% Formamid im Hybridisierungspuffer	5 M NaCl [μl]	0,5 M EDTA [μl]
0	9000	-
10	4500	-
20	2150	500
30	1020	500
40	460	500
50	180	500
60	40	500
70	-	350
80	-	175

3. Ergebnisse

TEIL A: KULTIVIERUNG

3.1 Endosymbiontische Anreicherungsmedien

Für eine spezifische Anreicherung des *Paederus*-Endosymbionten zu Kultivierungszwecken wurden zehn verschiedene Flüssigmedien als Verdünnungsreihen eingesetzt, die mit Käfer- bzw. Ei-Homogenisat beimpft waren. Eine definierte Menge (4 µl) einer jeden Verdünnungsstufe dieser Anreicherungsmedien wurde nach 1, 5, 10 und 20 Tagen mittels des diagnostischen Primerpaares KS1F/KS1R (PIEL, 2002) auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht.

Dabei konnte für die jeweiligen Flüssigmedien eine molekulare Identifizierung des Endosymbionten nach 20 Tagen in keiner höheren Verdünnungsstufe verzeichnet werden als zu Beginn (Tag 1) der Untersuchungen (siehe **Tab. 10 A, B**). Die einzige Ausnahme stellte die phosphatgepufferte Pepton-Salz-Lösung (mit und ohne Supplemente) mit Käfer-Homogenisat dar. In diesem Flüssigmedium konnte nach 20 Tagen Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C ein Vorhandensein des Endosymbionten in der im Vergleich zur 10-Tages-Probe nächst höheren Verdünnungsstufe festgestellt werden (siehe auch **Abb. 20**). Die Pepton-Salz-Lösung (ohne Supplemente) wurde deshalb als Universal-Verdünnungsmedium für sämtliche Kultivierungsexperimente mit dem *Paederus*-Endosymbionten eingesetzt.

Die im Folgenden aufgeführten beiden Tabellen (**Tab. 10 A, B**) zeigen nur die Auswertung der Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-4} , da der Endosymbiont in allen Verdünnungsreihen maximal bis zur 10^{-4} -Verdünnung molekular nachgewiesen werden konnte.

Tab. 10 A: Molekulare Detektion des *Paederus*-Endosymbionten mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R in Käfer-Homogenisat/Ei-Homogenisat in den Flüssigmedien Pepton-Salz-Lösung und Pepton-Salz-Lösung mit Supplene1/2/3 (siehe 2.8.2). +: Symbiont detektiert; -: Symbiont nicht detektiert.

Verdünnungsstufe	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Tag 1	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 5	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 10	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 20	+/+	+/+	+/+	-/+

Tab. 10 B: Molekulare Detektion des *Paederus*-Endosymbionten mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R in Käfer-Homogenisat/Ei-Homogenisat in den Flüssigmedien BHI-Bouillon, BHI-Bouillon mit Tellurit, Cetrimid-Bouillon, Malachitgrün-Bouillon, HPG-Nährlösung, Nährbouillon, Glucose-Mineralsalz-Nährlösung und VL 55-Nährlösung (siehe 2.8.2). +: Symbiont detektiert; -: Symbiont nicht detektiert.

Verdünnungsstufe	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Tag 1	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 5	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 10	+/+	+/+	-/+	-/+
Tag 20	+/+	+/+	-/+	-/+

Folgende Abbildung (**Abb. 20**) zeigt die elektrophoretische Auswertung der amplifizierten Proben der Pepton-Salz-Lösung bzw. Pepton-Salz-Lösung mit Suppline1/2/3 im Falle der Käfer-Homogenisate nach Tag 1-10 und 20. Die dabei nach Tag 20 auf dem Agarosegel auftretende Bande (157 Basenpaare) für die 10^{-3} -Verdünnungsstufen zeigt das Vorhandensein des Endosymbionten in den beiden Anreicherungsmedien und damit offenbar ein langsames Wachstum an. Eine molekulare Untersuchung der beiden Verdünnungsreihen nach 40 bzw. 60 Tagen zeigte keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

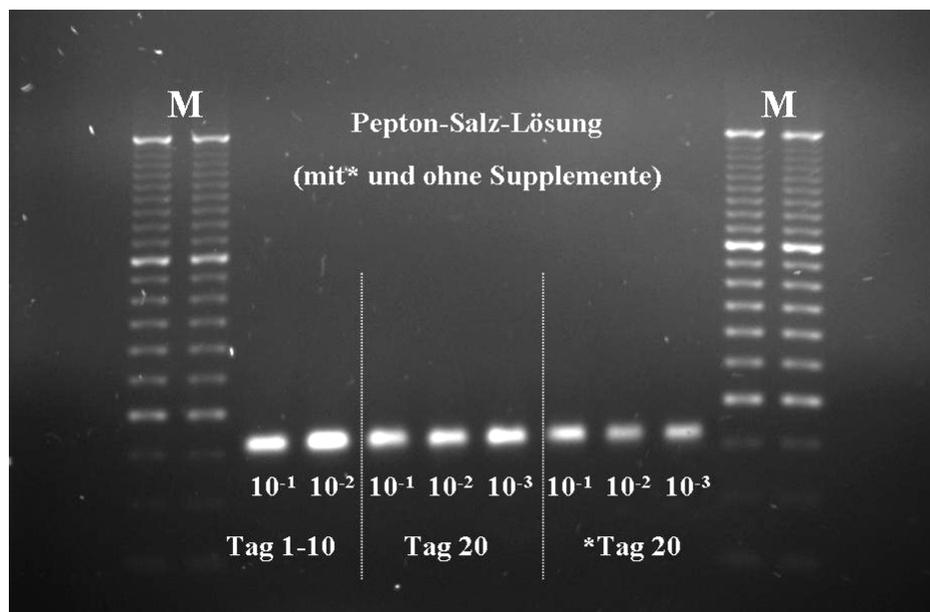


Abb. 20: Elektrophoretische Auftrennung des mit KS1F/KS1R amplifizierten 157 Basenpaare langen Teilstücks der *ped*-Gene auf einem 1,5%igen Agarosegel. M (Marker): 50bp-DNA-Leiter (von oben nach unten: 1000bp-50bp in 50er Schritten). Die einzelnen Bahnen sind mit der jeweiligen Verdünnungsstufe und den Tagen der Probennahme beschriftet. Daten für Pepton-Salz-Lösung mit Supplemente (*) für Tag 1-10 nicht gezeigt.

3.2 Identifizierte Bakterien aus den Kultivierungsexperimenten

Sämtliche Bakterienkulturen, die auf Universalmedien und Selektivmedien (siehe 2.8.1) vereinzelt werden konnten, wurden molekular mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R auf das Vorhandensein des *ped*-Clusters hin untersucht. Da die Pederin-Synthese-Gene einzigartig in der Natur und ausschließlich auf dem Genom des *Paederus*-Endosymbionten lokalisiert sind, identifiziert ein positives PCR-Signal (157bp-Amplifikat) den Symbionten eindeutig.

Im Falle aller isolierten Reinkulturen (aerob und anaerob) konnte diese hochspezifische Amplifikation eines 157 Basenpaare langen Teilstücks aus dem *ped*-Cluster nicht erfolgen. Dies bedeutete, dass der Endosymbiont außerhalb seines Käferwirts mit den in dieser Arbeit verwendeten herkömmlichen mikrobiologischen Methoden und Nährmedien nicht kultiviert werden konnte. Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 21 A-D) zeigen eine Auswahl verschiedener bewachsener Agar-Medien mit einem für die Ei- und Käfer-Homogenisate typischen Koloniebild.

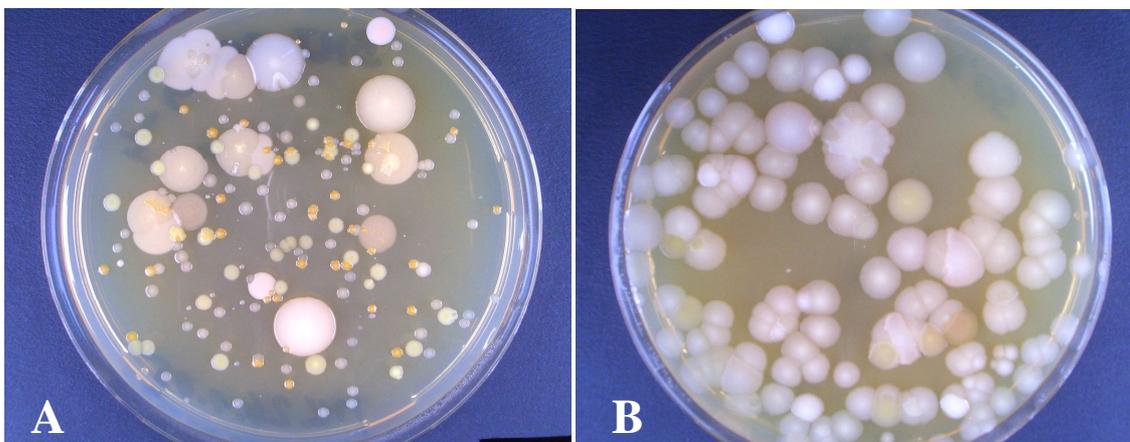


Abb. 21 A, B: BHI-Agar-Platten mit typischem bakteriellen Erscheinungsbild. Die linke Platte wurde mit Ei-Homogenisat (Verdünnungsstufe 10^{-3}), die rechte mit Käfer-Homogenisat (Verdünnungsstufe 10^{-4}) beimpft. Die Bebrütungsdauer bei 37°C betrug dabei 48 Stunden.

Auf den meisten Agar-Nährmedien konnte bereits nach 24-48 Stunden ein sehr gutes Bakterienwachstum verzeichnet werden. Dabei zeigten die Platten, die mit Ei- bzw. Käfer-Homogenisat niedriger Verdünnungsstufen (10^{-1} - 10^{-2}) beimpft worden waren, meist ein sehr dichtes, rasenartiges Bakterienwachstum. Einzelkolonien, die für die molekularen Untersuchungen benötigt wurden, konnten erst für höhere Verdünnungsstufen (10^{-3} - 10^{-7}) erhalten werden (siehe Abb. 21 A, B und D).

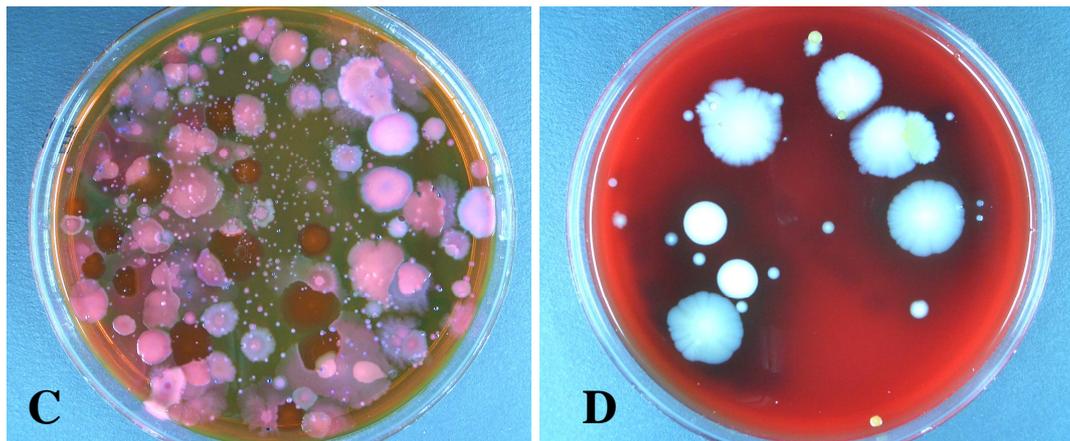


Abb. 21 C, D: Columbia-Blutagar-Platten, die mit Ei-Homogenisat (C: Verdünnungsstufe 10^{-2}) und Käfer-Homogenisat (D: Verdünnungsstufe 10^{-5}) beimpft wurden. Die Bebrütungsdauer bei 37°C betrug auch hier 48 Stunden.

Um einen Überblick über die bakterielle Diversität in den Käfer-Weibchen zu erhalten, wurde bei acht verschiedenen, aeroben Bakterienkolonien, die während der gesamten Kultivierungsexperimente immer wieder isoliert werden konnten, eine Gesamt-DNA-Extraktion durchgeführt. Von den aufgereinigten Nucleinsäuren der acht Isolate wurden anschließend die Gene für die ribosomale RNA (16S rDNA) amplifiziert und sequenziert. Die dabei identifizierten Bakterien sind in der folgenden Tabelle (**Tab. 11**) aufgelistet.

Tab. 11: Prozentuale Ähnlichkeit der 16S rDNA-Sequenzen der Isolate im Vergleich zu veröffentlichten 16S-Sequenzen und der 16S-Sequenz des Endosymbionten.

Isolat	Agar-Nährmedium	Prozentuale Ähnlichkeit und Datenbank-Zugangsnummer	Prozentuale Ähnlichkeit zum Endosymbionten
<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonas-Isolationsagar	99% D84020	92%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonas-Isolationsagar	99% D84013	91%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Mac Conkey-Agar	99% AB004754	86%
<i>Bacillus</i> sp.	BHI-Agar mit Tellurit	98% AY485275	82%
Bacillaceae bacterium LA28	BHI-Agar mit Tellurit	99% AF513457	81%
<i>Bacillus pumilus</i>	BHI-Agar mit Tellurit	99% AY112667	82%
<i>Paenibacillus pabuli</i>	BHI-Agar	97% AB073191	82%
<i>Paenibacillus lactis</i>	BHI-Agar	98% AY257868	85%

Zusätzlich wurden vier der oben aufgeführten Isolate bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl digital dokumentiert (siehe **Abb. 22**).

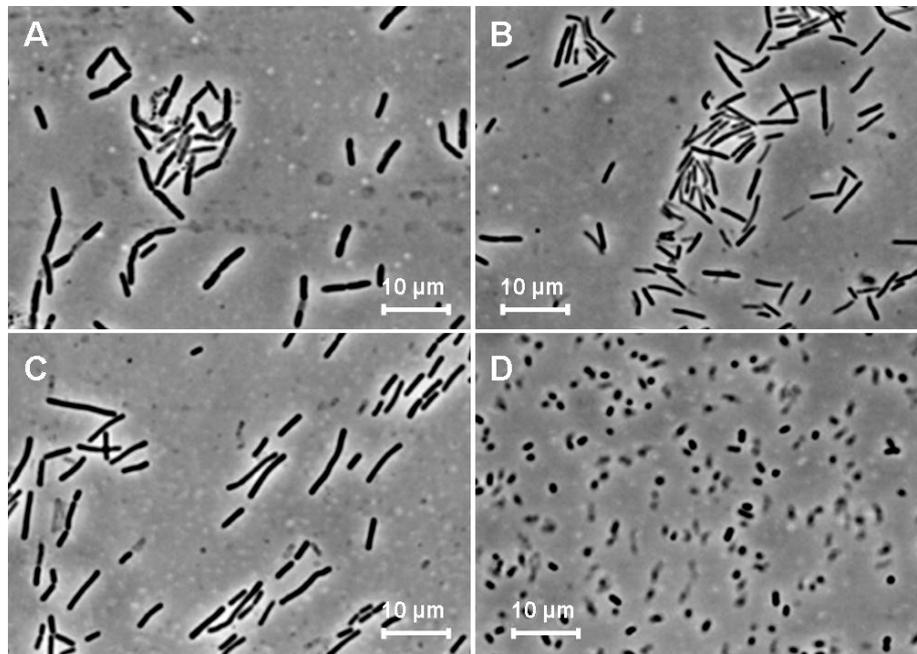


Abb. 22: A : *Paenibacillus pabuli* (ca. 1,5 µm x 5-7 µm), B : *Paenibacillus lactis* (ca. 1 µm x 4-6 µm), C: *Bacillus* sp. (ca. 1 µm x 5-10 µm), D: *Klebsiella oxytoca* (ca. 1 µm x 2 µm).

Abb. 23 schließlich zeigt die charakteristische Morphologie von Isolat C (*Bacillus* sp.) auf BHI-Agar (mit und ohne Tellurit-Zusatz).

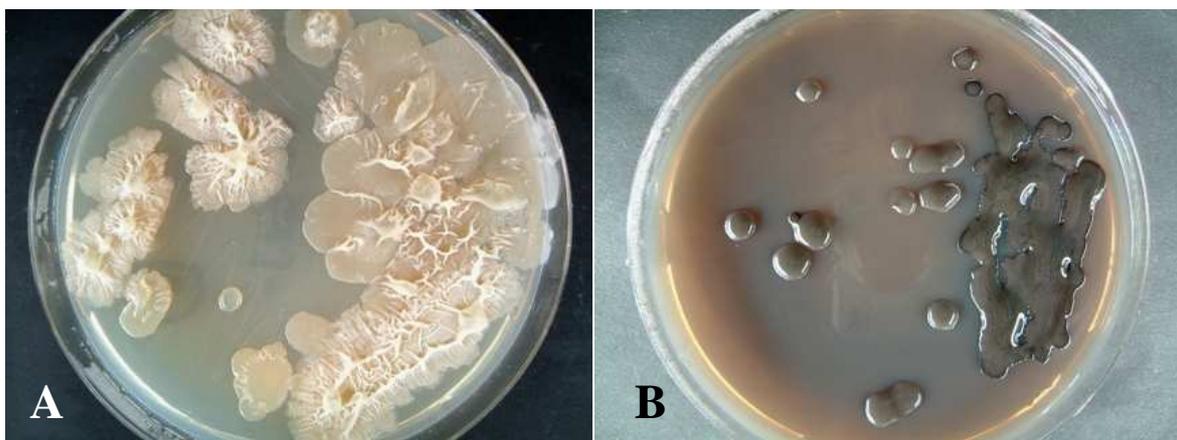


Abb. 23: Reinkultur von *Bacillus* sp. A: auf BHI-Agar, mit für *Bacillus* charakteristischer Oberflächenstruktur; B: auf BHI-Agar mit Tellurit-Zusatz (200 µg/ml). Die schwarze Farbe der Kolonien kommt dabei durch die Einlagerung elementaren Tellurs in den Bakterienzellen zustande.

TEIL B: LOKALISIERUNG

3.3 Äußere Kompartimentierung von *Paederus riparius*-Weibchen

Für eine exakte Lokalisierung des *Paederus*-Endosymbionten in den Käfer-Weibchen wurden die Insekten als erstes nach unten aufgeführtem Schema (siehe **Abb. 24**, links) in drei bzw. fünf Sektionen kompartimentiert und diese anschließend molekular mit dem Primerpaar KS1F/KS1R untersucht. Der Endosymbiont wurde dabei ausschließlich in den Abdominal-Segmenten 5-10 der Käfer detektiert (siehe **Abb. 24**, rechts).

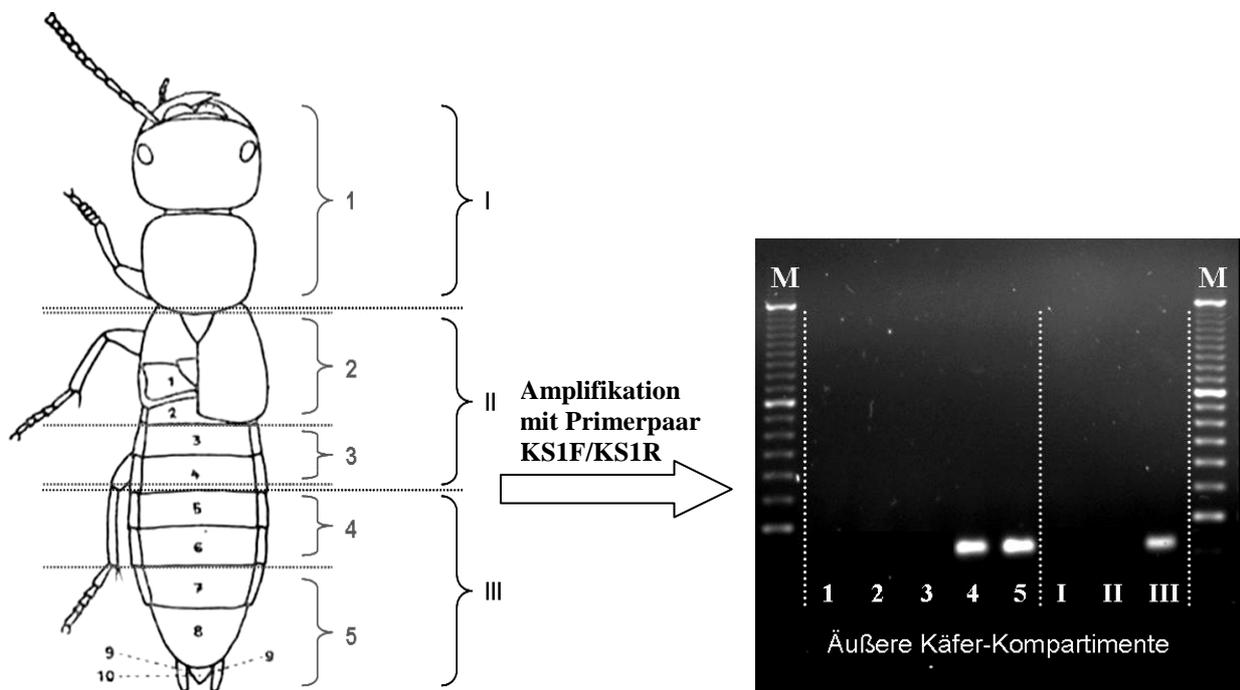
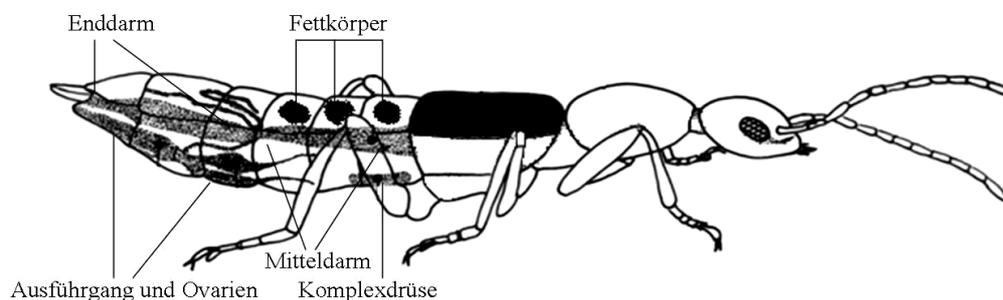


Abb. 24: Schematische Skizze eines Kurzflüglers mit den zwei bei *Paederus riparius* durchgeführten Schnittreihen (1-5; I-III) (links) und das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese mit der Detektion des Endosymbionten in den Kompartimenten 4 und 5 bzw. III (rechts). M (Marker): 50bp-DNA-Leiter (von oben nach unten: 1000bp-50bp in 50er Schritten). Die einzelnen Bahnen des 1,5%igen Agarosegels sind mit den entsprechenden Zahlen der jeweiligen Schnittreihe beschriftet.

Ein identisches Ergebnis konnte für die acht verbliebenen *Paederus riparius*-Weibchen, deren Kompartimente (vier Schnittreihen mit je 3 bzw. 5 Kompartimenten) ebenfalls mit dem diagnostischen Primerpaar untersucht wurden, wiederholt und somit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutete, dass sich der Endosymbiont in speziellen, noch nicht identifizierten Gewebestrukturen im Inneren der abdominalen Endsegmente 5-8 befinden musste, nach denen im Folgenden in den Käfern gesucht wurde.

3.4 Innere Kompartimentierung von *Paederus riparius*-Weibchen

Die innere abdominale Anatomie der *Paederus riparius*-Weibchen (siehe **Abb. 25 A**, oben) wurde nun auf das Vorhandensein ungewöhnlicher Strukturen, die für eine Beherbergung des Endosymbionten geeignet erschienen, untersucht. Dazu wurden aus sich entsprechenden Kompartimenten (abdominaler Darmtrakt, exokrine Komplexdrüse, Teile des Fettkörpers, vollständiger weiblicher Geschlechtsapparat) von fünf Käfer-Weibchen Homogenisate hergestellt, die wiederum mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R auf das Vorhandensein des Pederin-Bakteriums hin untersucht wurden. Zusätzlich wurde eine unbekannte Drüse (siehe **Abb. 25 B**), die in unmittelbarer Nähe des Ausführgangs gefunden wurde, mitanalysiert. Eine Detektion des Endosymbionten erfolgte dabei ausschließlich in den Proben, die Homogenisat des weiblichen Geschlechtsapparats enthielten. Nachfolgende Abbildung (**Abb. 25 A**) zeigt schematisch die Anordnung der inneren Kompartimente im weiblichen Käfer und das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate der fünf untersuchten Käfer-Kompartimente auf einem 1,5%igen Agarosegel.



↓
Amplifikation
mit Primerpaar
KS1F/KS1R

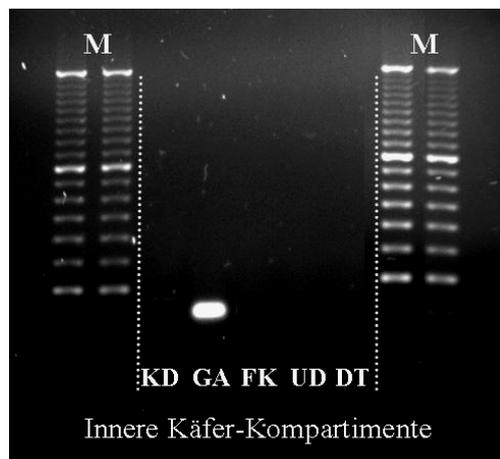


Abb. 25 A: Oben: Schematische Skizze von *Paederus riparius* mit der inneren Organisation der untersuchten Kompartimente (es fehlt die seitlich auf Höhe des abdominalen Darmtrakts verlaufende, im letzten Segment mündende, unbeschriebene Drüse). Unten: Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese mit der Detektion des Endosymbionten im Kompartiment GA. M (Marker): 50bp-DNA-Leiter (von oben nach unten: 1000bp-50bp in 50er Schritten). Die einzelnen Bahnen des Agarosegels sind mit Abkürzungen der jeweiligen Kompartimente beschriftet (KD: exokrine Komplexdrüse; GA: weiblicher Geschlechtsapparat; FK: Fettkörper; UD: unbekannte Drüse; DT: abdominaler Darmtrakt).

Diese Ergebnisse konnten für Homogenisate, die aus den inneren Kompartimenten weiterer 20 Weibchen (vier Homogenisat-Serien von jeweils fünf Weibchen) hergestellt und mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R untersucht wurden, wiederholt und somit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

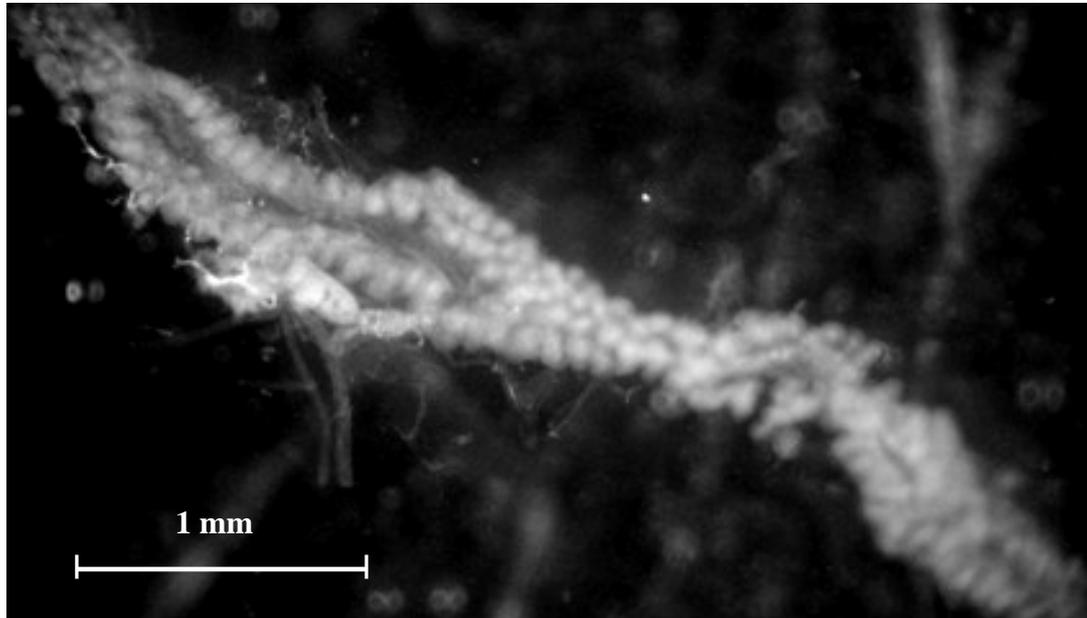


Abb. 25 B: Unbekannte, noch nicht beschriebene Drüse, die aus dem Abdominalbereich von weiblichen *Paederus riparius* im Zuge der molekularen Endosymbionten-Lokalisierung (siehe 3.4) isoliert werden konnte, und die möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des endosymbiontischen Wachstums spielt. Weiterführende Untersuchungen zur genauen Funktion und Wirkweise dieser Drüse konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und bleiben zukünftiger Forschung vorbehalten.

3.5 Untersuchung des weiblichen Geschlechtstrakts

3.5.1 Kompartimentierung des weiblichen Geschlechtstrakts

Da nun feststand, dass sich die Verbreitung des *Paederus*-Endosymbionten in den weiblichen Käfern ausschließlich auf den Geschlechtsapparat beschränkte, wurde dieses Kompartiment einer Sektion unterzogen. Zuvor mussten die aus den Insekten herauspräparierten Organe mit Micropräparierbesteck von anhaftendem Fettkörper und Tracheen befreit werden, um die einzelnen Kompartimente (Ovarien + Ovariengang, Genitalkammer + Ausführang, linke Anhangsdrüse, rechte Anhangsdrüse) mit einer Microfederschere exakt abtrennen zu können (siehe **Abb. 26 A, B, C**).

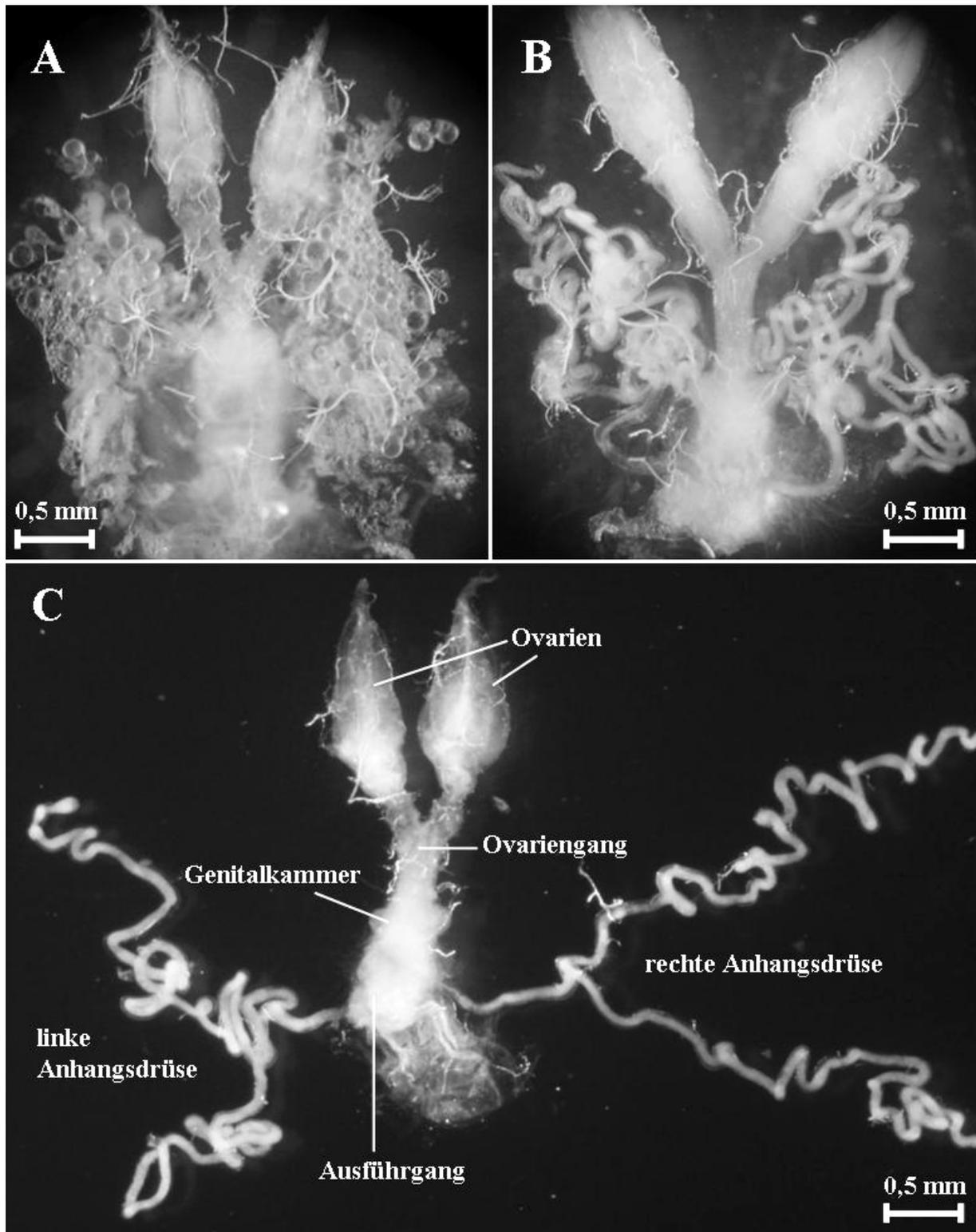


Abb. 26 A-C: Vollständiger Geschlechtsapparat von weiblichen *Paederus riparius*. A: Rohpräparat, bei dem die Anhangsdrüsen noch von Fettkörper und Tracheenästen umgeben sind. B: Präparat, von dem Fettkörper und Tracheen mit Micropräparierbesteck fast vollständig entfernt wurden. C: fertig präparierter Geschlechtsapparat, bei dem die Anhangsdrüsen von den Ausbuchtungen der Genitalkammer abgelöst und anschließend vorsichtig entwirrt wurden.

3.5.2 DAPI-Färbung der einzelnen Kompartimente

Die einzelnen Kompartimente (Ovarien + Ovariengang, Genitalkammer + Ausführungsgang, linke Anhangsdrüse, rechte Anhangsdrüse) von zwei weiblichen Geschlechtsapparaten, die zuvor in 4%iger PFA-Lösung fixiert wurden, wurden nun mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und anschließend als Quetschpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und dokumentiert.

Dabei zeigte sich, dass im Falle des Kompartiments „Ovarien + Ovariengang“ keine Bakterien im DAPI-Fluoreszenzmodus des Mikroskops detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Im Falle der drei anderen Kompartimente konnten wenige Bakterien (Ausführungsgang + Genitalkammer; Daten nicht gezeigt) bzw. sehr viele Bakterien (linke Anhangsdrüse, rechte Anhangsdrüse) im DAPI-Fluoreszenzmodus detektiert werden (siehe **Abb. 27 A, B**). Alle sichtbar gemachten Mikroorganismen wiesen dieselbe Morphologie und Größe auf, was darauf schließen ließ, dass es sich hier vermutlich um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelte.

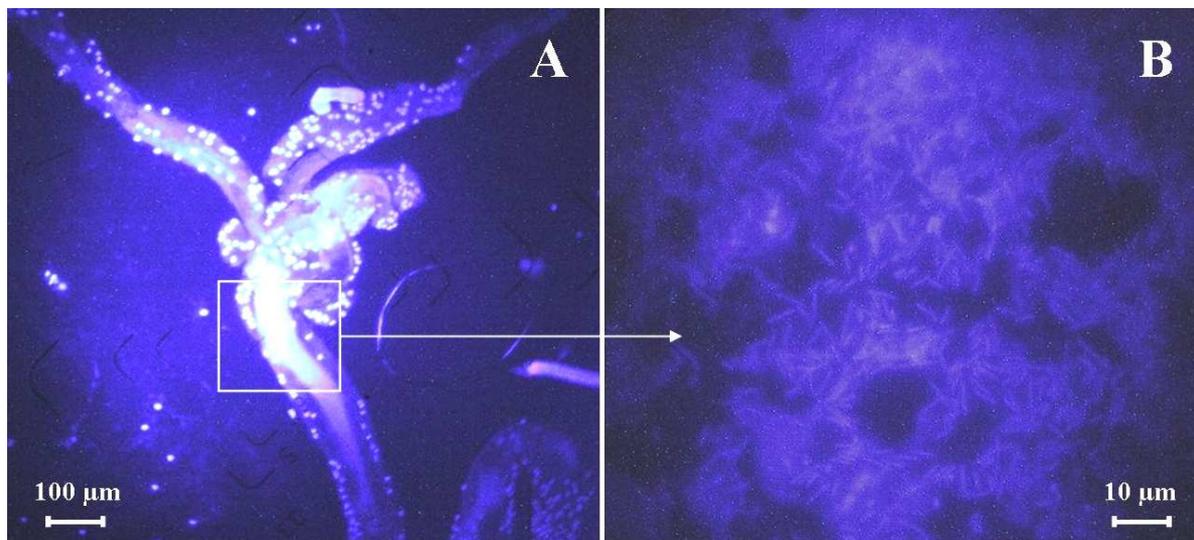


Abb. 27 A, B: Links: Anhangsdrüse in 100-facher Vergrößerung. Bläulich-weiß fluoreszierende Punkte stellen Zellkerne dar. Rechts: 1000-fache Vergrößerung (mit Hilfe von Immersionsöl) des links gekennzeichneten Bereichs. Der Ausschnitt zeigt eine morphologisch einheitliche Bakterienkolonie, die sich über die ganze Anhangsdrüse ausbreitet und bei der es sich offensichtlich um den *Paederus*-Endosymbionten handelt. Die Bakteriendichte ist dabei in beiden Anhangsdrüsen gleich bleibend sehr hoch.

3.5.3 Molekulare Untersuchung der einzelnen Kompartimente

Durch die sich anschließende DNA-Amplifikation aus Homogenisaten der einzelnen Kompartimente mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R und die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 1,5%igen Agarosegel konnte gezeigt werden, dass der Endosymbiont sowohl in der linken und der rechten Anhangsdrüse als auch im Kompartiment Genitalkammer + Ausführungsgang lokalisiert ist (siehe **Abb. 28**). Das Ausbleiben der spezifischen DNA-Bande im Falle des Kompartiments „Ovarien + Ovariengang“ deckt sich mit den unter **3.5.2** aufgeführten Ergebnissen.

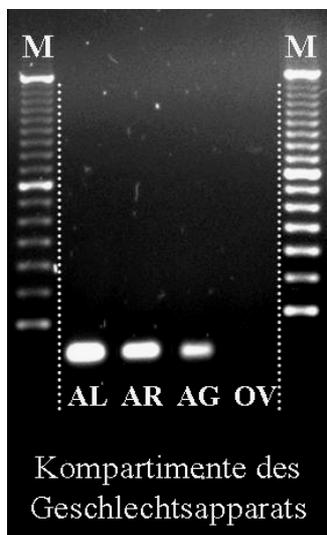


Abb. 28: Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate mit der Detektion des *Paederus*-Endosymbionten in den Kompartimenten AL, AR und AG. M (Marker): 50bp-DNA-Leiter (von oben nach unten: 1000bp-50bp in 50er Schritten). Die einzelnen Bahnen des Agarosegels sind mit Abkürzungen der jeweiligen Kompartimente eines Geschlechtsapparats beschriftet (AL: linke Anhangsdrüse; AR: rechte Anhangsdrüse; AG: Ausführungsgang + Genitalkammer; OV: Ovarien + Ovariengang).

Ein identisches Ergebnis konnte für vier weitere Homogenisat-Serien, die ebenfalls aus den Kompartimenten von jeweils fünf herauspräparierten Geschlechtsapparaten hergestellt und mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R untersucht wurden, wiederholt und somit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6 Mikrotomie

3.6.1 Paraffin-Schnitte

Nachdem jeweils eine Schnittserie eines Käfer-Abdomens und eines Eies angefertigt waren, zeigte sich bei einer ersten Begutachtung unter dem Lichtmikroskop, dass über 90%

der Schnitte so stark beschädigt waren, dass eine anschließende Auswertung mit den verschiedenen Färbetechniken nicht erfolgen konnte. Der Grund hierfür lag offenbar darin begründet, dass das Einbettmedium Paraffin im Verhältnis zu den darin eingebetteten Gewebeproben wesentlich weicher war, was sich letztlich negativ auf die Schneideigenschaft der Proben auswirkte.

3.6.2 UNICRYL-Schnitte

Die spezifische Schneidcharakteristik der in UNICRYL eingebetteten Proben war aufgrund des wesentlich höheren Härtegrades des polymerisierten Einbettmediums gegenüber den Proben für ein optimales Schnittergebnis ausschlaggebend. Insgesamt wurden jeweils sieben Schnittserien angefertigt, wobei im Falle der Abdomina (fünf vertikale und zwei horizontale Schnittserien) pro Serie zwischen 200 und 300 verwertbare Schnitte erhalten wurden - im Falle der Eier waren es zwischen 30 und 50. Als erstes wurden eine vertikale (siehe **Abb. 29 A-E**) und eine horizontale Schnittserie (siehe **Abb. 30 A-E**) eines Käfer-Abdomens mit einer Methylenblau-Lösung angefärbt, um einen Überblick über die Anordnung und die innere Organisation des weiblichen Geschlechtsapparats zu erhalten.

3.6.2.1 Methylenblau-Färbung von vertikalen Schnitten des Abdomens

Die folgenden Abbildungen (**Abb. 29 A-E**) zeigen eine Übersicht der angefärbten vertikalen Schnitte, wobei die Schnittrichtung zur Abdominalspitze hin verläuft.

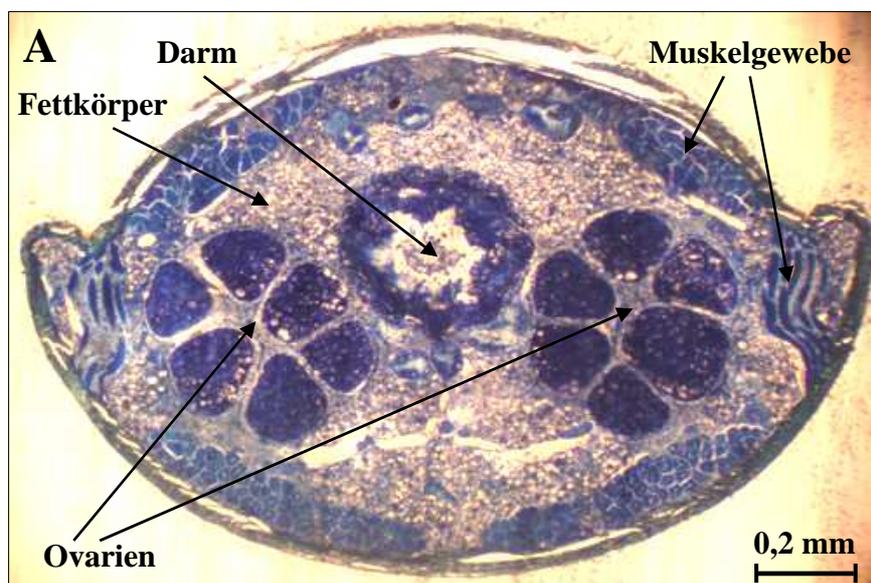


Abb. 29 A: Mit Methylenblau-Lösung angefärbter abdominaler Querschnitt eines *Paederus riparius*-Weibchens. Die Schnittdicke beträgt 3 μm .

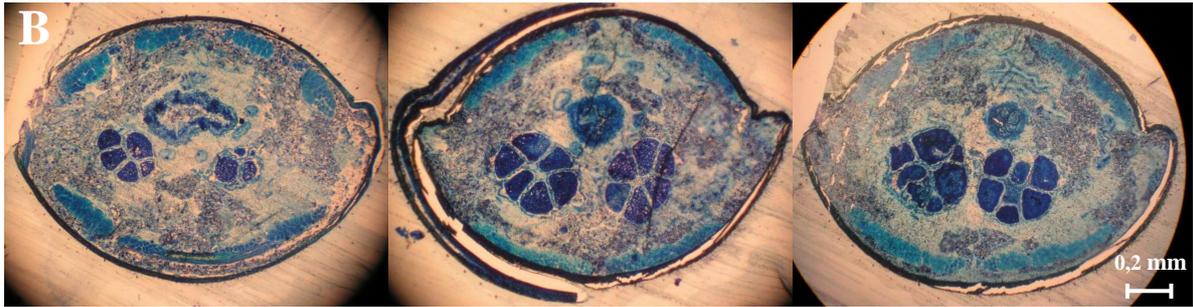


Abb. 29 B: Die Schnittabfolge zeigt den Bereich des weiblichen Abdomens kurz hinter den Elytren, in dem sich die Ovarien befinden. Die Größe der Geschlechtsorgane im Verhältnis zum Körperdurchmesser ist dabei enorm.

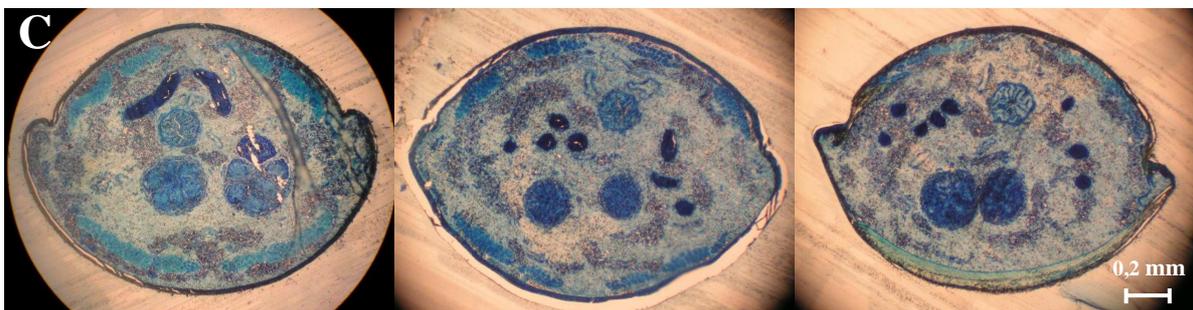


Abb. 29 C: In diesem Abschnitt des Abdomens verjüngen sich die Ovarien und beginnen, sich allmählich zu vereinigen. Hier sind auch erstmalig Schnittstellen der beiden Anhangsdrüsen (schwarzblau angefärbt) zu erkennen.

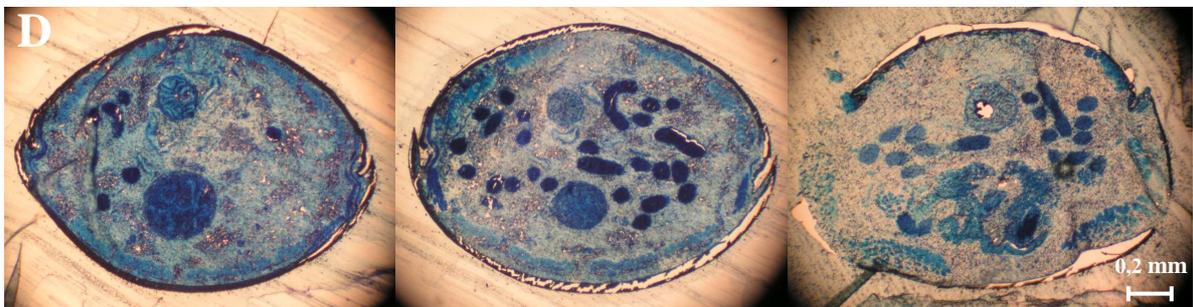


Abb. 29 D: Die Ovarien haben sich nun zum Ovariengang vereinigt, und die Dichte an angeschnittenen Anhangsdrüsen erreicht ihr Maximum (Mitte). Die Anhangsdrüsen beginnen in diesem Bereich, in den Ausführgang zu münden (rechts).



Abb. 29 E: Die Mündung der beiden Anhangsdrüsen im Ausführgang ist nun deutlich zu erkennen (links). Mit dessen Verbreiterung (Mitte) nimmt auch die Dichte der angeschnittenen Anhangsdrüsen stetig ab, die schließlich ganz verschwinden (rechts).

3.6.2.2 Methylenblau-Färbung von horizontalen Schnitten des Abdomens

Die folgenden Abbildungen (Abb. 30 A-E) zeigen eine Übersicht der angefärbten horizontalen Schnitte eines Abdomens von *Paederus riparius*, wobei die Schnittrichtung von dorsal nach ventral verläuft. Da die Qualität der horizontalen Schnitte im Vergleich zu den Querschnitten deutlich schlechter war, wurden hier nur die verwertbaren Dünnschnitte aufgeführt.

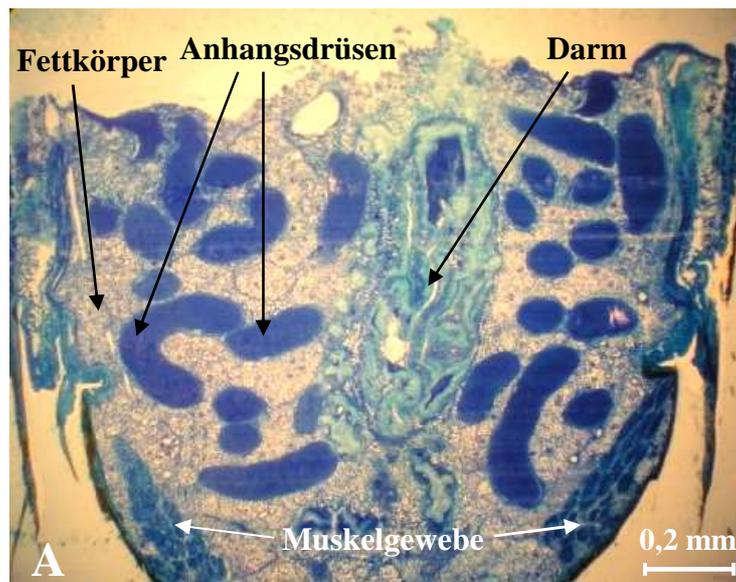


Abb. 30 A: Mit Methylenblau-Lösung angefärbter abdominaler Längsschnitt eines *Paederus riparius*-Weibchens. Die Schnittdicke beträgt 3 μ m.



Abb. 30 B: Die Schnittabfolge zeigt den Bereich des weiblichen Abdomens kurz hinter den Elytren mit dorsalem Erscheinen des Darms im 6. Abdominalsegment (links). Die höchste Dichte an angeschnittenen Anhangsdrüsen findet sich dabei ungefähr in der mittleren Ebene dieses Segments (Mitte). Die Dichte an angeschnittenen Anhangsdrüsen im 5. Abdominalsegment, wo sich die Ovarienäste zum Ovariengang vereinigen (rechts), ist dabei deutlich geringer (vgl. auch mit Ergebnissen unter 3.3) und verschwindet im 4. Abdominalsegment ganz (Daten nicht gezeigt).

Da der Endosymbiont ausschließlich in den beiden Anhangsdrüsen detektiert werden konnte - bis auf ein geringes Vorkommen im Ausführgang (siehe 3.5.2 und 3.5.3) -, wurden nun einige Schnittstellen der Anhangsdrüsen auf den mit Methylenblau-Lösung angefärbten Längsschnitten bei verschiedenen Vergrößerungen dokumentiert. Dabei konnten erneut, wie auch schon unter 3.5.2 beschrieben, Myriaden von Mikroorganismen entdeckt werden, die, soweit erkennbar, alle dieselbe Morphologie und Größe aufwiesen, und bei denen es sich höchstwahrscheinlich um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelte. Eine immens hohe Dichte dieses Bakteriums konnte in sämtlichen Schnittstellen der Anhangsdrüsen bei 400-1000-facher Vergrößerung gefunden werden (siehe Abb. 30 D, E).

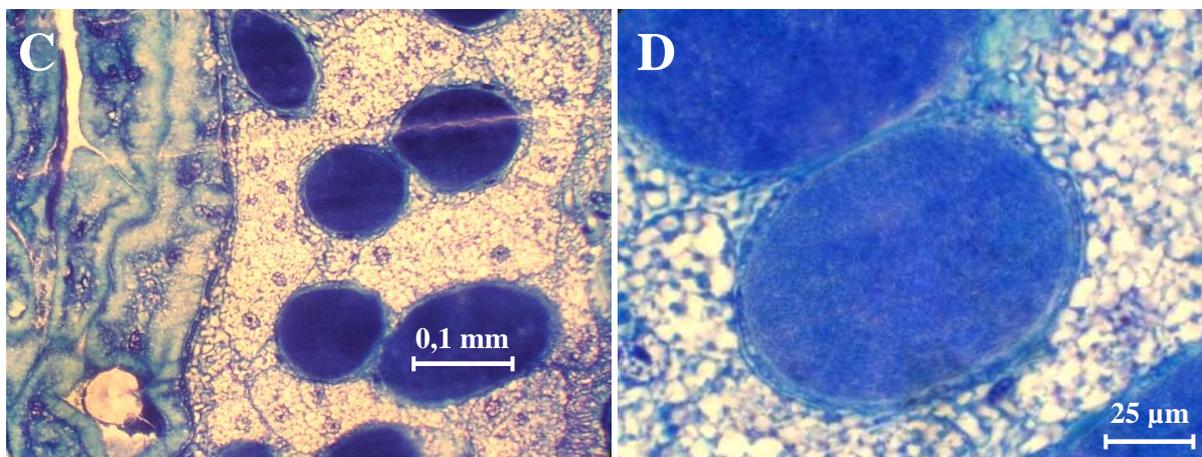


Abb. 30 C, D: Vergrößerung (100- bzw. 400-fach) der angeschnittenen Anhangsdrüsen in einem abdominalen Längsschnitt. Myriaden von Bakterienzellen, die vom einschichtigen Epithel der Anhangsdrüsen umgeben sind, werden bei 400-facher Vergrößerung (D) allmählich sichtbar.

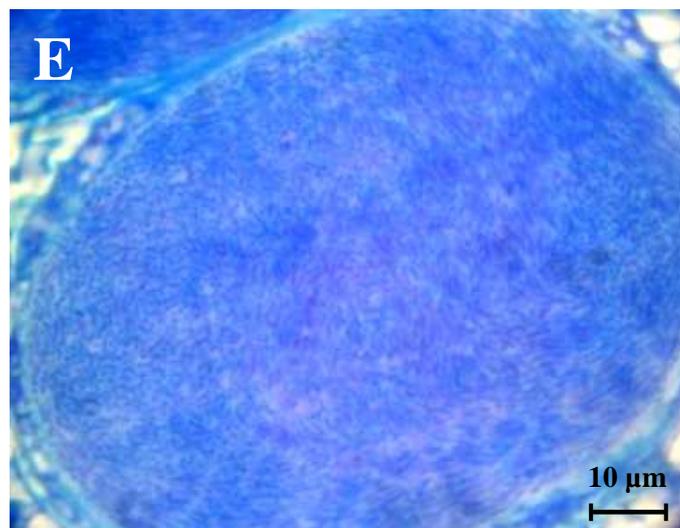


Abb. 30 E: 1000-fache Vergrößerung einer angeschnittenen Anhangsdrüse in einem abdominalen Längsschnitt. Die hohe Dichte einer einheitlichen Bakterienkolonie, bei der es sich offenbar um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelt, ist jetzt sehr gut zu erkennen.

Um nun zu zeigen, dass es sich bei der in den Anhangsdrüsen gefundenen Bakterienkolonie um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelte und nicht um eine Mischpopulation verschiedener Bakterienarten, wurde eine fluoreszenzmarkierte molekulare Sonde konstruiert, mit deren Hilfe auf den Quer- bzw. Längsschnitten ausschließlich der Pederin-Produzent sichtbar gemacht werden sollte.

3.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

3.7.1 Sonden-Design

Mit dem Programm Probe Design aus dem Softwarepaket ARB wurden anhand der veröffentlichten 16S rDNA-Sequenz des *Paederus*-Endosymbionten (KELLNER, 2001) mehrere potentielle Zielsequenzen für verschiedene Gensonden berechnet, von denen eine Auswahl in der folgenden Abbildung (**Abb. 31**) aufgelistet ist.

Zielsequenz	le	apos	ecol	grps	G+C	4GC+2AT	Decrease T by n*.3C ->	probe matches	n non group species	Sondensequenz
AAGGGGGCGAGCUCCCGG	18	A=1168	73	1	77.8	64.0	2; 2; 2; 4; 4; 4; 6; 6; 6; 6; 8; 8; 8; 8; 10; 10; 10; 10; 12; 12;	CCGGGAGCUCGCCCCCUU		
GGGGGGCGAGCUCCCGGAU	18	B=1206	77	1	77.8	64.0	2; 2; 2; 2; 4; 4; 4; 4; 6; 6; 6; 6; 8; 8; 8; 8; 10; 10; 10; 10;	AUCCGGGAGCUCGCCCCCU		
GARGAGGUGCCUUGGGA	18	C=32517	1017	1	55.6	56.0	4; 4; 4; 4; 8; 8; 8; 12; 12; 12; 16; 16; 16; 16; 20; 20; 24; 26; 27;	UCCCAAGGCGACUCUCUC		
AGGGGGCGAGCUCCCGGA	18	A+	3 74	1	77.8	64.0	2; 2; 2; 4; 4; 4; 4; 6; 6; 6; 6; 8; 8; 8; 8; 10; 10; 10; 10; 12;	UCCGGGAGCUCGCCCCCUU		
GAUCUGCCUGGAGAGGG	18	D=2066	128	1	61.1	58.0	3; 3; 3; 3; 6; 6; 6; 6; 9; 9; 12; 12; 12; 12; 15; 16; 16; 19; 22; 24;	CCUCUACCCAGGCGAUC		
AGGGGGAGGGUACCACG	18	E=42780	1452	1	61.1	58.0	2; 2; 2; 4; 4; 4; 4; 6; 6; 6; 6; 8; 8; 8; 8; 10; 11; 11; 11; 14;	CGUGGUAACCUUCCCCCU		
GGGAGGAGGGCAGAGAG	18	F=9883	444	1	66.7	60.0	3; 3; 3; 3; 6; 6; 6; 6; 9; 9; 9; 9; 12; 14; 14; 17; 17; 19; 22;	CUCUCUGCCCUUCCCCCU		
GGAGGAGGGCAGAGAGU	18	F+	1 445	1	61.1	58.0	3; 3; 3; 3; 6; 7; 7; 7; 10; 11; 11; 14; 14; 15; 15; 18; 18; 18; 21; 25;	ACUCUCUGCCCUUCCCCCU		
CGAAGAAGGGGGCGAGC	18	G=1146	66	1	72.2	62.0	1; 1; 1; 1; 2; 2; 2; 2; 3; 3; 3; 3; 4; 4; 4; 5; 5; 5; 6; 13;	GCUCGCCCCCUUUCUCCG		
UGAARGAGGUGCCUUGGG	18	C-	3 1016	1	55.6	56.0	4; 4; 4; 8; 8; 8; 8; 12; 12; 12; 16; 16; 17; 21; 21; 23; 24; 28; 30; 53;	CCCAAGGCGACUCUCUCA		
GGAGAAGGGGGCGAGCU	18	G+	1 67	1	66.7	60.0	1; 1; 1; 1; 2; 2; 2; 2; 3; 3; 3; 4; 4; 4; 5; 5; 5; 6; 8; 9;	AGCUCGCCCCCUUUCUCC		
AAGGGGAAGGUACCAC	18	E-	2 1451	1	55.6	56.0	2; 2; 2; 4; 4; 4; 6; 6; 6; 6; 8; 8; 10; 10; 12; 14; 15; 15; 19; 20;	GUGGUAACCUUCCCCCUU		
AGGGAUCUGCCUGGAGA	18	D-	7 125	1	55.6	56.0	3; 3; 3; 6; 6; 6; 6; 9; 9; 9; 12; 12; 12; 12; 15; 15; 15; 19; 20;	UCUACCCAGGCGAUCCCU		
GGGAUCUGCCUGGAGAG	18	D-	5 126	1	61.1	58.0	3; 3; 3; 3; 6; 6; 6; 6; 9; 9; 9; 9; 12; 12; 12; 15; 15; 15; 19; 20;	CUCUACCCAGGCGAUCCC		
UAGGGAUCUGCCUGGAG	18	D-	9 124	1	55.6	56.0	3; 3; 3; 6; 6; 6; 9; 9; 9; 9; 12; 12; 13; 13; 16; 17; 18; 19; 28; 29;	CUACCCAGGCGAUCCCUA		
AGAAGGGGGCGAGCUCC	18	A-	6 70	1	72.2	62.0	1; 1; 1; 2; 2; 2; 2; 3; 3; 3; 4; 5; 5; 6; 7; 7; 7; 9; 10; 11;	GGGAGCUCGCCCCCUUUC		
AAGAGGUGCCUUGGGA	18	C+	2 1018	1	50.0	54.0	4; 4; 4; 8; 8; 8; 12; 12; 12; 12; 16; 17; 17; 21; 22; 25; 25; 31; 31; 40;	UCCCAAGGCGACUCUCU		
AGUAGCUGGUCUACCAGC	18	H=42601	1433	1	55.6	56.0	4; 4; 4; 8; 8; 8; 8; 12; 12; 12; 16; 17; 17; 21; 22; 22; 26; 34; 40; 47;	GCGGUUAGCCAGGCUACU		

Abb. 31: Ausschnitt der von Probe Design vorgeschlagenen potentiellen Zielsequenzen und den entsprechenden Sondensequenzen. Zusätzlich mit angegeben sind verschiedene Sonden-Parameter (Länge, Hybridisierungsstelle, G+C-Gehalt und Schmelztemperatur der Sonde), anhand derer sich die Auswahl einer geeigneten Sonde (eingerahmt) orientierte.

Anhand der von Probe Design mitberechneten verschiedenen Sonden-Parameter wurde die Sonde mit der Hybridisierungsstelle 444 (Pae444; Sequenz: siehe 3.7.3) ausgewählt (siehe auch Abb. 33) und zur weiteren Überprüfung mit dem Unterprogramm PROBE MATCH auf ihre vermutete Spezifität hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Sonde ausschließlich zur Zielsequenz des *Paederus*-Endosymbionten komplementär war (siehe Abb. 32) und im Falle der nächst verwandten Nicht-Zielsequenz (*Pseudomonas aeruginosa*) zwei Basenfehlpaarungen (mismatches) aufwies. Die hohen destabilisierenden Effekte dieser beiden mismatches sollten eine unspezifische Fehlhybridisierung der Sonde mit dem Nicht-Zielorganismus verhindern.

Searched for		GGGAGGAAGGGCAGAGAG					'GGGAGGAAGGGCAGAGAG'	
name	fullname	mis	N_mis	wmis	pos	ecoli	rev	
*	B06Sabae endosymbiont	0	0	0.0	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UUAAUAGCU
*	B23Rufic endosymbiont	0	0	0.0	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UUAAUAGCU
*	B06Ripar endosymbiont	0	0	0.0	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UUAAUAGCU
*	B06Melan endosymbiont	0	0	0.0	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UUAAUAGCU
*	B06Fusci endosymbiont	1	0	1.5	9883	444	0	CUUUUAGUU-----A-----UUAAUAGCU
*	UncGam56 uncultured gamma	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	MrlGam53 marine gamma	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUA-----C-----UUAAUAGCG
*	BcmJB18 bacterium JB18	2	0	2.6	9883	444	0U-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAe138 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAe143 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer71 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseSpe40 <i>Pseudomonas sp</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer81 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer28 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAeru2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer56 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer78 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer68 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer57 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer51 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAe170 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ;	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	Unc17560 uncultured bacterium;	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAe152 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ;	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAe167 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ;	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAerug <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	Unc10332 uncultured bacterium	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer40 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer61 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseSp104 <i>Pseudomonas sp</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer72 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer39 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU
*	PseAer82 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2.6	9883	444	0	CUUUUAGUU-----UA-----UUAAUAGCU

Abb. 32: Ausschnitt der mit PROBE MATCH berechneten Spezifität der ausgewählten Sonde gegenüber der Zielsequenz des Endosymbionten von *Paederus riparius* (horizontal eingerahmt) und verschiedenen Nicht-Zielsequenzen (hauptsächlich *Pseudomonas aeruginosa*) mit mindestens zwei mismatches (vertikal eingerahmt).

Einen sehr wichtigen Aspekt für die Auswahl der spezifischen Sonde stellte ihre ribosomale Zugänglichkeit dar, die anhand eines von FUCHS et al. (1998) beschriebenen Sekundärstruktur-Modells der 16S rRNA von *E. coli* (siehe Abb. 33) abgeschätzt werden konnte. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die Hybridisierungsstelle der Sonde möglichst in einem Bereich mit hoher Zugänglichkeit und somit relativer Fluoreszenzintensität befand.

Evaluierung (siehe 3.7.2) gefunden - viele veröffentlichte 16S rRNA-Sequenzen stellen nur Teilsequenzen dar, denen meist Anfangs- und Endbereich der Sequenz aufgrund von Sequenzierungs-Fehlern fehlen. Potentielle Zielsequenzen in diesen Bereichen könnten somit bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden und würden letztlich zu falsch-positiven Ergebnissen [bei einer Hybridisierung der Sonde an diese unsequenzierten Bereiche des Zielstranges (Fehlhybridisierung)] führen.

3.7.2 Sonden-Evaluierung

3.7.2.1 Dissoziationskurven 1

Bei der sich anschließenden mikroskopischen Auswertung von Cy3-fluoreszierenden Endosymbionten-Zellen im Vergleich zu DAPI-fluoreszierenden Endosymbionten-Zellen (1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl) ergab sich, dass die Sonde Pae444 auch bei 80% Formamid-Konzentration keinerlei Dissoziation zeigte (siehe **Abb. 34**). Trotz dieser hohen stringenten Bedingungen konnte eine 100%ige Cy3-Fluoreszenz verzeichnet werden.

Paederus -Endosymbiont

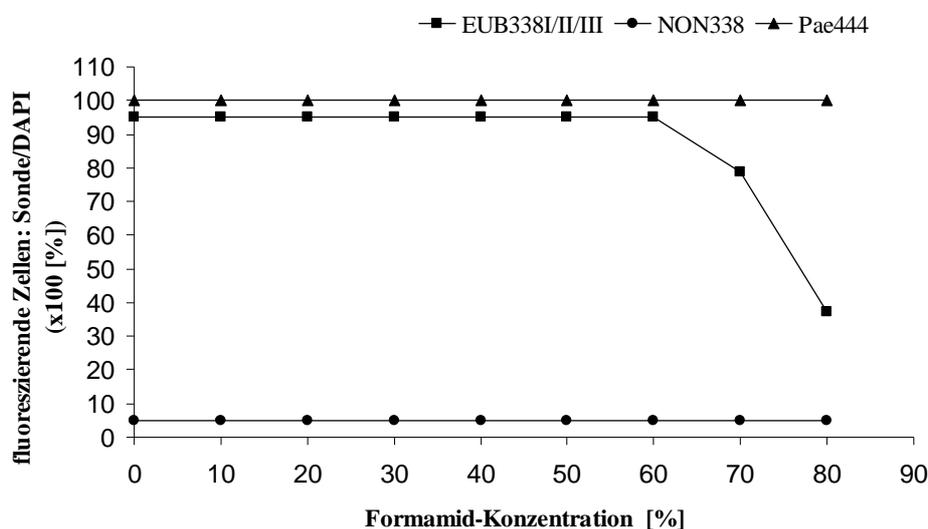


Abb. 34: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444, EUB338I/II/III und NON338 unter ansteigenden stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen, die mit fixierten Zellen des *Paederus*-Endosymbionten bestimmt wurden. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens 300 DAPI-fluoreszierende Zellen ausgezählt und mit den entsprechenden Cy3-fluoreszierenden Zellen ins Verhältnis gesetzt. Zur besseren Übersicht wurden die Datenpunkte für die Formamidkonzentrationen 0-60% (EUB-Kurve) und 0-80% (NON-Kurve) etwas unter 100% bzw. etwas über 0% Fluoreszenzintensität angesetzt.

Die Tatsache, dass eine spezifische Gensonde mit nicht exakt zentralisiert liegenden mismatches mit der ähnlichsten Nicht-Zielsequenz hybridisieren kann, ist für sehr niedrige stringente Bedingungen (Formamid-Konzentrationen von 0-20%) nicht ungewöhnlich. Im vorliegenden Fall konnte diese Fehl-Hybridisierung von Pae444 mit der Nicht-Zielsequenz von *Pseudomonas aeruginosa* jedoch auch für sehr hohe Stringenzen (bis 80% Formamid-Konzentration) beobachtet werden (siehe **Abb. 35**). Die Fluoreszenzintensität im Vergleich mit hybridisierten Zellen des Endosymbionten war dabei jedoch für die beiden höchsten Formamid-Konzentrationen (70% und 80%) deutlich geringer. Trotzdem reichte die höchste eingesetzte Stringenz von 80% Formamid-Konzentration im Hybridisierungsansatz auch hier nicht aus, um 50% Sonden-Dissoziation (gleichbedeutend mit der Schmelztemperatur der Sonde) zu verursachen. Dies galt auch für die eingesetzten EUB-Sonden.

Pseudomonas aeruginosa

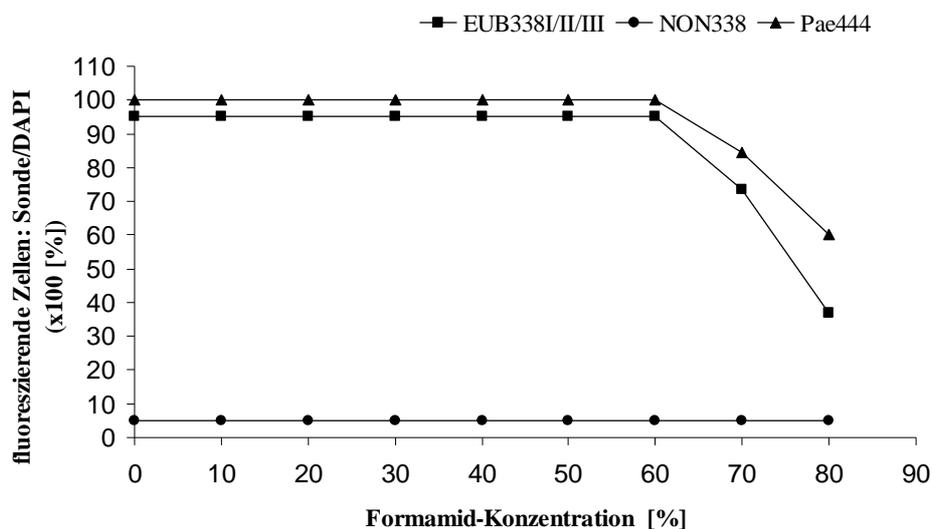


Abb. 35: Beschreibung siehe Abb. 34. Die Dissoziationskurven wurden hier jedoch mit fixierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt.

Da *Pseudomonas aeruginosa* ein ubiquitär vorkommendes Bakterium ist und demnach auch in Kurzflüglern gefunden werden kann, wurde zusätzlich die Helfer-Sonde cPae444 (Sequenz: siehe 3.7.3) synthetisiert. Zusammen mit der spezifischen Sonde eingesetzt, sollte das unmarkierte (keine Cy3-Farbstoffmarkierung) Kompetitor-Oligonucleotid eine mögliche Fehlhybridisierung mit der Nicht-Zielsequenz des pathogenen Pseudomonaden verhindern. Die optimalen Hybridisierungsbedingungen für die beiden Sonden wurden schließlich erneut

mit geeigneten Referenz-Organismen (*Paederus*-Endosymbiont, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) unter ansteigenden stringenten Bedingungen experimentell ermittelt.

3.7.2.2 Dissoziationskurven 2

Wie erwartet resultierte die Hybridisierung von Endosymbionten-Zellen mit der Sonde Pae444Cy3 im Vergleich mit DAPI-fluoreszierenden Zellen erneut in 100% Fluoreszenzintensität für sämtliche Stringenzen (0-80% Formamid-Konzentration) (siehe **Abb. 34** und **Abb. 36**). Die Hybridisierung des Endosymbionten mit der Kompetitor-Sonde cPae444Cy3, die zwei mismatches innerhalb der Bindungsstelle aufweist, zeigte dieselbe hohe Intensität über einen weiten Bereich ansteigender Formamid-Konzentrationen von 0-60%. Eine weitere Erhöhung der Stringenz auf 70 bzw. 80% führte zwar zu einem signifikanten Verlust der Fluoreszenzintensität, konnte aber auch hier keine Sonden-Dissoziation von 50% verursachen. Eine Hybridisierung der Misch-Sonde (cPae444Cy3/Pae444) an die 16S rRNA des Endosymbionten konnte nur für sehr geringe Formamid-Konzentrationen beobachtet werden. Bei Stringenzen ab 10% verschwand das schwache Fluoreszenz-Signal vollständig.

***Paederus* -Endosymbiont**

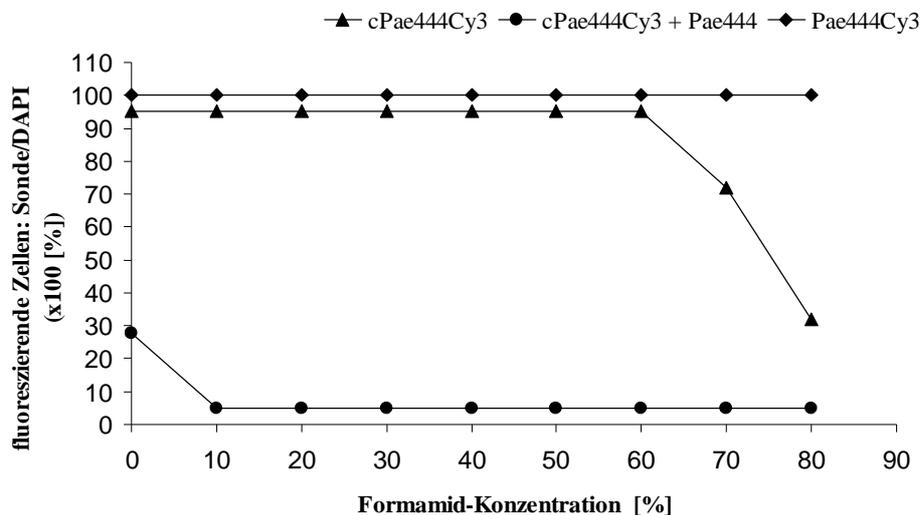


Abb. 36: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3, cPae444Cy3 und cPae444Cy3/Pae444 unter ansteigenden stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen, die mit fixierten Zellen des *Paederus*-Endosymbionten bestimmt wurden. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens 300 DAPI-fluoreszierende Zellen ausgezählt und mit den entsprechenden Cy3-fluoreszierenden Zellen ins Verhältnis gesetzt. Zur besseren Übersicht wurden die Datenpunkte für die Formamidkonzentrationen 0-60% (cPae444Cy3-Kurve) und 10-80% (cPae444Cy3/Pae444-Kurve) von 100 auf 95 bzw. von 0 auf 5% Fluoreszenzintensität festgesetzt.

Im Falle von mit Pae444Cy3 hybridisierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* konnte wiederum ein signifikanter Verlust der Fluoreszenzintensität bei sehr hohen stringenten Bedingungen (ab 60% Formamid-Konzentration im Hybridisierungsansatz) beobachtet werden (siehe **Abb. 35** und **Abb. 37**). Im Gegensatz dazu resultierte die Hybridisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen mit der Cy3-markierten Kompetitor-Sonde cPae444Cy3 in 100% Fluoreszenzintensität für sämtliche Formamid-Konzentrationen von 0-80%. Die Zugabe einer equimolaren Menge des unmarkierten Kompetitor-Oligonucleotids cPae444 zu der Cy3-markierten Endosymbionten-Sonde Pae444 verhinderte eine Hybridisierung der spezifischen Sonde an die 16S rRNA von *Pseudomonas aeruginosa* bei einer Formamid-Konzentration ab 20%.

Pseudomonas aeruginosa

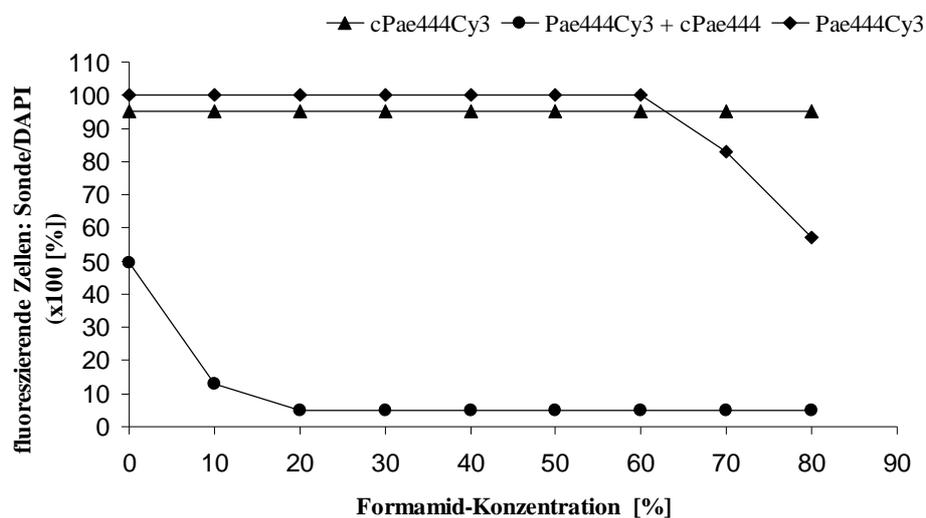


Abb. 37: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3, cPae444Cy3 und Pae444Cy3/cPae444 unter ansteigenden stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen, die mit fixierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt wurden. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens 300 DAPI-fluoreszierende Zellen ausgezählt und mit den entsprechenden Cy3-fluoreszierenden Zellen ins Verhältnis gesetzt. Zur besseren Übersicht wurden die Datenpunkte für die Formamidkonzentrationen 0-100% (cPae444Cy3-Kurve) und 20-80% (Pae444Cy3/cPae444-Kurve) von 100 auf 95 bzw. von 0 auf 5% Fluoreszenzintensität festgesetzt.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der Endosymbionten-Sonde wurde zusätzlich eine Hybridisierung mit fixierten Zellen von *Escherichia coli* als Negativkontrolle unter denselben stringenten Bedingungen, wie für den *Paederus*-Endosymbionten und *Pseudomonas aeruginosa*, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass im Falle von Pae444Cy3 selbst für sehr niedrige Stringenzen kein positives Hybridisierungssignal erhalten werden konnte (siehe **Abb.**

38). Im Gegensatz dazu konnte eine Hybridisierung von cPae444Cy3 (2 mismatches zur Sonden-Sequenz von Pae444) mit Zellen von *E. coli* bei sehr niedrigen Hybridisierungs-Stringenzen beobachtet werden. Durch Erhöhung der Stringenz auf 20% Formamid-Konzentration konnte jedoch eine Bindung der Sonde an die 16S rRNA von *E. coli* und damit ein positives Fluoreszenz-Signal vollständig verhindert werden.

Escherichia coli : "Negativkontrolle"

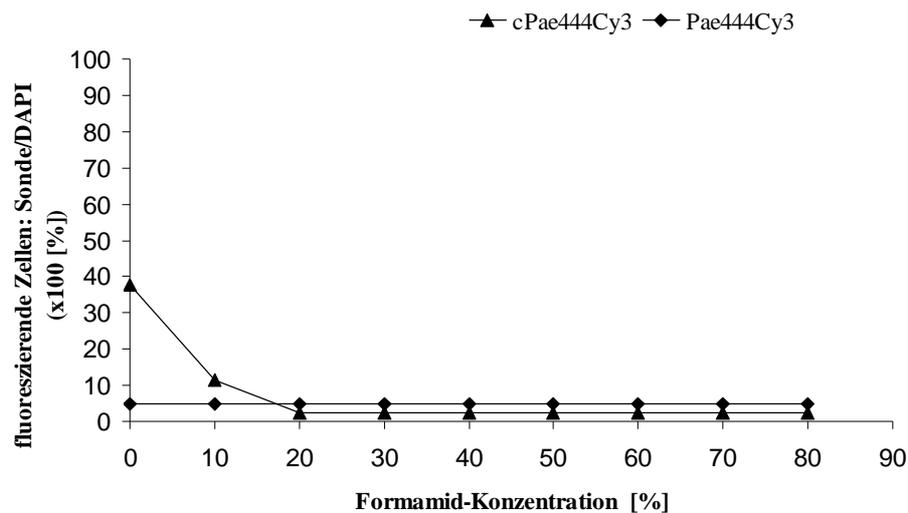


Abb. 38: Dissoziationskurven der Oligonucleotid-Sonden Pae444Cy3 und cPae444Cy3 unter ansteigenden stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen, die mit fixierten Zellen von *Escherichia coli* bestimmt wurden. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens 300 DAPI-fluoreszierende Zellen ausgezählt und mit den entsprechenden Cy3-fluoreszierenden Zellen ins Verhältnis gesetzt. Zur besseren Übersicht wurden die Datenpunkte für die Formamid-Konzentrationen 0-100% (Pae444Cy3-Kurve) und 20-80% (cPae444Cy3-Kurve) von 0 auf 5 bzw. von 0 auf 2,5% Fluoreszenzintensität festgesetzt.

3.7.3 Sonden-Sequenzen

Tab. 12 zeigt die Sequenzen der Cy3-markierten Endosymbionten-Sonde und des unmarkierten Kompetitor-Oligonucleotids cPae444 mit deren Hybridisierungsstellen.

Tab. 12: Sequenz und Bindungsstelle der konstruierten Endosymbionten-Sonde und des Kompetitors.

Sonde	Sequenz (5'-3')	Bindungsstelle	Ziel-Gruppe
Pae444	CTC TCT GCC CTT CCT CCC	16S, 444-462	<i>Paederus</i> - Endosymbiont
Kompetitor-Sonde	Sequenz (5'-3')	Bindungsstelle	Ziel-Gruppe
cPae444	CTT ACT GCC CTT CCT CCC	16S, 444-462	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>

3.7.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit UNICRYL-Schnitten

Nach der erfolgreichen Evaluierung der beiden Sonden wurden diese im Verhältnis 1:1 gemischt und davon 2 μ l pro Dünnschnitt-Probe eingesetzt. Die Hybridisierungsbedingungen wurden dabei auf eine Stringenz von 30% Formamid-Konzentration im Hybridisierungsansatz festgesetzt.

Nun wurden eine vertikale und eine horizontale Schnittserie eines Käfer-Abdomens (siehe **3.7.4.1 Abb. 39 A-G, Abb. 40 A-D und 3.7.4.2 Abb. 41 A-D**) mit der spezifischen Misch-Sonde hybridisiert, um einen Überblick über die Organisation des *Paederus*-Endosymbionten in den Anhangsdrüsen und im Ausführgang des weiblichen Geschlechtsapparats zu erhalten.

3.7.4.1 Hybridisierte Querschnitte von *Paederus riparius*-Abdomina

Die im Folgenden aufgeführten Abbildungen (**Abb. 39 A-G**) zeigen eine Übersicht von mit Pae444/cPae444 hybridisierten abdominalen Querschnitten von *Paederus riparius*-Weibchen, die zusätzlich mit dem Nucleinsäure-Farbstoff DAPI angefärbt wurden. Das Vorhandensein des Endosymbionten wurde dabei durch eine intensive, hellorange Fluoreszenz angezeigt.

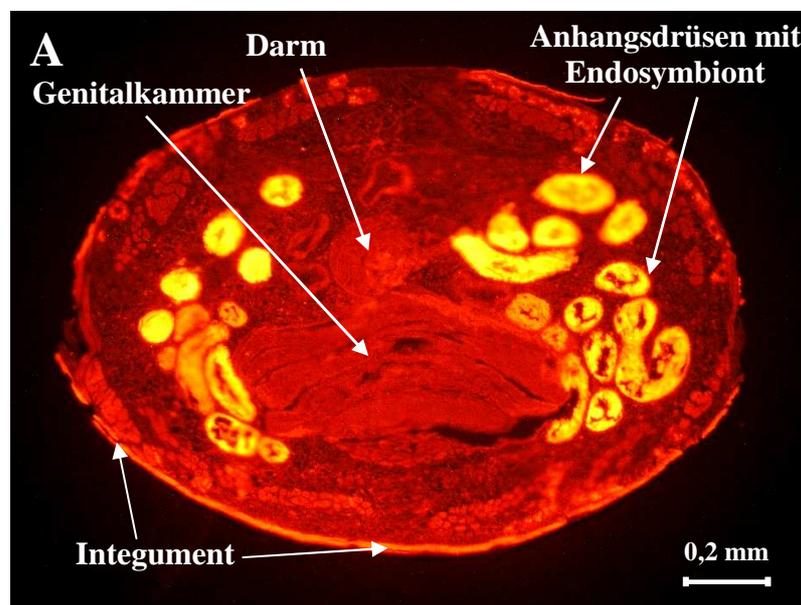


Abb. 39 A: Abdominaler Querschnitt (3 μ m Dicke) eines *Paederus riparius*-Weibchens im Cy3-Fluoreszenz-Modus, der mit einer 1:1 Mischung aus Cy3-markierter Endosymbionten-Sonde Pae444 und unmarkiertem Kompetitor-Oligonucleotid cPae444 bei mittleren stringenten Bedingungen (30% Formamid-konzentration im Hybridisierungsansatz) hybridisiert wurde. Die intensive, hellorange Fluoreszenz der angeschnittenen Anhangsdrüsen kommt durch eine irreversible Bindung der Sonde an die 16S rRNA des *Paederus*-Endosymbionten zustande. Die übrige, mattorange Fluoreszenz stellt Autofluoreszenz der umgebenden Gewebe dar. Das im Integument enthaltene Chitin weist dabei die stärkste Autofluoreszenz auf.

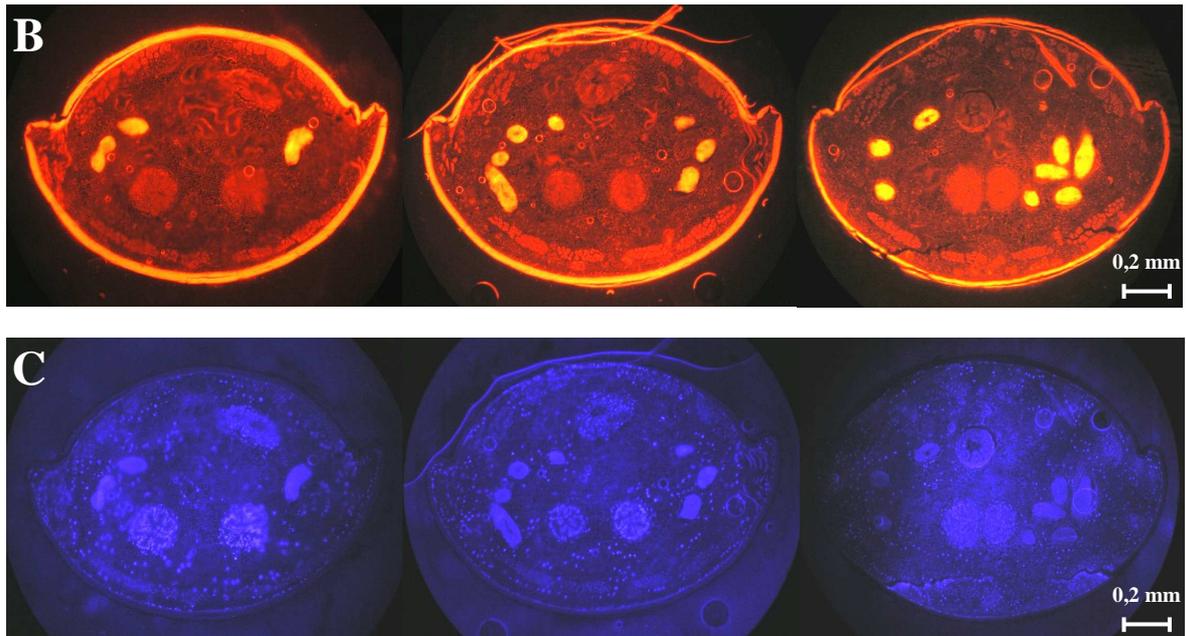


Abb. 39 B, C: Schnittabfolge aus dem Bereich des 5. und 6. Abdominal-Segments im Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenz-Modus. Die Ovarienäste beginnen langsam, sich zum Ovariengang zu vereinigen, und es finden sich hier erstmalig Schnittstellen der Anhangsdrüsen, die ein deutliches Fluoreszenz-Signal des Endosymbionten zeigen. Die starke blaue Fluoreszenz der entsprechenden Schnitte im DAPI-Modus rührt von der unspezifischen Färbung sämtlicher Nucleinsäuren (DNA und RNA) im Dünnschnitt-Präparat her.

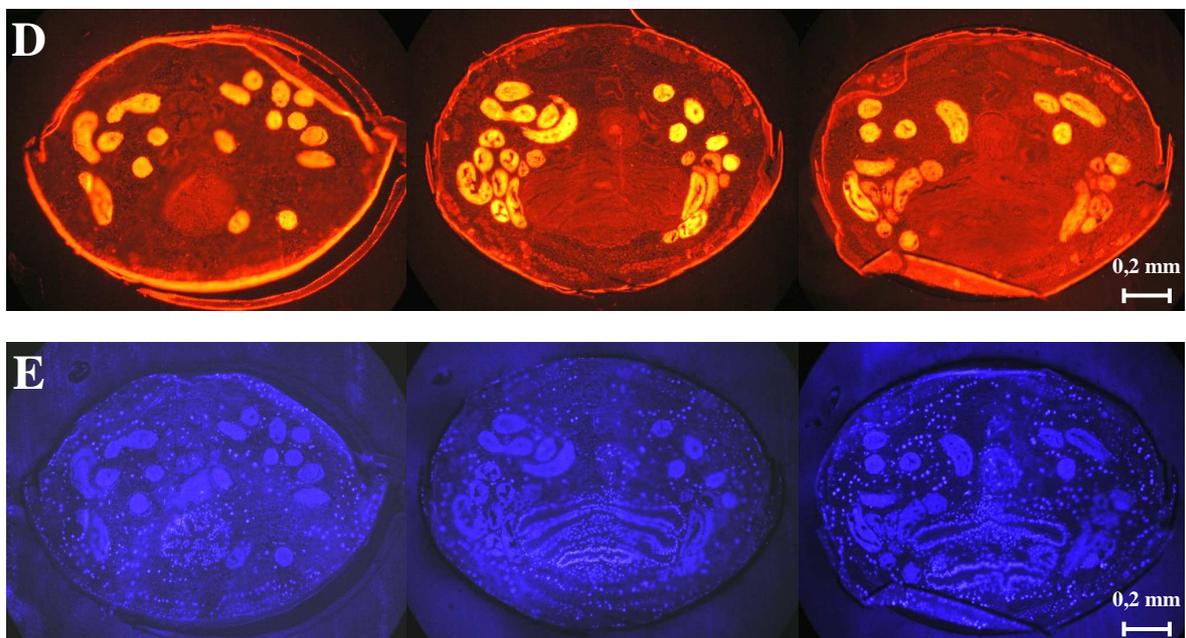


Abb. 39 D, E: Schnittabfolge aus dem Bereich des 6. und 7. Abdominal-Segments im Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenz-Modus. Die Anhangsdrüsen sind in diesem Bereich, in dem der Ovariengang in die Genitalkammer übergeht, am höchsten konzentriert. Das Vorkommen des Endosymbionten ist dabei auch hier ausschließlich auf die beiden Anhangsdrüsen begrenzt.

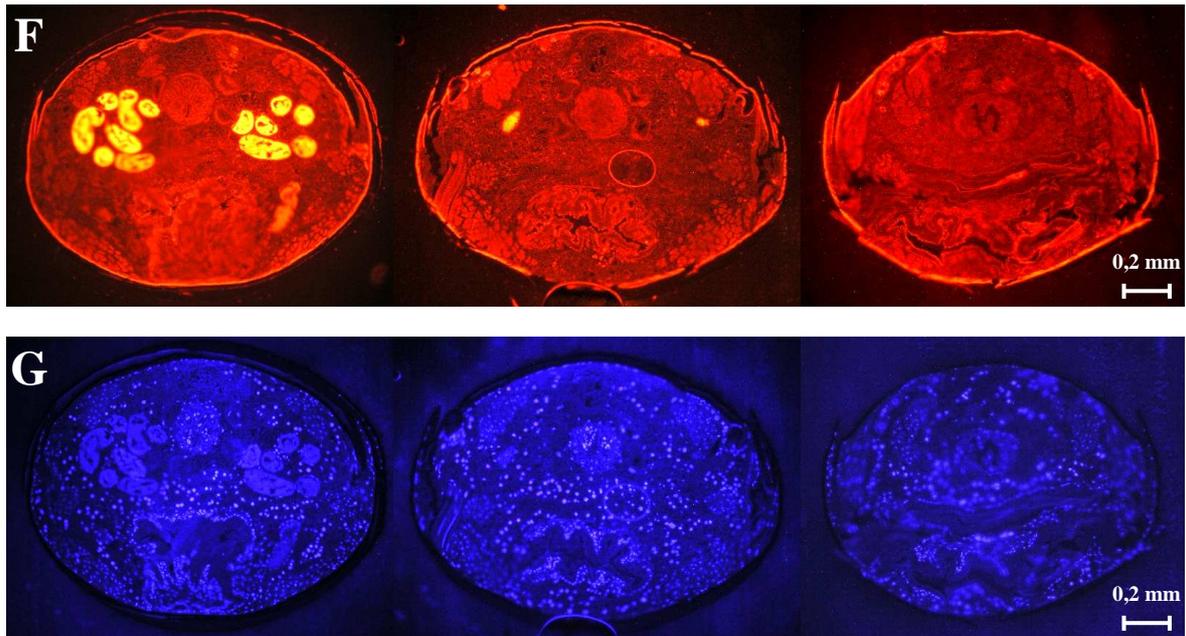


Abb. 39 F, G: Schnittabfolge aus dem Bereich des 7. und 8. Abdominal-Segments im Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenz-Modus. Mit dem Beginn der letzten Passage des weiblichen Geschlechtsapparats, dem Ausführngang, nimmt die Dichte der Anhangsdrüsen wieder ab und das den Endosymbionten detektierende, spezifische Fluoreszenz-Signal verschwindet schließlich vollständig.

Da der Endosymbiont bei der molekularen Untersuchung mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R auch im Kompartiment Ausführngang/Genitalkammer (siehe 3.5.3) detektiert werden konnte, wurde bei der fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung der verbliebenen vertikalen Dünnschnitt-Serien das Hauptaugenmerk auf diesen Bereich gelegt.

Der *Paederus*-Endosymbiont konnte dabei, wie auch schon unter 3.6.2.1 (Abb. 29 D, E) beschrieben, in dem Bereich des Ausführngangs detektiert werden, in den die beiden Anhangsdrüsen münden. Die folgenden Abbildungen (Abb. 40 A-D) zeigen diesen besonderen Bereich bei verschiedenen Vergrößerungen.



Abb. 40 A: Mit Methylenblau-Lösung angefarbter, vertikaler Dünnschnitt in dem Bereich des Ausführngangs, in den die beiden Anhangsdrüsen mit den Endosymbionten einmünden (dunkelblau gefärbt).

Bei der Betrachtung dieses Bereichs im Cy3-Fluoreszenz-Modus zeigte sich, dass das spezifische Cy3-Signal den Endosymbionten nicht nur in den beiden Mündungsbereichen der Anhangsdrüsen in unglaublich hoher Anzahl detektierte (**Abb. 40 B, D**), sondern auch in den umliegenden Geweben des Ausführgangs (**Abb. 40 C**). Die Menge an Endosymbionten-Zellen war hier jedoch deutlich geringer.

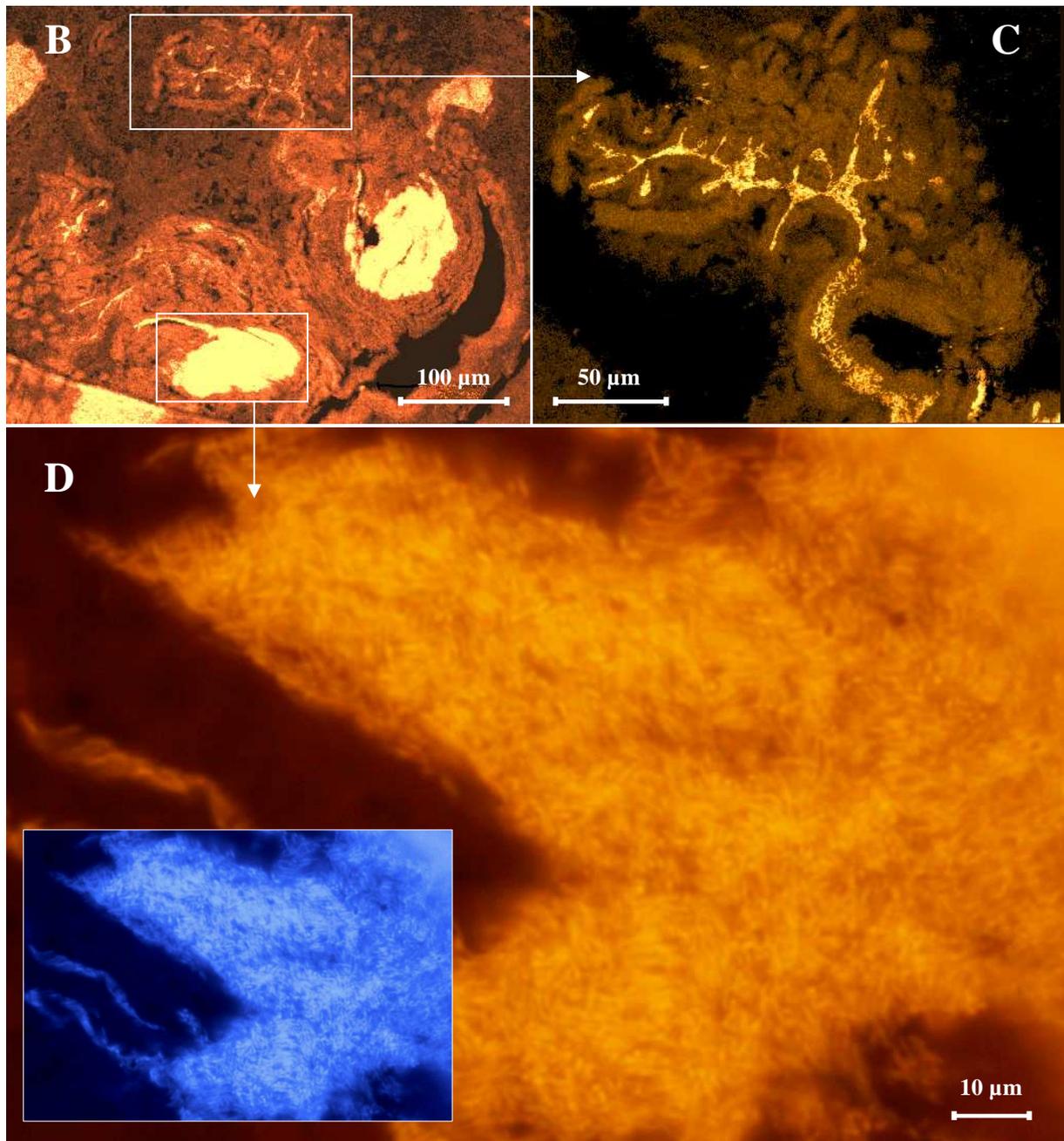


Abb. 40 B, C, D: Mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierte Dünnschnitte (3 μm Dicke) weiblicher *Paederus riparius* in dem Bereich des Ausführgangs, in den die Anhangsdrüsen münden, bei verschiedenen Vergrößerungen (B: 100x; C: 200x; D: 1000x mit Immersionsöl) im Cy3-Fluoreszenz-Modus. Aufnahmen B und C wurden mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (siehe 2.6) erstellt. In Aufnahme D wurde zusätzlich der verkleinerte entsprechende Ausschnitt im DAPI-Modus eingefügt.

Die fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der übrigen vertikalen Schnitt-Serien erbrachte ebenfalls, dass der *Paederus*-Endosymbiont in den Mündungsbereichen der Anhangsdrüsen im Ausführgang und in den Anhangsdrüsen selbst (siehe auch **3.7.4.2: Abb. 41 A-D**) in einer äußerst hohen Dichte vorhanden ist. Durch direkten Vergleich dieser Bereiche im Cy3-Modus mit den entsprechenden Bereichen im DAPI-Modus konnte zudem gezeigt werden, dass es sich um eine einheitliche Bakterienkolonie handelte. Die unter **3.6.2.2** gemachte Annahme, dass es sich bei den in den Schnittstellen der Anhangsdrüsen entdeckten Bakterien um eine Reinkultur des Endosymbionten handeln könnte, wurde somit bestätigt.

3.7.4.2 Hybridisierte Längsschnitte von *Paederus riparius*-Abdomina

Die nachfolgenden Abbildungen (**Abb. 41 A-D**) von hybridisierten Längsschnitten im Cy3-Fluoreszenz-Modus zeigen die in den Anhangsdrüsen weiblicher *Paederus riparius* vorkommende Endosymbionten-Kolonie bei verschiedenen Vergrößerungen. Durch den direkten Vergleich von Anhangsdrüsen-Schnittstellen im Cy3-Modus mit den entsprechenden Bereichen im DAPI-Modus konnte auch hier bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl gezeigt werden, dass es sich um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelte.

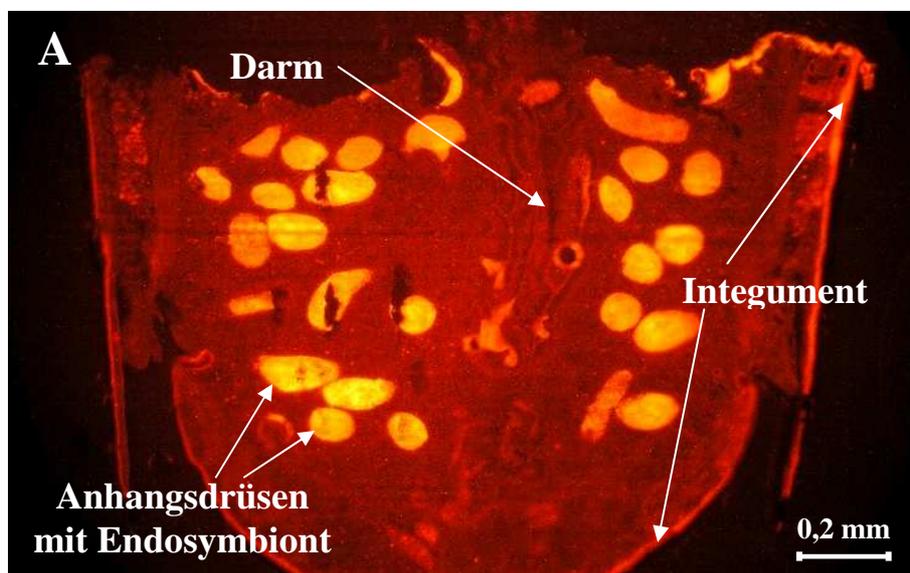


Abb. 41 A: Abdominaler Längsschnitt (3 μ m Dicke) eines *Paederus riparius*-Weibchens im Cy3-Fluoreszenz-Modus, der mit einer 1:1 Mischung aus Cy3-markierter Endosymbionten-Sonde Pae444 und unmarkiertem Kompetitor-Oligonucleotid cPae444 bei mittleren stringenten Bedingungen (30% Formamid-Konzentration im Hybridisierungsansatz) hybridisiert wurde. Die intensive, hellorange Fluoreszenz der Anhangsdrüsen-Schnittstellen kommt durch eine irreversible Bindung der Sonde an die 16S rRNA des *Paederus*-Endosymbionten zustande. Die übrige, mattorange Fluoreszenz stellt Autofluoreszenz der umgebenden Gewebe dar. Das im Integument enthaltene Chitin weist dabei die stärkste Autofluoreszenz auf.

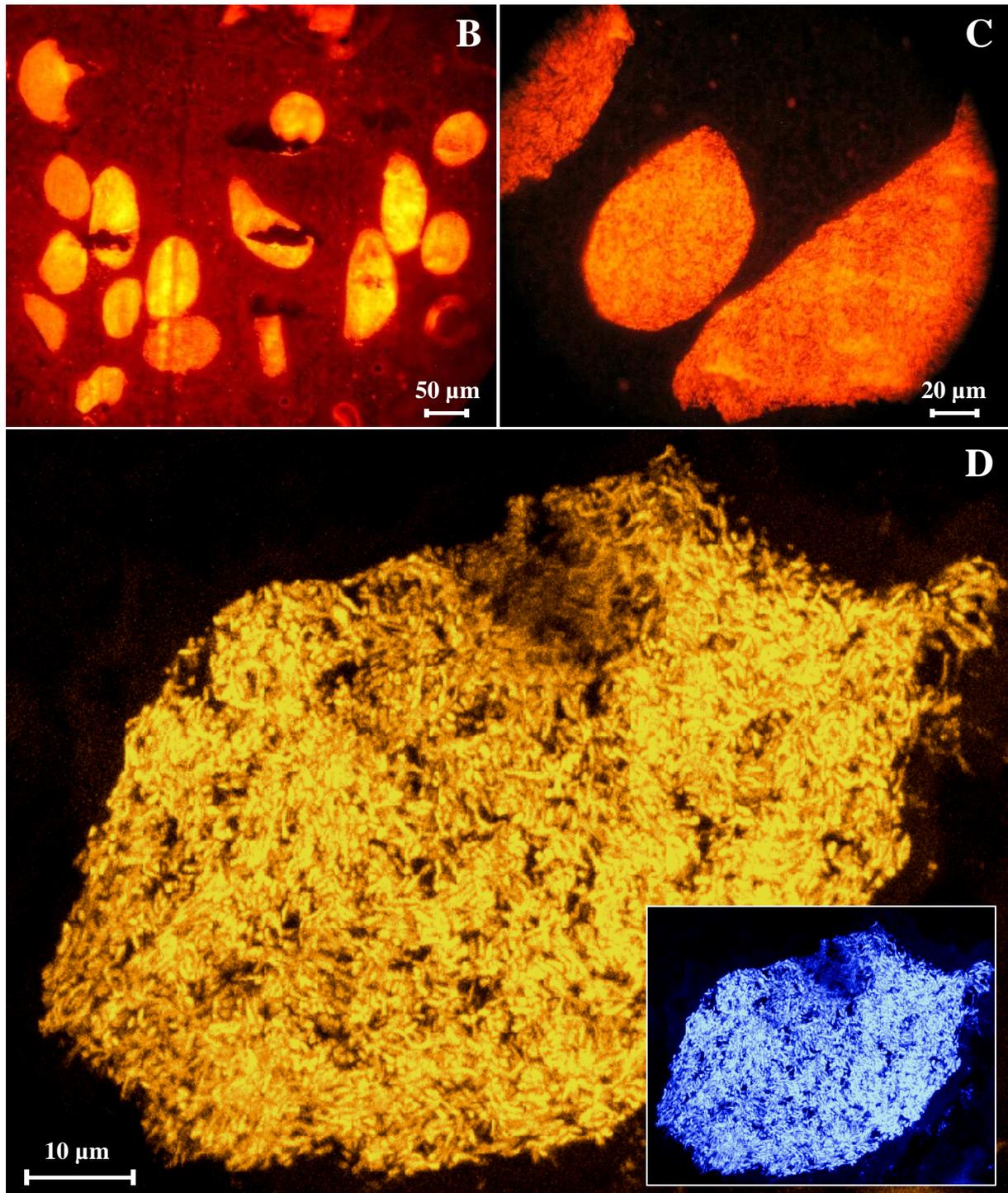


Abb. 41 B, C, D: Ausschnitte von mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten Längsschnitten (3 µm Dicke) weiblicher *Paederus riparius* im Bereich des 6. Abdominal-Segments. Die Aufnahmen zeigen die angeschnittenen Anhangsdrüsen mit der hellorange fluoreszierenden Endosymbionten-Kolonie bei verschiedenen Vergrößerungen (B: 100x; C: 400x; D: 1000x mit Immersionsöl) im Cy3-Fluoreszenz-Modus. Aufnahme D wurde mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (siehe 2.6) erstellt. In die Aufnahme wurde zusätzlich der verkleinerte entsprechende Ausschnitt im DAPI-Modus eingefügt.

3.7.4.3 Hybridisierte Dünnschnitte von *Paederus riparius*-Eiern

Da eine Übertragung des *Paederus*-Endosymbionten auf die Nachkommenschaft ausschließlich auf vertikalem Wege erfolgt und ein Vorhandensein des Endosymbionten auf der Ei-Oberfläche bereits von KELLNER (2001) festgestellt werden konnte, wurde in den mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten Ei-Dünnschnitten (5 µm Dicke) auf der Eischale bzw. im Ei-Inneren nach den Pederin produzierenden Bakterien gesucht.

In sämtlichen fluoreszenz-mikroskopisch untersuchten Schnittserien von *Paederus riparius*-Eiern konnte dabei ein Vorhandensein des Endosymbionten ausschließlich auf einer speziellen Schicht, die auf die eigentliche Eischale aufgelagert ist, festgestellt werden. Zudem konnte bei allen untersuchten Ei-Dünnschnitten festgestellt werden, dass das Ei-Innere stets bakterienfrei war (kein Cy3- bzw. DAPI-Fluoreszenz-Signal).

Die folgenden Abbildungen (**Abb. 42 A-C**) zeigen einen Überblick über die Verteilung des endosymbiontischen Bakteriums auf dieser besonderen Oberfläche von *Paederus riparius*-Eiern.

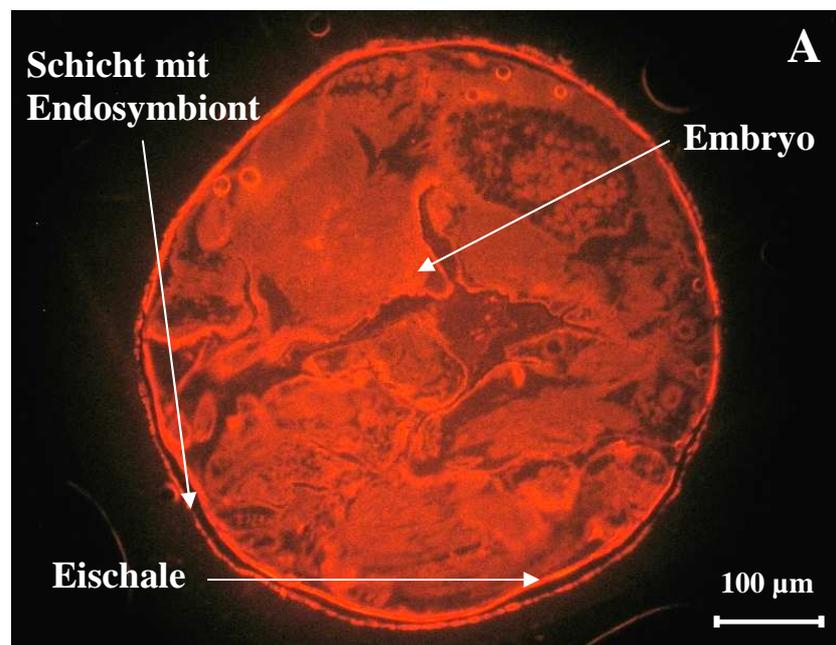


Abb. 42 A: Dünnschnitt eines sich kurz vor dem Schlupf befindlichen Eies von *Paederus riparius*, der mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisiert wurde, unter Cy3-Fluoreszenz. Die Autofluoreszenz der Eischale im Vergleich zum übrigen Gewebe ist dabei sehr hoch. Deutlich zu erkennen ist die zusätzliche Schicht, die die Eischale umgibt und auf der sich der Endosymbiont befindet. Die Schnittdicke beträgt 5 µm.



Abb. 42 B: Schnittfolge, welche die auffällig strukturierte Schicht über der eigentlichen Eischale (starke hellorange Autofluoreszenz) im Cy3-Fluoreszenz-Modus zeigt. Durch den Schneidevorgang hat sich die normalerweise eng anliegende Schicht von der Eischale etwas abgelöst. Die fluoreszierenden Endosymbionten-Zellen liegen dabei auf der Oberfläche dieser durch Konnektive verbundenen Strukturen.



Abb. 42 C: In dieser Schnittfolge ist zu erkennen, dass die Cy3-fluoreszierenden Endosymbionten-Zellen in einer speziellen Matrix auf die zahlreichen Strukturen der auf die Eischale aufgelagerten Schicht, die offenbar eine starke Oberflächenvergrößerung bewirken, aufgebracht sind. Die Eischale zeigt auch hier eine sehr starke, hellorange Autofluoreszenz.

Aufgrund der Dicke und leichten Wölbung der Schnitte und der Vielzahl von Endosymbionten-Zellen war eine exakte Fokussierung der Schnittebene mit allen Bakterienzellen eines vergrößerten Bereichs nicht möglich. Zur besseren Darstellung der Endosymbionten-Verteilung auf den zahlreichen Strukturen der oben beschriebenen, auf die Eischale aufgelagerten Schicht, wurden deshalb einige der Ei-Dünnschnitte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops dokumentiert.

Mit dieser Technik konnte eine fast dreidimensionale Dokumentation (siehe **Abb. 43**) von der Verteilung des *Paederus*-Endosymbionten auf und auch zwischen den Strukturen dieser Schicht, die offenbar der Oberflächenvergrößerung dienen, erzielt werden.

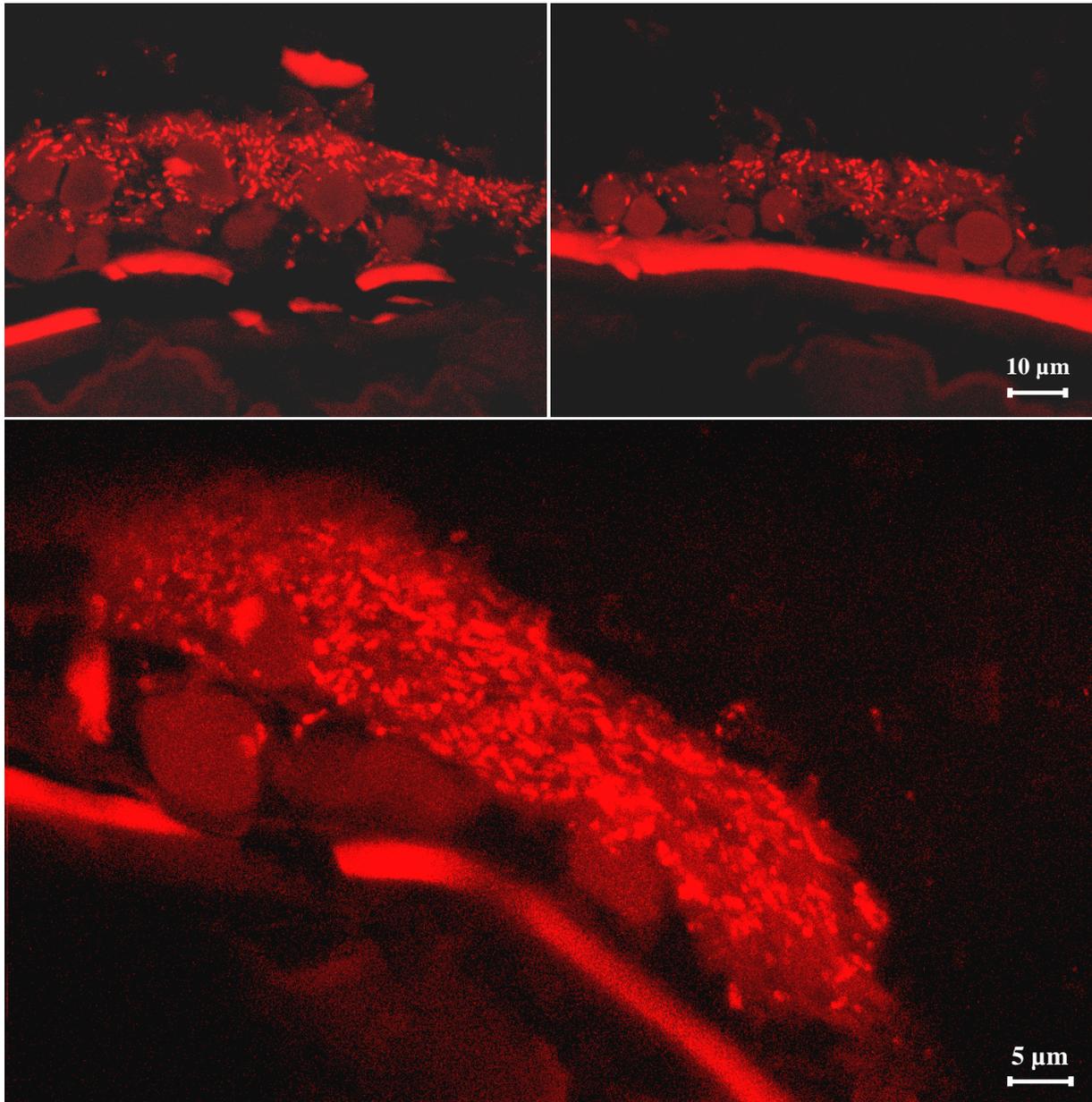


Abb. 43: Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Ei-Dünnschnitten im Cy3-Modus. Die Verteilung der Endosymbionten-Zellen auf und zwischen den zahlreichen Strukturen der auf die Eischale (links oben: zerborsten; rechts oben: intakt / beide mit helloranger Autofluoreszenz) aufgelagerten Schicht ist dabei sehr gut zu erkennen und wirkt fast plastisch.

Durch den Vergleich verschiedener Bereiche der Ei-Dünnschnitte unter DAPI-Fluoreszenz mit den entsprechenden Bereichen im Cy3-Fluoreszenz-Modus konnten neben den über die ganze Eioberfläche verteilten Endosymbionten auch einige andere Bakterien detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um nun eine bessere Übersicht über die Anordnung und Struktur der auf die Eischale aufgelagerten Schicht, auf der der *Paederus*-Endosymbiont lokalisiert ist, zu erhalten, wurden mehrere Eier von *Paederus riparius* elektronenmikroskopisch untersucht.

3.8 Elektronenmikroskopische Untersuchung von *Paederus riparius*-Eiern

Die Untersuchung der Ei-Oberflächen zahlreicher Eier von *Paederus riparius* mit einem Rasterelektronenmikroskop bestätigte die unter 3.7.4.3 gemachte Entdeckung, dass die eigentliche Eischale vollständig von einer Art granulösen Schicht bedeckt ist (siehe **Abb. 44**), auf der sich der zur Pederin-Synthese befähigte Endosymbiont bis zu seiner Übertragung auf die Nachkommenschaft der Käfer befindet.

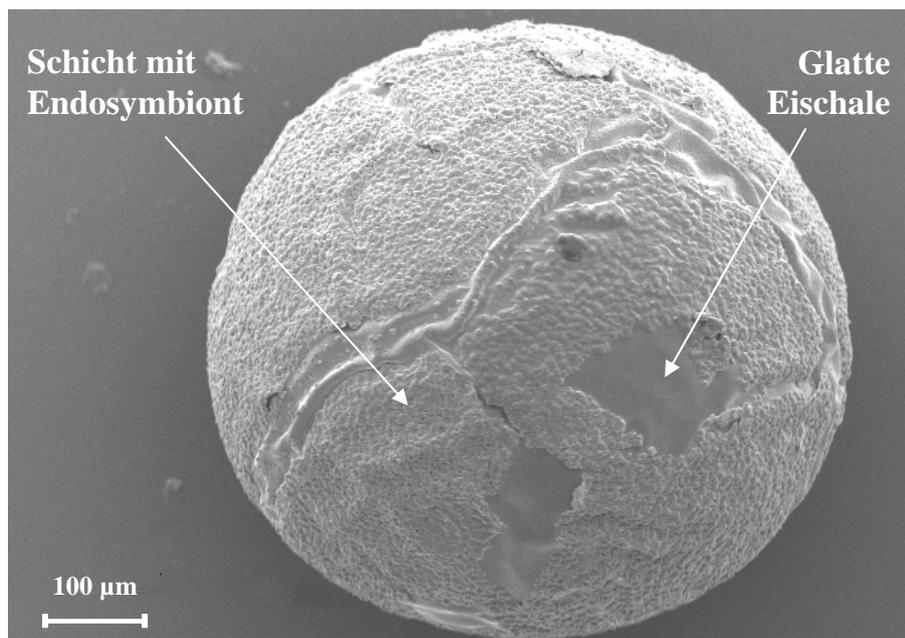


Abb. 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines abgelegten, zwei Tage alten *Paederus riparius*-Eies. Die den Endosymbionten beherbergende Schicht dieses Präparats ist an einigen Stellen abgeplatzt und lässt die darunter liegende ebene Eischale erkennen.

Bei ausreichend hoher Vergrößerung (500- bzw. 800-fach) ließ sich die einheitliche Struktur dieser Schicht deutlich erkennen. Dabei fiel auf, dass sie sich aus zahlreichen warzenartigen Erhebungen (Durchmesser zwischen 5 und 10 µm) zusammensetzte, die allesamt nach einem bestimmten Muster angeordnet und gleichsam miteinander vernetzt waren (siehe **Abb. 45**). Dass die homogen strukturierte Schicht nicht mit der Eischale verwachsen war, konnte unter Zuhilfenahme einer speziellen Dumont-Pinzette gezeigt werden. Mit deren feinen Spitzen (Durchmesser: 25 µm x 5 µm) ließ sich die granulöse Schicht unter einem Binokular fast vollständig von der Eischale abziehen, ohne diese dabei zu verletzen.

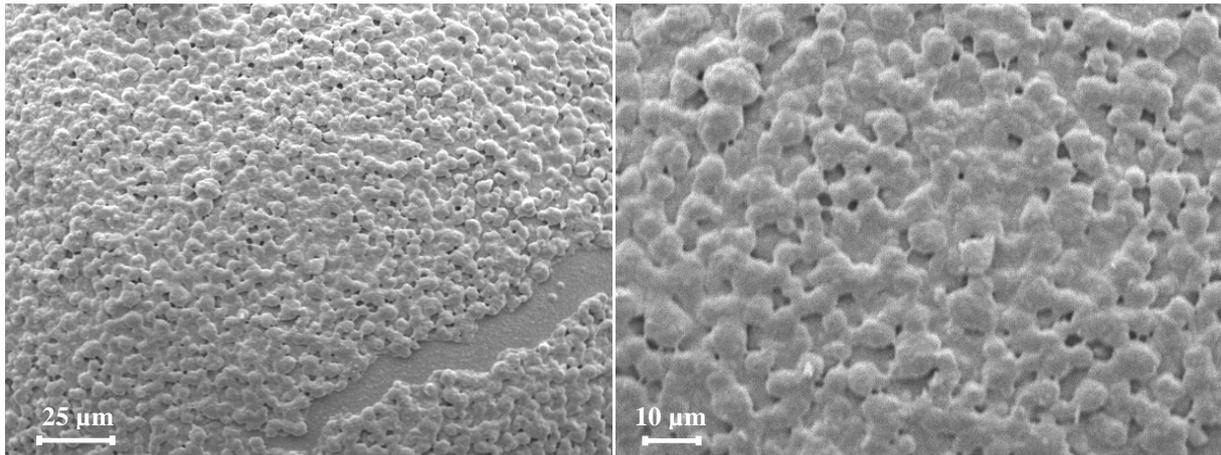


Abb. 45: 500- bzw. 800-fache Vergrößerung eines *Paederus riparius*-Eies unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die einheitliche, warzenartige Struktur der die Eischale umgebenden Schicht ist hier deutlich erkennbar. Die einzelnen Erhebungen sind dabei scheinbar durch Konnektive miteinander verbunden.

Diese interessanten Strukturen konnten bei allen von Käfer-Weibchen bereits abgelegten und mit dem Elektronenmikroskop untersuchten Eiern gefunden werden. Zur Überprüfung, ob die warzenartige Schicht bei der Passage der Eier durch den weiblichen Geschlechtsapparat schon im Ovar aufgebracht wird, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Eiern durchgeführt, die aus dem Ovariengang von *Paederus riparius*-Weibchen herauspräpariert werden konnten (siehe **Abb. 46**).

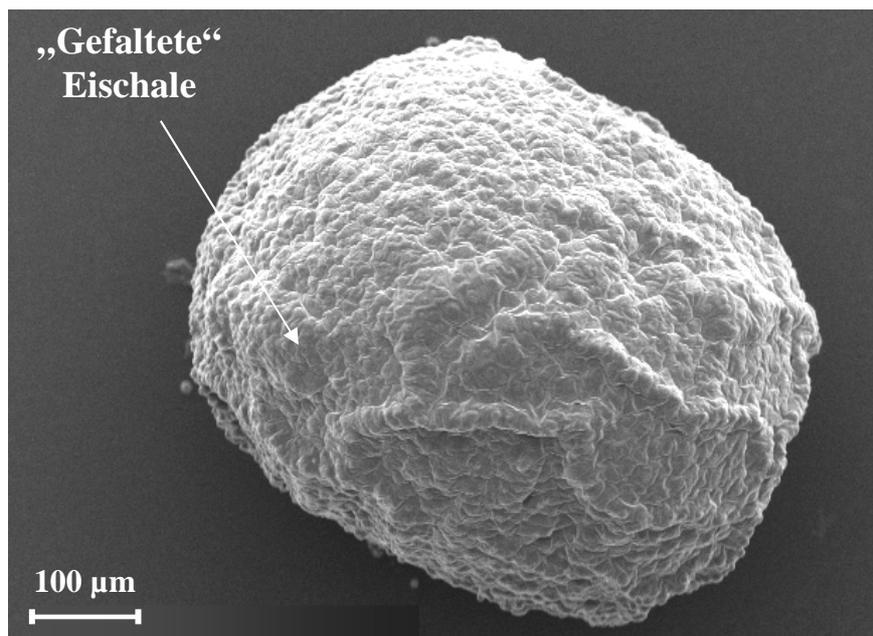


Abb. 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines aus dem Ovariengang herauspräparierten Eies von *Paederus riparius*. Die den Endosymbionten beherbergende Schicht fehlt hier.

Dabei zeigte sich, dass bei diesen Eiern die den Endosymbionten beherbergende Schicht, welche auf der Eischale von bereits abgelegten Eiern vorhanden war, fehlte. Auffallend war außerdem, dass die Eischale zwar eine glatte Oberfläche aufwies, diese jedoch stark eingefaltet war.

Die beiden folgenden Abbildungen (**Abb. 47 A, B**) zeigen deshalb zum besseren Verständnis die Eioberfläche eines aus dem Ovariengang herauspräparierten Eies von *Paederus riparius* im Vergleich zur Oberfläche eines bereits abgelegten, 3 Tage alten Eies. Der Unterschied ist dabei deutlich sichtbar.

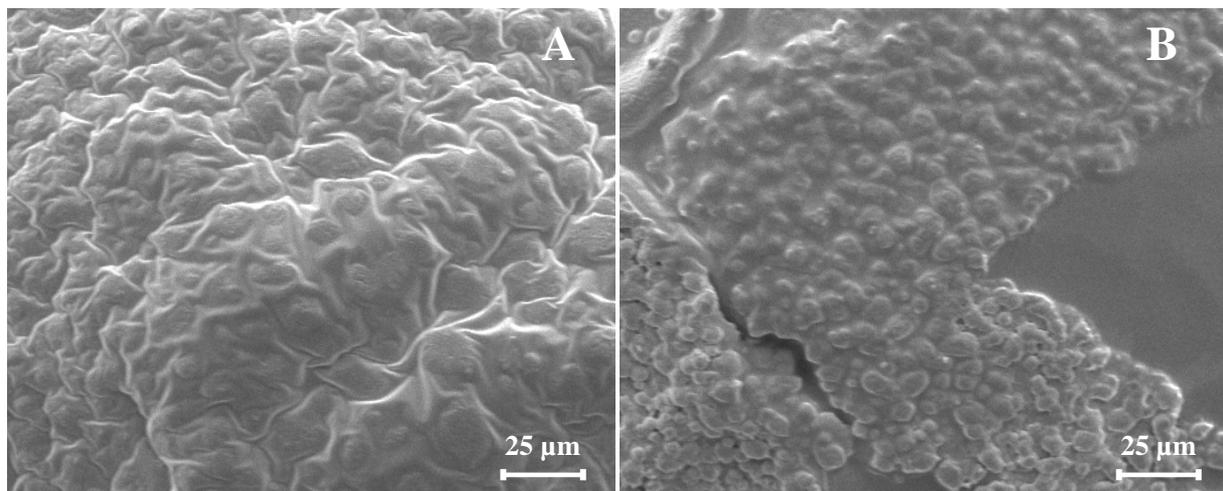


Abb. 47 A, B: 500-fache Vergrößerung von zwei *Paederus riparius*-Eiern unter dem Rasterelektronenmikroskop. **A:** Oberfläche eines aus dem Ovariengang von *Paederus riparius* herauspräparierten Eies, dessen Eischale stark gefaltet und von keiner granulösen Schicht umgeben ist. **B:** Die einheitliche, warzenartige Struktur der auf die Eischale aufgelagerten Schicht und die darunter liegende glatte Eischale eines von *Paederus riparius* bereits abgelegten Eies sind hier deutlich zu erkennen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich je zwei Eier aus den Ovariengängen und je zwei bereits abgelegte Eier verschiedener Weibchen mittels diagnostischer PCR auf das Vorhandensein des Endosymbionten hin untersucht (Daten nicht gezeigt). Um sicherzugehen, dass es sich bei den Weibchen, aus deren Ovariengängen die Eier herauspräpariert wurden, nicht um „-Tiere handelte, wurden zusätzlich deren Anhangsdrüsen abgetrennt und mit untersucht. Dabei wurden jeweils ein Ei bzw. beide Anhangsdrüsen eines Tieres in je einen fertigen PCR-Ansatz gegeben, darin kurz geschwenkt und wieder herausgenommen.

Die sich anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Proben zeigte im Falle der beiden abgelegten Eier ein Vorhandensein des Endosymbionten (durch die

spezifische Amplifikation eines 157 bp langen Teilstücks aus dem *ped*-Cluster) zuverlässig an. Im Falle der beiden Eier aus den Ovariengängen konnte anhand der Anhangsdrüsen der entsprechenden Weibchen gezeigt werden, dass es sich um „+“-Tiere handelte. Das spezielle, den *Paederus*-Endosymbionten detektierende Signal konnte dabei für die aus den Ovariengängen herauspräparierten Eier nicht erhalten werden.

3.9 Elektronenmikroskopische Untersuchung des Ausführungsgangs von *Paederus riparius*

Um nun weiteren Aufschluss über die Aufbringung der den Endosymbionten enthaltenden granulösen Schicht auf die Eier zu erhalten, wurde die Suche nach dafür geeigneten Strukturen in horizontal aufpräparierten Ausführungsgängen von *Paederus riparius*-Weibchen fortgesetzt.

Bei der elektronenmikroskopischen Auswertung der Proben konnte eine äußerst hohe Dichte an spitz zulaufenden Strukturen entdeckt werden, welche die innere Oberfläche des Ausführungsgangs vollständig auskleideten. Dabei fiel auf, dass die durchschnittlich 3,5 µm breiten und 5 µm langen Gebilde, die an Haifischzähne erinnern, allesamt nach einem bestimmten Muster nebeneinander angeordnet waren.

Die im Folgenden aufgeführten Abbildungen (**Abb. 48 A-E**) zeigen diese relevanten Strukturen bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Rasterelektronenmikroskop.

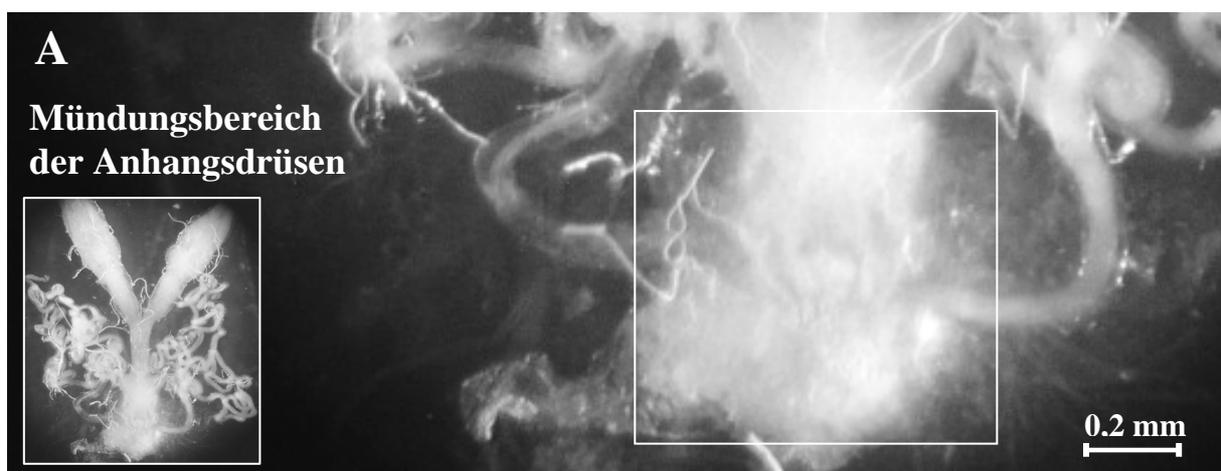


Abb. 48 A: Überblick über den Bereich des Ausführungsgangs, der für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen horizontal aufpräpariert wurde (weiß umrandet) und in den die beiden Anhangsdrüsen einmünden. Zur besseren Übersicht wurde zusätzlich eine stark verkleinerte Aufnahme des vollständigen weiblichen Geschlechtsapparats von *Paederus riparius* eingefügt.

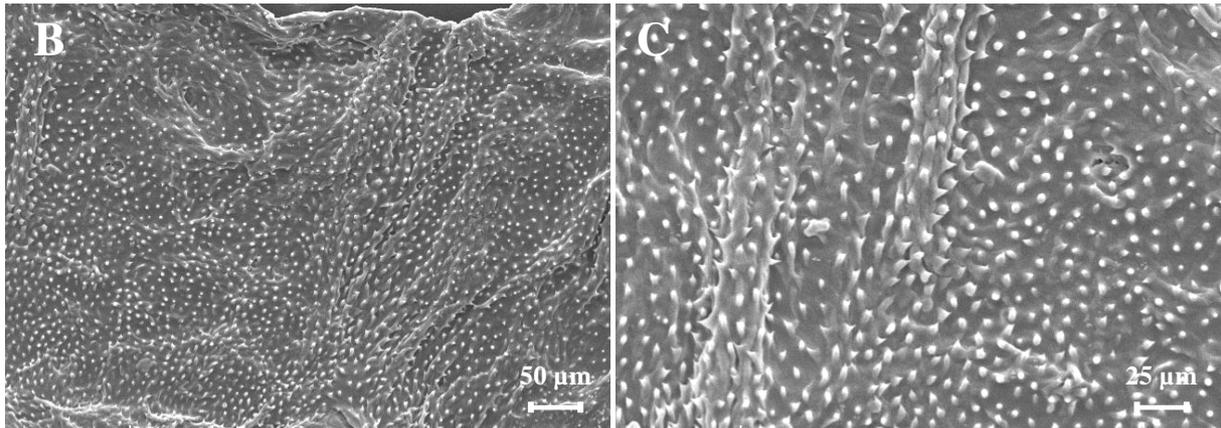


Abb. 48 B, C: 160- bis 320-fache Vergrößerung horizontal aufpräparierter Ausführgänge von verschiedenen *Paederus riparius*-Weibchen unter dem Rasterelektronenmikroskop. Bei zunehmender Vergrößerung wird eine einheitliche Anordnung von spitz zulaufenden Strukturen sichtbar, die auf der gesamten inneren Oberfläche des Ausführgangs verteilt sind.

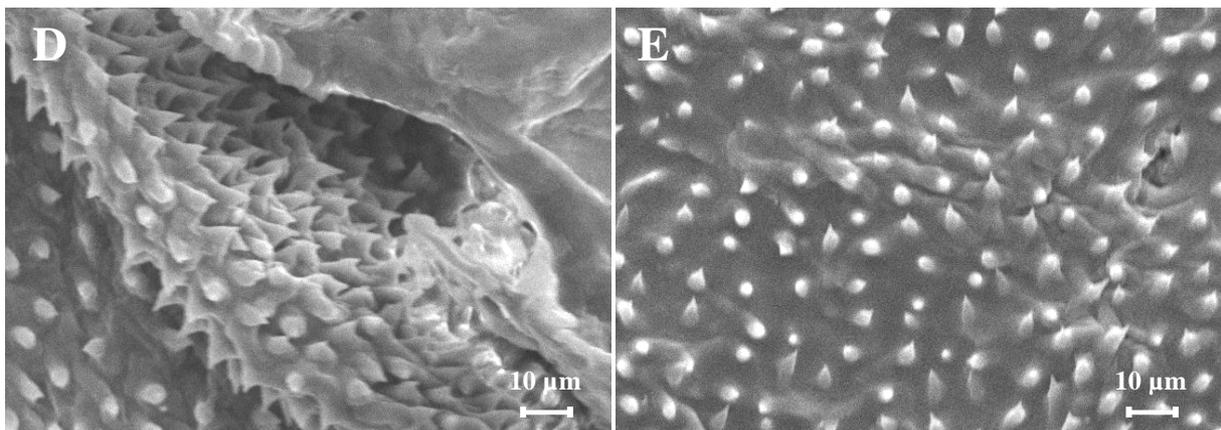


Abb. 48 D, E: 800-fache Vergrößerung von horizontal aufpräparierten Ausführgängen verschiedener *Paederus riparius*-Weibchen unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die einheitliche Größe und Struktur der an Haifisch-Zähne erinnernden Strukturen, welche die innere Oberfläche des Ausführgangs in einer hohen Dichte auskleiden, ist hier besonders gut zu erkennen.

Ein verblüffend ähnliches Muster konnte bereits bei der die Eischale umgebenden granulösen Schicht (siehe oben: **Abb. 45**), die den *Paederus*-Endosymbionten bis zur Übertragung auf die Nachkommenschaft beherbergt, entdeckt werden.

Zur besseren Übersicht zeigt die folgende Abbildung (**Abb. 49**) daher einen Vergleich der beiden verschiedenartigen Oberflächenstrukturen des Ausführgangs und der Eier, die beide annähernd dasselbe Anordnungs-Muster aufweisen. Hierbei konnte zudem festgestellt werden, dass der durchschnittliche Abstand der haifischzahnartigen, spitz zulaufenden

Strukturen im Ausführungsgang mit der durchschnittlichen Größe der einzelnen Erhebungen der granulösen Schicht auf den Eiern exakt übereinstimmte.

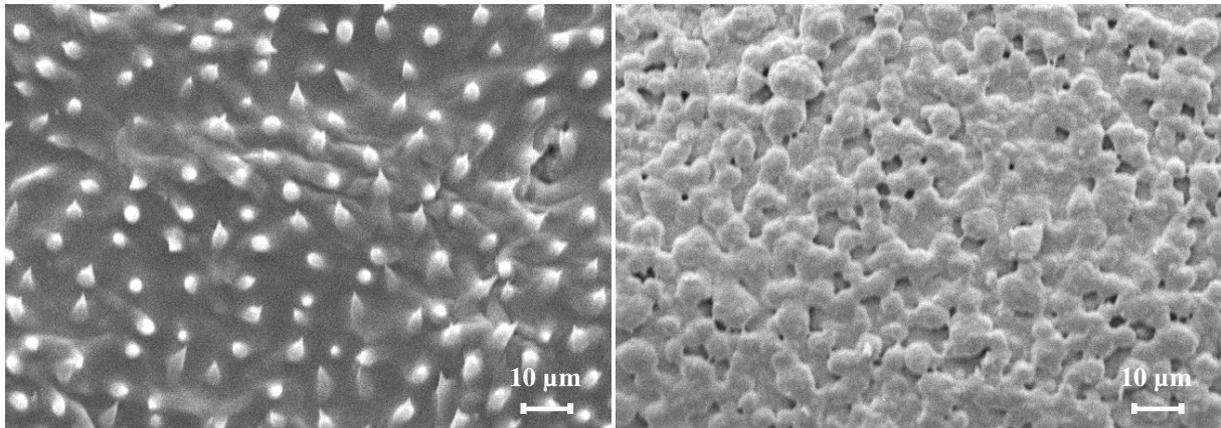


Abb. 49: 800-fache Vergrößerung eines horizontal aufpräparierten Ausführungsgangs im Vergleich zur granulösen, die Eischale umgebenden Schicht eines abgelegten Eies derselben Vergrößerung. Die fast haargenaue Übereinstimmung der verschiedenen Strukturen in ihrer Anordnung ist dabei deutlich zu erkennen.

TEIL C: ISOLIERUNG

3.10 Mechanische Isolierung des *Paederus*-Endosymbionten

Zur Überprüfung, ob sich der *Paederus*-Endosymbiont mechanisch isolieren ließ, wurde die aus den angeschnittenen Anhangsdrüsen austretende weißliche Masse, die im wässrigen Milieu mit einer Microliter-Pipette aufgesaugt werden konnte und bei der es sich vermutlich um eine darin vorkommende Reinkultur des Endosymbionten handelte, als erstes auf das Vorhandensein des spezifischen Teilstücks aus dem *ped*-Cluster mittels diagnostischer PCR untersucht.

Durch die sich anschließende Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (Daten nicht gezeigt) konnte bestätigt werden, dass der Pederin produzierende Endosymbiont in der gesammelten Flüssigkeit vorhanden war und demnach durch mechanische Einwirkung auf die Anhangsdrüsen (Einschneiden mit einer Microfederschere) von diesen isoliert werden konnte.

Die von mehreren Anhangsdrüsen gesammelte wässrige Lösung des *Paederus*-Endosymbionten konnte nun mit verschiedenen Methoden physiologisch und phylogenetisch untersucht werden. Zuvor wurde jedoch mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie überprüft, ob die Symbionten-Kolonie frei von kontaminierender Begleitmikroflora war.

3.10.1 Lichtmikroskopische Untersuchung im Phasenkontrast

Um einzelne Endosymbionten-Zellen lichtmikroskopisch betrachten zu können, mussten zuerst 10 µl der wässrigen Endosymbionten-Lösung auf einen diagnostischen Glasobjektträger aufgebracht werden. Nachdem die Flüssigkeit an der Luft getrocknet war, wurde der Objektträger kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen, um die Zellen mit Hitze zu fixieren.

Die Dokumentation der Bakterienprobe bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl zeigte, dass es sich um eine morphologisch einheitliche Kolonie mit dem typischen *Pseudomonas*-ähnlichen Erscheinungsbild handelte (siehe **Abb. 50**). Eine kontaminierende Begleitmikroflora konnte in der Probe nicht entdeckt werden.

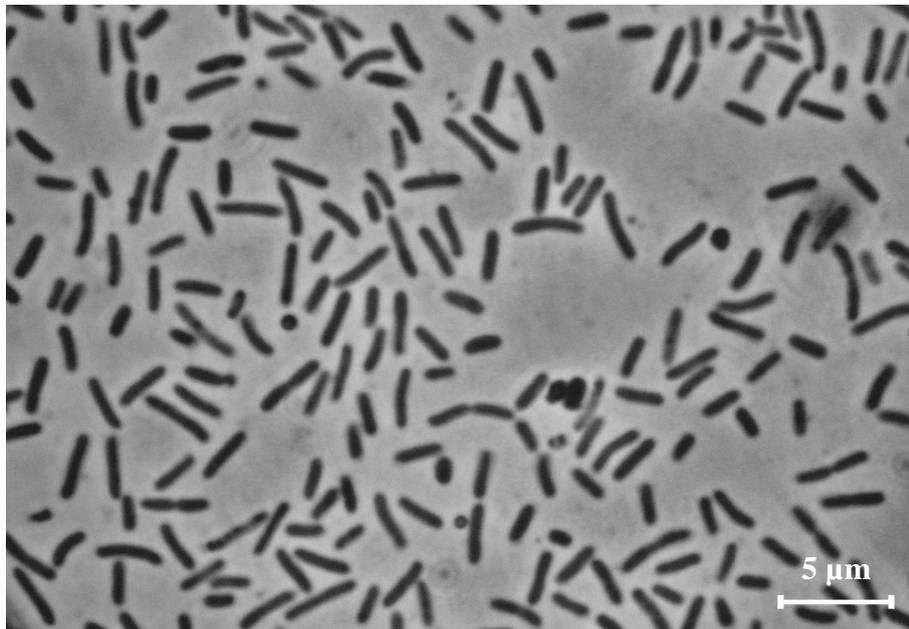


Abb. 50: 1000-fache Vergrößerung des aus den Anhangsdrüsen von weiblichen *Paederus riparius* isolierten, zur Pederin-Synthese befähigten Endosymbionten im Phasenkontrast (100x). Die morphologisch sehr hohe Ähnlichkeit zu *Pseudomonas aeruginosa* ist dabei deutlich zu erkennen.

3.10.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit Pae444Cy3/cPae444

Um jedoch hundertprozentig bestätigen zu können, dass aus den Anhangsdrüsen der Käfer eine Reinkultur des Endosymbionten ohne Begleitmikroflora isoliert werden konnte, mussten die in der wässrigen Lösung vorhandenen Symbionten-Zellen mit 4%iger PFA-Lösung fixiert

werden. Anschließend wurden 10 µl der fixierten Zell-Lösung auf einen diagnostischen Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Nach dem Entwässern mit Alkohol wurde die Endosymbionten-Probe mit der spezifischen Sonde Pae444Cy3/cPae444 bei 30% Stringenz hybridisiert.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hybridisierten Probe im Cy3-Fluoreszenz-Modus im Vergleich zu DAPI fluoreszierenden Zellen von zufällig ausgewählten, sich entsprechenden Bereichen auf dem Objektträger erbrachte, dass die aus den Anhangsdrüsen mechanisch isolierte Endosymbionten-Kolonie frei von unerwünschter Begleitmikroflora war. Es handelte sich hier somit definitiv um eine Reinkultur des Pederin-Produzenten.

Die nachfolgende Abbildung (**Abb. 51**) zeigt die beiden Fluoreszenz-Modi eines willkürlich ausgewählten Bereichs der hybridisierten Symbionten-Probe auf dem diagnostischen Objektträger.

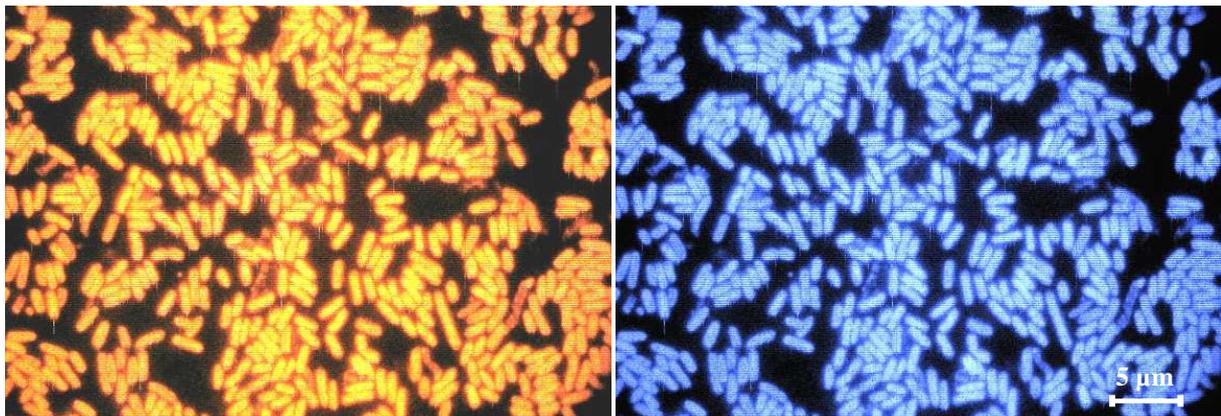


Abb. 51: 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl des aus den Anhangsdrüsen von weiblichen *Paederus riparius* isolierten und mit Pae444Cy3/cPae444 hybridisierten Endosymbionten im Cy3- bzw. DAPI-Modus des Fluoreszenzmikroskops. Die morphologisch sehr hohe Ähnlichkeit zu *Pseudomonas aeruginosa* geht daraus deutlich hervor. Die Größe einzelner Bakterienzellen beträgt dabei ca. 0,7 µm x 2,0 µm.

3.10.3 Enzym-Tests (Aminopeptidase, Katalase, Oxidase)

Da nun sicher war, dass es sich bei der von den Anhangsdrüsen mehrerer *Paederus riparius*-Weibchen gesammelten Endosymbionten-Lösung um eine Reinkultur des Bakteriums handelte, wurden damit verschiedene Enzym-Tests durchgeführt.

Als erstes wurde mit dem Aminopeptidase-Test die Gram-Eigenschaft des Endosymbionten überprüft. Auf die Teststreifen wurde dafür 50 µl der Endosymbionten-Lösung aufgebracht

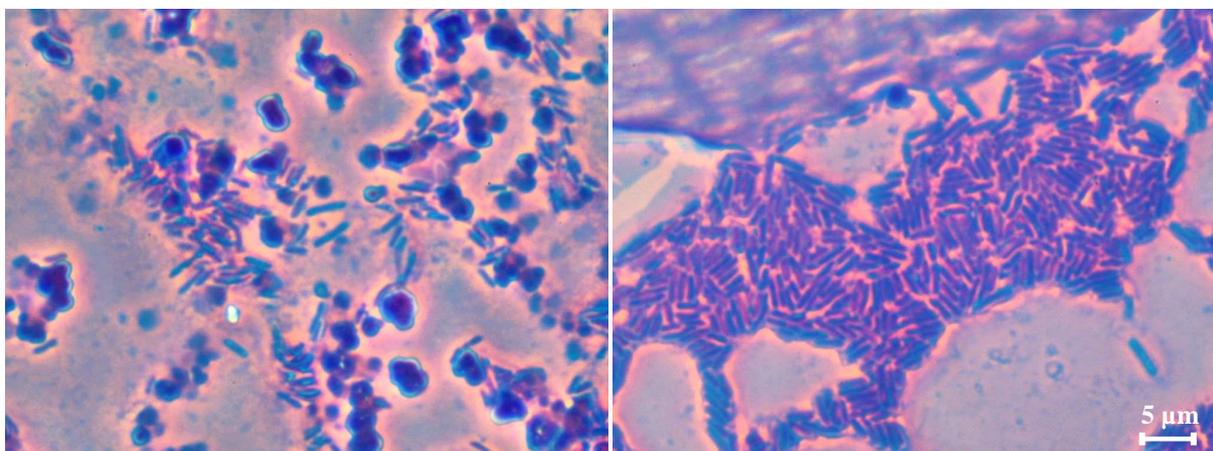
und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die anschließende Gelbfärbung des Teststreifens zeigte das Vorhandensein der L-Alanin-Amino-peptidase an, ein Enzym, das ausschließlich bei gramnegativen Mikroorganismen vorkommt. Dies bestätigte, dass es sich bei dem isolierten *Paederus*-Endosymbionten um ein gramnegatives Bakterium handelte, was durch seine sehr nahe Verwandtschaft zu *Pseudomonas aeruginosa* auch offensichtlich war.

Mit einem weiteren Test sollte das Vorhandensein des Wasserstoffperoxid-spaltenden Enzyms Katalase nachgewiesen werden. Dazu wurden 20 µl der Endosymbionten-Lösung auf einen Glasobjektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Die anschließende Überschichtung mit 10%-iger H₂O₂-Lösung löste eine starke Gasentwicklung (O₂) auf der eingetrockneten Probe aus, was ein Vorhandensein dieses Enzyms im Endosymbionten bestätigte.

Der letzte Enzym-Test sollte zeigen, ob der endosymbiontisch in *Paederus riparius* lebende Pederin-Produzent das Atmungsketten-Enzym Cytochromoxidase besitzt. Dafür wurden 50 µl der Endosymbionten-Lösung auf einen Oxidase-Teststreifen aufgebracht und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die anschließend eintretende Blaufärbung des Teststreifens zeigte zuverlässig an, dass der *Paederus*-Endosymbiont dieses spezielle Enzym der Atmungskette besitzt.

3.10.4 Überprüfung der Beweglichkeit

Bei der Betrachtung von frisch isolierten Endosymbionten-Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte eine sehr geringe Beweglichkeit der Bakterien festgestellt werden. Die sich anschließende Geißelfärbung nach KODAKA et al. (1982) zeigte, dass es sich bei dem *Paederus*-Endosymbionten um ein unbegeißeltes Bakterium handelte, was in der folgenden Abbildung (**Abb. 52**) deutlich zu erkennen ist.



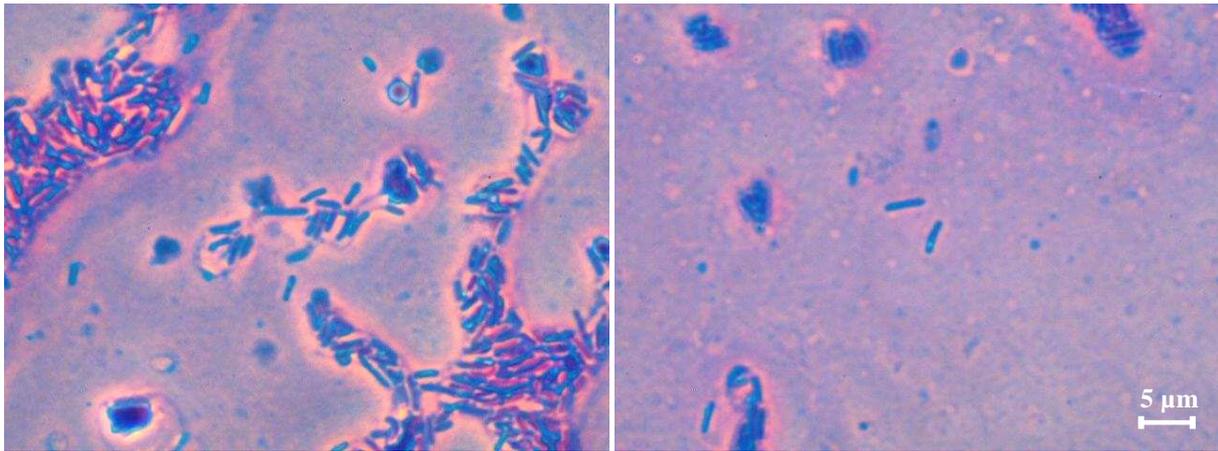


Abb. 52: 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl des nach KODAKA et al. (1982) angefärbten *Paederus*-Endosymbionten. Die Zellen wurden dazu auf einen Glasobjektträger aufgebracht (siehe auch 2.9.13). Die für Pseudomonaden typische polare Begeißelung fehlt hier.

Zum Vergleich wurden mit Uranyl-Acetat-Lösung negativkontrastierte Zellen des Pederin-Bakteriums unter dem Transmissionselektronenmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen dokumentiert.

Die im Folgenden aufgeführten Abbildungen (**Abb. 53 A, B**) zeigen erneut, dass es sich um ein vollständig unbegeißeltes Bakterium handelt.

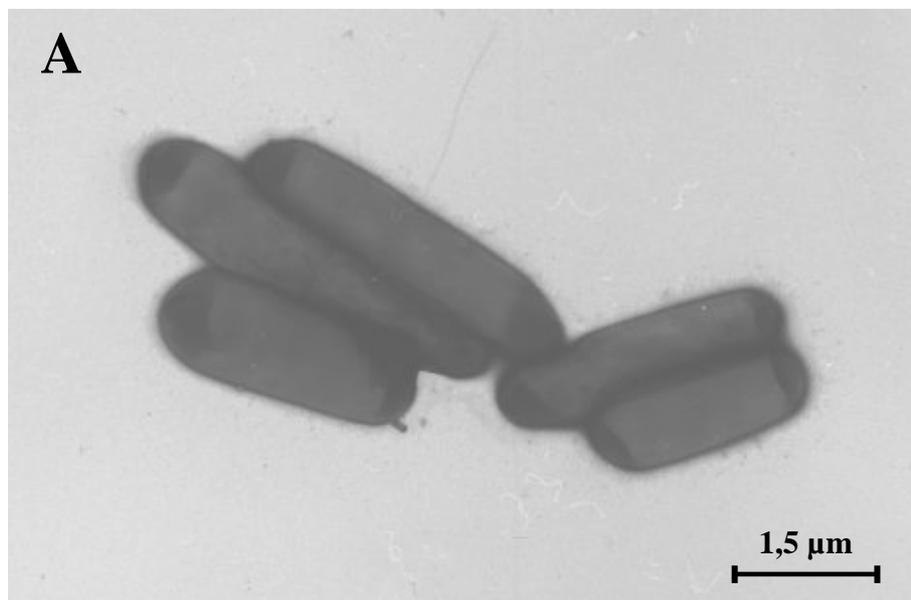


Abb. 53 A: Negativkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahme des *Paederus*-Endosymbionten bei 12.000-facher Vergrößerung.

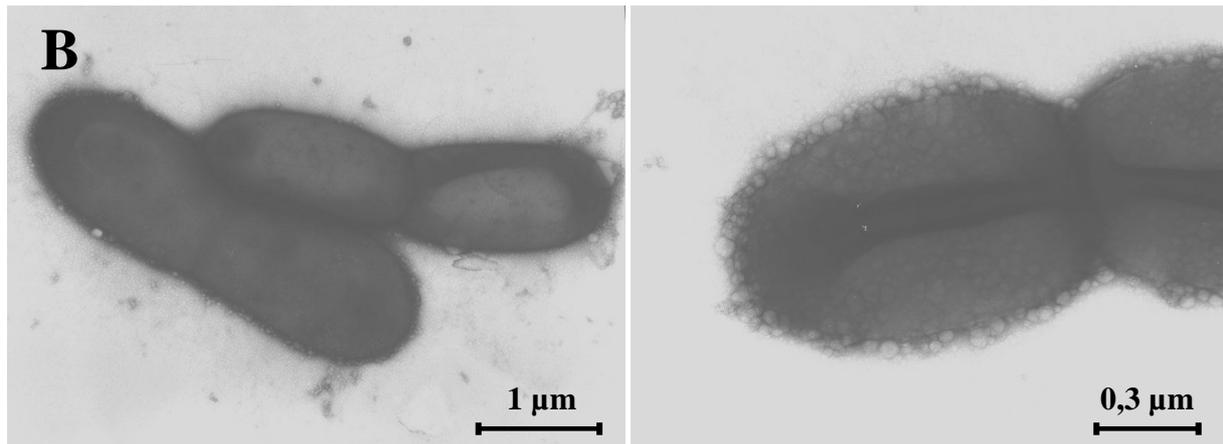


Abb. 53 B: Negativkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen des *Paederus*-Endosymbionten bei 17.500-facher (links) bzw. 40.000-facher (rechts) Vergrößerung. Die Zellen befinden sich dabei gerade in einer Teilungsphase.

3.11 DNA-Extraktion von Endosymbionten-Zellen

Mit einem herkömmlichen DNA-Isolations-Kit gelang es, die Gesamt-DNA von isolierten Endosymbionten-Zellen aus frisch abgetöteten *Paederus riparius*-Weibchen und neun Jahre alten, eingefrorenen *Paederus sabeus*-Weibchen zu isolieren (Daten nicht gezeigt). Diese DNA diente im Folgenden dazu zu bestätigen, dass sie mit den von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S rRNA-Gensequenzen der Endosymbionten (Datenbanknummern: AJ316018 und AJ295331) der beiden kontinental voneinander getrennten *Paederus*-Arten übereinstimmten - KELLNER erhielt die 16S-Sequenzen der beiden Endosymbionten über Klonierungsexperimente mit amplifizierter 16S rDNA, die aus extrahierter Gesamt-DNA von Weibchen der beiden *Paederus*-Arten gewonnen wurde.

3.11.1 Amplifikation der 16S ribosomalen DNA

Mit dem für Bacteria universellen Primerpaar GM3F/GM4R konnten aus der extrahierten Gesamt-DNA der beiden isolierten Endosymbionten-Kolonien die vollständigen 16S rRNA-Gene amplifiziert werden. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 54) zeigt die elektrophoretische Auftrennung der mit einem herkömmlichen Reinigungs-Kit von niedermolekularen Bestandteilen gereinigten 16S rDNAs der beiden Endosymbionten (je zweimal amplifiziert) und die für die Sequenzierung benötigte Konzentrationsbestimmung der DNA, die mit dem NanoDrop-Spectrophotometer erfolgte.

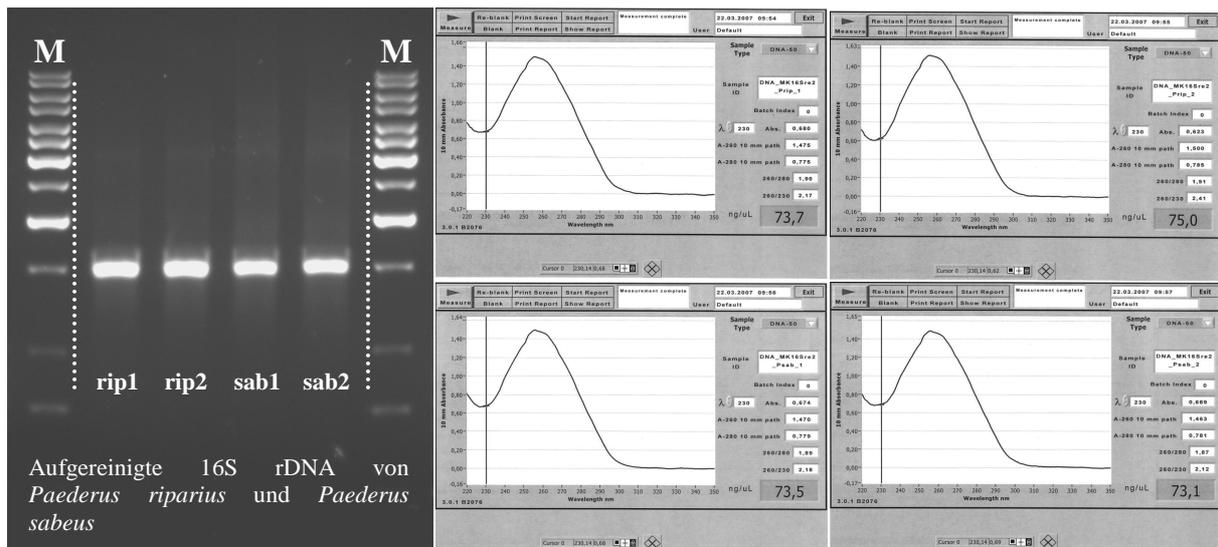


Abb. 54: Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der aufgereinigten 16S-PCR-Amplifikate der beiden isolierten Endosymbionten-Kulturen aus den Anhangsdrüsen weiblicher *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* auf einem 1%igen Agarosegel und die Konzentrationsdiagramme der 16S rDNA. M (Marker): 1 kb-DNA-Leiter (von oben nach unten in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250). Die einzelnen Bahnen des Agarosegels sind mit Abkürzungen der jeweiligen amplifizierten 16S rDNA der beiden Endosymbionten beschriftet (rip1/rip2: amplifizierte 16S rDNA des Endosymbionten von *Paederus riparius*; sab1/sab2: amplifizierte 16S rDNA des Endosymbionten von *Paederus sabeus*).

Dabei betrug die DNA-Konzentration im Falle der amplifizierten 16S rDNA des Endosymbionten von *Paederus riparius* (rip1/rip2) 73,7 ng/μl bzw. 75,0 ng/μl PCR-Amplifikat. Im Falle des Endosymbionten von *Paederus sabeus* wurden 73,5 ng/μl bzw. 73,1 ng/μl PCR-Amplifikat errechnet. Die DNA mit der jeweils höheren Konzentration (rip2: 75,0 ng/μl bzw. sab1: 73,5 ng/μl) wurde anschließend zur Bestimmung der Basensequenz an die Firma MWG-Biotech geschickt.

3.11.2 Sequenzierung der 16S ribosomalen DNA

Von der Firma MWG-Biotech konnten im Falle der eingeschickten 16S rDNA-Proben der beiden Endosymbionten 1396 bzw. 1397 Basenpaare (*Paederus riparius*- bzw. *Paederus sabeus*-Endosymbiont) entschlüsselt werden (siehe **Abb. 55** bzw. **Abb. 56**). Der BLAST-Vergleich dieser Sequenzen mit den entsprechenden, von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenzen (jeweils 1500 Basenpaare) ergab eine 99,86%ige bzw. 99,93%ige Übereinstimmung (2 mismatches zum *Paederus riparius*- bzw. 1 mismatch zum *Paederus sabeus*-Endosymbiont).

```

1      GCAAGTTCGAGCGGAAGAAGGGGGC [ A ] AGCTCCCGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATA 60
61     CCTAGGGATCTGCCTGGTAGAGGGGGATAACGTTCCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAAC 120
121    GTCCCTAAGGGAGAAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAACCTAGGTCGG 180
181    ATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGG 240
241    ATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG 300
301    AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC 360
361    GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGAGAGTTAATAGCTTTCTGTTTTGA 420
421    CGTTACCAACGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGG 480
481    TCGGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTTAGGTAGATTTGCAAGTTGGA 540
541    TGTGAAATCCC [ C ] GGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTACAGAGCTAGAGTACAGT 600
601    AGAGGTTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGGAAGGAACACCAG 660
661    TGGCGAAGGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAA 720
721    CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAGTCC 780
781    TGAGGCTTTAGTGGGCGAGCTAACGCGATAAGTTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 840
841    GTTAAACTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC 900
901    GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGCCGAGAAGCTTTTCAGAGATGAAGA 960
961    GGTGCTTTGGGAAGCTCGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGA 1020
1021   TGTGTTGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTATCCTCAGTTACCAGCACGTTAAGGT 1080
1081   AGGCACCTGAGGAGACTGCCGGTGACAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCA 1140
1141   TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAAAGGATGCCA 1200
1201   AGCCGCGAGGCGGAGCTAATCCCGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC 1260
1261   GACTGCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTT 1320
1321   CCGGGCCTTGATACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTGG 1380
1381   TCTAACCGCAAGGGGG 1396

```

Abb. 55: Von der Firma MWG-Biotech entschlüsselte Basensequenz der 16S rDNA des aus den Anhangsdrüsen von weiblichen *Paederus riparius* isolierten Endosymbionten. Fett markierte Basen in eckigen Klammern stellen mismatches zur entsprechenden, von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenz dar, wobei A bei Kellers Sequenz einem G entspricht und C einem T.

```

1      GTCGAGCGGAAAAAGGGGGCAAGCTCCCGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACCTA 60
61     GGGATCTACCTGGTAGAGGGGGATAACGTTCCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTTCC 120
121    TAAGGGAGAAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAACCTAGGTCGGATTA 180
181    GCTAGTTGGTAGGGTAA [ A ] GGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGA 240
241    TCAGTCCACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATA 300
301    TTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT 360
361    TGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGAGAGTTAATAGCTTTCTGTTTTGACGTT 420
421    ACCAACGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTTCG 480
481    AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTTAGGTGGATTTGCAAGTTGGATGTG 540
541    AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTACAGAGCTAGAGTACAGTAGAG 600
601    GGTGTTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGGAAGGAACACCAGTGGC 660
661    GAAGGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGG 720
721    ATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAGTCCCTTGAG 780
781    GCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA 840
841    AAATCAAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAG 900
901    CAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGCCGAGGACTTTTCAGAGATGAAGAGGTG 960
961    CCTTTGGGAAGCTCGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT 1020
1021   GGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTATCCTCAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGG 1080
1081   ACTCTGAGGAGACTGCCGGTGACAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCAATCAT 1140
1141   GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAAGGATGCCAAGCC 1200
1201   GCGAGGCGGAGCTAATCCCGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT 1260
1261   GCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG 1320
1321   GCCTTGATACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTGGTCTA 1380
1381   ACCGCAAGGGGAG-AAGGT 1397

```

Abb. 56: Von der Firma MWG-Biotech entschlüsselte Basensequenz der 16S rDNA des aus den Anhangsdrüsen von weiblichen *Paederus sabeus* isolierten Endosymbionten. Fett markierte Basen in eckigen Klammern stellen mismatches zur entsprechenden, von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenz dar, wobei A bei Kellers Sequenz einem G entspricht.

Der BLAST-Vergleich der beiden oben aufgeführten 16S-Sequenzen miteinander ergab eine 99,6%ige Übereinstimmung in der Basenabfolge mit insgesamt 5 mismatches (KELLNER 2001): 8 mismatches).

3.11.3 RFLP-Analyse der 16S ribosomalen DNA

Mit den von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenzen der Endosymbionten von *Paederus riparius* und *Paederus sabeus* wurde ein virtuelles Schnittmuster am Computer erstellt. Dieses Muster wurde anschließend mit den in vitro erhaltenen Fragmenten der amplifizierten 16S rDNAs der beiden isolierten Endosymbionten verglichen. Zum Vergleich wurden zusätzlich die 16S rDNAs von drei nahverwandten Pseudomonaden virtuell und in vitro mitverdaut (Datenbanknummern: AE004844, D84013, D84020).

Die folgenden Abbildungen (**Abb. 57 A-D**) zeigen für alle drei Restriktionsenzyme (Bsh1236I, MboI, RsaI) die virtuellen Schnittmuster und Fragmentgrößen im Vergleich zur elektrophoretischen Auftrennung der in vitro erzeugten Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel.

```

AGAGTTT7[MboI]GATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAA[G]AAGGGGGC[G]A
GCTCCCGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACCTAGG115[MboI]GATCT[G]CCTGGTAGAGGGGATAACGTTCCGAAAG
GGACGCTAATACCGCATACGTCCTAAGGGAGAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAACCTAGGTCGGATTA
GCTAGTTGGTAGGGTAAGGGCCTACCAAGCGAC267[MboI]GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGAT291[MboI]GATCAGTCACAC
TGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCT374[MboI]GATCCA
GCCATGCCG389[Bsh1236I]CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGAGAGTTAAT
AGCTTCTGTTTTGACGTTACCAACGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG514[Bsh1236I]CGGTAATACGAAGG
GTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGT[A]GATTTGCAAGTTGGATGTGAAATCCC[T]GGGCTCAA
CCTGGAACTGCATCCAAACTACAGAGCTAGAGT644[RsaI]ACAGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATGGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGACTAGCCGTTGGAGTCCCTGAGGCTTTAGTGCGCAGCTAA
CG854[Bsh1236I]CGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGT878[RsaI]ACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCG
CACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG958[Bsh1236I]CGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCCGAG[A]AC
TTTTAGAGATGAAGAGGTGCCTTTGGAACTCGGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCTTATCCTCAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCGGTGACAAG
CCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAGGTGCTACAATGGTCCGGT1235[RsaI]A
CAAAAGGATGCCAAGCCG1254[Bsh1236I]CGAGGCGGAGCTAATCCCAGAAACC1279[MboI]GATCGTAGTCCG1291[MboI]GAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCG1340[Bsh1236I]CGAATCAGCATGTCG1355[Bsh1236I]CG
GTGAATACGTTCCCGGCCTTGT1380[RsaI]ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTGGTCTAA
CCGCAAGGG[G]GAAGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA[A]CCGTA

```

Abb. 57 A: Übersicht der mit dem Onlinetool IncisiEnz (<http://www.biorcgld.org/public/home.php>) virtuell erzeugten Schnittstellen der drei Restriktionsenzyme auf der von KELLNER (2001) veröffentlichten Basensequenz der 16S rDNA des Endosymbionten von *Paederus riparius*. Fett markierte, in eckigen Klammern stehende Basen stellen die acht mismatches zur von KELLNER (2001) veröffentlichten 16S-Sequenz des Endosymbionten von *Paederus sabeus dar*, wobei A einem G entspricht und umgekehrt. T entspricht einem C.

Dabei stimmen die mit Bsh1236I in vitro erzeugten Schnittfragmente der 16S rDNAs der beiden Endosymbionten mit den virtuellen bis auf ein zusätzliches Fragment (ca. 280 Basenpaare) im Falle des Endosymbionten von *Paederus sabeus* (siehe **Abb. 57 B**, unten

rechts: weißer Kreis) überein. Die beiden mit je 15 Basenpaaren kleinsten Fragmente fehlen hier. Der Vergleich mit den Schnittfragmenten der drei nahverwandten Pseudomonaden zeigt große Unterschiede in der Anzahl und Länge der Fragmente. Im Falle der mit MboI verdauten 16S rDNAs der beiden Endosymbionten konnten im Vergleich zum virtuellen Schnittmuster zwei zusätzliche Schnittfragmente (je ca. 300 Basenpaare) erhalten werden (siehe **Abb. 57 C**, unten rechts: schwarze Kreise). Die mit 7, 12 und 24 Basenpaaren kleinsten Fragmente fehlen. Ein großer Unterschied in Anzahl und Größe der Schnittfragmente zum Schnittmuster von *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* ist hier ebenfalls deutlich zu erkennen. Auch für die mit RsaI verdauten 16S rDNAs der beiden Endosymbionten konnte ein zusätzliches Schnittfragment (ca. 900 Basenpaare) im Falle des Symbionten von *Paederus sabeus* (siehe **Abb. 57 D**, unten rechts: weißer Kreis) erhalten werden. Ein sichtbarer Unterschied zum Schnittmuster der drei verwandten Pseudomonaden geht jedoch mit Ausnahme des Schnittmusters von *Pseudomonas fluorescens* nur aus dem Vergleich mit den virtuell erhaltenen Fragmentlängen hervor.

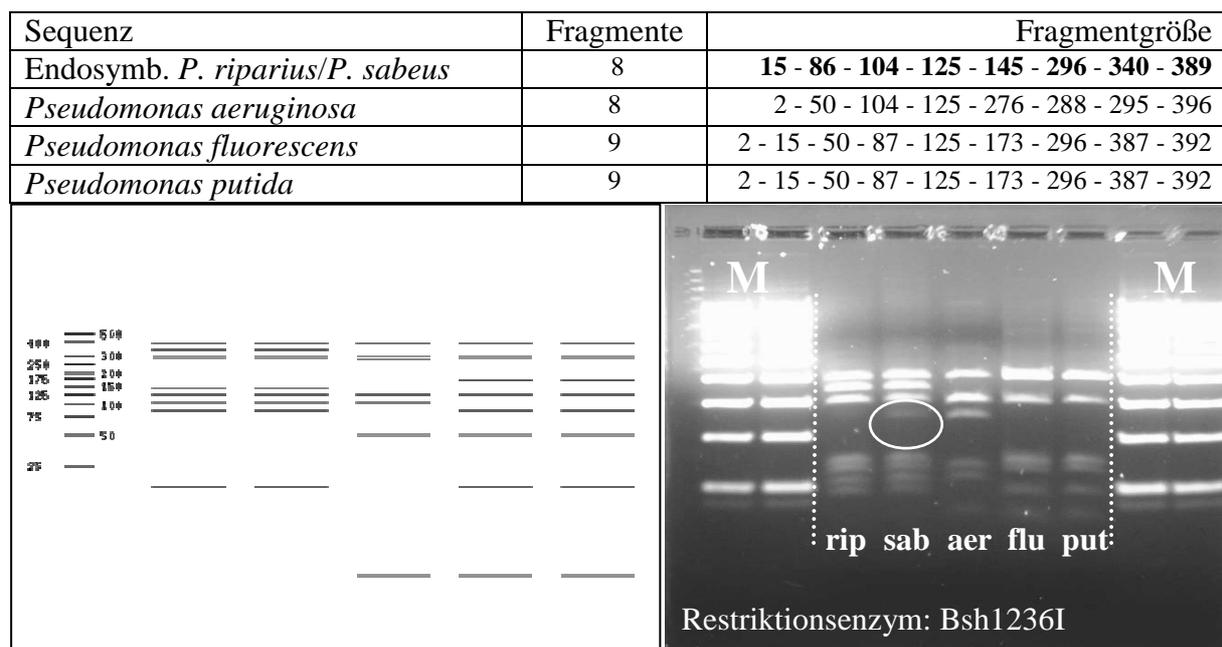


Abb. 57 B: Mit Bsh1236I virtuell erzeugte Schnittmuster der 16S rDNAs der beiden Endosymbionten von *Paederus riparius* und *P. sabeus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* mit Angabe der Fragmentgrößen (oben und unten links) im Vergleich mit den in vitro erhaltenen Fragmenten der verdauten 16s rDNAs auf einem 2%igen Agarosegel (unten rechts). M (Marker): 100bp-DNA-Leiter (von oben nach unten in bp: 1031, 900-100 in 100er Schritten, 80). Die einzelnen Bahnen des Gels sind mit Abkürzungen der jeweiligen Organismen beschriftet, von denen die 16S rDNA isoliert wurde (rip: 16s rDNA des Endosymbionten von *Paederus riparius*; sab: von *Paederus sabeus*; aer: 16s rDNA von *Pseudomonas aeruginosa*; flu: von *Pseudomonas fluorescens*; put: von *Pseudomonas putida*). Ein zusätzlich erhaltenes Fragment wurde mit einem weißen Kreis umrandet.

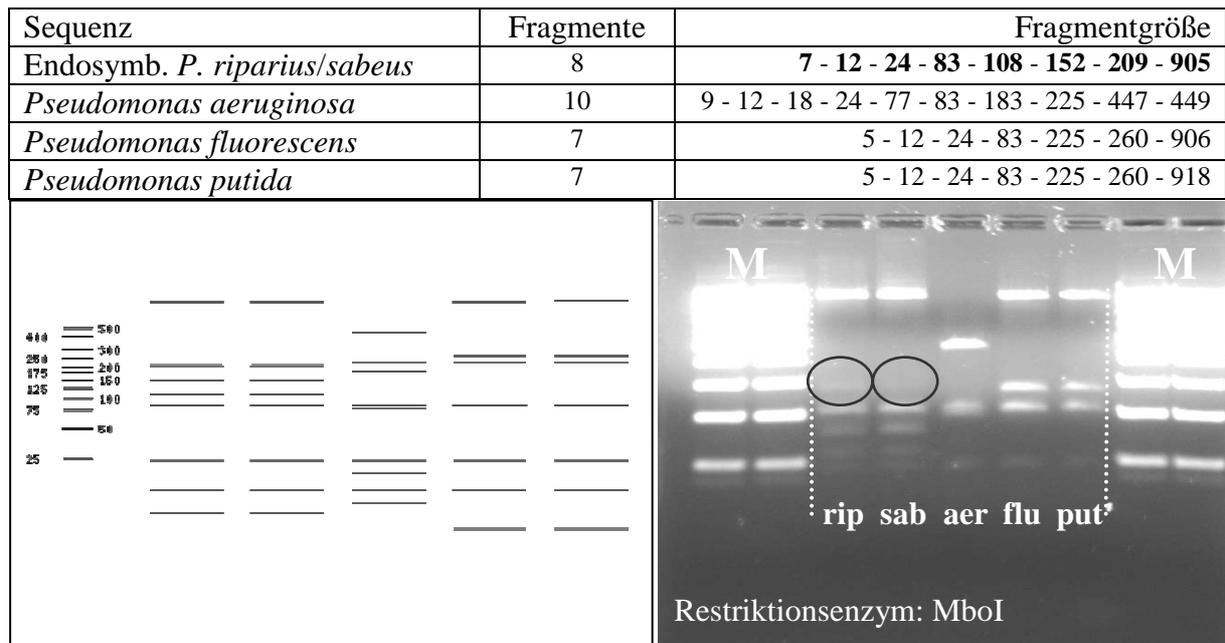


Abb. 57 C: Beschreibung siehe Abb. 57 B. Als Restriktionsenzym wurde hier jedoch MboI verwendet. Zusätzlich erhaltene Fragmente wurden mit einem schwarzen Kreis umrandet.

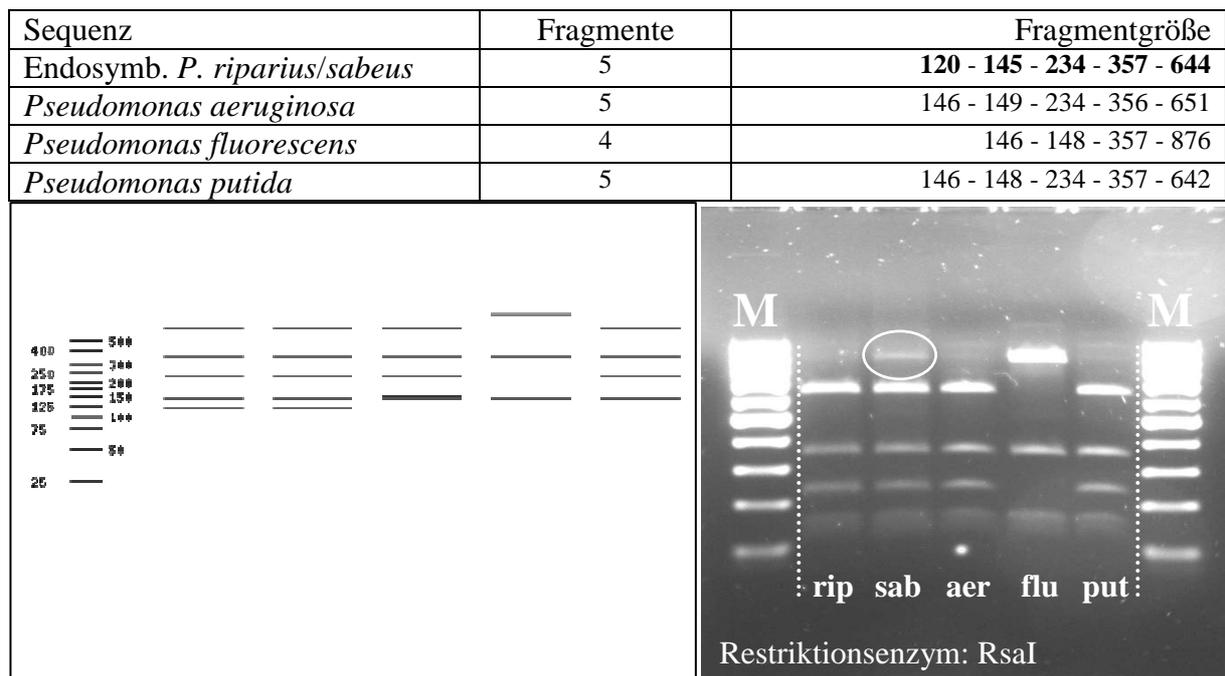


Abb. 57 D: Beschreibung siehe Abb. 57 B. Als Restriktionsenzym wurde hier jedoch RsaI verwendet. Ein zusätzlich erhaltenes Fragment wurde mit einem weißen Kreis umrandet.

3.11.4 Nachweis von Nitrit- und N₂O-Reduktase-Gensequenzen

Eine Amplifikation potentieller Fragmente der spezifischen Gene *PSnosZ*, *nosZ*, *nirK* und *nirS*, welche für die bakterielle Denitrifikation benötigt werden und die für die beiden periplasmatischen Enzyme N₂O-Reduktase und Nitrit-Reduktase codieren, konnte nur im Falle der von *Pseudomonas aeruginosa* isolierten und aufgereinigten genomischen DNA erreicht werden. Eine Amplifikation von potentiellen *nirK*-Teilsequenzen konnte dabei nicht bewirkt werden.

Im Falle der für die PCR eingesetzten genomischen DNA des von *Paederus riparius* isolierten Endosymbionten und von *Escherichia coli* (wurde als Negativkontrolle verwendet) konnte kein potentielles Signal auf dem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Eine mögliche Befähigung des *Paederus*-Endosymbionten zur Denitrifikation konnte somit vollständig ausgeschlossen werden.

Die nachfolgende Abbildung (**Abb. 58**) zeigt die auf einem Agarosegel sichtbar gemachten PCR-Produkte, die von den eingesetzten DNA-Isolaten mit den vier verschiedenen Denitrifikanten-Primerpaaren amplifiziert werden konnten.

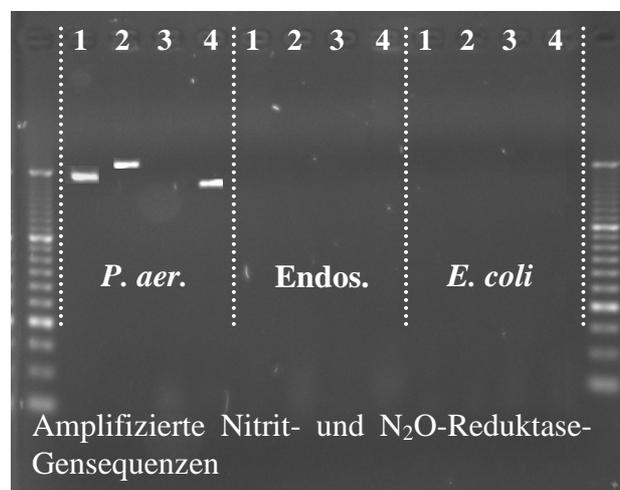


Abb. 58: Elektrophoretische Auftrennung amplifizierter potentieller Teilsequenzen der *PSnosZ*-, *nosZ*-, *nirK*- und *nirS*-Gene auf einem 1%igen Agarosegel. M (Marker): 50bp-DNA-Leiter (von oben nach unten in bp: 1000-50 in 50er Schritten). Die einzelnen Bahnen des Gels sind mit Abkürzungen der jeweiligen Organismen beschriftet, von denen die genomische DNA isoliert und für die Touch-Down-PCR eingesetzt wurde (*P. aer.*: genomische DNA von *Pseudomonas aeruginosa*; Endos.: des Endosymbionten von *Paederus riparius*; *E. coli*: von *Escherichia coli*). Gleiche Zahlen über den einzelnen Bahnen des Gels (jeweils 1-4) entsprechen dabei jeweils einem von vier eingesetzten Primerpaaren, die zur Amplifikation von Teilsequenzen der verschiedenen Denitrifikations-Gene verwendet wurden (1: *PSnosZ*175F/1144R; 2: *nosZ*661F/1773R; 3: *nirK*1F/5R; 4: *nirS*1F/6R).

4. Diskussion

4.1 Kultivierung des *Paederus*-Endosymbionten

Während der Kultivierungsversuche des *Paederus*-Endosymbionten war eine Direktisolierung dieses Pederin produzierenden Bakteriums von seinem Wirt noch nicht möglich. Darüber hinaus gab es zu diesem Zeitpunkt keinerlei Erkenntnis darüber, ob der Endosymbiont in einer Mischpopulation mit anderen Mikroorganismen oder in einer Reinkultur in den Käfer-Weibchen vorkommt.

4.1.1 Anreicherung des *Paederus*-Endosymbionten

Es wurde daher versucht, den *Pseudomonas*-ähnlichen Endosymbionten mit Hilfe der so genannten Anreicherungskultur zur Zellvermehrung zu bewegen, wobei sein relativer Anteil an einer potentiellen Mischpopulation selektiv erhöht werden sollte. Da der Endosymbiont phylogenetisch sehr nah verwandt mit *Pseudomonas aeruginosa* ist (KELLNER, 2001), wurden bestimmte, für Pseudomonaden selektive Bedingungen festgelegt, die ein Wachstum des Symbionten bei gleichzeitiger Hemmung der Entwicklung aller unerwünschten Mikroorganismen begünstigen sollten. Die auf diese Weise geschaffene künstliche ökologische Nische sollte zur selektiven Anreicherung des *Paederus*-Endosymbionten beitragen.

Da in keiner der eingesetzten Anreicherungslösungen (Ausnahme: Pepton-Salz-Lösung, siehe unten) ein Wachstum des Endosymbionten von *Paederus riparius* verzeichnet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Mikroorganismus um ein besonders langsam wachsendes Bakterium handelt. Da zudem nichts über die möglicherweise sehr hohen Nährstoffanforderungen (Energie-, Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle) und Umgebungsbedingungen (Temperatur, Licht oder Sauerstoffpartialdruck) des Endosymbionten bekannt war, ist es sehr wahrscheinlich, dass die in den Flüssigmedien vorgegebenen Wachstumsbedingungen den endosymbiontischen Anforderungen nicht gerecht werden konnten bzw. die eingesetzten selektiven Zusätze innerhalb kürzester Zeit zum Tod eines Großteils der Endosymbionten-Zellen geführt haben. Somit setzten sich die Mikroorganismen aus den Käfer- bzw. Ei-Homogenisaten durch, die an die vorgegebenen Wachstumsbedingungen besser angepasst waren und dadurch höhere Wachstumsraten

erzielen konnten - der Endosymbiont wurde somit wahrscheinlich von der Begleitmikroflora in den Homogenisaten überwachsen und anschließend verdrängt.

Die Tatsache, dass nach 20 Tagen möglicherweise ein minimales Wachstum in den mit Käfer-Homogenisat beimpften Pepton-Salz-Lösungen (mit und ohne Supplemente) zu verzeichnen war, würde einerseits für eine eher geringe Nährstoffanforderung des Endosymbionten sprechen, wäre andererseits aber möglicherweise auch auf unsauberes Pipettieren während der Probennahme zurückzuführen. Da die Pepton-Salz-Lösung in der Mikrobiologie jedoch als universelles Dispersions- und Verdünnungsmittel eingesetzt wird, in dem keine bzw. nur sehr geringe Zellverluste auftreten und darüber hinaus die Bestandteile des Peptons wachstumshemmende Substanzen, wie Schwermetalle und Tenside, binden können, ist die Annahme eines Pipettierfehlers eher unwahrscheinlich. Die gegenüber diesem Medium eventuell höheren Nährstoffansprüche der Begleitmikroflora aus den Käfer-Homogenisaten könnten es dem Endosymbionten letztlich durchaus ermöglicht haben, sich in diesem Medium sehr langsam zu vermehren.

Die molekulare Detektion des Endosymbionten im Falle aller Anreicherungsmedien, die mit Homogenisat aus Eiern von *Paederus riparius* beimpft wurden, konnte im Vergleich zu den entsprechenden Anreicherungsmedien, die mit Homogenisat aus ganzen Käfern beimpft wurden, immer zwei Verdünnungsstufen höher erfolgen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf das größere Verhältnis von eingesetztem Probenmaterial zu verwendetem Dispersionsmittel im Falle der Ei-Homogenisate zurückzuführen.

4.1.2 Nährmedien zur Kultivierung des *Paederus*-Endosymbionten

Auf allen Nährböden, die im Verlauf dieser Arbeit für Kultivierungsversuche des in weiblichen *Paederus riparius* lebenden Endosymbionten verwendet wurden, konnten zahlreiche verschiedene Mikroorganismen als Reinkulturen kultiviert werden. Der gesuchte Pederin-Produzent befand sich jedoch nicht darunter. Die Gründe hierfür liegen höchstwahrscheinlich, wie auch schon für die flüssigen Anreicherungsmedien beschrieben, in einem Überwachsen des Endosymbionten von der Begleitmikroflora, die in den Ei- bzw. Käfer-Homogenisaten neben den symbiontischen Bakterien zusätzlich vorkommt und diese letztlich in deren Wachstum hemmt. Möglich wäre auch, dass die eingesetzten Konzentrationen der in vielen der Agar-Medien verwendeten Selektiv-Hemmstoffe zu hoch waren und deshalb zu einem Absterben des Endosymbionten führten. Nach PONTES & DALE (2006) stellt eine Kontamination zu Beginn des Kultivierungsvorhabens das größte

Problem dar. Da endosymbiontische Bakterien im Vergleich zu frei lebenden Mikroorganismen wesentlich geringere Wachstumsraten zeigen (DARBY et al., 2005; MATTHEW et al., 2005), werden sie rasch von einer kontaminierenden Begleitmikroflora überwachsen, die sich zum Zeitpunkt der Symbionten-Isolierung im Ausgangsmaterial befindet. Da während der Nahrungsaufnahme die Möglichkeit besteht, dass fremde Mikroorganismen in das Wirtsinsekt gelangen, sollte die Isolierung der symbiontischen Bakterien von ihren Wirten vornehmlich an Insektenstadien, wie Eiern, Puppen oder frisch geschlüpften Imagines, durchgeführt werden, die noch keine Möglichkeit zur Aufnahme von Nahrung hatten (PONTES & DALE, 2006).

Auch die mit leicht sauren pH-Werten (pH 5,5) eingesetzten Agar-Nährmedien konnten zu keinem Erfolg bei der Kultivierung des *Paederus*-Symbionten führen. Dabei fiel auf, dass auf diesen Medien auch kein anderes Bakterienwachstum verzeichnet werden konnte. Untersuchungen des pH-Werts verschiedener innerer Kompartimente frisch aufpräparierter Käfer-Weibchen (vollständiger Geschlechtsapparat, exokrine Komplexdrüse, Hämolymphe, Fettkörper, abdominaler Darmtrakt) (Daten nicht gezeigt) zeigten schließlich, dass im Insekteninneren ein durchweg neutrales Milieu vorliegt. Dies verwundert letztlich wenig, da eine optimale Katalyseleistung der meisten Enzyme erst bei neutralen pH-Werten erreicht wird. Somit ist dieser „neutrale Lebensraum“ denkbar ungeeignet für azidophile Mikroorganismen, deren pH-Optimum bei 5 oder weit darunter liegen kann (MADIGAN et al., 2002).

Selbst im Falle der mit den verschiedensten Supplinen und Extrakten versetzten Agarmedien konnte ein Wachstum des Endosymbionten nicht herbeigeführt werden. Vergleich man das bakterielle Wachstum auf diesen Medien mit dem von Bakterien, die auf den entsprechenden supplement- bzw. extraktfreien Medien wuchsen, so konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl und Dichte der darauf gewachsenen Kolonien verzeichnet werden. Dies lässt sich offenbar damit erklären, dass alle auf diesen Medien gewachsenen Mikroorganismen die eingesetzten Suppline und Extrakte zum Wachstum nicht benötigen haben oder aber sie die darin enthaltenen Stoffe selbst synthetisieren konnten.

Eine Kultivierung des *Paederus*-Endosymbionten konnte auch im Falle der eingesetzten Tellurit-Nährböden nicht erreicht werden, obwohl das endosymbiontische Bakterium ein voll funktionsfähiges Tellurit-Resistenz-Operon (*ter*-Cluster) besitzt, das ein Wachstum auf tellurithaltigen Medien bis zu einer MIC („minimal inhibitory concentration“) von 500 µg/ml erlauben sollte (PIEL, 2004). Tellurit wird mittlerweile seit mehr als 80 Jahren in Selektiv-Medien zur Isolierung von hauptsächlich pathogenen Mikroorganismen, wie

Corynebacterium diphtheriae, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* oder *Shigella* spp. verwendet (TAYLOR, 1999). Die den Bakterien die Tellurit-Resistenz verleihenden Gene [Telluritsalze besitzen starke antibakterielle Eigenschaften (FLEMING, 1932)] sind dabei entweder auf Plasmiden oder auf dem Genom von vielen nicht miteinander verwandten Bakterien, einschließlich pathogenen Mikroorganismen, lokalisiert. Das Tellurit-Resistenz-Operon des *Paederus*-Endosymbionten befindet sich auf dessen Genom in einer Region stromaufwärts des *ped*-Clusters und zeigt sehr hohe Ähnlichkeit zu den *ter*-Genen von *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* O157:H7 und anderen Pathogenen (PIEL, 2004). Da ein Vorkommen dieses Schwermetalls in der Natur ziemlich selten ist, wird vermutet, dass die Resistenz gegenüber derartigen Verbindungen nur eine sekundäre Eigenschaft der Bakterien darstellt (TAYLOR, 1999).

Die genauen Gründe für die Unkultivierbarkeit des *Paederus*-Endosymbionten können letztlich nur vermutet werden, da bislang noch keine Veröffentlichungen über das bereits sequenzierte Genom (PIEL, i. Vorb.) dieses Bakteriums und damit mögliche Hinweise auf dessen Nährstoffanforderungen vorliegen. Da es sich bei dem Pederin-Produzenten jedoch nicht um ein intrazellulär lebendes Bakterium mit einer drastischen Genomreduktion (PIEL, schriftl. Mitt.) handelt, wie sie z. B. der *Buchnera*-Endosymbiont erfahren hat (BAUMANN et al., 1995), und die Beziehung des Endosymbionten zu seinem Käfer-Wirt eher unbeständig als obligat anzusehen ist - ca. 10% der *Paederus*-Weibchen in der Natur sind symbiontenfrei (KELLNER & DETTNER, 1995; KELLNER, 1999) -, ist es nach PIEL (mündl. Mitt.) nur eine Frage der Zeit, bis eine erfolgreiche Kultivierung des *Paederus*-Symbionten erfolgen kann.

Nach GRENIER et al. (1994) und FUKATSU & NIKOH (2000) würden an ihren Wirt angepasste, spezialisierte Endosymbionten aufgrund ihrer anspruchsvollen Anforderungen sogar gänzlich unkultivierbar sein. Dass diese Aussage nicht verallgemeinert werden kann, zeigten DALE & MAUDLIN bereits 1999. Ihnen gelang es, einen sekundären Endosymbionten (*Sodalis glossinidius* gen. nov., sp. nov.) aus der Hämolymphe der Tsetse-Fliege *Glossina morsitans morsitans* zu isolieren und auf einem Agar basierten Medium (MM-Agar) in Reinkultur anzuzüchten. Ebenso gelang es GHERNA et al. (1991) und DALE et al. (2006), die sekundären Endosymbionten (*Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov. und "*Candidatus* *Arsenophonus arthropodicus*") des Parasitoiden *Nasonia vitripennis* und der Taubenlausfliege *Pseudolynchia canariensis* zu isolieren und auf einem verfestigten Nährboden als Reinkultur zu kultivieren.

Auch viele andere, sekundäre Endosymbionten konnten bisher erfolgreich außerhalb ihrer natürlichen Wirte kultiviert werden (WELBURN et al., 1987; HYPISA & DALE, 1997; O'NEILL et al., 1997; DARBY et al., 2005). Die Anzucht gelang hier allerdings nur in speziellen Insekten-Zelllinien und nicht auf Agar basierten Nährmedien.

4.1.3 Isolierte Mikroorganismen aus *Paederus riparius*-Weibchen

Von sämtlichen aus *Paederus riparius*-Weibchen isolierten Bakterien, die auf den verschiedenen eingesetzten Agar-Nährmedien in Reinkultur angezchtet werden konnten, wurden die acht häufigsten, aerob gewachsenen Kulturen, die immer wieder isoliert werden konnten, phylogenetisch bestimmt. Die Verteilung der Isolate beschränkte sich dabei ausschließlich auf zwei der insgesamt 18 aus Laboruntersuchungen bekannten Hauptlinien der Bacteria. Dies waren zum einen die Proteobakterien, die größte und metabolisch vielfältigste Gruppe aller bekannten Bakterien, deren Vertreter alle gramnegativ sind (MADIGAN & MARTINKO, 2006), und zum anderen die grampositiven Bakterien. Innerhalb dieser beiden Großgruppen konzentrierten sich die Isolate auf die Gamma (γ)-Unterabteilung der Proteobakterien (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*) bzw. auf die Untergruppe der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (*Bacillus* sp., *Bacilliaceae* bacterium, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus pabuli*, *Paenibacillus lactis*).

Pseudomonaden sind allgemein bekannt für ihr ubiquitäres Vorkommen und können neben Umgebungen, wie im Wasser, Boden und Pflanzen, auch in Insekten gefunden werden (KAPATRAL et al., 2000). Ebenso finden sich die Vertreter der zu den Enterobakterien gehörenden Gattung der Klebsiellen hauptsächlich im Erdboden und im Wasser. Auch die isolierten *Bacillus*-Arten werden in der Natur vorwiegend im Erdboden angetroffen. Sie leben dort fakultativ aerob. Viele dieser Arten produzieren zudem extrazelluläre hydrolytische Enzyme, die für den Abbau von Biopolymeren, wie Polysacchariden, Lipiden und Nucleinsäuren, verwendet werden (SNEATH, 1991). Unter den zur Sporenbildung befähigten *Bacillus*-Arten gibt es ebenso wie bei den Pseudomonaden auch einige insektenpathogene Arten (z. B. *Paenibacillus larvae* und *Paenibacillus popilliae*), die sehr nah verwandt mit den beiden isolierten *Paenibacillus*-Arten sind. Diese pathogenen Arten sind jedoch primär saprophytische Bodenbewohner und infizieren lebende Tiere nur zufällig (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Da sich Kurzflügler der Gattung *Paederus* s. l. hauptsächlich in feuchten Lückensystemen aufhalten (DETTNER, 1991), wie z. B. am Rande von Gewässern, und dort zwischen den feuchten Bodenpartikeln dem Beutejagen nachgehen, ist es nahe

liegend, dass die acht isolierten und identifizierten Bakterien über die Aufnahme von Wasser und an Beutetieren anhaftenden Bodenpartikeln in den Verdauungstrakt der Insekten gelangt sind. Die Verweildauer der mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen in den einzelnen Kompartimenten des Darmtrakts dürfte dabei von verschiedenen Parametern abhängig sein, wie z. B. pH-Wert oder Sauerstoffpartialdruck (DETTNER, 2003). Einige der identifizierten Bakterien könnten natürlich auch aus *Drosophila melanogaster* stammen, da die *Paederus*-Käfer während ihrer Haltung im Labor mindestens zweimal die Woche damit gefüttert wurden. Die mikrobielle Zusammensetzung im Insektendarm kann aufgrund von Umwelteinflüssen stark variieren. Nach DOUGLAS (2000) kann sich die Mikrobiota im Intestinaltrakt z. B. verändern, wenn die Insekten zur Zucht ins Labor gebracht werden, wobei sogar spezifische Unterschiede in der Insekten-Mikrobiota bei der Unterbringung in verschiedenen Laboren, bei unterschiedlichen Temperaturen oder Nahrungsquellen bekannt sind.

Die Tatsache, dass in der bakteriellen Diversität im Falle der mit Ei- bzw. Käfer-Homogenisat beimpften Nährmedien keine großen Unterschiede zu verzeichnen waren, könnte vermutlich daran liegen, dass die Eier bei ihrer Abgabe mit bakterienhaltigem Kot in Berührung kamen - ein Teil der über die Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen wird höchstwahrscheinlich verdaut oder passiert den Darmtrakt unverändert, um schließlich nach einer gewissen Zeit mit dem Kot wieder ausgeschieden zu werden. Da die Geschlechtsöffnung, über welche die Eier abgegeben werden, in direkter Nähe der Enddarmöffnung mündet, ist eine Kontamination der Eier mit ausgeschiedenen Mikroorganismen nicht unwahrscheinlich. Viele Insekten beschmieren ihre Eier sogar absichtlich mit Kot, um so eine Weitergabe darin enthaltener endosymbiontischer Bakterien, die extra- oder intrazellulär im Darmbereich untergebracht sind, an deren Nachkommenschaft zu gewährleisten (BUCHNER, 1965; DETTNER, 2003).

4.2 Lokalisierung des *Paederus*-Endosymbionten

Mit Hilfe verschiedener molekularer Methoden (Diagnostische-PCR, FISH) konnte gezeigt werden, dass sich der Pederin produzierende Endosymbiont in den so genannten Anhangsdrüsen des weiblichen Geschlechtsapparats konzentriert. Dabei konnte auch eine verhältnismäßig große Menge an Endosymbionten-Zellen in den zahlreichen Verwinkelungen

des Ausführgangs detektiert werden (vgl. auch **Abb. 40 B, C**), in den die paarig angelegten Drüsen münden.

4.2.1 Unterbringung des *Paederus*-Endosymbionten

Die Funktion dieser auch als akzessorische Organe bezeichneten Anhangsdrüsen ist vielfältig und steht oft (wenn auch nicht immer) mit der Eiablage in Zusammenhang. So produzieren diese als so genannte Kittdrüsen bei vielen Insekten eine kittartige Substanz, mit der die abgelegten Eier auf dem Substrat angeheftet werden. Weiterhin können sie Sekrete zur Bildung der Ootheken (Eikapseln) bei den Blattodea (Schaben) und Mantodea (Fangschrecken) liefern, die hier als Schutzhüllen der Eigelege dienen. Bei Insekten, die einen Legeapparat (Ovipositor) besitzen, können die Anhangsdrüsen Substanzen abgeben, die als eine Art Schmiermittel für das reibungslose Aneinandervorbeigleiten der einzelnen Teile des Ovipositors sorgen. Die Anhangsdrüsen der aculeaten Hymenopteren haben sich sogar zu Giftdrüsen des zu einem Wehrstachel umgebildeten Legestachels entwickelt. Bei *Glossina* (Tsetse-Fliegen) und vielen pupiparen Dipteren, wie z. B. den Hippobosciden (Lausfliegen), fungieren diese akzessorischen Organe als so genannte Milchdrüsen, in denen vor allem Lipide und Proteine für die sich vollständig in den adulten Tieren entwickelnden Larven produziert werden (DETTNER, 2003). Die Lage und Form der weiblichen Anhangsdrüsen kann dabei von Insekt zu Insekt recht unterschiedlich ausfallen. Nach MEIXNER (1932) beherbergen die großen, paarig angelegten Anhangsdrüsen bei einigen Vertretern der Polyphaga zudem meist Endosymbionten, wie in dieser Arbeit für *Paederus riparius* gezeigt werden konnte.

Dabei stellen die akzessorischen Drüsen bei weitem nicht die einzige Möglichkeit für die dauerhafte Unterbringung von Endosymbionten in Insekten dar. Die wohl ursprünglichste Form der Symbiontenunterbringung ist die Aufbewahrung von Bakterien in bestimmten, abgeschlossenen Darmabschnitten, in denen die Mikroorganismen ungestört verweilen können. Als Beispiel seien hier die Larven und Imagines der Trypetiden (Fruchtfliegen) genannt, deren Endosymbionten verstreut im Mitteldarm vorliegen. In vielen Fällen erfolgt von Generation zu Generation eine erneute, orale Aufnahme der Endosymbionten - entweder, weil die Endosymbionten als frei lebende Bakterien weit verbreitet im natürlichen Umfeld ihrer Wirte vorkommen oder aber weil spezielle Einrichtungen zur Übertragung der begehrten Bakterien auf die schlüpfenden Larven vorhanden sind. Demgegenüber stehen z. B. die selbstleuchtenden Organe von vielen Cephalopoden [als besonderes Beispiel sei hier die

Symbiose des hawaiianischen Kalmars *Euprymna scolopes* mit Leuchtbakterien der Art *Vibrio fischeri* erwähnt, eine der am besten untersuchten Tier-Bakterien-Symbiosen überhaupt (PHILLIPS, 2006)] und Knochenfischen, die sich als Hauteinstülpungen mit drüsenartigem Charakter anlegen und später symbiontische Bakterien beherbergen - ein deutliches Argument für die Akquisition der Symbionten ohne die Beteiligung des Darms. Dies gilt ebenso für die Endosymbionten beherbergenden Nephridien der Borstenwürmer, die von ihren „Gästen“ über bestimmte Exkretionsporen besiedelt werden (BUCHNER, 1965). Wie aber gelangten diese nicht darmassoziierten Endosymbionten ursprünglich in ihre teilweise sehr speziellen Unterkünfte? FEKL konnte 1954 zeigen, dass die Tracheen von Insekten sehr oft die typische Bakterienflora aus deren natürlicher Umwelt beherbergen und dass deren Hämolymphe, ohne vorherige Verletzung der Tiere, ebenso diese Mikroorganismen enthalten kann. Es ist also durchaus denkbar, dass endosymbiontisch lebende Bakterien irgendwann in eben dieser Art und Weise von ihren Wirten aufgenommen wurden, obwohl letztlich keine wissenschaftlichen Beweise dafür existieren (BUCHNER, 1965).

Eine abgeleitete Entwicklungsstufe für die Beherbergung symbiontischer Bakterien stellt die intrazelluläre Unterbringung der Mikroorganismen in Zellen des Darmepithels von Insekten, wie z. B. Brotkäfern oder bestimmten Rüsselkäfern, dar. Diese Bakterien werden schließlich mit dem Kot der Insekten abgegeben und können ohne weiteres von anderen Individuen derselben Art aufgenommen werden (DETTNER, 2003). Eine noch höhere Entwicklungsstufe zeigt sich bei der extra- und intrazellulären Unterbringung von Endosymbionten in der Leibeshöhle ihrer Wirtsinsekten. Die Besiedelung der Insekten mit den Bakterien erstreckt sich dabei von der Hämolymphe über Lücken im Fettkörper bis hin zur dauerhaften Aufnahme in einzelne, nun als Mycetocyten bezeichnete Fettkörperzellen. Die höchste Entwicklungsstufe in der Beherbergung von symbiontischen Mikroorganismen stellt schließlich die Vereinigung dieser Endosymbionten enthaltenden Mycetocyten zu Organ ähnlichen Strukturen, den so genannten Mycetomen, dar. Diese meist auffällig bunt gefärbten Strukturen sind äußerst vielgestaltig und zudem immer von Tracheen durchzogen. Die Vermehrung der darin untergebrachten Bakterien wird dabei stets vom Wirtsinsekt kontrolliert. Interessanterweise können Mycetome in manchen Fällen nicht nur eine einzige Endosymbionten-Art (Monosymbiose: bestimmte Arten von Pflanzensaugern), sondern gleich eine Vielzahl von unterschiedlichen Endosymbionten-Spezies (Di- bzw. Polysymbiose: Zikaden) in mosaikartig voneinander abgetrennten Bereichen dieses Organs beherbergen (DETTNER, 2003).

4.2.2 Weitergabe des *Paederus*-Endosymbionten

KELLNER konnte schon 2001 zeigen, dass ein auf der Oberfläche von *Paederus*-Eiern lokalisiertes gramnegatives Bakterium für die Weitergabe der Fähigkeit zur eigenständigen Pederin-Produktion an die Nachkommenschaft verantwortlich ist. Dieser mittlerweile als *Paederus*-Endosymbiont bekannte Mikroorganismus (KELLNER, 2001, 2002, 2003; PIEL, 2002, 2004, 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen molekularen Methoden (Diagnostische-PCR, FISH) auf der Oberfläche von *Paederus riparius*-Eiern nachgewiesen werden. Verglich man die Fluoreszenz-Intensitäten der mit der spezifischen Endosymbionten-Sonde hybridisierten Serien-Dünnschnitte von Abdomina weiblicher *Paederus riparius* mit denen, die aus Eiern hergestellt wurden, so zeigte sich generell eine deutlich geringere Fluoreszenz im Falle der Ei-Serienschnitte. Da es sich bei der Sonde um eine ribosomal gerichtete Sonde handelte, lässt sich schließen, dass die Anzahl der Ribosomen im Falle der auf den Eiern detektierten Symbionten deutlich geringer war als im Falle der in den Anhangsdrüsen detektierten Endosymbionten. Dies bedeutet offenbar, dass die Stoffwechselaktivität der auf den Eiern haftenden Endosymbionten deutlich reduziert ist und sich die Bakterien bis zu ihrer Übertragung auf die *Paederus*-Larven in einer Art Ruhezustand befinden. Hierbei ist auch die Ausbildung eines Biofilms denkbar, der die Endosymbionten in eine selbst-produzierte, extrazelluläre Matrix (adhäsive Polysaccharide) hüllt (COSTERTON et al., 1995) (vgl. auch **Abb. 42 B, C** und **Abb. 43**). Da neben *Pseudomonas aeruginosa* auch die meisten anderen Bakterien in der Lage sind, einen Biofilm zu produzieren, könnte diese Fähigkeit aufgrund der sehr hohen Verwandtschaft zu dem opportunistischen Pathogen auch bei dem Pederin-Produzenten vorhanden sein. Ursprünglich wurde angenommen, dass das Wachstum dieser hoch strukturierten, an Oberflächen angeklebten Zellgemeinschaften in der Natur höchstwahrscheinlich als Schutzmechanismus gegenüber feindlichen Umweltbedingungen dient (COSTERTON et al., 1995, 1999; COSTERTON & STEWART, 2000). Mittlerweile geht man davon aus, dass bestimmte Zellen innerhalb eines Biofilms einen veränderten Stoffwechsel aufweisen, der sie neben ungünstigen Umweltbedingungen auch gegenüber ausgiebiger Antibiotika-Behandlung resistent macht (STEWART, 2003; WALTERS et al., 2003). Viele antibiotische Stoffe und auch niedermolekulare antimikrobielle Substanzen vermögen oftmals nicht, in den Biofilm in ausreichender Menge einzudringen (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Neben dieser sehr negativen Eigenschaft von Biofilm umhüllten Zellen beschrieben O'TOOLE & KOLTER (1998) für *Pseudomonas fluorescens* die Ausbildung eines Biofilms, der die Wurzeln von

Pflanzen wie eine Art Schutzschicht umhüllt und diese so vor phytopathogenen Bodenbakterien und Pilzen schützen kann. Ebenso wäre dies im Falle der mit den Endosymbionten versehenen *Paederus*-Eier denkbar. Hier könnte die Ausbildung eines Biofilms die Eier bzw. die für die Infektion der Nachkommenschaft benötigten symbiontischen Mikroorganismen vor feindlichen Bedingungen nach der Eiablage, wie z. B. einer eventuellen Fremdbesiedelung durch Schimmelpilze oder pathogene Bodenbakterien, schützen. Der Biofilm könnte hier auch gegenüber der Einwirkung von Regenwasser auf die abgelegten Eier einen Schutz bieten und verhindern, dass die Symbionten-Zellen von der Ei-Oberfläche abgewaschen werden.

Für die Entwicklung und Erhaltung eines Biofilms ist dabei die Zell/Zell-Kommunikation von entscheidender Bedeutung. Heftet sich eine Zelle an eine Oberfläche an, so werden biofilmspezifische Gene exprimiert. Diese Gene sind für die Synthese von bestimmten Signalmolekülen verantwortlich, welche für die Zwischenzellkommunikation benötigt werden, und leiten die Polysaccharidbildung ein. Im Falle des mit dem *Paederus*-Endosymbionten sehr nah verwandten Pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich bei den Hauptsignalmolekülen um bestimmte Homoserinlactone. Überschreiten diese Verbindungen einen bestimmten Konzentrations-Schwellenwert, so wirken sie als chemotaktische Signale, die in der Nähe befindliche artgleiche Zellen anlocken und die Biofilmbildung einleiten. Dieses Phänomen wird allgemein als „quorum sensing“ (Feststellung der Beschlussfassungsfähigkeit) bezeichnet (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Wie aber gelangen nun die in den paarigen Anhangsdrüsen in unglaublich hoher Dichte lokalisierten Endosymbionten von dort auf die Eier? Durch die Sektion des weiblichen Geschlechtsapparats und die mikroskopische Untersuchung von mit histologischen (Methylenblau) und molekularen (Cy3, DAPI) Farbstoffen behandelten Serien-Dünnschnitten dieses Bereichs konnte gezeigt werden, dass die die symbiontischen Bakterien enthaltenden Anhangsdrüsen direkt in den Ausführgang münden, ein Bereich, den die Eier kurz vor ihrer Abgabe nach außen passieren müssen (vgl. auch **Abb. 29 E**; **Abb. 40 A, B**; **Abb. 48 A**). Dabei wird ein Teil der Bakterien höchstwahrscheinlich durch einen in den akzessorischen Drüsen entstehenden leichten Überdruck, den das Ei beim Passieren der Genitalkammer durch Drücken auf die daran angehefteten „Knotenpunkte“ der beiden Drüsen (vgl. auch **Abb. 26 B**) erzeugt, über eine Art Schleuse in den Ausführgang gepumpt - eine aktive Abgabe der Endosymbionten durch Kontraktion bestimmter, mit dem Ausführgang verbundener Muskeln wäre darüber hinaus ebenfalls denkbar. Hierbei sei auf die Cleoniden (Rüsselkäfer)

verwiesen, die zwei keulenförmige Symbiontenbehälter mit engem Ausführgang besitzen, der in das Futteral mündet, welches den Legeapparat aufnimmt. Diese so genannten „Bakterienspritzen“ werden von einer gut entwickelten Längsmuskulatur überzogen und ermöglichen so eine dosierte Abgabe der symbiontischen Bakterien auf die Ei-Oberfläche (BUCHNER, 1960).

Zwischen den im Ausführgang vorhandenen, einheitlich angeordneten haifischzahnartigen Strukturen (wahrscheinlich Chitindornen, die offenbar dazu dienen, die Endosymbionten vor einer vorzeitigen Abgabe nach außen zurückzuhalten) könnte nun eine gleichmäßige Verteilung der eingebrachten Bakterien erfolgen. Dabei könnte die Ausbildung eines Biofilms auf dieser sehr strukturierten Oberfläche durch die Anhaftung der Zellen eingeleitet werden, wobei dies durchaus bereits in den Anhangsdrüsen geschehen sein kann. Die in die Polysaccharid-Matrix eingehüllten Endosymbionten-Zellen könnten nun zusammen mit einem ebenfalls aus den Anhangsdrüsen stammenden Protein-Gemisch, welches letztlich für die Bildung der die Eischale umgebenden Schicht verantwortlich ist, durch Muskelkontraktionen des Abdominalbereichs auf die Eischale aufgepresst werden. Die charakteristische warzenartige Oberfläche der Eier könnte sich schließlich wenige Stunden nach der Eiablage durch Aushärten an der Luft vollständig ausgebildet haben, was nach THAYER (2005) für die Eier einiger Staphyliniden-Arten nicht unüblich ist.

Da das Beschmieren der Ei-Oberfläche mit endosymbiontischen Bakterien schon lange als Übertragungsweg für extrazelluläre Symbionten bekannt ist (STEINHAUS, 1946), wird diese Form der Übertragung als sehr ursprünglich betrachtet (BUCHNER, 1965). Das Aufbringen der Endosymbionten auf die Eier kann jedoch nur dann reibungslos erfolgen, wenn sich der Aufbewahrungsort der Bakterien bereits im Epithel des Insektendarms oder im Darmlumen befindet. Auf der Eischale deponiertes, mit Kot vermisches Symbiontenmaterial kann schließlich von den beim Schlupf noch sterilen Larven oral aufgenommen werden (DETTNER, 2003). Eine Infektion zu Beginn des Larvenstadiums gilt auch im Falle der mit den Pederin produzierenden Endosymbionten versehenen Eier von *Paederus riparius* als wahrscheinlich, da die frisch geschlüpften Larven sich stets sofort auf die Suche nach einem geeigneten Versteck machten und ein späteres Auffressen der Eischale nie verzeichnet werden konnte. Die zufällige Beobachtung des Schlupfes einer *Paederus riparius*-Larve unter dem Binokular zeigte, dass die scheinbar unter sehr hoher Spannung stehende Eischale beim Schlupf an mehreren Stellen auf einer Seite des Eies aufplatzte. Die zahlreichen entstandenen, fransenartigen Eischalen-Reste wurden dabei in die sterile embryonale Nährflüssigkeit eingetaucht, was höchstwahrscheinlich zur Infektion mit dem *Paederus*-Endosymbionten

geführt hat. Ob das Bakterium letztlich von der Larve oral, anal oder über das Tracheensystem aufgenommen wird, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Neben dieser primitiven Art der Bakterien-Weitergabe existieren zahlreiche andere Wege, um die benötigten Endosymbionten von der Elterngeneration auf die Nachkommenschaft zu übertragen. Dabei besteht die Möglichkeit, dass die Symbionten mehr oder weniger zufällig mit der Nahrung aufgenommen werden. Diese Art des Symbiontentransfers setzt jedoch voraus, dass die im Darmtrakt ihrer Wirte lokalisierten Bakterien auch außerhalb ihrer Unterkünfte lebensfähig sein müssen. Im Gegensatz dazu muss die Übertragung von symbiontischen Bakterien auf die nachfolgenden Entwicklungsstadien im Falle einer obligaten Wechselbeziehung unbedingt gewährleistet sein. Die Symbiontenweitergabe gestaltet sich dabei sehr kompliziert, wenn die Bakterien außerhalb des Darmes in der Leibeshöhle vorliegen und von dort zu den weiblichen Geschlechtsorganen umgelagert werden müssen. Um in der Hämolymphe besser transportiert werden zu können, müssen die oftmals entartet vorliegenden, teilweise riesigen Bakterienzellen zuerst in kleinere Infektionsformen umgewandelt werden. Diese gelangen anschließend mit Hilfe bestimmter Transportzellen, transitärer Mycetome oder auf aktivem Wege in die weiblichen Geschlechtsorgane, um dort meist eine polare Infektion der Eizelle herbeizuführen. Im Falle der gleichzeitigen Unterbringung mehrerer verschiedener Endosymbionten-Spezies in einem Wirtsinsekt können je nach Bakterienart unterschiedliche Übertragungswege genutzt werden. Bei den Zikaden beispielsweise, die bis zu 6 verschiedene Symbionten-Spezies pro Wirtsart beherbergen können, erfolgen ein koordinierter Transfer und eine spezifische Verteilung der endosymbiontischen Bakterien im Verlauf der Embryonalentwicklung durch bewegliche Mycetocyten, Mycetome und Keimstreifbewegungen. Es wurden dabei sogar Umladungsphänomene mehrerer Endosymbionten von Mycetom zu Mycetom nachgewiesen (DETTNER, 2003). Eine vollkommen andere Methode des Symbiontentransfers wird von den Glossinen (Tsetse-Fliegen) und den Pupiparen betrieben, die ihre sich einzeln im Mutterleib entwickelnden Larven mit dem Sekret ihrer Milchdrüsen füttern. Da die Endosymbionten dieser Insekten in eben diesen Drüsen lokalisiert sind, werden sie zusammen mit dem Milchdrüsen-Sekret von den Larven aufgenommen und können so an den jeweils spezifischen Orten angesiedelt werden (BUCHNER, 1965). Auch die Versorgung der Nachkommenschaft bei den Erdwanzen (*Brachypelta*) mit endosymbiontischen Bakterien stellt eine sehr interessante Methode des Symbiontentransfers dar. Die frisch geschlüpften Larven saugen dabei an bakterienhaltigen Tropfen, die von den weiblichen Elterntieren über den Enddarm abgegeben werden.

4.2.3 Regulation des endosymbiontischen Wachstums

Während der oben genannten Phase der Brutfürsorge bei Erdwanzen der Gattung *Brachypelta* schwellen die Krypten des Darmes aufgrund eines explosionsartigen Wachstums der darin lokalisierten Endosymbionten stark an (BUCHNER, 1965). Ein derartiges Anschwellen konnte auch im Falle der am weiblichen Geschlechtsapparat paarig angelegten Anhangsdrüsen von *Paederus riparius* beobachtet werden. Dies war immer dann der Fall, wenn sich die Tiere in einer Eiablage-Periode befanden. Bei Weibchen, die außerhalb dieser Periode seziiert wurden, konnten die endosymbiontischen Pederin-Produzenten zwar ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch hatten hier die Anhangsdrüsen eine deutlich sichtbare Reduktion ihres Umfangs erfahren (Daten nicht gezeigt). BUCHNER konnte schon 1953 zeigen, dass im Allgemeinen eine deutlich sichtbare, spontane Zunahme des Endosymbionten-Wachstums häufig mit der Infektion der Eier einhergeht. Für die Blattliden (Schaben) konnte z. B. gezeigt werden, dass eine signifikante Vermehrung deren endosymbiontischer Bakterien auf der Ei-Oberfläche zur Ausbildung einer dicken, die Eier bedeckenden Bakterienschicht führte.

Wie lässt sich nun ein derartiges, scheinbar spontan einsetzendes Wachstum symbiontischer Bakterien von ihren Wirten kontrollieren bzw. zu welchem Zeitpunkt setzt es ein? Es steht unbestritten fest, dass im Falle echter Symbiosen die Wirtstiere in jeder Hinsicht Herr der Lage im Hinblick auf ihre bakteriellen Einwohner sind. Der Wirt ist dabei imstande, den Grad und die spezielle Form der Vermehrung seiner endosymbiontischen Gäste uneingeschränkt zu steuern, was meist über die Regulation der Gestalt und der Größe der Bakterien geschieht. In einigen Fällen existiert für die Wirte sogar die Möglichkeit, sich bei Bedarf ihrer „Untermieter“ gänzlich zu entledigen. Es besteht also keinerlei Zweifel daran, dass die Wirtsorganismen eine beträchtliche Kontrolle im Hinblick auf die Vermehrung und die Gestalt ihrer Endosymbionten ausüben. Der absolute Einklang zwischen den Bedürfnissen des Wirts und dem Verhalten der Symbionten ist dabei erstaunlich. Wird die Reproduktions-Intensität der Bakterien beträchtlich gehemmt, so überträgt sich das im Allgemeinen auf alle im Wirtsorganismus vorhandenen symbiontischen Bakterien. Vergleicht man die Wachstumszunahme der symbiontischen Mikroorganismen während eines individuellen Wirtszyklus mit der von frei oder parasitisch lebenden Bakterien, so fällt diese für die Endosymbionten deutlich geringer aus (DARBY et al., 2005; MATTHEW et al., 2005). Dies zeigt sich auch in den seltenen Fällen der in Insekten-Zelllinien kultivierbaren Symbionten bzw. der auf Agar basierten Nährmedien kultivierbaren Symbionten-Reinkulturen, wo

ebenfalls eine wesentlich stärkere Zellvermehrung beobachtet werden konnte als im Wirtsinneren (WELBURN et al., 1987; GHERNA et al., 1991; HYPISA & DALE, 1997; O'NEILL et al., 1997; DALE & MAUDLIN, 1999; DARBY et al., 2005; DALE et al., 2006). Die Verfügbarkeit von Nährstoffen in den Bakterien beherbergenden Wirten ist offenbar ziemlich gering, und dementsprechend hemmt eine gelegentliche Verminderung der Stoffwechselaktivität der Wirtstiere auch die Vermehrung deren Endosymbionten (BUCHNER, 1965). Im Falle überwinternder Embryonalstadien von Blattläusen, Schuppenläusen und einigen Zikadengattungen erfahren deren symbiontische Bakterien keinerlei Veränderung hinsichtlich ihrer Vermehrung. Ebenso kann bei den als Larven überwinternden Schildläusen keine Vermehrung der geringen Anzahl der Endosymbionten während dieser Ruheperiode verzeichnet werden (SCHWARTZ, 1932). GIER (1936) konnte beobachten, dass das Ei-Wachstum von Schaben gehemmt werden kann, wenn den Tieren z. B. kein geeignetes Futter zur Verfügung steht oder deren Reproduktionszyklus von Ruheperioden unterbrochen wird. Die Vermehrung der in den Ovariolen lokalisierten endosymbiontischen Bakterien kommt dabei ebenfalls zum Erliegen.

Es ist bekannt, dass ein Überangebot bestimmter, essentieller Vitamine die Zellvermehrung in Bakterien-Kulturen hemmen kann. FINK (1952) vermutete daher, dass eine von den Wirten gesteuerte, gesteigerte Syntheseaktivität seitens der Symbionten zum Absterben dieser Bakterien führt. Deren Vermehrungsfähigkeit im Wirt würde somit innerhalb einer bestimmten Grenze gehalten werden. Neben all diesen Faktoren, die hauptsächlich zur Kontrolle der Vermehrungsrate und der symbiontischen Gestalt dienen, gibt es noch ein anderes beeindruckendes Kriterium zur Ausbildung dieser „vollkommenen“ Endosymbiosen - die uneingeschränkte Kontrolle über die räumliche Ausbreitung der Mikroorganismen in den Wirtstieren. Erstgenannten werden von ihren Gastgebern gewöhnlicherweise deutlich abgegrenzte Zonen in Form von Mycetocyten oder Mycetomen zur Verfügung gestellt. Werden diese speziellen Zonen jedoch von den Wirten für andere Zwecke benötigt, so beschränkt sich die Ausbreitung der Symbionten auf in diesen Bereichen verfügbar gemachte, kleinflächigere Abschnitte; so im Falle der symbiontenhaltigen Zonen des Darmepithels, die manchmal mit größter Genauigkeit gegenüber steril verbleibenden Zonen abgegrenzt werden. Dies gilt jedoch nicht nur für bestimmte Bereiche, die Darmeinstülpungen aufweisen, sondern auch für gerade, unverwundene Abschnitte der Darmröhre. Sind die Endosymbionten jedoch im Fettgewebe in Mycetocyten lokalisiert, so ist ihr Lebensraum dort gewöhnlich auf deutlich abgegrenzte Bereiche beschränkt, innerhalb derer wiederum eine weitere Beschränkung auf wohl definierte Unterbereiche existiert. Diese spezifischen Zonen sind oftmals von einem

Rand aus Fettzellen umgeben, der von den symbiontischen Bewohnern gemieden wird, obwohl es sich dabei um genau die gleiche Art von Zellen handelt wie bei jenen, in denen sich die Endosymbionten aufhalten. Dies gilt auch für echte Mycetome, deren exakt angepasste Einwohner niemals außerhalb dieser Verbände nachgewiesen werden konnten (BUCHNER, 1965).

Eine Beschränkung auf bestimmte Zonen im Wirtsorganismus konnte auch für den *Paederus*-Endosymbionten gezeigt werden. Dieser wurde in den Käfer-Weibchen ausschließlich in den Anhangsdrüsen detektiert. Da es sich hier um eine extrazelluläre Endosymbiose handelt und die Bakterien über einen Verbindungskanal direkt auf die Eier aufgebracht werden können, entfallen hier komplizierte Transportwege über die Hämolymphe. Auch eine Veränderung der Gestalt der Zellen konnte während der Untersuchungen niemals festgestellt werden. Diese beiden Aspekte und die Tatsache, dass ca. 10% der *Paederus*-Weibchen symbiontenfrei (KELLNER & DETTNER, 1995; KELLNER, 1999) und dabei als so genannte aposymbiontische Wirte uneingeschränkt lebensfähig sind, deuten auf eine noch verhältnismäßig junge Wechselbeziehung hin. Dies zeigt sich auch in einem Vergleich mit den obligaten intrazellulären Symbiosen, wie sie zum Beispiel bei den Aphiden (Blattläusen) oder den Glossinen (Tsetse-Fliegen) gepflegt werden und wo ein Partner ohne den anderen nicht lebensfähig ist (WERNEGREEN, 2002; ZIENTZ et al., 2004).

Eine Regulation des Zellwachstums im Falle des *Paederus*-Endosymbionten ist zum einen durch eine gesteigerte Hormonproduktion während der Eiablageperiode denkbar. Die dabei von den Corpora allata synthetisierten Juvenilhormone sind in den adulten Insekten unter anderem für die Synthese des Vitellogenins (Vitelin), das Massenprotein des Eidotters, im Fettkörper verantwortlich. Dieses Protein enthält unter anderem 12,3% Mannose und 9,6% Lipide und macht ca. 70-90% des vom Fettkörper eines Weibchens synthetisierten Proteins aus (DETTNER, 2003). Da beide Anhangsdrüsen von reichlich Fettkörper umgeben sind (vgl. auch **Abb. 26 A**), könnte ein Transport dieses Proteins in die Symbionten-Drüsen zu einem gesteigerten Zellwachstum der Bakterien führen. Auf der anderen Seite könnte ein erhöhter Juvenilhormonspiegel im Wirtsinsekt, der seinerseits wiederum einen erhöhten Vitellogeninspiegel zur Folge hat, die Produktion von Pederin durch den Endosymbionten stimulieren (Signaltransduktion), was letztlich zu einer gesteigerten Teilungsrate der Bakterien führen würde.

Da die Verbindung zwischen Wirtsinsekt und Pederin-Bakterium jedoch eher unbeständig als obligat anzusehen ist, ist es durchaus auch möglich, dass es sich hier um eine Kultur mit einer gleich bleibend hohen Wachstumsrate handelt, die von ihrem Käfer-Wirt keinerlei

Kontrolle erfährt. Die zum Wachstum benötigten Nährstoffe könnten dabei aus dem die weiblichen Anhangsdrüsen umgebenden Fettkörper bezogen werden, der generell bei Insekten neben bestimmten Fettsäuren auch beträchtliche Mengen an Proteinen und Glykogen enthält (DETTNER, 2003). Dies könnte durch den Einsatz von extrazellulären Enzymen erreicht werden, die von den Bakterienzellen in die Umgebung ausgeschieden werden. Diese so genannten Exoenzyme sind in der Lage, unlösliche Polymere, wie z. B. Proteine oder Stärke, abzubauen (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Die Abbauprodukte könnten schließlich zurück in die Anhangsdrüsen transportiert und dort von den Endosymbionten-Zellen aufgenommen werden. Da während einer Eiablageperiode von einem einzigen Weibchen bis zu 30 Eier produziert werden können (KELLNER, 1994), entsteht in den Anhangsdrüsen eine relativ hohe Durchflussrate endosymbiontischer Zellen. Der dabei von Ei zu Ei auftretende Verlust der Symbiontenmasse in den beiden Drüsen muss durch eine gleich bleibend hohe Teilungsrate der Bakterien ausgeglichen werden, die wiederum eine dauerhafte Versorgung mit Nährstoffen voraussetzt. Man kann also sagen, dass es sich hierbei um ein Fließsystem mit konstantem Volumen handelt, dem ständig Nährstoffe zugefügt werden müssen und aus dem gleichzeitig der produzierte Bakterien-Überschuss abgeführt wird. Dies erinnert stark an eine kontinuierliche Kultur, bei der die Zellzahl und der Nährstoffstatus konstant bleiben, sobald sich das System im Gleichgewicht befindet.

Mit dem Beginn der Ei-Produktion und dem damit verbundenen Anstieg der Symbionten-Dichte in den Anhangsdrüsen erhöht sich gleichzeitig auch die Pederin-Syntheseleistung, da pro Ei durchschnittlich bis zu 1,8 µg Pederin eingelagert wird. Die Pederinmenge, die ein Weibchen an seine Eier weitergibt, bleibt dabei in der Regel über die ganze Eiablageperiode gleich (KELLNER, 1994). Außerhalb dieser Periode kommt die Pederin-Produktion durch die Endosymbionten nicht zum Erliegen, dürfte jedoch aufgrund der jetzt auch geringeren Bakterien-Zellzahl deutlich vermindert sein. Der Hauptteil des für die adulten Käfer ebenfalls als Abwehrstoff dienenden Pederins - KELLNER & DETTNER konnten 1996 zeigen, dass Larven, die von Pederin produzierenden Weibchen abstammten, von angreifenden Wolfsspinnen verschmäht wurden - befindet sich nicht, wie ursprünglich angenommen, in der Hämolymphe der Tiere, sondern in einer speziellen, nach außen mündenden exokrinen Komplexdrüse (KELLNER & DETTNER, 1992). Von dort aus kann der Giftstoff offenbar bei Bedarf nach außen abgegeben werden (DETTNER, 2007; GREBE, 2007), wodurch es den Käfern ermöglicht wird, sich damit von Zeit zu Zeit einzureiben, um für potentielle Fressfeinde ungenießbar zu werden. Dies würde, wie oben schon vermutet, eine kontinuierliche Pederin-Synthese durch die endosymbiontischen Bakterien voraussetzen.

Dieses Symbionten übertragende und gleichzeitig Pederin produzierende System erinnert stark an die Funktionsweise eines Chemostaten. Die Zelldichte wird dabei über die in das System eingebrachte Menge an limitierendem Nährstoff reguliert. Wenn man also die Konzentration dieses Nährstoffes im System erhöht (dies würde theoretisch einem hohen Juvenilhormonspiegel bzw. dem damit verbundenen Vitellogeninspiegel entsprechen), während die Verdünnungsrate konstant bleibt, nimmt die Zelldichte zu. Durch eine Veränderung der Verdünnungsrate und der Nährstoffkonzentration lassen sich verschiedene Populationsdichten einstellen, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten wachsen (MADIGAN et al., 2002). Die Veränderung der Verdünnungsrate würde dabei der aus den Anhangsdrüsen austretenden Endosymbiontenmasse während der Eiablage-Periode entsprechen.

4.3 Isolierung des *Paederus*-Endosymbionten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Sektionsmethode entwickelt werden, mit deren Hilfe es möglich ist, den *Paederus*-Endosymbionten als wässrige Reinkultur von dessen Käfer-Wirt zu isolieren. Über die sich anschließenden molekularen Untersuchungen der endosymbiontischen 16S rDNA, die Mikroskopie (Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie) von Symbionten-Zellen und die Überprüfung des Besitzes bestimmter Enzyme, konnte eine sehr gute Charakterisierung des Pederin produzierenden Bakteriums erfolgen. Aus Zeitgründen war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich, gezielte Anreicherungs- und Kultivierungsversuche mit der isolierten Reinkultur durchzuführen. Dies sollte daher zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

4.3.1 Bisherige Erkenntnisse zur Physiologie und Phylogenie des *Paederus*-Endosymbionten

KELLNER konnte bereits 2002 zeigen, dass es sich bei dem aus den Anhangsdrüsen von weiblichen *Paederus riparius* isolierten Endosymbionten um ein Bakterium mit sehr naher Verwandtschaft zu *Pseudomonas aeruginosa* handelt. Zu dieser Zeit war es jedoch weder möglich, den symbiontischen Mikroorganismus exakt zu lokalisieren, noch das Pederin-Bakterium von seinem Wirt zu isolieren, weshalb die phylogenetische Einordnung über die Extraktion von Gesamt-DNA aus Pederin produzierenden Weibchen mit anschließenden

Klonierungsexperimenten erfolgen musste. Von den weltweit mehr als 600 beschriebenen Arten der Gattung *Paederus* s. l. (FRANK, 1988) konnte bislang für 13 Arten gezeigt werden, dass sie definitiv Pederin enthalten. Für 22 weitere Mitglieder dieser Gattung konnte ein direkter Beweis für den Besitz von Pederin nicht erbracht werden. Die Tatsache, dass für diese Arten die Verursachung einer Blasenbildung auf der Haut von Säugetieren beobachtet werden konnte, spricht jedoch stark für den Besitz des giftigen Amids (FRANK & KANAMITSU, 1987; WHELAN & WEIR, 1987; MORSY et al., 1996; NIKBAKHTZADEH & SADEGHIANI, 1999). Besonders gut untersucht sind dabei die fünf Arten *Paederus riparius*, *P. sabeus*, *P. fuscipes*, *P. melanurus* und ein Vertreter der Untergattung *Paederidus* (*Paederidus ruficollis*), von denen ebenfalls - wie schon im Falle von *Paederus riparius* - die Sequenz der 16S rRNA-Gene der in den Käfern endosymbiontisch lebenden Pederin-Produzenten entschlüsselt werden konnte. Durch einen Ähnlichkeitsvergleich der fünf Sequenzen miteinander zeigte sich, dass sie zu fast 100% identisch waren und es sich somit in allen fünf Fällen um dieselbe Bakterienart handelte, deren 16S-Sequenzen sich um maximal sieben Nucleotide unterschieden (KELLNER, 2002). Die Tatsache, dass die Fähigkeit zur eigenständigen Pederin-Produktion adulter *Paederus*-Weibchen innerartlich auch horizontal (durch Fressen von endosymbiontenhaltigen Eiern im ersten Larvalstadium) erworben werden kann, konnte mehrfach belegt werden (KELLNER, 1999; KELLNER, 2001). Eine horizontal übertragene Fähigkeit zur Pederin-Synthese durch weibliche *Paederus*-Imagines konnte auch im Falle verschiedener *Paederus*-Arten gezeigt werden. Die Übertragungshäufigkeit auf eine andere Art verringerte sich dabei jedoch deutlich mit ansteigendem Unterschied in der Nucleotidsequenz der 16S rDNA der jeweiligen Endosymbionten (KELLNER, 2002). Dies könnte trotz der sehr hohen Sequenzähnlichkeiten ein Anzeichen für eine beginnende Aufspaltung des Symbionten der verschiedenen *Paederus*-Arten in eigenständige Arten sein, die aufgrund der kontinentalen Trennung im Falle von *Paederus sabeus* sehr wahrscheinlich schneller stattfindet als für die europäischen Arten. Um jedoch eine exakte Aussage über eine mögliche Aufspaltung treffen zu können, müssten zusätzlich die Pederin produzierenden Endosymbionten von *Paederus*-Arten der übrigen Kontinente [z. B. *Paederus columbinus* Castelnau, Südamerika; Pederin-Nachweis durch PAVAN (1982)] untersucht werden. Nach FOX et al. (1992) müssten für derartige Untersuchungen Gene mit einer im Vergleich zur 16S rDNA schnelleren Evolutionsrate und höheren Variation herangezogen werden, wie z. B. die *wsp* Gene in *Wolbachia* (VAN MEER et al., 1999). Im Falle von Stämmen mit sehr ähnlichen bzw. identischen 16S rDNA-Sequenzen könnte so gezeigt werden, dass es sich um verschiedene Spezies handelt.

4.3.2 Neue Erkenntnisse zur Physiologie und Phylogenie des *Paederus*-Endosymbionten

In der vorliegenden Arbeit gelang es zum ersten Mal, den in Kurzflüglern der Gattung *Paederus* s. l. lebenden Endosymbionten von einem seiner Wirte (*Paederus riparius*) als wässrige Reinkultur zu isolieren.

4.3.2.1 Zur Morphologie und Beweglichkeit des *Paederus*-Endosymbionten

Die Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen zeigte, dass die Morphologie des Pederin produzierenden Bakteriums der dessen nächstem Verwandten, *Pseudomonas aeruginosa*, deutlich entsprach. Die Zellen zeigten dabei die für Pseudomonaden typische gerade bzw. leicht gekrümmte Stäbchenform, ebenso wie die charakteristische Größe (0,5-1,0 µm x 1,5-4,0 µm) (MADIGAN et al., 2002), die im Falle des Endosymbionten ca. 0,7 x 2,0 µm beträgt. Dass es sich bei dem Symbionten um ein gramnegatives Bakterium handelt, zeigt alleine schon seine nahe Verwandtschaft zu dem opportunistischen Pathogen. Auch die Tatsache, dass die Zellwände gramnegativer Bakterien während des ersten Denaturierungsschrittes des PCR-Vorgangs zerstört werden und ihre DNA somit ungehindert für eine Amplifizierung zur Verfügung steht (Direkt-PCR), bestätigte diese Eigenschaft für die untersuchte Reinkultur des Endosymbionten, die ohne vorherige DNA-Extraktion mit dem diagnostischen Primerpaar KS1F/KS1R detektiert werden konnte. Den endgültigen Beweis lieferte jedoch ein spezifischer Enzymtest, der ein ausschließlich in der Bakterienzellhülle von gramnegativen Bakterien lokalisiertes Enzym (L-Alanin-Aminopeptidase) zuverlässig anzeigt; so auch im Falle des *Paederus*-Endosymbionten. Auch KELLNER (1999) vermutete, dass es sich bei dem Pederin-Produzenten um einen gramnegativen Mikroorganismus handeln musste. Er konnte zeigen, dass die auf der Ei-Oberfläche lokalisierten Symbionten-Zellen offenbar sehr empfindlich gegenüber starker Kälte (-30°C) und großer Hitze (80°C) sind. Durch Fütterungsversuche mit derartig behandelten Eiern gelang es nicht, wie im Falle unbehandelter Eier, Larven von aposymbiontischen Elterntieren in später Pederin produzierende Imagines zu transformieren. Da Temperaturen von 80°C für die selektive Isolierung von Endosporen verwendet werden (SCHLEGEL, 1985), zog er letztlich die Schlussfolgerung, dass es sich bei dem Pederin-Produzenten um einen nicht zur Sporenbildung befähigten Mikroorganismus ohne eine schützende Zellwand, wie sie für gramnegative Bakterien charakteristisch ist, handeln musste.

Nach CAMPBELL (2000) ist etwa die Hälfte aller Prokaryoten in der Lage, sich gerichtet fortzubewegen. Dies geschieht bei den meisten beweglichen Mikroorganismen mittels rotierender Geißeln und gilt auch für *Pseudomonas aeruginosa*, den nächsten Verwandten des *Paederus*-Endosymbionten. Die relativ hohe Beweglichkeit verdankt der opportunistische Mikroorganismus einer einzelnen polaren Geißel, die darüber hinaus für die Anhaftung und das Eindringen in menschliches Gewebe während der frühen Infektionsphase verwendet wird (KAPATRAL et al., 2000). Neben der polaren Begeißelung, bei der die Geißeln an einem oder beiden Enden der Zelle befestigt sind - gelegentlich kann auch ein Geißelbündel vorhanden sein, was dann als lophotrich bezeichnet wird -, gibt es noch die peritriche Begeißelung. Bei dieser Art der Anordnung sind die Geißeln an vielen Stellen um die Zelle herum verteilt (MADIGAN et al., 2002). Eine andere Art mikrobieller Bewegung, die bei den Bacteria weit verbreitet ist, stellt die Gleitbewegung dar. Diese wird von einigen unbegeißelten Prokaryoten zur Fortbewegung genutzt. Sie ist zwar erheblich langsamer als der Geißelantrieb, ermöglicht es den Zellen aber trotzdem, sich in ihrer Umgebung gleitend fortzubewegen. Dabei beruht das Gleiten auf verschiedenen Mechanismen. Bei den Cyanobakterien z. B. scheiden die Zellen während der Gleitbewegung einen Polysaccharidschleim aus, der offenbar sowohl mit der Zelloberfläche als auch mit der festen Oberfläche, auf der sich die Zellen fortbewegen, in Verbindung steht und die Bakterien gleichsam voran zieht. Dagegen nimmt man im Falle der nichtphototrophen Bakterien an, dass der Gleitmechanismus mit Hilfe spezifischer Bewegungsproteine erfolgt, die in der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran verankert sind und die Zellen mit einem gleichmäßigen, zahnradartigen Mechanismus in Bewegung versetzen (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Während der lichtmikroskopischen Auswertung der wässrigen Endosymbionten-Reinkultur konnte nur eine minimale Beweglichkeit der Zellen (leichtes Zittern und Hin- und Herdrehen auf der Stelle) beobachtet werden, die jedoch niemals in einem Ortswechsel resultierte. Die sich anschließende Geißelfärbung und die Betrachtung der mit Uranyl-Acetat negativkontrastierten Zellen unter dem Transmissionselektronenmikroskop zeigten, dass es sich bei dem aus *Paederus riparius* isolierten Endosymbionten um ein vollständig unbegeißeltes Bakterium handelte, was die beobachtete Unbeweglichkeit erklärte. Die speziell auf die Anhangsdrüsen ausgerichtete Lebensweise des Pederin-Produzenten scheint diese bestimmten Strukturen für die Fortbewegung überflüssig zu machen. Frei lebenden Zellen wird es aufgrund ihrer Beweglichkeit ermöglicht, verschiedene Gebiete ihres Lebensraumes zu erreichen, was in Hinsicht auf die geringe Nährstoff-Verfügbarkeit in manchen

Umgebungen über Leben und Tod der Zellen entscheiden kann. Dabei ist die Geißelbewegung jedoch wie jeder andere physikalische Prozess mit dem Verbrauch von Energie verbunden (MADIGAN et al., 2002). Aufgrund der unglaublich hohen endosymbiontischen Zelldichte in den beiden akzessorischen Drüsen und darüber hinaus einer direkten Nährstoffversorgung durch den Wirt, erscheint diese Einsparung an Fortbewegungsstrukturen (Geißeln) vor allem in ökonomischer Hinsicht als durchaus sinnvoll. Eine mögliche gleitende Fortbewegung des *Paederus*-Endosymbionten in situ kann jedoch nicht ausgeschlossen werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.3.2.2 Zum Stoffwechsel des *Paederus*-Endosymbionten

Da eine Kultivierung des Endosymbionten auf den unterschiedlichsten Medien sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen nicht erreicht werden konnte, wurde die Endosymbiontenkultur auf das Vorhandensein zweier, am aeroben Stoffwechsel beteiligter Enzyme (Katalase und Cytochromoxidase) untersucht, um ein mögliches Wachstum unter anaeroben Bedingungen vollständig ausschließen zu können. Diese beiden Enzyme sind in der Natur sehr weit verbreitet und kommen unter anderem bei fast allen aeroben Bakterien vor, so auch bei *Pseudomonas aeruginosa* und allen anderen Pseudomonaden. Da bei der aeroben Atmung durch die Reduktion von O_2 zu H_2O hochtoxische Sauerstoffformen, wie z. B. O_2^- und H_2O_2 als zufällige Nebenprodukte entstehen, mussten aerob lebende Mikroorganismen Enzyme entwickeln, die eine Zerstörung dieser toxischen Sauerstoffderivate gewährleisten. Dabei stellt die Katalase, die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) angreift, das am weitesten verbreitete Enzym dieser Kategorie dar, das in einigen obligaten Aerobiern sogar fehlen kann (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Zusammen mit der Superoxid-Dismutase (SOD), welche aerob wachsende Bakterien unbedingt benötigen, kann das hochreaktive Superoxidanion (O_2^-) zu Sauerstoff umgewandelt werden (MADIGAN et al., 2002).

Die Cytochrom *c* Oxidase stellt bei allen aerob atmenden Organismen den terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette dar. Das Enzym katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von Cytochrom *c* mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und dem Transport von Protonen über eine biologische Membran. Varianten der Cytochrom *c* Oxidase kommen in der inneren Zellmembran aerober Bakterien vor. Diese enthalten zum Teil modifizierte Kofaktoren oder verwenden andere Elektronendonoren als Cytochrom *c*, wie z. B. Chinol-Oxidasen im Falle von *Escherichia coli*. Zudem besitzen sie allesamt große

strukturelle und funktionelle Homologie und enthalten im aktiven Zentrum eine Häm-Gruppe und ein Kupfer-Ion (http://de.wikipedia.org/wiki/Cytochrom_c_Oxidase).

Da das Vorhandensein beider Enzyme im *Paederus*-Endosymbionten nachgewiesen werden konnte, kann eine anaerobe Lebensweise des Pederin-Bakteriums vollständig ausgeschlossen werden. Dies wird auch durch die Tatsache bekräftigt, dass der Unterbringungsort des symbiontischen Bakteriums - die paarig angelegten Anhangsdrüsen - von einer großen Anzahl von Tracheen und Tracheolen umspannt ist. Da die Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff über Diffusion durch das Anhangsdrüsen Gewebe stattfinden muss, da keine direkte Verbindung der Tracheen mit dem Inneren der Anhangsdrüsen besteht und somit eventuell eine geringere Sauerstoffkonzentration übertragen wird, als in der Luft vorhanden ist, wäre auch eine mikroaerophile Lebensweise durchaus denkbar. Diese Vermutung könnte ebenso durch die unter 4.2.2 beschriebene wahrscheinliche Ausbildung eines Biofilms bekräftigt werden, der die Endosymbionten auf der Ei-Oberfläche nach der Ablage der Eier zusätzlich vor einer zu hohen Sauerstoffkonzentration schützen könnte.

Da *Pseudomonas aeruginosa* unter anderem zur Denitrifikation befähigt ist (STANIER et al., 1966; MADIGAN & MARTINKO, 2006), wurde ein mögliches Vorhandensein der dafür benötigten Gene ebenso bei dem *Paederus*-Endosymbionten überprüft - nicht zuletzt auch im Hinblick auf zukünftige Kultivierungsexperimente. Da die Expression und die Aktivität der an der Denitrifikation beteiligten Enzyme durch die Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt werden, findet dieser Stoffwechselfvorgang vor allem unter anoxischen oder mikroaerophilen Bedingungen statt (TIEDJE, 1988). Eine potentielle Denitrifikation durch den im Käferwirt lebenden Endosymbionten konnte jedoch mit Hilfe von spezifischen Denitrifikanten-Primern (BRAKER et al., 1998; SCALA & KERKHOF, 1999) ausgeschlossen werden. Es ist daher durchaus denkbar, dass der Endosymbiont die Fähigkeit, Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor zu benutzen, aufgrund seiner an den Käferwirt angepassten endosymbiontischen Lebensweise verloren hat. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da durch eine permanente Sauerstoffversorgung der endosymbiontischen Bakterien durch die die Anhangsdrüsen umspannenden Tracheen stets eine aerobe Atmung durch die Symbionten bevorzugt wird, selbst dann, wenn Nitrat ebenfalls in der Umgebung vorliegt. Eine Beibehaltung von Genen, die aufgrund einer vom Wirt zur Verfügung gestellten konstanten und nährstoffreichen Umgebung überflüssig gemacht werden, erscheint daher für die angepassten Endosymbionten als wenig sinnvoll. Der Trend zur Genomreduktion im Falle derartiger, mit ihren Wirten in enger Beziehung stehenden Bakterien ist mit einem im großen Maßstab angelegten Verlust bestimmter Gene, die für ein symbiontisches Leben nicht

benötigt werden, assoziiert und ist umso stärker ausgeprägt, je länger eine symbiontische Verbindung besteht (ANDERSSON & KURLAND, 1998; ANDERSSON & ANDERSSON, 1999; MORAN & WERNEGREN, 2000; SHIGENOBU et al., 2000; AKMAN et al., 2002; VAN HAM et al., 2003; DEGNAN et al., 2005).

4.3.2.3 Zur Phylogenie des *Paederus*-Endosymbionten

Das Ergebnis der Sequenzierung der 16S rDNA im Falle der beiden Endosymbionten, die als Reinkulturen von ihren Wirten, *Paederus riparius* und *Paederus sabei*, isoliert werden konnten, stimmte mit den entsprechenden von KELLNER (2001) veröffentlichten Sequenzen zu durchschnittlich 99,9% überein. Nach FOX et al. (1992) gelten Sequenz-Übereinstimmungen von mindestens 99,5% für das Vorhandensein einer einzigen Art. Da im Falle der für diese Arbeit untersuchten 16S rDNA-Gene der endosymbiontischen Bakterien der beiden *Paederus*-Arten jedoch statt der vollständigen 1500 Basenpaare der ribosomalen DNA nur knapp 1400 Basenpaare entschlüsselt werden konnten, wurde zusätzlich eine RFLP-Analyse mit verschiedenen Enzymen durchgeführt. Dieser Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus zeigte, dass sich die beiden 16S rDNA-Sequenzen deutlich von den zusätzlich verdauten 16S-Sequenzen von *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* unterschieden (vgl. auch **Abb. 57 B, C, D**). Verglich man jedoch die in vitro erhaltenen Schnittmuster mit den virtuell erzeugten, so zeigte sich im Falle aller verdauten 16S-Sequenzen, dass stets die kleinsten Fragmente mit einer Größe unter 50 Basenpaaren auf den Agarosegelen fehlten. Die Tatsache, dass es sich um sehr kleine Fragmente mit einer Größe zwischen 2 und 24 Basenpaaren handelte, ließ jedoch den Schluss zu, dass diese DNA-Stücke aufgrund ihres gegenüber größeren Fragmenten wesentlich schnelleren Laufverhaltens am unteren Ende des Gels „heruntergefallen“ sind und vom Elektrophoresepuffer aufgenommen wurden.

Auch im Falle der beiden endosymbiontischen 16S rDNA-Sequenzen zeigten sich gewisse Unterschiede in dem erhaltenen Fragmentmuster. Dies führte anfangs fälschlicherweise zu der Annahme, dass es sich trotz der fast 100%igen Übereinstimmung in der Basensequenz der 16S rDNAs der beiden *Paederus*-Symbionten offenbar doch um zwei verschiedene Endosymbionten handeln musste. Eine Annahme, die jedoch schnell wieder abgelegt werden konnte. Bei näherer Betrachtung der Agarosegele und der virtuellen Schnittstellen der jeweiligen Enzyme (vgl. auch **Abb. 57 A**) zeigte sich nämlich, dass die Abweichung im Fragmentmuster bei einem Verdau mit Bsh1236I und RsaI auf zusätzliche Banden

zurückzuführen war, die offenbar von nicht vollständig verdauten DNA-Stücken herrührten. Dies konnte auch bei einem Verdau mit MboI beobachtet werden (vgl. auch **Abb. 57 B, C, D**).

Es konnte letztlich gezeigt werden, dass es sich bei den beiden aus den Anhangsdrüsen von *Paederus riparius* und *Paederus sabei* isolierten Endosymbionten-Reinkulturen um eine einzige Bakterienart handelt, die jedoch vermutlich an ihre heterospezifischen Wirte individuell stark angepasst ist (KELLNER, 2002). Dass es sich bei der Pederin-Symbiose höchstwahrscheinlich um eine noch sehr junge Verbindung handelt, kann einerseits an dem relativ großen Genom des symbiontischen Bakteriums und andererseits an dem für eine sehr alte Verbindung zu hohen GC-Gehalt erkannt werden (PIEL, schriftl. Mitt.). Gewöhnlich besitzen obligate Endosymbionten, die meist eine sehr alte Verbindung mit ihren Wirten pflegen, ein kleines Genom und zeigen einen GC-Gehalt von weniger als 30%. Im Falle obligater und sekundärer Endosymbionten mit einer verhältnismäßig jungen Beziehung zu ihren Wirten, bewegen sich deren Genomgrößen und GC-Gehalt, prozentual gesehen, zwischen denen älterer obligater Endosymbionten und denen von frei lebenden Verwandten (HEDDI et al., 1998; DALE & MAUDLIN, 1999; MOYA et al., 2002). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der *Paederus*-Endosymbiont offenbar „gerade“ im Begriff ist, sich in verschiedene Linien aufzuspalten. Dies lässt sich am ehesten anhand des afrikanischen Symbionten von *Paederus sabei* erkennen, dessen 16S-Sequenz im Vergleich zu den von KELLNER (2002) entschlüsselten Sequenzen der Endosymbionten der anderen vier *Paederus*-Arten (*Paederus riparius*, *P. melanurus*, *P. fuscipes* und *Paederidus ruficollis*) die meisten Unterschiede in der Basenabfolge aufweist.

Da das Pederin produzierende Bakterium keine intrazelluläre Lebensweise pflegt und zudem aposymbiontische *Paederus*-Wirte (zumindest im Labor) uneingeschränkt lebensfähig sind, kann man ausschließen, dass es sich bei dem symbiontischen „Untermieter“ um einen P-Symbionten handelt. Viel wahrscheinlicher ist die Annahme, dass es sich um einen S-Symbionten handeln könnte. Diese so genannten sekundären oder fakultativen Endosymbionten werden gewöhnlicherweise vertikal weitergegeben (maternale Vererbung). Eine Übertragung von Wirt zu Wirt kann hier jedoch ebenso auf horizontalem Wege erfolgen (AKSOY et al., 1997; RUSSELL et al., 2003), was auch im Falle des *Paederus*-Endosymbionten sowohl konspezifisch als auch heterospezifisch gezeigt werden konnte (KELLNER, 2001, 2003). Dies ist ein weiterer Beweis, dass es sich bei der Pederin-Symbiose um eine verhältnismäßig junge Verbindung handelt. Dass die Annahme eines S-Symbionten für die Gattung *Paederus* s. l. jedoch nicht unbedingt aufrechterhalten werden kann, zeigt sich

vor allem durch die Tatsache, dass der Besitz sekundärer Bakterien offenbar das Ergebnis zahlreicher unabhängiger Infektionen ist (RUSSELL et al., 2003), was im Hinblick auf die Homogenität in der Phylogenie der Endosymbionten der verschiedenen *Paederus*-Spezies denkbar unmöglich erscheint. Auch das Fehlen eines primären Symbionten in *Paederus* könnte diese Annahme bestärken (PIEL, schriftl. Mitt.), obwohl nach PONTES & DALE (2006) einige fakultative Endosymbionten bekannt sind, deren Insektenwirte keine obligaten Mikroorganismen beherbergen.

4.4 Ökologische Bedeutung des Polyketids Pederin

Das Polyketid Pederin dient Kurzflüglern der Gattung *Paederus* s. l. in erster Linie offenbar zur chemischen Abwehr von potentiellen Fressfeinden, wie den im natürlichen Lebensraum der Käfer vorkommenden Lycosidae (Wolfsspinnen) (KELLNER & DETTNER, 1996). Die Annahme, dass das in den Käfern vorhandene Pederin zur Feindabwehr nicht aktiv abgegeben werden kann (PAVAN & VALCURONE DAZZINI, 1971), konnte erst kürzlich widerlegt werden. Der Giftstoff wird dabei jedoch nicht wie das in der Hämolymphe der Ölkäfer enthaltene Cantharidin durch Reflexbluten abgegeben, sondern kann offenbar bei Bedarf über eine zwischen Sternit III und IV ausmündende exokrine Komplexdrüse (KELLNER & DETTNER, 1992) - nach neuesten Untersuchungen der Hauptspeicherort für Pederin (DETTNER, 2007; GREBE, 2007) - zusammen mit einem Alken-Gemisch nach außen abgegeben werden.

Aufgrund seiner höchst aktiven antiviralen Wirksamkeit und einer stark ausgeprägten Antitumor-Wirkung ist der Naturstoff natürlich in erster Linie für die medizinische Forschung interessant, um in der Zukunft neuartige Medikamente im Kampf gegen Krebs und Infektionskrankheiten entwickeln zu können. Da eine Kultivierung des Pederin-Bakteriums, wie auch im Falle der meisten anderen interessanten bakteriellen Naturstoff-Produzenten, derzeit nicht möglich ist, muss diesem Versorgungsproblem mit bioaktiven Naturstoffen durch die heterologe Expression symbiontischer Biosynthesegene in kompetenten, leicht zu kultivierenden Bakterien begegnet werden. Seine cytotoxische Wirkweise verdankt das Polyketid Pederin offenbar der zwischen den beiden Sechsringen liegenden α -Hydroxyamidoacetal-Gruppe (THOMPSON et al., 1992), die es nach PAVAN (1982) zum stärksten Inhibitor der cytoplasmatischen Proteinsynthese durch die 80S Ribosomen der Eukaryoten macht. Dies geschieht, indem die Translokation des Ribosoms während der

Elongation der Polypeptidkette unterbunden wird (VAZQUEZ, 1979). Die mitochondriale Proteinsynthese, ebenso wie die bakterielle Proteinsynthese durch die 70S Ribosomen wird dabei nicht beeinflusst (TIBONI et al., 1968; PAVAN, 1982).

Polyketide sind in der Natur sehr weit verbreitete Stoffwechselmetabolite, die sowohl in Mikroorganismen als auch in Eukaryoten gefunden werden können. Viele Polyketide mit antiparasitärer, antibiotischer oder Antitumor-Wirkung wurden besonders in Zusammenhang mit Bakterien, wie Streptomyceten, und bestimmten Pilzen beschrieben (TEUSCHER & LINDEQUIST, 1994; REIN & BORRONE, 1999). Daneben lassen sich diese überaus interessanten Naturstoffe auch in verschiedenen Algen, Dinoflagellaten und Pflanzen finden (HOPWOOD & SHERMAN, 1990; AUSTIN & NOEL, 2003), in denen sie offenbar als Abwehrstoffe gegenüber deren natürlichen Feinden zum Einsatz gebracht werden (MANOJLOVIC et al., 2000; CHOI et al., 2004). Die wohl interessanteste und zugleich auch vielfältigste Gruppe von Polyketidproduzenten stellen marine Organismen dar, wie z. B. die Schwämme, Manteltiere und die Moostierchen. Aus diesen stammt der Großteil der bis heute bekannten, aus medizinischer Sicht überaus interessanten Naturstoffe mit stark cytotoxischen Eigenschaften (PIEL, 2004; MOORE, 2005; PIEL et al., 2005; Moore, 2006; PIEL, 2006). Diese zur so genannten Pederin-Familie gehörenden Substanzen werden dabei von den Invertebraten nicht etwa selbst hergestellt, sondern werden wie auch im Falle der Pederin produzierenden Käfer der Gattung *Paederus* s. l. von nicht kultivierbaren, hoch angepassten Endosymbionten synthetisiert.

5. Zusammenfassung

Weibliche Kurzflügler der Gattung *Paederus* s. l. (Coleoptera: Staphylinidae) beherbergen einen mit *Pseudomonas aeruginosa* sehr nahe verwandten Endosymbionten, der für die Synthese des stark cytotoxischen Naturstoffs Pederin verantwortlich ist. Die ökologische Bedeutung dieses Giftstoffs für die Käfer liegt dabei offenbar in einer Abwehrfunktion gegenüber potentiellen Prädatoren, wie z. B. Wolfsspinnen, begründet. Aufgrund einer sehr hohen tumorhemmenden und antiviralen Wirksamkeit ist Pederin in erster Linie für die medizinische Forschung interessant. Ziel dieser Arbeit war es, den Endosymbionten von *Paederus riparius* mit verschiedenen mikrobiologischen und molekularen Methoden in den Käfern bzw. auf deren Eiern exakt zu lokalisieren, um somit die Organisation dieser Bakterien im Wirtsinneren näher zu beleuchten und deren Übertragungsweg auf die Nachkommenschaft aufklären zu können. Durch eine gezielte Isolierung des Pederin-Symbionten sollte dieser schließlich auf exakt abgestimmten, Agar basierten Kulturmedien angezüchtet werden, um letztlich eine Produktion dieses komplizierten Polyketids außerhalb der Käfer in ökologisch nachhaltiger Weise gewährleisten zu können.

1. Mit Hilfe von Pederin-Gen-spezifischen Primern konnte der Endosymbiont in den Abdominalspitzen der Käfer detektiert werden. Eine sich anschließende molekulare Untersuchung verschiedener abdominaler Organe zeigte, dass das Vorhandensein des symbiontischen Bakteriums ausschließlich auf die am weiblichen Geschlechtsapparat paarig angelegten Anhangsdrüsen und den Ausführgang begrenzt ist. Über eine in situ-Färbung der beiden akzessorischen Drüsen mit dem Nucleinsäurefarbstoff DAPI konnte daraufhin zum ersten Mal das Vorhandensein einer morphologisch einheitlichen, stark an *Pseudomonas* erinnernden Kolonie gezeigt werden.
2. Der Einsatz einer eigens entwickelten, fluoreszenzmarkierten Gensonde ermöglichte es, das endosymbiontische Bakterium in Serien-Dünnschnitten von Abdomina und Eiern gezielt sichtbar zu machen. Dabei zeigte sich im Falle der Abdominalschnitte, dass der Pederin-Produzent in einer enorm hohen Dichte als Reinkultur in den Anhangsdrüsen und in etwas geringerer Menge in bestimmten Bereichen des Ausführgangs lokalisiert ist, in den die beiden Symbionten-Drüsen münden. Im Falle der Ei-Dünnschnitte konnte der Endosymbiont auf einer die Eischale umgebenden warzenartigen Schicht detektiert werden, auf die das Bakterium in einer biofilmartigen, festen Matrix aufgebracht ist. Die Verteilung der Symbionten-Zellen erstreckte sich dabei stets in einer dünnen Schicht über

die gesamte Ei-Oberfläche. Ein möglicher Weg der Übertragung vom Weibchen auf die Eier wäre die aktive oder passive Abgabe einer definierten Menge Bakterienmaterial über einen Schleusenmechanismus, der die Anhangsdrüsen gegenüber dem Inneren des Ausführgangs während der Ei-Passage öffnen und verschließen kann.

3. Mit einer speziellen Sektionstechnik gelang es, den Endosymbionten von seinem Insekten-Wirt zu isolieren. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Bakterienlösung zeigte dabei das Vorhandensein einer *Pseudomonas aeruginosa* sehr ähnlichen, offenbar kontaminationsfreien Zellkolonie. Den endgültigen Beweis, dass es sich dabei um eine Reinkultur des *Paederus*-Endosymbionten handelte, erbrachte jedoch erst die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit der spezifischen Gensonde hybridisierten Zellen.
4. Anhand der isolierten Reinkultur des Pederin produzierenden Symbionten konnte über verschiedene Enzymtests gezeigt werden, dass es sich um ein gramnegatives Bakterium mit einem aeroben oder mikroaerophilen Stoffwechsel handelt, das jedoch im Gegensatz zu den Pseudomonaden vollständig unbegeißelt ist. Die dafür benötigten Gene sind offenbar im Zuge der endosymbiontischen Anpassung an den Käfer-Wirt durch zahlreiche Genomreduktionen verloren gegangen. Dies gilt wahrscheinlich ebenso für die Gene, die *Pseudomonas aeruginosa* die Fähigkeit zur Denitrifikation verleihen. Diese Gene konnten im Rahmen spezifischer PCR-Experimente in den Endosymbionten nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus erbrachte eine vergleichende RFLP-Analyse der endosymbiontischen 16S rDNAs der beiden voneinander kontinental getrennten *Paederus*-Arten *P. riparius* und *P. sabeus* die Erkenntnis, dass eine genetische Aufspaltung des Pederin-Symbionten in eigenständige Arten noch nicht stattgefunden hat.
5. Ein mögliches Wachstum des Endosymbionten konnte mit den Pederin-Gen-spezifischen Primern in einem flüssigen Anreicherungsmedium nachgewiesen werden. Durch eine Beimpfung der verschiedensten universellen und selektiven Nährböden mit Ei- bzw. Käfer-Homogenisat konnte im Laufe der Kultivierungsexperimente eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer Bakterien kultiviert werden. Eine gezielte Anzucht des *Paederus*-Endosymbionten auf diesen Medien konnte jedoch nicht erreicht werden, was nicht zuletzt auch auf einen zu geringen Kenntnisstand über die möglicherweise sehr speziellen Nährstoffanforderungen der Pederin-Produzenten außerhalb ihrer Käfer-Wirte zurückgeführt werden kann.

6. Summary

Female rove beetles of the genus *Paederus* s. l. (Coleoptera: Staphylinidae) harbour endosymbiotic bacteria, which are closely related to *Pseudomonas aeruginosa*. These microorganisms are responsible for the biosynthesis of the natural product pederin, which exhibits strong cytotoxic properties. The ecological importance of this poisonous substance for the beetles apparently lies well-founded in deterring potential predators like wolf spiders. Due to its highly active antitumoral and antiviral efficiency the polyketide pederin is predominantly interesting for medical researches. The aim of this dissertation was to exactly localize the endosymbiont of *Paederus riparius* by using microbial and molecular techniques inside the beetles and on their eggs respectively, for highlighting the organisation of these bacteria inside their hosts and elucidating their mode of transmission to the beetles' offspring. Finally, the pederin-symbiont should be cultivated on accurately balanced, agar based culture media by well-directed isolation from its host, in order to assure an ecologically sustainable production of this complex polyketide outside the beetles.

1. Via pederin-specific primers, the endosymbiont could be detected in the female beetles' abdominal tips. Subsequent molecular analysis of different abdominal organs revealed the existence of the symbiotic bacterium being restricted exclusively to the pairwise attached accessory glands of the females' internal genitalia and the efferent duct. In situ staining of the accessory glands with the nucleic acid-dye DAPI showed for the first time the existence of a morphologically uniform bacterial colony with strong similarity to *Pseudomonas*.
2. Application of a specially constructed, fluorescently labeled gene-probe enabled a directed visualisation of the symbiotic bacterium in serial thin sections of abdomina and eggs. In the case of abdominal-sections it could be demonstrated that the pederin-producer is localized in tremendous density as pure culture in the accessory glands and in somewhat lower amount in certain areas of the efferent duct, into which both symbiont glands lead. Looking at the egg thin sections, the endosymbiont could be detected on a tuberculate layer that coats the chorion and to which the bacterium is applied to in a biofilm-like solid matrix. Thereby the allocation of symbiont-cells always extended over the whole egg surface in a thin layer. A possible mode of transmitting the endosymbionts from the females onto their eggs could be an active or passive release of a well-defined amount of

bacterial substance through a sluice-mechanism, which can open and close the accessory glands to the interior of the efferent duct during egg-passage.

3. Using a specific dissection-procedure, it could be managed to isolate the endosymbiont from its insect host. Microscopical examination of the obtained bacterial solution revealed the existence of a *Pseudomonas aeruginosa* like cell colony, which apparently was free of contaminating microorganisms. The final proof, that is was about a pure culture of the *Paederus*-endosymbiont, could be adduced by fluorescent-microscopical analysis of cells being hybridized with the specific gene-probe.
4. It could be demonstrated via enzymatic tests of the isolated pure culture of the pederin-producing symbiont, that it is about a gram-negative bacterium with aerobic or microaerophilic metabolism, being completely unflagellated compared to the pseudomonads. The therefore required genes apparently got lost by numerous genome reductions in the course of endosymbiotic accommodation to the beetle-host. This probably also counts for the genes, which give *Pseudomonas aeruginosa* the capability of denitrification. However, these genes could not be detected in the endosymbionts within the scope of specific PCR-experiments. Furthermore, a comparative RFLP-analysis of the endosymbiotic 16S rDNAs of both continentally separated *Paederus*-species, *P. riparius* and *P. sabeus*, adduced that a genetic divergence of the endosymbiont in independent species did not occur yet.
5. A possible endosymbiotic growth in a liquid enrichment medium could be proved with pederin-gene-specific primers. By inoculation of many different universal and selective nutrient media with homogenate from eggs and beetles, respectively, a multitude of gram-positive and gram-negative bacteria could be cultivated over the breeding-experiments. However, a well-directed starting of the *Paederus*-endosymbiont on these media could not be achieved, not least because of too little knowledge about possibly very specific nutrient requirements, the pederin-producers need outside their beetle-hosts.

7. Literaturverzeichnis

- AKSOY, S., CHEN, X. and HYPASA, V. (1997). Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect. Mol. Biol.* 6: 183-190.
- AKMAN, L., YAMASHITA, A., WATANABE, H., OSHIMA, K., SHIBA, T., HATTORI, M. and AKSOY, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* 32: 402-407.
- AMANN, R. I., KRUMHOLZ, L. and STAHL, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762-770.
- ANDERSSON, J. O. & ANDERSSON, S. G. E. (1999). Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 664-671.
- ANDERSSON, S. G. E. & KURLAND, C. G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 6: 263-268.
- ARAUJO, J. (1978). Anatomie comparée des systèmes glandulaires de défense chimique des Staphylinidae. *Arch. Biol.* 89: 217-250.
- ARNETT, R. H. & THOMAS, M. C. (2001). *American Beetles* (CRC Press, 2001), vol. 1.
- ASHE, J. S. & NEWTON, A. F., Jr. (1993). Larvae of *Trichophya* and phylogeny of the tachyporine group of subfamilies (Coleoptera: Staphylinidae) with a review, new species and characterization of the Trichophyinae. *Systematic Entomology* 18: 267-286.
- AUSTIN, M. B. & NOEL, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20: 79-110.
- BALCH, W. E., FOX, G. E., MAGRUM, L. J., WOESE, C. R. and WOLFE, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.
- BAST, E. (2001). *Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Spektrum, Akad. Verl., Berlin/Heidelberg.
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., LAI, C. Y., ROUBAKHSH, D., MORAN, N. A. and CLARK, M. A. (1995). Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*-intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 55-94.
- BAUMANN, P., MORAN, N. A. and BAUMANN, L. (2000). Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M. (eds). New York.
- BERNHAEUER, M. & SCHUBERT, K. (1912). Staphylinidae III. In Schenkling, S. (Herausgeber), *Coleopterorum Catalogus*, Band 40. W. Junk, Berlin.

- BETTINI, S. (1958). [Discussion] p. 36. In: I. Symposium on Insect Biochemistry. IV. Int. Congr. Biochem., Vienna, 1958.
- BLATTNER, R. F., PLUNKETT, III G., BLOCH, A. C., PERNA T. N., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, D. J., RODE, K. C., MAYHEW, F. G., GREGOR, J., DAVIS, W. N., KIRKPATRICK, A. H., GOEDEN, A. M., ROSE, J. D., MAU, B. and SHAO, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* Vol. 277. no. 5331, pp. 1453-1462.
- BLOCHMANN, F. (1892). Über das regelmäßige Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Zentbl. Bakt.* 11: 234-240.
- BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G., BATTERSHILL, C. N., COPP, B. R., MCCOMBS, J. D., PERRY, N. B., PRINSEP, M. and THOMPSON, A. M. (1990). From the Antarctic to the Antipodes; 45° of marine chemistry. *New Journal of Chemistry* 14: 761-775.
- BOHÁČ, J. (1985). Review of the subfamily Paederinae (Coleoptera: Staphylinidae) in Czechoslovakia. *Acta ent. Bohemoslov.* 82: 360-385.
- BONAMARTINI CORRADI, A., MANGIA, A., NARDELLI, M. and PELIZZI, G. (1971). The crystal and molecular structure of di-(p-bromobenzoyl) pederin monoethanolate. *Gazz. Chim. Ital.* 101: 591-605.
- BRAKER, G., FESEFELDT, A. and WITZEL, K.-P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3769-3775.
- BREGA, A., FALASCHI, A., DE CARLI, L. and PAVAN, M. (1968). Studies on the mechanism of the action of pederine. *J. Cell Biol.*, 36: 485-496.
- BROSIUS, J., PALMER, M. L., KENNEDY, P. J. and NOLLER, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National academy of Science U.S.A.* 75: 4801-4805.
- BUCHNER, P. (1953). *Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen*. Verlag Birkhäuser, Basel/Stuttgart.
- BUCHNER, P. (1960). *Tiere als Mikrobenzüchter*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- BUCHNER, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Wiley Interscience Publishers, New York.
- CAMPBELL, N. A. (2000). *Biologie*, herausgegeben von Jürgen Markl, Spektrum Akademischer Verlag: 568, 673.

- CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D., MONDELLI, R. PAVAN, M. and QUILICO, A. (1965a). Propriétés. Biologiques et composition chimique de la péderine. Ann. Soc. Entomol. Fr. 1: 813-816.
- CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D., MONDELLI, R. and QUILICO, A. (1965b). The structure of pederin. Tetrahedron Lett. (29): 2537-2545.
- CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D., MONDELLI, R. and QUILICO, A. (1966). Struttura della pederina. Gazz. Chim. Ital. 96: 3-38.
- CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D., QUILICO, A. and SELVA, A. (1967). The structure of peperone, a novel substance from *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae). Tetrahedron Lett. 41: 4023-4025.
- CARDANI, C., FUGANTI, C. and GHIRINGHELLI, D. (1968). Configurazione assoluta del pederolattone. Gazz. Chim. Ital. 98: 474-479.
- CASTELLI, A. (1935b). Azione sperimentale della cantaridina usata per contatto sui tessuti oculari esterni. p. 493-506, 2 pl. In: Atti Congr. Soc. Oftalmol., Rome, 1935.
- CHEN, D.-Q., MONTLLOR, C. B. and PURCELL, A. H. (2000). Fitness effects of two endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid *A. kondoi*. Entomol. Exp. Appl. 95: 315-323.
- CHOI, G. J., LEE, S.-W., JANG, K. S., KIM, J.-S., CHO, K. J. and KIM, J.-C. (2004). Effects of chrysophanol, parietin and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. Crop. Prot. 23: 1215-1221.
- CHOU, I. (1957). History of entomological studies in China before the 20th century. Sci. Publ. Off., Peking. 132 p.
- CIFERRI, O., PARISI, B. and TIBONI, O. (1968). The mode of action of pederin, a drug inhibiting protein synthesis in eucaryotic organisms. Giorn. Bot. Ital., 102: 337-345.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. and LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995). Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49: 711-745.
- COSTERTON J. W., STEWART, P. S. and GREENBERG, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.
- COSTERTON, J. W. & STEWART, P. S. (2000). Bacterial biofilms. In NATARO, J. P., BLASER, M. J. and CUNNINGHAM-RUNDLES, S., eds, Persistent Bacterial Infections. American Society of Microbiologists, Washington, DC, pp 423-439.
- COUPPIE, P., BEAU, F. and GROSSHANS, E. (1992). *Paederus* dermatitis: apropos of an outbreak in Conakry (Guinea) in November 1989. Ann. Dermatol. Venereol. 1992; 119(3): 191-195.

- DAIMS, H., BRÜHL, A., AMANN, R., SCHLEIFER, K.-H. and WAGNER, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 434-444.
- DALE, C. & MAUDLIN, I. (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossinia morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 267-275.
- DALE, C., BEETON, M., HARBISON, C., JONES, T. and PONTES, M. (2006). Isolation, pure culture and characterisation of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*”, an intracellular secondary Endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2006, p. 2997-3004.
- DARBY, A. C., CHANDLER, S. M., WELBURN, S. C. and DOUGLAS, A. E. (2005). Aphid-symbiotic bacteria cultured in insect cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4833-4839.
- DEGNAN, P. H., LAZARUS, A. B. and WERNEGREN, J. J. (2005). Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res.* 15: 1023-1033.
- DETTNER, K. (1983). Vergleichende Untersuchungen zur Wehrchemie und Drüsenmorphologie abdominaler Abwehrdrüsen von Kurzflüglern aus dem Subtribus Philontina (Coleoptera: Staphylinidae). *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci. Tübingen.* 38: 319-328.
- DETTNER, K. (1991). Chemische Abwehrmechanismen bei Kurzflüglern (Coleoptera: Staphylinidae). *Jahresber. Naturwiss. Ver. Wuppertal*, 44: 50-58.
- DETTNER, K. (1993). Defensive secretions and exocrine glands in free-living staphylinid beetles-their bearing on phylogeny (Coleoptera: Staphylinidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 21 (1): 143-162.
- DETTNER, K. (2003). *Lehrbuch der Entomologie*, 2. Auflage: 75-88, 119-123, 613-633, Rückseite Einband.
- DETTNER, K. (2007). In Vorbereitung.
- VON DOHLEN, C. D., KOHLER, S., ALSOP, S. T. and MCMANUS, W. R. (2001). Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature* 412: 433-436.
- DOUGLAS, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 17-3.

- DOUGLAS, A. E. (2000). Symbiotic microorganisms in insects. *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 4: 526-537.
- DRENKARD, E. & AUSUBEL, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743.
- EARLE, K. V. (1949). Fuetazo dermatitis. *J. Trop. Med. Hyg.*, 52: 183-187.
- EWALD, P. W. (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann. NY Acad. Sci.* 503: 295-306.
- FEKL, W. (1954). Die Bakterienflora der Tracheen und des Blutes einiger Insekten. *Z. Morphol. Ökol. Tiere* 44: 442-458.
- FERRARI, J., DARBY, A. C., DANIELL, T. J., GODFRAY, H. C. J. and DOUGLAS, A. E. (2004). Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol. Entomol.* 29: 60-65.
- FINK, R. (1952). Morphologische und physiologische Untersuchungen an den intrazellulären Symbionten von *Pseudococcus citri* Risso, *Z. Morph. Ökol.* 41.
- FLEMING, A. (1932). On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. Incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. *J. Pathol. Bacteriol.* 35: 831-842.
- FOX, G. E., WISOTZKEY, J. D. and JURTSCHUK, P. J. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166-170.
- FRANK, J. H. & KANAMITSU, K. (1987). *Paederus*, sensu lato (Coleoptera: Staphylinidae): Natural history and medical importance. *Journal of Medical Entomology* 24: 155-191.
- FRANK, J. H. (1988). *Paederus*, sensu lato (Coleoptera: Staphylinidae): An index and review of the taxa. *Insecta mundi*, 2: 97-159.
- FRANK, J. H. & THOMAS, M. C. (2005). Rove beetles of the world, Staphylinidae (Insecta: Coleoptera: Staphylinidae). <http://creatures.ifas.ufl.edu>.
- FREUDE, H., HARDE, K. W. and LOHSE, G. A. (1964). Die Käfer Mitteleuropas, Band 4. Goecke und Evers, Krefeld: 7, 133.
- FUCHS, B. M., WALLNER, G., BEISKER, W., SCHWIPPL, I., LUDWIG, W. and AMANN, R. (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4973-4982.

- FUKATSO, T. & NIKOH, N. (2000). Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid *Antonia crawii* (Insecta, Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* 66: 643-650.
- FURUSAKI, A., WATANABE, T., MATSUMOTO, t. and Yanagiya, M. (1968). The crystal and molecular structure of pederin di-p-bromobenzoate. *Tetrahedron Lett.* 60: 6301-6304.
- FUSETANI, N., SUGAWARA, T. and MATSUNAGA, S. (1992). Theopederins A-E, potent antitumor metabolites from a marine sponge, *Theonella* sp. *J. Org. Chem.*, 57: 3828-3832.
- GELMETTI, C. & GRIMALT, R. (1993). *Paederus* dermatitis: an easy diagnosable but misdiagnosed eruption. *Eur. J. Pediatr.*, 152: 6-8.
- GENEVRAY, J., GASCHEN, H., AUTRET, M. and DODERO, J. (1934). *Paederus* vesicants (*P. fuscipes* et *P. alternans*) au Tonkin. Étude entomologique, clinique et expérimentale. *Arch. Inst. Pasteur Indochine*, 19: 313-329.
- GHERNA, R. L., WERREN, J. H., WEISBURG, W., COTE, R., WOESE, C. R., MANDELCO, L. and BRENNER, D. J. (1991). *Arsenophonus nasoniae* gen. Nov., sp. Nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 563-565.
- GIER, H. T. (1936). The morphology and behaviour of the intracellular bacteroids of roaches. *Biol. Bull.* 71.
- GIL, R., LATORRE, A. & MOYA, A. (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology* (2004) 6(11): 1109-1122.
- GIOVANNONI, S. J., DELONG, E. F., OLSEN, G. J. and PACE, N. R. (1988). Phylogenetic, group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170: 720-726.
- GOEBEL, W. & GROSS, R. (2001). Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol.* 9: 267-273.
- GÖLDI, E. A. (1913). Die sanitärisch-pathologische Bedeutung der Insekten und verwandten Gliedertieren, namentlich als Krankheits-Erreger und Krankheits-Überträger. Friedländer, Berlin. 155 p..
- GOVAN, J. R. & DERETIC, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60: 539-574.
- GREBE, M. (2007). In Vorbereitung.

- GRENIER, A.-M., NARDON, C. and RAHBE, Y. (1994). Observations on the microorganisms occurring in the gut of the pea aphid *Acyrtosyphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 41-49.
- HACKER, J. & KAPER, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
- VAN HAM, R., KAMERBEEK, J., PALACIOS, C., RAUSELL, C., ABASCAL, F., BASTOLLA, U., FERNÁNDEZ, J. M., JIMÉNEZ, L., POSTIGO, M., SILVA, F. J., TAMAMES, J., VIGUERA, E., LATORRE, A., VALENCIA, A., MORÁN, F. and MOYA, A. (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 581-586.
- HANSEN, M. (1997 a). Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biologiske Skrifter, Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab* 48: 1-339.
- HARDE, K. W. & SEVERA, F. (2006). *Der Kosmos Käferführer: Die Käfer Mitteleuropas*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart.
- HEDDI, A., CHARLES, H., KHATCHDOURIAN, C., BONNOT, G. and NARDON, P. (1998). Molecular characterisation of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G-C content of an endocytobiotic DNA. *J. Mol. Evol.* 47: 52-61.
- HERMAN, L. H. (1981). Revision of the subtribe Dolicaonina of the New World, with discussions of phylogeny and the Old World genera (Staphylinidae, Paederinae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 167: 327-520.
- HERMAN, L. H. (2001). *Catalog of the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera). 1758 to the End of the second Millennium*. Bulletin of the American museum of natural history, number 265, New York: 2001.
- HOPWOOD, D. A. & SHERMAN, D. H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24: 37-66.
- HORION, A. (1965). Staphylinidae Teil 2: Paederinae. In *Faunistik der mitteleuropäischen Käfer*, Band 10. Klostermann, Frankfurt a. M..
- HYPSA, V. & DALE, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*”, an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 1140-1144.
- ITO, Y. (1932). Dermatitis linearis und Dermatitis artificialis durch den Extrakt von „*Paederus idae* Sharp“. *Fukuoka Acta Med.*, 25(8): 60-61.

- ITO, Y. (1934a). Dermatitis linearis. *Hifuka Hinyokika Zasshi* 35(4): 434-435.
- ITO, Y. (1934b). Studies on the poison of *Paederus* and pathological observations on dermatitis, Pt. 4. *Fukuoka Ika Daigaku Zasshi* 27(5): 1205-1249.
- JANDER, G., RAHME, L. G. and AUSUBEL, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* 182: 3843-3845.
- KAISER, A. (2002). Effekt ontogenetischer Entwicklung und respiratorischer Veränderungen auf Zusammensetzung und Säure-Basen-Status der Flüssigkeitskompartimente von Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dissertation (edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-alexander-2002-09-25/PDF/Kaiser.pdf -).
- KAPATRAL, V., ZAGO, A., KAMATH, S., and CHUGANI, S. (2000). *Pseudomonas*, Encyclopedia of Microbiology, Volume 3, Second Edition. University of Illinois at Chicago College of Medicine: 876-893.
- KELLNER, R. L. L. & DETTNER, K. (1992). Comparative morphology of abdominal glands in Paederinae (Coleoptera: Staphylinidae). *Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.*, Vol. 21. No. 2, pp. 117-135.
- KELLNER, R. L. L. (1994). Pederin: Ein ungewöhnlicher Giftstoff und seine Bedeutung in der Biologie und Ökologie von *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae). Dissertation, Universität Bayreuth.
- KELLNER, R. L. L. & DETTNER, K. (1995). Allocation of pederin during lifetime of *Paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): evidence for polymorphism of hemolymph toxin. *Journal of Chemical Ecology* 21, 1719-1733.
- KELLNER, R. L. L. & DETTNER, K. (1996). Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia* 107(3): 293-300.
- KELLNER, R. L. L. (1999). What is the basis of pederin polymorphism in *Paederus riparius* rove beetles? The endosymbiotic hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 41-49.
- KELLNER, R. L. L. (2001). Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabeus*. *Journal of Insect Physiology* 47: 475-483.
- KELLNER, R. L. L. (2001). Horizontal transmission of biosynthetic capabilities for pederin in *Paederus melanurus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Chemoecology* 11: 127-130.

- KELLNER, R. L. L. (2002). Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabeus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2002): 389-395.
- KELLNER, R. L. L. (2003). Stadium-specific transmission of endosymbionts needed for pederin biosynthesis in three species of *Paederus* rove beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 107: 115-124.
- KOBAYASHI, J., ITAGAKI, F., SHIGEMORI, H. and SASAKI, T. (1993). Three new onnamide congeners from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. *J. Nat. Prod.*, 56: 976-981.
- KOCH, K. (1989). Ökologie, Band 1. In FREUDE, H., HARDE, K. W. und LOHSE, G. A. (Herausgeber). *Die Käfer Mitteleuropas*. Goecke und Evers, Krefeld.
- KODAKA, H., ARMFIELD, A. Y., LOMBARD, G. L. and DOWELL JR., V. R. (1982). Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 948-952.
- KONISHI, M & ITO, Y. (1973). Early entomology in east Asia. p. 1-20. In: SMITH, R. F., MITTLER, T. E. and SMITH, C. N., eds., *History of entomology*. Annual Reviews, Palo Alto, Calif..
- LAWRENCE, J. F. & NEWTON, A. F., Jr. (1982). Evolution and classification of beetles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 261-290.
- LAWRENCE, J. F. & NEWTON, A. F., Jr. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). Pp. 779-1006. In PAKALUK, J. & ŚLIPIŃSKI, S. A. (eds.) *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- DE LEON, D. (1952). The vesicating properties of a staphylinid, *Paederus* nr. *intermedius* Boh., in the Philippines. *Coleopt. Bull.*, 6: 15-16.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. and PARKER, J. (2002). *Brock Mikrobiologie*, Deutsche Ausgabe, Herausgeber: Werner Goebel: 88-91, 162-163, 176-180, 524-527, 774-775.
- MADIGAN, M. T. & MARTINKO, J. M. (2006). *Brock Mikrobiologie*, Deutsche Ausgabe, Herausgeber: Pearson Studium: 103-105, 178-182, 370-470, 700-702.
- MAHAJAN-MIKLOS, S., TAN, M. W., RAHME, L. G. and AUSUBEL, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.

- MANOJLOVIC, N. T., SOLUJIC, S., SUKDOLAK, S. and KRSTIC, L. J. (2000). Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus *Xanthoria*. J. Serb. Chem. Soc. 65: 555-560.
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M. and SCHLEIFER, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. Systematic and Applied Microbiology 15: 593-600.
- MATSUMOTO, T., TSUTSUI, S., YANAGIYA, M., YASUDA, S., MAENO, S., KAWASHIMA, J., UETA, A and MURAKAMI, M. (1964). The partial structure of pederin. Bull. Chem. Soc. Jpn. 37: 1892-1893.
- MATSUMOTO, T., YANAGIYA, M., MAENO, S. and YASUDA, S. (1968). A revised structure of pederin. Tetrahedron Lett., (60): 6297-6300.
- MATSUNAGA, S., FUSEYANI, N. and NAKAO, Y. (1992). Eight new cytotoxic metabolites closely related to Onnamide A from two marine sponges of the genus *Theonella*. Tetrahedron, 48: 8369-8376.
- VAN MEER, M. M. M., WITTEFELDT, J. and STOUTHAMER, R. (1999). Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. Insect Molec. Biol. 8: 399-408.
- MEINWALD, J. (1977). An approach to the synthesis of pederin. Pure Appl. Chem. 49: 1275-1290.
- MEIXNER, J. (1932). Coleoptera Latreille. In: KÜKENTHAL, W. & KRUMBACH, T. (1926-1938). Handbuch der Zoologie, Band 4: Teilband 1 und 2: Progoneata, Chilopoda, Insecta 1, 2, 3. Berlin/Leipzig, Walter de Gruyter. P. 1188-1348.
- MOORE, B. S. (2005). Biosynthesis of marine natural products: Microorganisms (Part A). Nat. Prod. Rep. 22: 580-593.
- MOORE, B. S. (2006). Biosynthesis of marine natural products: Macroorganisms (Part B). Nat. Prod. Rep. 23: 615-629.
- MONTLLOR, C. B., MAXMEN, A. and PURCELL, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. Ecol. Entomol. 27: 189-195.
- MORAN, N. A. & WERNEGREN, J. J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. Trends Ecol. Evol. 15: 321-326.
- MORSY, T. A., ARAFA, M. A. S., YOUNIS, T. A. and MAHMOUD, I. A. (1996). Studies on *Paederus alfieri* Koch (Coleoptera: Staphylinidae) with special reference to the medical importance. J. Egypt Soc. Parasitol. 26: 337-352.

- MOYA, A., LATORRE, A., SABATER, B. and SILVA, F. J. (2002). Comparative molecular evolution of primary (*Buchnera*) and putative secondary endosymbionts of aphids based on two protein-coding genes. *J. Mol. Evol.* 54: 127-137.
- MUYZER, G., TESKE, A., WIRSEN, C. O. and JANNASCH, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* 164: 165-172.
- NARQUIZIAN, R. & KOCIENSKI, P. J. (2000). The pederin family of antitumor agents: structures, synthesis and biological activity. The role of natural products in drug discovery. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag. 32: 25-56.
- NARQUIZIAN, R. & KOCIENSKI, P. J. (2000). The role of natural products in drug discovery. Springer, Heidelberg, Germany, vol. 32, p. 653.
- NEWTON, A. F., Jr. & THAYER, M. K. (1995). *Protopselaphinae* new subfamily for *Protopselaphus* new genus from Malaysia, with a phylogenetic analysis and review of the Omaliine Group of Staphylinidae including Pselaphidae. In: PAKALUK, J. & ŚLIPIŃSKI, S. A. (eds.) *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- NIKBAKHYZADEH, M. R. & SADEGHIANI, C. (1999). Dermatite due a deux especes de *Paederus* au sud de l'Iran. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 92: 56.
- NORTON, S. A. & LYONS, C. (2002). Blister beetles and the ten plagues. *Lancet.* 359(9321): 1950.
- OLIVER, K. M., RUSSELL, J. A., MORAN, N. A. and HUNTER, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1803-1807.
- O'NEILL, S. L., PETTIGREW, M. M., SINKINS, S. P., BRAIG, H. R., ANDREADIS, T. G. and TESH, R. B. (1997). In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol. Biol.* 6: 33-39.
- O'TOOL, G. A. & KOLTER, R. (1998). Initiation of biofilm in *Pseudomonas fluorescens* WC365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- PASSADOR, L. & IGLEWSKI, B. H. (1995). Quorum sensing and virulence gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. In: ROTH J. A., editor. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995. p. 65-78.

- PAUL, G. K., GUNASEKERA, S. P., LONGLEY, R. E. and POMPONI, S. A. (2002). Theopederins K and L. Highly potent cytotoxic metabolites from a marine sponge *Discodermia* species. *J. Nat. Prod.* 65: 59-61.
- PAVAN, M. & BO, G. (1953). Pederin, toxic principle obtained in the crystalline state from the beetle *Paederus fuscipes* Curt. *Physiol. Comp. Oecol.*, 3: 307-312.
- PAVAN, M. (1963). Ricerche biologiche e mediche su pederina e su estratti purificati di *Paederus fuscipes* Curt. (Coleoptera, Staphylinidae). Mario Ponzio, Pavia. 93 p..
- PAVAN, M. & VALCURONE DAZZINI, M. (1971). Toxicology and pharmacology - Arthropoda. p. 365-409. In: FLORKIN, M. & SCHEER, B. T., eds., *Chemical zoology*. Vol. 6. Academic Press, London.
- PAVAN, M. (1975). Sunto delle attuali conoscenze sulla pederina. *Pubbl. Ist. Entomol. Agrar. Univ. Pavia*, p. 1-35.
- PAVAN, M. (1982). Summary of the present data on pederin. *Pubbl. Ist. Entomol. Univ. Pavia*, 23: 1-61.
- PAWLOWSKY, E. N. & STEIN, A. K. (1927). Experimentelle Untersuchung über die Giftwirkung von *Paederus fuscipes* Curt. (Coleoptera: Staphylinidae) auf den Menschen. *Arch. Schiffs- Tropenhyg.*, 31: 271-282.
- PENCHENIER, L., MOUCHET, J., CROS, B., LEGALL, P., COSNEFROY, J. Y., QUEZEDE, P. and CHANDENIER, J. (1994). Invasions of *Paederus sabeus* (Coleoptera: Staphylinidae) in central Africa. 1. Entomological and epidemiological aspects. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 87(1): 45-48.
- PERRY, N. B., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G. and PANNELL, L. K. (1988). Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 4850-4851.
- PERRY, N. B., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G. and THOMPSON, A. M. (1990). Antiviral and antitumor agents from a New Zealand sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and solution conformations of mycalamides A and B. *J. Org. Chem.*, 55: 223-227.
- PFENNIG, N. (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. sp. Nov., a ring-shaped vitamin B12-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 283-288.
- PHILLIPS, M. L. (2006). Interdomain interactions: Dissecting animal-bacterial symbioses. *BioScience*, May 2006, Vol. 56 No. 5: 376-381.
- PICKEL, D. B. (1940). Dermatite purulenta produzida por duas especies de *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Rev. Entomol.*, Rio de Janeiro, 11: 775-793.

- PIEL, J. (2002). A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 14002-14007, PNAS, 29.10.2002, vol. 99, no.22.
- PIEL, J., HÖFER, I. and HUI, D. (2004). Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. Journal of Bacteriology, Mar. 2004, p. 1280-1286.
- PIEL, J., HUI, D., WEN, G., BUTZKE, D., PLATZER, M., FUSETANI, N. and MATSUNAGA, S. (2004). Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. PNAS, vol. 101, no. 46: 16222-16227. (www.pnas.org/cgi/dol/10.1073/pnas.0405976101).
- PIEL, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. Nat. Prod. Rep. 21: 519-538.
- PIEL, J. (2005). Wirkstoffe aus Symbiosen. BIOSpektrum 2/05, 11. Jahrgang: 172-173.
- PIEL, J., BUTZKE, D., FUSETANI, N., HUI, D., PLATZER, M., WEN, G. and MATSUNAGA, S. (2005). Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: Antitumor polyketides of the pederin family. J. Nat. Prod. 2005, 68, 472-479.
- PIEL, J. (2006). Bacterial symbionts: Prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. Curr. Med. Chem. 13: 39-50.
- PONTES, M. H. & DALE, C. (2006). Culture and manipulation of insect facultative symbionts. TRENDS in Microbiology, Vol. 14 No. 9: 406-412.
- PRAKTIKUMSSKRIPT ÖKOLOGISCHE MIKROBIOLOGIE (2004). Modulpraktikum: Molekulare mikrobielle Ökologie, BITÖK, Universität Bayreuth.
- QUILICO, A., CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D. and PAVAN, M. (1961). Pederina e pseudopederina. Chim. Ind., 43: 1434-1436.
- RAHME, L. G., SREVENS, E. J., WOLFORT, S. F., SHAO, J., TOMPKINS, R. G., CALDERWOOD, S. B. and AUSUBEL, S. F. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268: 1899-1902.
- RAMÍREZ, M. (1966). Aspectos bionómicos y ecológicos de especies venezolanas del género *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae). Acta Biol. Venez., 5: 41-67.
- REIN, K. S. & BORRONE, J. (1999). Polyketides from dinoflagellates: Origins, pharmacology and biosynthesis. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 124: 117-131.
- ROBERTS, J. I. & TONKING, H. D. (1935). Notes on an East African vesicant beetle, *Paederus crebrepunctatus*. Epp. Ann. Trop. Med. Parasitol. 29: 415-420.

- RUSSELL, J. A., LATORRE, A., SABATER-MUÑOZ, B., MOYA, A. and MORAN, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.* 12: 1061-1075.
- SAKEMI, S., ICHIBA, T., KOHMOTO, S., SAUCY, G. and HIGA, T. (1988). Isolation and structure elucidation of Onnamide A, a new bioactive metabolite of a marine sponge, *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4851-4853.
- SANGWAN, S., CHEN, X., HUGENHOLTZ, P. and JANSSEN, P. H. (2004). *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, October 2004, p. 5875-5881, Vol. 70, No. 10.
- SAUER, C., STACKEBRANDT, E., GADAU, J., HÖLLDOBLER, B. and GROSS, R. (2000). Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1877-1886.
- SCALA, D. J. & KERKHOF, L. J. (1999). Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1681-1687.
- SCHLEGEL, H. G. (1985). *Allgemeine Mikrobiologie*, 6th ed. Stuttgart: Thieme.
- SCHWARTZ, W. (1932). Neue Untersuchungen über die Pilzsymbiose der Schildläuse (Lecaniinen). *Arch. Mikrobiol.* 3.
- SCHWEMMLER, W. (1989). *Symbiogenesis, a macro-mechanism of evolution: progress towards a unified theory of evolution based on studies in cell biology*. Berlin [u. a.]: de Gruyter, 1989.
- SENDUR, N., SAVK, E. and KARAMAN, J. (1999). *Paederus* dermatitis: A report of 46 cases in Aydin, Turkey. *Dermatology* 199(4): 353-355.
- SHIGENOBU, S., WATANABE, H., HATTORI, M. and ISHIKAWA, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbionts of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407: 81-86.
- SILO-SUH, L., SUH, S. J., SOKOL, P. A. and OHMAN, D. E. (2002). A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (sigma-22) and RhIR contribute to pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15699-15704.
- SIMPSON, J. S., GARSON, M. J., BLUNT, J. W., MURRAY, H. G., MUNRO, M. H. G. and HOOPER, J. N. A. (2000). Mycalamides C and D, cytotoxic compounds from the marine sponge *Stylinos* n. species. *J. Nat. Prod.*, 63: 704.

- SINGH, P. K., SCHAEFER, A. L., PARSEK, M. R., MONINGER, T. O., WELSH, M. J. and GREENBERG, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407: 762-764.
- SNEATH, P. H. A. (1991). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1113-1114. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- SOLDATI, M., FIORETTI, A. and GHIONE, M. (1966). Cytotoxicity of pederin and of some of its derivatives on cultured mammalian cells. *Experientia*, 22: 176-178.
- STEINHAUS, E. A. (1946). *Insect Microbiology*. Comstock Publishing Company, Ithaca, NY.
- STEWART, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.* 185: 1485-1491.
- STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. and DOUDOROFF, M. (1966). The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 159-271.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J., BRINKMAN, F. S. L., HUFNAGLE, W. O., KOWALIK, D. J., LAGROU, M., GARBER, R. L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L. L., COULTER, S. N., FOLGER, K. R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G. K.-S., WU, Z., PAULSEN, I. T., REIZER, J., SAIER, M. H., HANCOCK, R. E. W., LORY, S. and OLSON, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- SUGGS, S. V., HIROSE, T., MIYAKE, T., KAWASHIMA, E. H., JOHNSON, M. J., ITAKURA, K. and WALLACE, R. B. (1981). Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences, p. 683-693. In BROWN, D. & FOX, C. F. (ed.), *Developmental biology using purified genes*. Academic Press, Inc., New York.
- TAKASAKI, K. (1933). Eye injury caused by a poisonous insect, *Paederus idea* Lewis. *Acta. Soc. Ophthalmol. Jpn.* 37(2): 154-164.
- TAKASAKI, K. (1934). On ocular injury caused by *Paederus idea* Lewis. Pt. 4. The effect of Cantharidin on the eye of the rabbit. *Acta. Soc. Ophthalmol. Jpn.* 38(8): 1795-1804.
- TAMAS, I., KLASSON, L., CANBACK, B., NÄSLUND, A. K., ERIKSSON, A.-S., WERNEGREN, J. J., SANDSTRÖM, J. P., NORAN, M. A. and ANDERSSON S. G. E. (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296: 2376-2379.

- TAYLOR, D. E. (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* 7: 111-115.
- TEUSCHER, E. & LINDEQUIST, U. (1994). *Biogene Gifte*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- THAYER, M. K. (2005). 11. Staphylinoidea. [chapter] 11.7. Staphylinidae Latreille, 1802, pp. 296-344. In: BEUTEL, R.G. & LESCHEN, R.A.B. (Coleoptera eds.); Kristensen, N.P. & Beutel, R.G. (Insecta eds.), *Coleoptera, Vol. I. Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim)*. Handbook of Zoology Vol. IV, Arthropoda: Insecta. De Gruyter, Berlin, New York.
- THÉODORIDÈS, J. (1950b). Experiments on the vesicating properties of species of *Paederus* (Staphylinidae) in France. *Coleopt. Bull.* 4: 21-22.
- THOMPSON, A. M., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G., PERRY, N. B. and PANNELL, L. K. (1992). Chemistry of the mycalamides, antiviral and antitumor compounds from a marine sponge. Part 3. Acyl, alkyl and silyl derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, p. 1335-1342.
- TIBONI, O., PARISI, B. and CIFERRI, O. (1968). The mode of action of pederin, a drug inhibiting protein synthesis in eucaryotic organisms. *Giorn. Bot. Ital.*, 102: 337-345.
- TIEDJE, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, New York. p. 179-243.
- TODD, R. E., GUTHRIDGE, S. L. and MONTGOMERY, C. (1996). Evacuation of an aboriginal community in response to an outbreak of blistering dermatitis induced by a beetle (*Paederus australis*). *Med. J. Aust.* 164(4): 238-240.
- TSCHECH, A. & PFENNIG, N. (1984). Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 137:163-167.
- VÁZQUEZ, D. (1979). Inhibitors of protein biosynthesis, vol. 30 of *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin.
- VUONG, D., CAPON, R. J., LACEY, E., GILL, J. H., HEILAND, K. and FRIEDEL, T. J. (2001). *Nat. Prod.*, 64: 640.
- WADA, H. (1926). Klinische und experimentelle Untersuchungen über die durch den Giftkäfer (*Paederus riparius* L.) verursachte Dermatitis und ihre Aetiologie. *Hifuka Hinyokika Zasshi* 26: 1044-1061.

- WALTERS, M. C. III, ROE, F., BUGNICOURT, A., FRANKLIN, M. J. and STEWART, P. S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 317-323.
- WELBURN, S. C., MAUDLIN, I. and ELLIS, D. S. (1987). In vitro cultivation of *Rickettsia*-like organisms from *Glossina* spp. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81: 331-335.
- WELCH, R. C. (1993). Ovariole development in Staphylinidae (Coleoptera). *Invertebrate Reproduction and Development* 23: 225-234.
- WERNEGREEN, J. I. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat. Rev. Genet.* 3: 850-861.
- WHELAN, K. F., COLLERAN, E. and TAYLOR, D. E. (1995). Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the IncH12 Plasmid R478. *J. Bacteriol.* 177: 5016-5027.
- WHELAN, P. I. & WEIR, T. A. (1987). Skin lesions caused by *Paederus australis* Guérin-Méneville (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Aust. Entomol. Soc.* 26: 287-288.
- WIDDEL, F. (1980). Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.
- ZIENTZ, E., DANDEKAR, T. and GROSS, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 745-770.
- ZIENTZ, E., GROSS, R. und FELDHAAR, H. (2006). Intrazelluläre bakterielle Endosymbiosen in Insekten. *BIOspektrum* 1/06 12. Jahrgang.

Anhang 1

2.8.1 Verfestigte komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien

2.8.1.1 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien

2.8.1.1.01 **BHI-Agar (Hirn-Herz-Infusionsagar)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 5,5 und 7,4

Proteose-Pepton	10,0 g/l
Hirnextrakt	7,8 g/l
Herzextrakt	9,7 g/l
Dextrose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g/l
Agar	15,0 g/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung einer großen Anzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien.

2.8.1.1.02 **BHI-Agar mit Supplementen** (Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.01**

pH = 5,5 und 7,4

D22 Insect Medium (siehe 2.8.3.2)	10,0 g/l
Trehalose	2,6 g/l
Prolin	6,4 g/l
Glutamin	6,0 g/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen aeroben, grampositiven und gramnegativen Bakterien.

2.8.1.1.03 **BHI-Agar mit Tellurit** (Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.01**

pH = 5,5 und 7,4

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Kaliumtellurit-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 2,0; 4,0 ml/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.1.1.04 BHI-Agar mit Supplementen und Tellurit (Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.01**

pH = 5,5 und 7,4

D22 Insect Medium (siehe 2.8.3.2)	10,0 g/l
Trehalose	6,0 g/l
L-Prolin	2,6 g/l
Glutamin	6,4 g/l

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Kaliumtellurit-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 2,0; 4,0 ml/l
Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.1.1.05 BHI-Agar mit Penicillin G (Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.01**

pH = 5,5 und 7,4

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Penicillin G-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 100,0 µl/l
Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Mikroorganismen. Penicillin G hemmt das Wachstum von grampositiven Bakterien.

2.8.1.1.06 BHI-Agar mit Penicillin G und Tellurit (Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.01**

pH = 5,5 und 7,4

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Penicillin G-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 100,0 µl/l
Kaliumtellurit-Stammlösung (siehe **2.8.3.3**) 2,0; 4,0 ml/l
Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen, tellurit-resistenten Bakterien.

2.8.1.1.07 Mac Conkey-Agar (ohne Salz) (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,4

Pepton	20,0 g/l
Lactose	10,0 g/l
Neutralrot	0,075 g/l
Gallensäuresalz	5,0 g/l
Agar	12,0 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Mikroorganismen.

2.8.1.1.08 Malachitgrün-Agar (Trockennährmedium) (Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Malachitgrün-Oxalat	0,03 g/l
Fleischextrakt	9,0 g/l
Fleischpepton	15,0 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,1 g/l
Agar	15,0 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.1.1.09 Pseudomonas-Isolations-Agar (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Kaliumsulfat	10,0 g/l
Magnesiumchlorid	1,0 g/l
Tiergewebe, peptisch	20,0 g/l
Triclosan (Irgasan)	0,025 g/l
Agar	13,6 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas* spp..

2.8.1.1.10 Pseudomonas-Isolations-Agar mit Penicillin G und Tellurit

(Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.13**

pH = 7,0

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Penicillin G-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	100,0 µl/l
Kaliumtellurit-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	2,0; 4,0 ml/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von tellurit-resistenten *Pseudomonas* spp.. Penicillin G soll ein mögliches Wachstum von grampositiven Bakterien unterdrücken.

2.8.1.1.11 Pseudomonas-Isolations-Agar mit CNA-Supplement**(Cetrimid-Nalidixinsäure-Agar-Supplement)** (Fluka, Deutschland)Grundrezept siehe **2.8.1.1.13**

pH = 7,0

CNA-Supplement: selektives Supplement für die Isolierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

Cetrimid	0,01 g/l
Nalidixinsäure	0,015 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.1.1.12 **Pseudomonas-Isolations-Agar mit CFC-Supplement**

(Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin Selektiv -Supplement)

(Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.13**

pH = 7,0

CFC-Supplement: Antibiotika-Supplement zur selektiven Isolierung von Pseudomonas spp..

Cetrimid 0,01 g/l

Fucidin 0,01 g/l

Cephaloridin 0,025 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von Pseudomonas Spezies.

2.8.1.2 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Fertignährböden

2.8.1.2.01 **Columbia-Agar mit 5% Schafblut** (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Natriumchlorid 5,0 g/l

Spezial-Nährsubstrat 23,0 g/l

Stärke 1,0 g/l

Agar 15,0 g/l

Schafblut, defibriniert 50,0 ml/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchslosen und anspruchsvollen Bakterien.

2.8.1.2.02 **Columbia-III-Agar mit 5% Schafblut** (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Casein, pankreatisch 10,0 g/l

Proteose-Pepton Nr. 3 5,0 g/l

Hefeextrakt 5,0 g/l

Rinderherz-Infusion aus 500 g 3,0 g/l

Stärke 1,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l

Agar 15,0 g/l

Schafblut, defibriniert 50,0 ml/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchslosen und anspruchsvollen Bakterien.

2.8.1.2.03 EMB-Agar (Eosin-Methylenblau-Agar) (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,1

Eosin Y	0,4 g/l
Methylenblau	0,065 g/l
Pepton	10,0 g/l
Lactose	10,0 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,0 g/l
Agar	15,0 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von gramnegativen Bakterien. Die beiden Farbstoffe Eosin Y und Methylenblau inhibieren dabei weitestgehend das Wachstum von grampositiven Mikroorganismen.

2.8.1.2.04 Herz-Infusion-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,4

Natriumchlorid	5,0 g/l
Rinderherz-Infusion aus 500 g	10,0 g/l
Tryptose	10,0 g/l
Agar	15,0 g/l
Schafblut, defibriert	50,0 ml/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von vielen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen.

2.8.1.2.05 Pseudosel-Agar (Cetrimid-Agar) (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,2

Gelatine, pankreatisch	20,0 g/l
Magnesiumchlorid	1,4 g/l
Kaliumsulfat	10,0 g/l
Cetrimid	0,3 g/l
Agar	13,6 g/l

Selektivmedium zur Isolierung und Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas* spp..

2.8.1.2.06 Schokoladenagar (Kochblutagar) (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,3

Caseinpepton	7,8 g/l
Fleischpepton	7,8 g/l
Hefeextrakt	2,8 g/l
Glucose	1,0 g/l

Natriumchlorid	5,6 g/l
Agar	15,0 g/l
Schafblut, defibriniert	70,0 ml/l
Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung anspruchsvoller grampositiver und gramnegativer Bakterien.	

2.8.1.3 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen

2.8.1.3.01 **Pepton-Salz-Agar** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Pepton aus Fleisch, peptisch	1,0 g/l
Natriumchlorid	8,5 g/l
Kaliumphosphat monobasisch	0,3 g/l
Natriumphosphat dibasisch Dodecahydrat	1,2 g/l
Agar	16,0 g/l
Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung anspruchsvoller Bakterien, das dem Verlust sehr empfindlicher Zellen beim Überimpfen vorbeugen soll.	

2.8.1.3.02 **Pseudomonas Indigofera Medium** (selbst abgewogen)

(<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000365.html>)

pH = 7,2

Hefeextrakt	10,0 g/l
Dextrose	5,0 g/l
Natriumacetat	0,5 g/l
Agar	12,0 g/l
Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von Pseudomonas spp..	

2.8.1.4 Verfestigte komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte

2.8.1.4.01 **Mehlkäferextrakt-Agar** (Eigenrezept)

pH = 7,2

Mehlkäfer-Extrakt (siehe 2.8.3.1)	300,0 ml
Agar	16,0 g/l
Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen, in Insekten lebenden Mikroorganismen.	

2.8.1.4.02 ***Paederus*-Extrakt 2-Agar** (Eigenrezept)

pH = 7,2

Paederus riparius-Extrakt (siehe **2.8.3.1**) 300,0 ml

Agar 16,0 g/l

Selektivmedium speziell zur Isolierung und Kultivierung des sehr anspruchsvollen, in *Paederus*-Käfern lebenden Endosymbionten.

2.8.1.4.03 **Pepton-Salz-Agar mit Suppline1/2/3** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.21**

pH = 7,0

Suppline1/2/3 siehe **2.8.3.1**

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung sehr anspruchsvoller, gramnegativer Bakterien.

2.8.1.4.04 **Pepton-Salz-Agar mit *Paederus*-Extrakt 1** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

Grundrezept siehe **2.8.1.1.21**

pH = 7,0

Paederus-Extrakt 1 (siehe **2.8.3.1**) 20,0 ml/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen, in *Paederus*-Kurzflüglern lebenden Mikroorganismen.

2.8.1.5 Verfestigte komplexe Nährböden für Anaerobier: Fertignährböden

2.8.1.5.01 **Brucella-Agar mit Hemin und Vitamin K1** (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,0

Casein, pankreatisch 10,0 g/l

Tiergewebe, peptisch 10,0 g/l

Hefeextrakt 2,0 g/l

Dextrose 1,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l

Natriumhydrogensulfid 0,1 g/l

Hemin 0,1 g/l

Vitamin K1 0,01 g/l

Agar 15,0 g/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anaeroben Bakterien.

2.8.1.5.02 Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,6

Casein, pankreatisch	8,2 g/l
Tiergewebe, peptisch	2,5 g/l
Sojamehl, papainisch	1,0 g/l
Dextrose	5,8 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Natriumchlorid	1,7 g/l
di-Kaliumphosphat	0,8 g/l
L-Cystin	0,4 g/l
Hemin	0,01 g/l
Tris-Aminomethan	3,0 g/l
Vitamin K1	0,01 g/l
Agar	13,5 g/l
Schafblut, defibriniert	50,0 ml/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen Anaerobiern.

2.8.1.5.03 Schaedler-KV-Agar mit 5% Schafblut (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,6

Casein, pankreatisch	8,2 g/l
Tiergewebe, peptisch	2,5 g/l
Sojamehl, papainisch	1,0 g/l
Dextrose	5,8 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Natriumchlorid	1,7 g/l
di-Kaliumphosphat	0,8 g/l
L-Cystin	0,4 g/l
Hemin	0,01 g/l
Tris-Aminomethan	3,0 g/l
Vitamin K1	0,01 g/l
Kanamycin	0,1 g/l
Vancomycin	0,0075 g/l
Agar	13,5 g/l
Schafblut, defibriniert	50,0 ml/l

Selektivmedium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen gramnegativen anaeroben Mikroorganismen.

2.8.1.5.04 **Wilkins Chalgren Anaerobier-Agar** (Fertignährboden)

(BD Diagnostics, Deutschland)

pH = 7,1

Casein, pankreatisch	10,0 g/l
Pepton S	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Dextrose	1,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
L-Arginin	1,0 g/l
Natrium-Pyruvat	1,0 g/l
Hemin	0,005 g/l
Vitamin K1	0,0005 g/l
Agar	10,0 g/l

Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung von anaeroben Bakterien.

2.8.1.6 Verfestigte synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen

2.8.1.6.01 **Glucose-Mineralsalz-Agar** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g/l
Glucose	10,0 g/l
Agar	15,0 g/l
Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	1,0 ml/l

Synthetisches Universalmedium für die Isolierung und Kultivierung einer Vielzahl von Bakterien, die keine Wachstumsfaktoren benötigen.

2.8.1.6.02 **VL 55-Agar** (selbst abgewogen)

(nach SANGWAN et al., 2004)

pH = 7,2

2-[N-morpholino]-Ethansulfonsäure	3,9 g/l
MgSO ₄	0,05 g/l
CaCl ₂	0,07 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,05 g/l
Glucose	1,5 g/l
Agar	15,0 g/l
Selenit-Wolframat-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	2,0 ml/l

Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	2,0 ml/l
autoklaviertes Medium auf 50-55°C abkühlen lassen, dann Zugabe von:	
Vitamin-Stammlösung 1 (siehe 2.8.3.3)	2,0 ml/l
Vitamin-Stammlösung 2 (siehe 2.8.3.3)	6,0 ml/l
Synthetisches Universalmedium zur Isolierung und Kultivierung sehr anspruchsvoller Mikroorganismen.	

2.8.2 Flüssige komplexe und synthetische (chemisch definierte) Nährmedien

2.8.2.1 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Trockennährmedien zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.1.01 **BHI-Bouillon (Hirn-Herz-Bouillon)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,4

Pepton	10,0 g/l
Kalbshirn (Infusion aus 200 g)	12,5 g/l
Rinderherz (Infusion aus 250 g)	5,0 g/l
Dextrose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g/l

Universal-Bouillon zur Anreicherung und Kultivierung von
anspruchsvollen Bakterien.

2.8.2.1.02 **BHI-Bouillon mit Tellurit**

(Fluka, Deutschland)

Grundrezept siehe **2.8.2.1.01**

pH = 7,4

autoklaviertes Medium auf 50-55°C abkühlen lassen,
dann Zugabe von:

Kaliumtellurit-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	2,0; 4,0 ml/l
--	---------------

Selektiv-Bouillon zur Anreicherung von tellurit-resistenten
Bakterien.

2.8.2.1.03 **Cetrimid-Bouillon (Pseudomonas-selektiv-Bouillon)** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,3

Gelatinpepton, pankreatisch	16,0 g/l
-----------------------------	----------

Casein-Hydrolysat	10,0 g/l
Kaliumsulfat	10,0 g/l
Magnesiumchlorid	1,4 g/l
Cetrimid	0,2 g/l
Selektiv-Bouillon zur Isolierung und Anreicherung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	

2.8.2.1.04 **Malachitgrün-Bouillon** (Trockennährmedium)

(Fluka, Deutschland)

pH = 7,0

Malachitgrün-Oxalat	0,03 g/l
Fleischextrakt	9,0 g/l
Fleischpepton	15,0 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,1 g/l

Selektiv-Bouillon zur Anreicherung und Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.2.2 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen

(zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.2.01 **Hefeextrakt-Pepton-Glucose-(HPG)-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Hefeextrakt	5,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Glucose	1,0 g/l

Universal-Bouillon zur Anreicherung anspruchsvoller Mikroorganismen.

2.8.2.2.02 **Nährbouillon** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Fleischextrakt	3,0 g/l

Universal-Bouillon zur Anreicherung nicht sehr anspruchsvoller Mikroorganismen.

2.8.2.2.03 **Pepton-Salz-Lösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

Pepton aus Fleisch, peptisch	1,0 g/l
Natriumchlorid	8,5 g/l

Kaliumphosphat monobasisch	0,3 g/l
Natriumphosphat dibasisch Dodecahydrat	1,2 g/l
Universal-Lösung zum Dispergieren und Verdünnen von Bakterien; mit sehr geringer Zellverlustrate.	

2.8.2.3 Flüssige komplexe Nährböden für Aerobier: Eigenrezepte

(zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.3.01 **Pepton-Salz-Lösung mit Suppline1/2/3** (Eigenrezept)

(nach BAST, 2001)

Grundrezept siehe **2.8.2.2.03**

pH = 7,0

Suppline1/2/3

siehe **2.8.3.1**

Selektiv-Lösung zur Anreicherung und Kultivierung sehr anspruchsvoller, gramnegativer Bakterien.

2.8.2.4 Flüssige synthetische Nährböden für Aerobier: selbst abgewogen

(zur Anreicherung und Verdünnung)

2.8.2.4.01 **Glucose-Mineralsalz-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach BAST, 2001)

pH = 7,0

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
---------------------------------	---------

NH ₄ Cl	1,0 g/l
--------------------	---------

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g/l
--	---------

FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01 g/l
--	----------

CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g/l
--	----------

Glucose	10,0 g/l
---------	----------

Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	1,0 ml/l
---	----------

Synthetische Nährlösung für die Anreicherung einer Vielzahl von Bakterien, die keine Wachstumsfaktoren benötigen.

2.8.2.4.02 **VL 55-Nährlösung** (selbst abgewogen)

(nach SANGWAN et al., 2004)

pH = 7,2

2-[N-morpholino]-Ethansulfonsäure	1,95 g/l
-----------------------------------	----------

MgSO ₄	0,025 g/l
-------------------	-----------

CaCl ₂	0,035 g/l
-------------------	-----------

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,025 g/l
--	-----------

Selenit-Wolframat-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	1,0 ml/l
---	----------

Spurenelement-Stammlösung (siehe 2.8.3.3)	1,0 ml/l
---	----------

autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen,

dann Zugabe von:

Vitamin-Stammlösung 1 (siehe 2.8.3.3)	1,0 ml/l
Vitamin-Stammlösung 2 (siehe 2.8.3.3)	3,0 ml/l

Synthetische Nährlösung zur Isolierung und Kultivierung von sehr anspruchsvollen Bakterien.

2.8.3 Medienzusätze und Stammlösungen

2.8.3.1 Komplexe und synthetische Medienzusätze: Eigenrezepte

2.8.3.1.01 **Mehlkäfer-Extrakt** (Eigenrezept)

Labormörser	
Mehlkäferlarven	100 Stück
Saline (0,85% w/v)	300,0 ml

Die Mehlkäferlarven wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Keramikmörser zu einem feinen Pulver zerrieben, welches in Saline mit einem Wirbelmischer resuspendiert wurde. Anschließend fand eine Zentrifugation der erhaltenen Suspension für 20 Minuten bei 13.000 Umdrehungen statt, um darin enthaltene Chitinpanzerreste, Fettrückstände und Bakterienzellen zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde sterilfiltriert.

2.8.3.1.02 ***Paederus*-Extrakt 1** (Eigenrezept)

Labormörser	
<i>Paederus riparius</i> -Weibchen	10 Stück
Saline (0,85% w/v)	10,0 ml

Selbe Vorgehensweise, wie unter **2.8.3.1.01** beschrieben.

2.8.3.1.03 ***Paederus*-Extrakt 2** (Eigenrezept)

Labormörser	
Abdomen von <i>Paederus riparius</i> -Weibchen	300 Stück
VE-Wasser	300,0 ml

Selbe Vorgehensweise, wie unter **2.8.3.1.01** beschrieben. Anstelle von Saline wurde hier VE-Wasser benutzt.

2.8.3.1.04 **Suppline 1: Zusatz für Pepton-Salz-Agar** (Eigenrezept)

Fleischextrakt	3,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch, peptisch	5,0 g/l

Pepton aus Casein, tryptisch	5,0 g/l
Brilliantgrün	0,02 g/l
Prolin-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	0,5 ml/l
Trehalose-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	6,0 ml/l
autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen, dann Zugabe von:	
Vitamin-Stammlösung 3 (1x) (siehe 2.8.3.4)	6,0 ml/l

2.8.3.1.05 **Suppline 2: Zusatz für Pepton-Salz-Agar** (Eigenrezept)

Fleischextrakt	5,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Pepton aus Fleisch, peptisch	7,5 g/l
Pepton aus Casein, tryptisch	10,0 g/l
Brilliantgrün	0,02 g/l
Prolin-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	1,0 ml/l
Trehalose-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	12,0 ml/l
autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen, dann Zugabe von:	
Vitamin-Stammlösung 3 (2,5x) (siehe 2.8.3.4)	6,0 ml/l

2.8.3.1.06 **Suppline 3: Zusatz für Pepton-Salz-Agar** (Eigenrezept)

Fleischextrakt	5,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Pepton aus Fleisch, peptisch	10,0 g/l
Pepton aus Casein, tryptisch	15,0 g/l
Brilliantgrün	0,02 g/l
Prolin-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	2,0 ml/l
Trehalose-Stammlösung (siehe 2.8.3.4)	20,0 ml/l
autoklaviertes Medium auf ca. 50-55°C abkühlen lassen, dann Zugabe von:	
Vitamin-Stammlösung 3 (5x) (siehe 2.8.3.4)	6,0 ml/l

2.8.3.2 Komplexe und synthetische Medienzusätze: Pulverzusätze

2.8.3.2.01 **D22 Insect Medium (synthetischer Zusatz)** (Pulver)

(United States Biological, USA)

Calciumchlorid	0,8 g/l
Magnesiumchlorid	0,421654 g/l
Magnesiumsulfat	1,641152 g/l
Natriumacetat	0,013868 g/l
Natriumphosphat, monobasisch	0,330769 g/l
Kalium-L-Glutaminsäure	4,975 g/l
Natrium-L-Glutaminsäure	7,98 g/l
Glycin	5,0 g/l

p-Aminobenzoesäure	0,02 mg/l
Biotin	0,01 mg/l
Cholinchlorid	0,2 mg/l
Folsäure	0,02 mg/l
myo-Inositol	0,02 mg/l
Nicotinsäure	0,02 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	0,02 mg/l
Pyridoxamin-Dihydrochlorid	0,02 mg/l
Riboflavin	0,02 mg/l
Thiamin-Dichlorid	0,02 mg/l
Glucose	1,8 g/l
Lactalbumin Hydrolysat	13,6 g/l
L-Äpfelsäure	0,6 g/l
di-Natriumsuccinat Hexahydrat	0,055 g/l
Hefeextrakt	1,36 g/l

2.8.3.3 Stammlösungen: selbst abgewogen

2.8.3.3.01 Kaliumtellurit-Stammlösung: 10 ml (100 mg/ml) (selbst abgewogen)

Endkonzentration im Medium

2,0 ml	200,0 µg/ml
4,0 ml	400,0 µg/ml

Selektive Hemmstofflösung, die das Wachstum von allen Bakterien, die im Gegensatz zum *Paederus*-Endosymbionten und einigen anderen Mikroorganismen kein Tellurit-Resistenzgen besitzen, hemmt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert.

2.8.3.3.02 Penicillin G-Stammlösung: 50 ml (10 mg/ml) (selbst abgewogen)

Endkonzentration im Medium

100 µl/l	1,0 µg/ml
----------	-----------

Selektive Hemmstofflösung, die das Wachstum von grampositiven Bakterien hemmt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert.

2.8.3.3.03 Selenit-Wolframat-Stammlösung (selbst abgewogen)

(nach WIDDEL, 1980)

NaOH	0,4 g/l
Na ₂ SeO ₃ * 5 H ₂ O	6,0 mg/l
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	8,0 mg/l

2.8.3.3.04 Spurenelementstammlösung (selbst abgewogen)

(nach TSCHECH und PFENNIG, 1984)

Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
Salzsäure, 25%	10 ml
FeCl ₂ * 4 H ₂ O	1,5 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ * 2 H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	36 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg

2.8.3.3.05 Vitamin-Stammlösung 1 (selbst abgewogen)

(nach PFENNIG, 1978)

Biotin	10,0 mg/l
Nikotinsäure	100,0 mg/l
Thiamin-Dichlorid	100,0 mg/l
p-Aminobenzoesäure	40,0 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	50,0 mg/l
Pyridoxamin-Dihydrochlorid	150,0 mg/l
Cyanocobalamin (Vit. B12)	50,0 mg/l

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

2.8.3.3.06 Vitamin-Stammlösung 2 (selbst abgewogen)

(nach BALCH et al, 1979)

DL-6, 8-Thioctinsäure	10,0 mg/l
Riboflavin	10,0 mg/l
Folsäure	10,0 mg/l

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

2.8.3.4 Stammlösungen: Eigenrezepte**2.8.3.4.01 Prolin-Stammlösung: 10 ml (50 mg/ml)** (Eigenrezept)

Endkonzentration im Medium	
Pepton-Salz-Agar (Suppline 1)	25,0 µg/ml
Pepton-Salz-Agar (Suppline 2)	50,0 µg/ml
Pepton-Salz-Agar (Suppline 3)	100,0 µg/ml

Die Prolinkonzentration zum Beispiel in der Hämolymphe von Schwarzkäfern (*Zophobas*) beträgt ca. 500 µg/ml (KAISER, 2002).

2.8.3.4.02 Trehalose-Stammlösung: 20 ml (0,5 g/ml) (Eigenrezept)

Endkonzentration im Medium

Pepton-Salz-Agar (Suppline 1) 3,0 mg/ml

Pepton-Salz-Agar (Suppline 2) 6,0 mg/ml

Pepton-Salz-Agar (Suppline 3) 10,0 mg/ml

Die Trehalosekonzentration zum Beispiel in der Hämolymphe von Tabakswärmern (*Manduca*) beträgt ca. 20 mg/ml (DETTNER und PETERS, 2003).

2.8.3.4.03 Vitamin-Stammlösung 3 (1x konzentriert) (Eigenrezept)

(PIEL, mündl. Mitt.)

Biotin 4,0 mg/l

Nicotinsäure 40,0 mg/l

Ca-D(+)-Pantothenat 10,0 mg/l

Ersten Genomanalysen zu Folge ist der *Paederus*-Endosymbiont nicht in der Lage, die drei aufgeführten Vitamine selbst zu synthetisieren. Um die Nährstoffanforderungen für den Symbionten möglichst genau zu treffen, wurde die Vitaminlösung in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

Die fertige Stammlösung wurde sterilfiltriert, da sich einige der enthaltenen Vitamine beim Autoklavieren zersetzen.

2.8.3.4.04 Vitamin-Stammlösung 3 (2,5x konzentriert) (Eigenrezept)

(PIEL, mündl. Mitt.)

Biotin 10,0 mg/l

Nicotinsäure 100,0 mg/l

Ca-D(+)-Pantothenat 25,0 mg/l

2.8.3.4.05 Vitamin-Stammlösung 3 (5x konzentriert) (Eigenrezept)

(PIEL, mündl. Mitt.)

Biotin 20,0 mg/l

Nicotinsäure 200,0 mg/l

Ca-D(+)-Pantothenat 50,0 mg/l

Anhang 2

2.10.7.5.01 Natriumphosphat-Stammlösungen

1 M NaH ₂ PO ₄	34,5 g auf 250 ml VE-Wasser
1 M Na ₂ HPO ₄	44,5 g auf 250 ml VE-Wasser
0,1 M Natriumphosphat-Puffer (NaPi), pH 7,4	22,6 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 77,4 ml 1 M Na ₂ HPO ₄

VE-Wasser ad 1000 ml; alle Puffer werden autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.10.7.5.02 3x Phosphate-buffered Saline (3x PBS)

NaCl	22,8 g
0,1 M NaPi, pH 7,4	300,0 ml

VE-Wasser ad 1000 ml; autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern; für 1x PBS (130 mM NaCl, 10 mM NaPi, pH 7,4): 3x PBS 1:3 verdünnen.

2.10.7.5.03 4% Paraformaldehydlösung (4% PFA)

2 g PFA in 30 ml VE-Wasser geben, unter Rühren auf 60°C erhitzen und mit einem Tropfen 2 N NaOH lösen.
16,6 ml 3x PBS zugeben; pH mit HCl auf 7,2 einstellen.
VE-Wasser ad 50 ml; sterilfiltrieren und im Dunkeln bei 4°C lagern; 2 Wochen haltbar.

2.10.7.5.04 1x PBS/96% Ethanol (PBS/EtOH)

je 25 ml 1x PBS und Ethanol (96%) in ein steriles 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen sterilfiltrieren.

2.10.7.5.05 1M Tris-HCl, pH 8,0

121,1 g Tris in 800 ml VE-Wasser lösen, 42 ml HCl konz. zugeben, abkühlen, pH einstellen.
VE-Wasser ad 1000 ml; autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

2.10.7.5.06 5M NaCl

292,2 g NaCl in 800 ml VE-Wasser lösen.
VE-Wasser ad 1000 ml; autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

2.10.7.5.07 **Formamid, deionisiert** (Sigma, Deutschland)

bei 4°C lagern; angebrochene Flasche rasch verbrauchen oder aliquotieren und bei -20°C lagern.

2.10.7.5.08 **steriles Wasser**

autoklaviertes, sterilfiltriertes Millipore-Wasser; aliquotieren.

2.10.7.5.09 **10% Natriumdodecylsulfat (10% SDS)**

50 g SDS (Elektrophorese-Qualität) in 450 ml VE-Wasser auf 68°C erhitzen und pH mit HCl konz. auf 7,2 einstellen.

VE-Wasser ad 500 ml; nicht sterilisieren; bei Raumtemperatur lagern.

2.10.7.5.10 **0,5 M EDTA**

18,6 g EDTA in 80 ml VE-Wasser durch Einstellen des pH auf 8,0 lösen (ca. 2 g NaOH-Pellets nötig!).

VE-Wasser ad 100 ml; nicht sterilisieren; autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

2.10.7.5.11 **4',6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)**

Stammlösung: 1 mg ml⁻¹

Arbeitslösung: 1 µg ml⁻¹

in lichtgeschützten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (mit Alufolie umwickelt) bei -20°C lagern.

2.10.7.5.12 **Hybridisierungspuffer und Waschpuffer**

Hybridisierungspuffer		Waschpuffer	
2 ml pro Formamidkonzentration ansetzen.		50 ml pro OT in Zentrifugen-Röhrchen ansetzen.	
5 M NaCl	360 µl	1 M Tris-HCl, pH 8,0	1 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,0	40 µl	5 M NaCl	0-9000 µl
Formamid, deionisiert	0-1600 µl	0,5 M EDTA	175-500 µl
Millipore- Wasser, autoklaviert	ad 2 ml	Millipore- Wasser, autoklaviert	ad 50 ml
10% SDS	2µl	10% SDS	2µl

2.10.7.5.13 Waschpuffer

Tris-HCl, pH 8,0 ; NaCl; EDTA; Millipore-Wasser; SDS

2.10.7.5.14 NaCl- und EDTA-Volumina im Waschpuffer

% Formamid im Hybridisierungspuffer	5 M NaCl [μl]	0,5 M EDTA [μl]
0 (0 μ l Formamid)	9000	-
10 (200 μ l Formamid)	4500	-
20 (400 μ l Formamid)	2150	500
30 (600 μ l Formamid)	1020	500
40 (800 μ l Formamid)	460	500
50 (1000 μ l Formamid)	180	500
60 (1200 μ l Formamid)	40	500
70 (1400 μ l Formamid)	-	350
80 (1600 μ l Formamid)	-	175

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Personen, die es mir ermöglicht haben, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tierökologie II in einer angenehmen Atmosphäre durchzuführen, insbesondere:

- Herrn Prof. Konrad Dettner für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung
- Herrn Prof. Jörn Piel für einige wichtige Hinweise in Bezug auf die Stoffwechselphysiologie des *Paederus*-Endosymbionten
- Herrn Dr. Dilip Gadkari für die Bereitstellung von *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* und *Escherichia coli*
- Herrn Dr. Marcus Horn für die überaus kompetente Hilfe bei der Konstruktion der endosymbionten-spezifischen Gensonde und seiner steten Diskussionsbereitschaft in mikrobiologischen und molekularen Belangen
- Herrn Dr. Oscar Valdes für die Hilfe bei der Herstellung von Käfer-Homogenisaten
- Frau Dr. Katja Hartig, ebenso wie den technischen Mitarbeiterinnen des Zentrallabors im Lehrstuhl für Pflanzensystematik für die Dokumentation von Agarosegelen
- Herrn Dr. Ulf-Joachim Vollmer (Zentrallabor Klinikum Kulmbach) für die Bereitstellung diverser mikrobiologischer Utensilien und eines Anaerobentopfes
- Frau Rita Grotjahn für die Erstellung zahlreicher elektronenmikroskopischer Aufnahmen
- Frau Andrea Kirpal für die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben und die Durchführung diverser Sequenzierreaktionen
- Dem Lehrstuhl für Tierökologie I für die Bereitstellung des Mikrotoms
- Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 678 für die interessanten Diskussionsbeiträge während der Seminare
- Sämtlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierökologie II für den regen wissenschaftlichen Gedankenaustausch und das hervorragende Arbeitsklima
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die die Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 678 finanziert hat

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meiner Freundin Heike Nowak für die zahlreichen Aufmunterungen und das sorgfältige Korrekturlesen während der Erstellung dieser Arbeit und für die jahrelange Unterstützung.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese oder eine gleichartige Doktorprüfung habe ich nicht an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Matthias Kador

Bayreuth, den 17.01.2008

