

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

**Die chemische Ökologie von Kurzflügelkäfern der Gattungen
Dianous und *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

ANDREAS SCHIERLING

aus Wunsiedel

Bayreuth, im März 2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2010 bis März 2013 am Lehrstuhl für Tierökologie II der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Konrad Dettner angefertigt.

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.).

Dissertation eingereicht am:	05.03.2013
Zulassung durch die Prüfungskommission:	07.03.2013
Wissenschaftliches Kolloquium:	30.07.2013

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. K. Dettner (Erstgutachter)

Prof. Dr. K. H. Hofmann (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Ch. Laforsch (Vorsitz)

Prof. Dr. K. Seifert

PD Dr. St. Geimer

INHALTSVERZEICHNIS

TEIL I - SYNOPSIS

1. Einführung.....	1
1.1 Chemische Verteidigung bei Arthropoden.....	1
1.2 Chemische Abwehr der Staphylinidae	2
1.3 Chemische Ökologie der Steninae	4
1.4 Zielsetzungen der Arbeit	6
2. Beschreibung der Teilprojekte.....	9
2.1 Morphologie und Ultrastruktur der Pygidialdrüsen der Steninae	9
2.1.1 Morphologie des Pygidialdrüsensystems von <i>S. comma</i> und <i>S. biguttatus</i>	10
2.1.2 Ultrastruktur der großen Reservoirs und des zugehörigen Drüsengewebes von <i>S. comma</i> und <i>S. biguttatus</i>	11
2.1.3 Ultrastruktur und Funktion der kleinen Reservoirs und des zugehörigen Drüsengewebes von <i>S. comma</i> und <i>S. biguttatus</i>	13
2.1.4 Morphologie des Pygidialdrüsensystems weiterer Steninae	16
2.2 Zusammensetzung der Pygidialdrüsensekrete verschiedener Steninae.....	17
2.3 Biologische Wirkung der Pygidialdrüsensekrete der Steninae	19
2.3.1 Fraßhemmende Wirkung der Pygidialdrüsensekrete	20
2.3.2 Antimikrobielle Wirkung der Pygidialdrüsensekrete.....	23
2.3.3 Einfluss der Konfiguration der chiralen Sekretkomponenten Stenusin und Norstenusin auf deren biologische Wirkung.....	26
2.4 Biosynthese der stickstoffhaltigen Sekretkomponenten.....	28
2.5 Evolution der Pygidialdrüsenysteme und -sekrete der Steninae.....	34
3. Zusammenfassung.....	38
4. Summary.....	40
5. Literaturverzeichnis.....	42

TEIL II - PUBLIKATIONEN

Publikationen und Publikationsmanuskripte..... 49

Darstellung des Eigenanteils 50

 Publ. I: The Pygidial Defense Gland System of the Steninae (Coleoptera,
 Staphylinidae): Morphology, Ultrastructure and Evolution..... 53

 Publ. II: The Multifunctional Pygidial Gland Secretion of the Steninae
 (Coleoptera: Staphylinidae): Ecological Significance and
 Evolution. 55

 Publ. III: Biosynthesis of the Defensive Alkaloid (Z)-3-(2-Methyl-1-
 butenyl)pyridine in *Stenus similis* Beetles. 57

 Publ. IV: Biosynthesis of the Defensive Alkaloid Cicindeloinine in *Stenus*
 solutus Beetles..... 59

Danksagung..... 61

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1	Typischer Staphylinidenhabitus und ausgewählte Abwehrverbindungen der Staphylinidae	3
Abb. 2	Bekannte Verbindungen aus den Pygidialdrüsen der Steninae	5
Abb. 3	Morphologie der Pygidialdrüsen der Steninae	10
Abb. 4	Morphologie und Ultrastruktur des Pygidialdrüsensystemteils R1/D1 von <i>Stenus comma</i> und <i>S. biguttatus</i>	12
Abb. 5	Morphologie und Ultrastruktur des Pygidialdrüsensystemteils R2/D2 von <i>Stenus comma</i> und <i>S. biguttatus</i>	15
Abb. 6	Abwandlungen und Reduktionen des Drüsensystems R2/D2 bei weiteren Steninen	16
Abb. 7	Massenspektren von Stenusin und den Dehydroverbindungen aus <i>S. scaber</i>	18
Abb. 8	<i>Two-Choice</i> -Biotests zur Ermittlung der Deterrentaktivität der synthetischen Drüsensekretkomponenten und -sekrete gegen die Ameise <i>Lasius flavus</i>	21
Abb. 9	<i>Two-Choice</i> -Biotests zur Ermittlung der Deterrentaktivität der synthetischen Drüsensekretkomponenten gegen den Fisch <i>Xiphophorus helleri</i>	23
Abb. 10	Einfluss der Konfiguration des Stenusins auf dessen biologische Wirkung	26
Abb. 11	Elektroantennogramm. Veränderung des Summenpotentials aller Rezeptoren in einer Antenne von <i>S. bimaculatus</i> nach Aufblasen von Stenusin	27
Abb. 12	Massenspektren von 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin aus dem Pygidialdrüsensekret von <i>S. similis</i> und Cicindeloin aus dem Sekret von <i>S. solutus</i> nach Verfüttern der markierten Aminosäuren L-[D ₉ , ¹⁵ N ₂]-Lysin und L-[D ₁₀ , ¹⁵ N]-Isoleucin	29
Abb. 13	Biosynthese der Hauptkomponenten-Alkaloide aus den Pygidialdrüsen der Steninae	30
Abb. 14	Massenspektren von Vorläufermetaboliten der Alkaloid-Biosynthese in den Pygidialdrüsen der Steninae	31
Abb. 15	Stereoselektive Biosynthese des Stenusins in <i>S. similis</i> und <i>S. bimaculatus</i>	33
Abb. 16	Möglicher Stammbaum der Steninae basierend auf der Verteilung der Abwehrverbindungen im Pygidialdrüsensekret	36
Tabelle 1	Quantitative Zusammensetzung der Pygidialdrüsensekrete ausgewählter Steninae	19
Tabelle 2	Agardiffusionstests zur Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivitäten der Sekretkomponenten	24

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bzw.	beziehungsweise
CI	chemische Ionisation
D1	R1 bandförmig aufgelagertes Drüsengewebe, Ort der Alkaloid-Biosynthese
D2	sekretorisch aktives Gewebe zu R2, Ort der Terpen-Biosynthese
EI	electron impact ionization, Elektronenstoßionisation
et al.	et alii/et alae („und andere“)
GC	Gaschromatograph bzw. Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatograph/Massenspektrometer-Kopplung
incl.	inklusive
M⁺	Molekülion
m1	Vorläufermetabolit 1 aus der Alkaloid-Biosynthese
m2	Vorläufermetabolit 2 aus der Alkaloid-Biosynthese
MS	Massenspektrometer bzw. Massenspektrum
m/z	Masse durch Ladungszahl
n.d.	nicht durchgeführt
Publ.	Publikation
R1	großes Pygidialdrüsenreservoir
R2	kleines Pygidialdrüsenreservoir an der Basis des Großen
s	Sekunde
TIC	Totalionenstromchromatogramm
u	Unit (Masseneinheit)
z.B.	zum Beispiel

Teil I

Synopsis

1. Einführung

1.1 Chemische Verteidigung bei Arthropoden

Prädation und Prädationsvermeidung sind wesentliche Elemente im Leben jedes Tieres, die sich in hohem Maße auf den Erfolg einer Art auswirken. Um dem Angriff eines Räubers oder Parasitoiden zu entgehen, haben sich im Tierreich mannigfaltige Mechanismen entwickelt, denen jedoch stets die gleichen Basisstrategien zugrunde liegen. An erster Stelle steht immer der Versuch eines potentiellen Beutetieres oder Wirtes sich der Wahrnehmung jeglicher Prädatoren zu entziehen, wodurch ein Verletzungsrisiko oder Energieverlust durch Interaktion mit einem Angreifer minimiert werden kann (LEDERHAUSE, 1990). Scheitern diese als primäre (passive) Abwehrmechanismen bezeichneten Tarnungsversuche, so kommt es zur Konfrontation zwischen Prädatator und Beute (ROBINSON, 1969; EDMUNDS, 1974, DETTNER, 2007). In diesem Fall kommen sekundäre (aktive) Abwehrmechanismen des Beutetieres, wie beispielsweise Flucht, oder als letztes Mittel der Gegenangriff zum Einsatz (SCHMIDT, 1990a). Neben dem plötzlichen Präsentieren von Schreckfärbung (deimatisches Verhalten), dem Totstellen (Thanatose), oder der mechanischen Feindabwehr, ist bei Arthropoden die aktive Verteidigung durch bioaktive Abwehrsekrete (Allomone) besonders weit verbreitet (SCHMIDT, 1990a; ROTH & EISNER, 1962; EISNER & MEINWALD, 1966; DETTNER, 2003, 2007). So kommen nach WHITMAN et al. (1990) in über der Hälfte aller terrestrischen Arthropodengattungen Peptide, Proteine oder niedermolekulare Verbindungen als Wehrstoffe zum Einsatz, welche Angreifer vertreiben oder durch toxische Wirkung massiv schädigen können (BLUM, 1981; DETTNER, 2003).

Im einfachsten Fall erfolgt eine chemische Abwehr durch Regurgitation des Kropfinhaltes oder durch Defäkation aus Enddarm oder Enddarmanhängen (EISNER & MEINWALD, 1966; WHITMAN et al., 1990; EISNER, 2003; DETTNER, 2003, 2007). Am weitesten verbreitet ist jedoch die Abgabe eines Abwehrsekrets aus exokrinen Wehrdrüsen. Diese bestehen in der Regel aus sekretorisch aktiven Geweben, welche die bioaktiven Verbindungen produzieren, assoziiert mit Reservoiren zur Sekretspeicherung. Die Sekretabgabe erfolgt über Ausführungsgänge, die die Reservoire mit der Körperoberfläche verbinden oder das Sekret spezialisierten Strukturen zur Sekretapplikation zuführen (ROTH & EISNER, 1962; SCHMIDT, 1990b; EISNER, 2003; DETTNER, 2003, 2007). Bei Reizung kann abgegebenes Wehrsekret passiv über die eigene Körperoberfläche fließen, aktiv auf Angreifer aufgetragen, auf Distanz versprüht oder injiziert werden (EISNER & MEINWALD, 1966; SCHMIDT 1990b; WHITMAN et al., 1990; EISNER, 2003; DETTNER, 2003, 2007).

Als eine weitere Form der chemischen Verteidigung kann das Anreichern von Abwehrverbindungen im Körperinneren der Arthropoden angeführt werden (HAPP & EISNER, 1961; CARREL & EISNER, 1974; WHITMAN et al., 1990; EISNER et al., 2005; DETTNER, 2003, 2007). Die Wirkstoffe können hierbei über die Nahrung (Pflanzen, Tiere) aufgenommen, von den Arthropoden *de novo* synthetisiert oder von symbiontischen Bakterien produziert werden (DETTNER, 2003, 2007). Durch das Verteilen der Wirkstoffe in zahlreichen Kompartimenten des Arthropoden-Körpers wird ein Transfer auf weitere Entwicklungsstadien ermöglicht, wodurch auch unbewegliche (Eier) oder nur teilweise bewegliche Stadien (Puppen) effektiv geschützt werden können (DETTNER, 2003). Über eine Abwehrwirkung nach Verletzen des Tieres hinaus kann die toxische Hämolymphe bei Gefahr auch aktiv durch Reflexbluten nach außen abgegeben werden (HAPP & EISNER, 1961; CARREL & EISNER, 1974; WHITMAN et al., 1990; EISNER, 2003; DETTNER, 2003, 2007). Eine Eigenschädigung der Tiere durch in exokrinen Drüsen produzierte Wehrsekrete kann mittels einer Isolation der aktiven Verbindungen in spezialisierten Strukturen relativ einfach verhindert werden. Der Einsatz von Hämolympfgiften hingegen bedarf in der Regel komplexen Anpassungen und Entgiftungsstrategien, da die toxischen Verbindungen sich mehr oder weniger frei im Körper befinden. Hierzu werden die aktiven Substanzen meist als chemisch inaktivierte Form in der Hämolymphe gelagert und erst kurz vor Kontakt mit einem Angreifer aktiviert. Somit kann der Titer an freiem, toxischen Wirkstoff stets auf einem niedrigen Niveau gehalten werden (TOPPEL et al., 1988; DETTNER, 1997).

1.2 Chemische Abwehr der Staphylinidae

Vertreter der Familie der Staphylinidae (Kurzflügelkäfer) weisen einen einzigartigen Körperbau auf, der deutlich vom typischen Habitus der Coleoptera abweicht. Die Käfer sind schlank gebaut und besitzen meist deutlich reduzierte Elytren, die lediglich die Basis des Abdomens bedecken (DETTNER, 1991, 1993; DETTNER et al., 1985; EISNER et al., 2005) (Abb. 1). Die verkürzten Elytren und ein Aufbau des Abdomens aus teleskopartig ineinander verschiebbaren, ringförmigen Segmenten, verleiht den Tieren eine enorme Beweglichkeit, wodurch Habitate in Lückensystemen wie in Genist, unter der Rinde abgestorbener Bäume oder in Fruchtkörpern von Pilzen erschlossen werden können (DETTNER, 1991, 1993). Da die Elytren der Kurzflügelkäfer mit ihrer Reduktion jedoch auch ihre Funktion als schützende Bedeckung des empfindlichen Abdomens verlieren, sind die Käfer deutlich anfälliger gegen Angriffe jeglicher Art. Um diesen Gefahren zu entgehen, haben die Staphylinidae zahlreiche

abdominale Wehrdrüsen entwickelt, deren hochwirksame Abwehrsekrete zur Verteidigung gegen Prädatoren, Parasiten und Mikroorganismen eingesetzt werden können (ARAUJO, 1978; DETTNER, 1991, 1993; EISNER et al., 2005) (Abb. 1).

Die Wehrdrüsen der Staphylinidae weisen sowohl morphologisch, als auch chemisch eine hohe Diversität auf (ARAUJO, 1978; DETTNER, 1983). Grundsätzlich sind sowohl unpaar (Aleocharinae, Paederinae), als auch paarig (Oxytelinae, Xantholininae, Steninae) ausgebildete Drüsensysteme verbreitet (DETTNER, 1993). Stets vorhanden sind Reservoirs mit entweder aufgelagertem (Staphylininae, Aleocharinae, Steninae) oder vom Reservoir separierten (Oxytelinae, Aleocharinae) Drüsengewebe (SHOWER & KISTNER, 1977; STEIDLE & DETTNER, 1993; DETTNER, 1993). Je nach betrachteter Unterfamilie können sich die Abwehrdrüsen und deren Öffnungen nach außen an verschiedenen Positionen des Abdomens befinden (SHOWER & KISTNER, 1977; DETTNER, 1991, 1993).

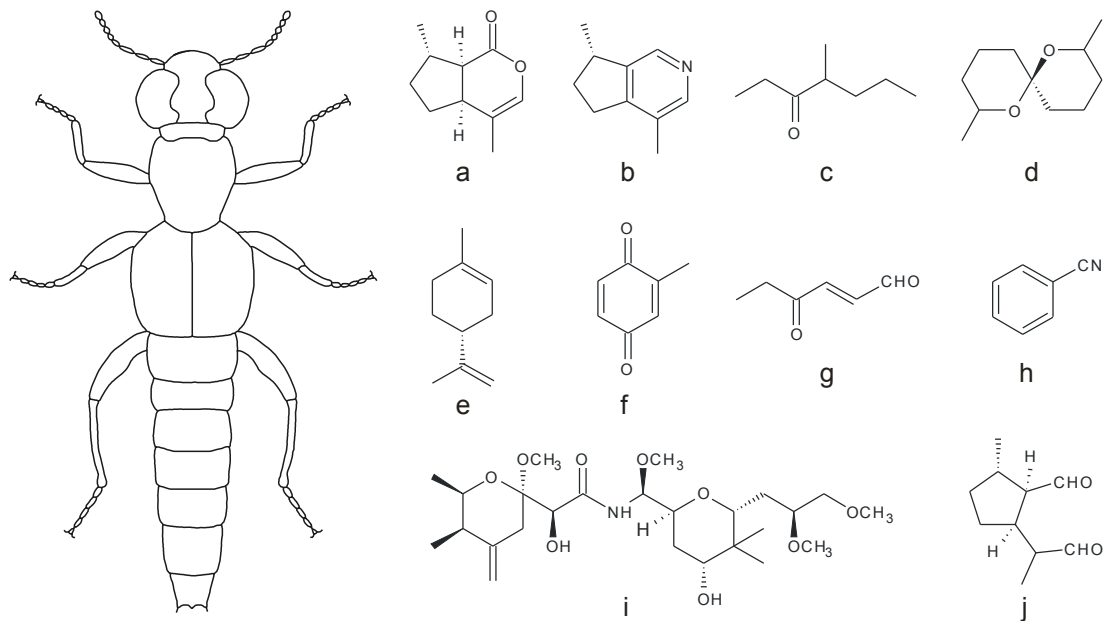


Abb. 1 Typischer Staphylinidenhabitus (*links*) und ausgewählte Abwehrverbindungen der Staphylinidae (*rechts*). **a** Nepetalacton, **b** Actinidin, **c** 4-Methyl-3-heptanon, **d** (*E,E*)-2,8-Dimethyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan, **e** Limonen, **f** p-Toluchinon, **g** 4-Oxo-2-hexenal, **h** Cyanobenzol, **i** Pederin, **j** Iridodial (PAVAN, 1975; JEFSON et al., 1983; DETTNER, 1983, 1991, 1993; DETTNER & SCHWINGER, 1982, 1986; DETTNER et al., 1985; HUTH & DETTNER, 1990; DETTNER & REISSENWEBER, 1991).

Hinsichtlich der Wirkstofftypen in den Abwehrsekreten lassen sich innerhalb der Staphylinidae eine Terpen-Gruppe, eine Chinon-Gruppe und eine Gruppe mit variabler Drüsenchemie unterscheiden (DETTNER, 1991, 1993). Vertreter der Terpen-Gruppe zeichnen sich vor allem durch Actinidin (Philonthina) oder durch Iridoide, Ketone, Spiroverbindungen und Monoterpene (Staphylinina, diverse Xantholininae) als Hauptkomponenten aus

(Abb. 1, a-e), während in der Chinon-Gruppe (Oxytelinae, Aleocharinae) primär in artspezifischen Formulierungsverbindungen gelöste Chinonderivate als Wirkstoffe vorliegen (Abb. 1, f) (JEFSON et al., 1983; DETTNER, 1983, 1991; DETTNER & SCHWINGER, 1986; HUTH & DETTNER, 1990; FRANCKE & DETTNER, 2005). In der Gruppe mit variabler Drüsenchemie (Omaliinae, Proteininae, Steninae) werden diverse Carbonsäuren, Aldehyde, Ketone, Ester, Terpene sowie Alkaloide und verschiedenste aromatische Verbindungen synthetisiert (Abb. 1, g, h) (DETTNER, 1991, 1993). Neben bei Bedrohung aktiv abgegebenen Sekreten treten bei einigen Arten auch in der Hämolymphe gespeicherte komplexe Verbindungen wie das hochtoxische Polyketid Pederin (Paederinae) auf (Abb. 1, i) (PAVAN, 1975). Die toxischen Abwehrverbindungen werden teilweise zusätzlich durch Klebstoffe, wie den an der Luft polymerisierenden Dialdehyd Iridodial (*Deleaster* spp.), unterstützt (Abb. 1, j) (DETTNER et al., 1985).

1.3 Chemische Ökologie der Steninae

Der evolutionäre Erfolg des Staphyliniden-Modells zeigt sich neben der kosmopolitischen Verbreitung der Kurzflügler auch in den enormen Artenzahlen innerhalb der Familie sowie in einigen Gattungen der Staphylinidae (GREBENNIKOV & NEWTON, 2009). So zählt beispielsweise die Kurzflügler-Gattung *Stenus* LATREILLE, 1797 mit weltweit 2470 bekannten Arten zu den artenreichsten Gattungen im gesamten Tierreich (PUTHZ, 2012). Vertreter dieser Gattung leben meist an Ufern von Gewässern, in Gärten oder in der Vegetation von Feuchtwiesen, Sümpfen und Mooren, wo sie sich räuberisch von Collembola und anderen Kleininsekten ernähren (KOCH, 1989; BETZ, 1998). Wenige Arten sind auch an trockenen Standorten, oder in Ameisennestern zu finden (PUTHZ, 2012). Als typische Staphylinidae sind die der Unterfamilie der Steninae zuzuordnenden Schwestergattungen *Stenus* und *Dianous* LEACH, 1819 zur chemischen Verteidigung gegen angreifende Organismen befähigt. Die Abwehrsekrete der Steninae werden in einem paarig angelegten Pygidialdrüsen-system produziert und gespeichert, das sich in der Abdominalspitze der Käfer befindet (JENKINS, 1957). Bei Gefahr können basale Bereiche der Reservoir-Ausführgänge ausgestülpt und Angreifer durch Krümmung des Abdomens mit abgegebenem Wehrsekret benetzt werden (JENKINS, 1957; NEUMANN, 1993).

Die im Pygidialdrüsen-system der Steninae gebildeten Verbindungen wurden bereits durch einige Arbeitsgruppen analysiert und sind heute weitgehend bekannt (Abb. 2). So konnten die Piperidin-Alkaloide Stenusin und Norstenusin sowie bei einigen Arten das Pyridin-Alkaloid

3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und das Epoxypiperidein-Alkaloid Cicindeloin als Hauptkomponenten nachgewiesen werden (SCHILDKNECHT et al., 1975; KOHLER, 1979; LUSEBRINK et al., 2009; MÜLLER et al., 2012) (Abb. 2). In geringeren Mengen sind zum Teil auch Variationen der Hauptkomponenten wie teilweise dehydrierte Stenusin- und Norstenusinderivate oder 3-(2-Methyl-1-propenyl)-pyridin bekannt (LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2009). Als weitere Komponenten sind die Monoterpene 1,8-Cineol, α -Pinen, Isopiperitenol und 6-Methyl-5-hepten-2-on nachgewiesen (SCHILDKNECHT, 1970; NEUMANN, 1993) (Abb. 2). Sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der Sekrete im Pygidialdrüsenystem der Steninae variiert je nach Art und kann für chemotaxonomische Zwecke herangezogen werden (LUSEBRINK, 2007).

Während die Biosynthese der Terpen-Komponenten im Abwehrsekret der Steninae vermutlich aus Isopreneinheiten des Mevalonat-Stoffwechsels erfolgt, ist das weit verbreitete Abwehr-Alkaloid Stenusin auf die Aminosäurevorstufen L-Lysin und L-Isoleucin zurückzuführen (MORGAN, 2004; LUSEBRINK et al., 2008a). Die deutlich erkennbaren Übereinstimmungen in der Molekülstruktur des Stenusins und der weiteren Alkaloid-Komponenten des Abwehrsekrets lassen eine Biosynthese aller Alkaloide ähnlich zu der des Stenusins vermuten (Abb. 2). Ein experimenteller Nachweis dieser Hypothese steht allerdings noch aus.

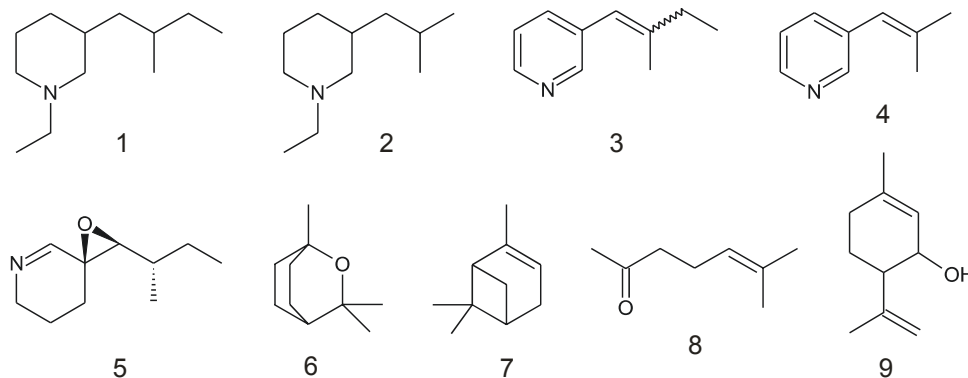


Abb. 2 Bekannte Verbindungen aus den Pygidialdrüsen der Steninae. **1** Stenusin, **2** Norstenusin, **3** 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, **4** 3-(2-Methyl-1-propenyl)-pyridin, **5** (2S,3S,1'S)-Cicindeloin, **6** 1,8-Cineol, **7** α -Pinen, **8** 6-Methyl-5-hepten-2-on, **9** Isopiperitenol (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1975; KOHLER, 1979; NEUMANN, 1993; LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2009; MÜLLER et al., 2012).

Das Pygidialdrüsensekret der Steninae weist eine starke biologische Aktivität sowie Funktionalität auf und wird von den Tieren auf verschiedene Art und Weise genutzt. Durch ein hohes Potential einiger Verbindungen als *Feeding Deterrent* kann das Sekret als effektive Verteidigungswaffe gegen potentielle Prädatoren eingesetzt werden (CONNERT, 1974;

NEUMANN, 1993; LUSEBRINK et al., 2009). Weiterhin wird das Sekret mit den Hinterbeinen an der Abdominalspitze abgenommen und durch „*Secretion Grooming*“ („Sekretputzen“, KOVAC & MASCHWITZ, 1989) auf der Körperoberfläche verteilt, wo es dank seiner antimikrobiellen Eigenschaften den Käfer vor Infektionen durch Mikroorganismen schützt (BETZ, 1999; LUSEBRINK, 2007, LUSEBRINK et al., 2008b). Das wohl spektakulärste Einsatzgebiet der Pygidialdrüsensekrete der Steninae ist die Fortbewegung der Käfer auf der Wasseroberfläche durch Abgabe kleiner Sekretmengen, welche bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von PIFFARD (1901) sowie BILLARD & BRUYANT (1905) beschrieben wurde. Mit ihren hydrophoben Tarsenunterseiten sind die Steninae in der Lage, sich auf der Oberfläche von Gewässern zu bewegen. Beim so genannten „Spreitungsschwimmen“ berührt der Käfer mit seinen an der Abdominalspitze ausgestülpten Pygidialdrüsen die Wasseroberfläche und gibt einen kleinen Sekrettopfen ab (LINSENMAIR, 1963; LINSENMAIR & JANDER, 1963; SCHILDKNECHT, 1970). Die nahezu wasserunlöslichen Sekretkomponenten spreiten auf der Wasseroberfläche augenblicklich auseinander und bilden einen sich rasch ausdehnenden, monomolekularen Film, an dessen Rand der Käfer vorangetrieben wird (SCHILDKNECHT, 1970; DETTNER, 1991; LANG et al., 2012). Bei kontinuierlicher Sekretabgabe können die Tiere so beeindruckende Geschwindigkeiten von über 40 cm/s erreichen und durch Krümmung des Abdomens aktiv ihre Bewegungsrichtung steuern (SCHILDKNECHT, 1976, SCHILDKNECHT et al., 1976, LANG et al. 2012). Das Phänomen des Spreitungsschwimmens auf der Wasseroberfläche ist außerhalb der Steninae nur bei semiaquatischen Wanzen der Gattungen *Velia*, *Microvelia* und *Rhagivelia* (Heteroptera, Gerromorpha) bekannt, wobei hier keine abdominal produzierten Sekrete zum Einsatz kommen, sondern spreitungsaktive Verbindungen im Speicheldrüsensekret über das Rostrum nach hinten abgegeben werden (LINSENMAIR & JANDER, 1963; ANDERSEN, 1976).

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Die vorliegende Dissertationsschrift beschäftigt sich mit der chemischen Ökologie der Steninae. Vor allem für defensive Verhaltensweisen ist diesbezüglich das Pygidialdrüsensystem von zentraler Bedeutung, dessen Sekret von den Tieren sowohl zur Abwehr diverser Organismen, als auch zur Fortbewegung auf der Wasseroberfläche eingesetzt werden kann. Obwohl bereits einige Arbeiten über die Pygidialdrüsen und Wehrsekrete ausgewählter Vertreter der Steninae veröffentlicht wurden, sind nur wenige Daten bezüglich biologischer Wirkung und Biosynthese der Verbindungen aus dem

Drüsensekret sowie der Ultrastruktur und Funktionsmorphologie des Steninen-Pygialdrüsensystems selbst vorhanden. Weiterhin erfolgte bisher keine Analyse der Drüsenmorphologie und Sekretzusammensetzung hinsichtlich potentiell phylogenetisch relevanter, artspezifischer Merkmale. Basierend auf den bislang publizierten Erkenntnissen über das Pygialdrüsensystem der Steninae und dessen Sekretionsprodukte wurden als Grundlage für die vorliegende Arbeit folgende Hypothesen formuliert:

1. Innerhalb der Steninae existieren phylogenetisch relevante, artspezifische Unterschiede bezüglich Morphologie, Ultrastruktur und Funktionsmorphologie der Pygialdrüsen.
 - licht-, transmissionselektronen- und rasterelektronenmikroskopische Analyse des Pygialdrüsensystems ausgewählter Steninae zur Ermittlung von Morphologie, Ultrastruktur und Funktion des Drüsensystems
 - vergleichende Analyse der Pygialdrüsenmorphologie ausgewählter Arten aus der Gruppe der Steninae
2. Im Pygialdrüsensekret der Steninae sind neben den bislang bekannten Verbindungen weitere Komponenten vorhanden.
 - GC/MS-Analyse der Pygialdrüsensekrete diverser Steninae
3. Die multifunktionale Wirksamkeit des Pygialdrüsensekrets der Steninae ist auf die spezifische Aktivität der Einzelkomponenten oder deren Mischungen gegen verschiedene Zielorganismen zurückzuführen.
 - Analyse der biologischen Wirkung bekannter Sekretkomponenten gegen unterschiedliche Organismengruppen
4. Die Biosynthese aller stickstoffhaltigen Komponenten im Pygialdrüsensekret der Steninae folgt dem in LUSEBRINK et al. (2008a) für Stenusin vorgeschlagenen Mechanismus über identische Vorläufermetaboliten.
 - Fütterung von deuterierten Alkaloid-Vorstufen an ausgewählte *Stenus*-Arten
 - GC/MS-Analyse der Pygialdrüsensekrete hinsichtlich des Einbaus der Deuterium-Markierung in die Sekret-Alkaloide

5. Innerhalb der Steninae sind Trends bezüglich der Evolution des Pygidialdrüsen-systems und dessen Sekrets erkennbar.

→ vergleichende Analyse der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Sekrete diverser Steninae

→ Vergleich der Sekretzusammensetzung mit der Drüsenmorphologie der untersuchten Steninae und bereits publizierten phylogenetischen Literaturdaten

2. Beschreibung der Teilprojekte

In der vorliegenden Arbeit wurde die Chemische Ökologie der Steninae sowie das hierbei besonders relevante Pygidialwehrdrüsensystem der Käfer untersucht. Neben der qualitativen und quantitativen Analyse flüchtiger und verhaltensmodifizierender Verbindungen im Pygidialdrüsensekret erfolgte eine Untersuchung der biologischen Wirkung einzelner Sekretkomponenten und der Gesamtsekrete auf Wirbeltiere, Insekten und Mikroorganismen. Weiterhin wurde die Biosynthese der Sekret-Alkaloide aufgeklärt und eine biogenetische Verwandtschaft der Alkaloid-Komponenten ermittelt. Darüber hinaus erfolgte eine detaillierte Betrachtung der Ultrastruktur und Funktionsweise des Pygidialdrüsensystems und potentieller Evolutionstrends in Drüsenmorphologie und Wehrsekret-Zusammensetzung.

Die durchgeführten Arbeiten der einzelnen Teilprojekte sind im folgenden Abschnitt im Detail dargestellt. Die Links zu den vollständigen Publikationen sind in Teil II angefügt.

2.1 Morphologie und Ultrastruktur der Pygidialdrüsen der Steninae

Bereits 1957 beschäftigte sich M. F. JENKINS mit der Morphologie der Pygidialdrüsen der Steninae anhand von *Dianous coerulescens* GYLLENHAL, 1810 und *Stenus comma* LÉCONTE, 1863. In seiner Arbeit berichtet er von paarigen Drüsenreservoirien mit bandförmig aufgelagertem sekretorisch aktivem Gewebe. In weiteren Arbeiten wurden später für *S. comma* und *S. biguttatus* LINNÉ, 1758 zusätzliche, kleinere Reservoirie grobmorphologisch beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Chemie von den großen unterschieden (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1976; DETTNER, 1993; LUSEBRINK, 2007). Der Ort der Biosynthese der Verbindungen in den zusätzlichen Reservoirien konnte allerdings in bisherigen Analysen noch nicht geklärt werden.

Da das Pygidialdrüsensystem bei den Arten *S. comma* und *S. biguttatus* ohne jegliche Reduktion und in all seinen Einzelstrukturen funktionell quasi als Grundbauplan vorliegt, wird die Morphologie und Ultrastruktur der Drüsen und Reservoirie zunächst ausführlich und erstmals für diese beiden Arten beschrieben. Im Anschluss daran werden die Modifikationen des Drüsensystems bei weiteren Steninae erläutert.

2.1.1 Morphologie des Pygidialdrüsen systems von *S. comma* und *S. biguttatus*

Das Pygidialdrüsen system der Arten *S. comma* und *S. biguttatus* ist morphologisch weitgehend identisch ausgebildet. Es erstreckt sich dorsal der Geschlechtsorgane und lateral des Darmes über die letzten drei bis vier Abdominalsegmente (JENKINS, 1957). Das Drüsen system besteht aus zwei großen Reservoiren (R1), denen das zugehörige sekretorische Gewebe (D1) in einer Einfaltung der Reservoirwand bandförmig aufgelagert ist. Die Ausführgänge der großen Reservoirre münden in verbreiterte Membranstrukturen, die zur Sekretabgabe an der Abdominalspitze lateral des Afters ausgestülpt werden können (JENKINS, 1957) (Abb. 3). An der Basis der Ausführgänge von R1 befindet sich je ein weiteres, kleineres Reservoir (R2), das nicht von D1 befüllt wird (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1976). Das bisher unbekannte, zu R2 gehörige Drüsengewebe (D2) befindet sich als „blumenkohlartig“ strukturiertes Gebilde gegenüber der Mündung von R2 und umschließt dort den Ausführungsgang von R1 (Abb. 3).

Die ausstülpbaren Membranbereiche können durch Erhöhung des Hämolymphdrucks nach außen gedrückt werden. Die Retraktion erfolgt über mehrere Muskelgruppen, die zentral zwischen den beiden Ausführgängen und im Bereich der Mündung von R2 ansetzen (JENKINS, 1957).

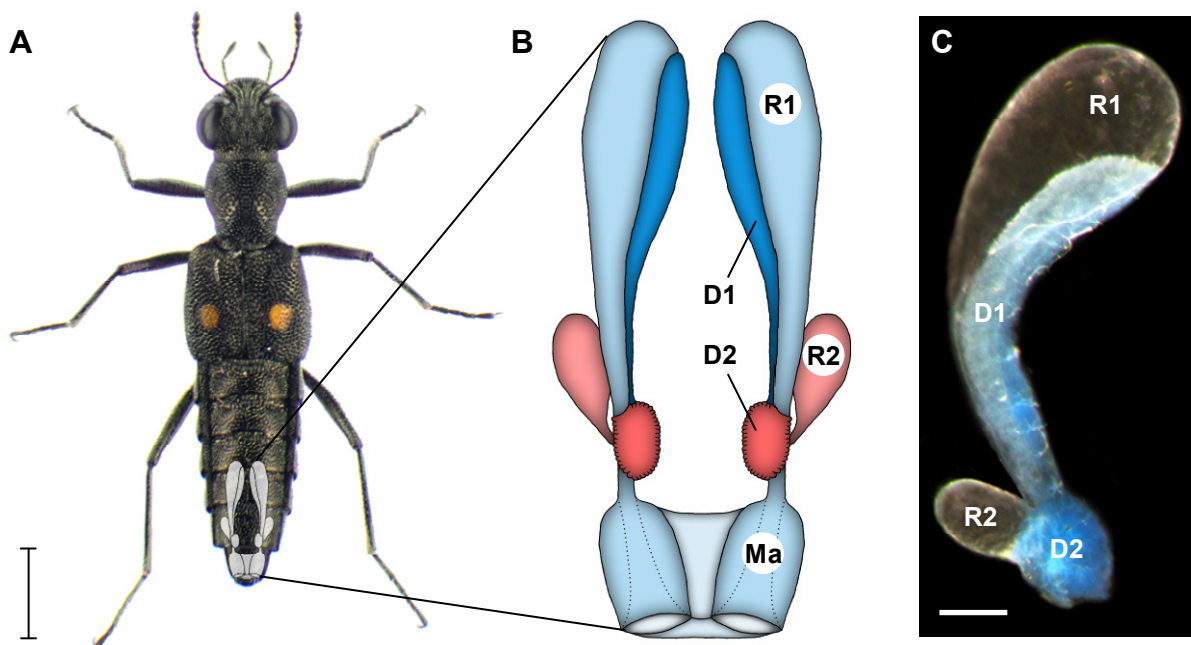


Abb. 3 Morphologie der Pygidialdrüsen der Steninae. (A) *S. comma* mit in natürlicher Lage eingezeichneten Pygidialdrüsen. (B) Schematische Übersichtsdarstellung des Pygidialdrüsen systems von *S. comma* und *S. biguttatus*. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hälfte des Pygidialdrüsen systems von *S. comma* nach Vitalfärbung mit Methyleneblau.

R1 große Drüsenreservoirre, **D1** bandförmiges, auf R1 aufgelagertes Drüsengewebe, **R2** kleine Drüsenreservoirre, **D2** sekretorisches Gewebe zu R2, **Ma** ausstülpbare Membranbereiche der Reservoir-Ausführungsgänge. Messbalken: (A) 1 mm, (C) 200 μ m.

2.1.2 Ultrastruktur der großen Reservoirs und des zugehörigen Drüsengewebes von *S. comma* und *S. biguttatus*

Die großen Reservoirs R1 des Pygidialdrüsen Systems werden nach Öffnen des Abdomens von *S. comma* oder *S. biguttatus* als durchsichtige, flüssigkeitsgefüllte Blasen mit einer Länge von 1,3-1,5 mm sichtbar. In einer seitlichen Einfaltung der Reservoirwand liegen die etwa 1,2 mm langen zugehörigen sekretorischen Gewebe D1 (Abb. 3, 4A), die alle Alkaloid-Komponenten des Pygidialdrüsensekrets produzieren (SCHILDKNECHT et al., 1975; KOHLER, 1979; LUSEBRINK et al., 2009; MÜLLER et al., 2012). Entfernt man die Weichteile eines präparierten Drüsen Systems durch Mazeration in 10 % KOH (20 min, 90 °C), so bleiben im Bereich von D1 tubuläre Strukturen mit einer Länge von etwa 21 μm und einem Durchmesser von 0,3-0,7 μm zurück (Publ. I, Abb. 3A, B). Hierbei handelt es sich um cuticuläre Kanäle, die die im Drüsengewebe produzierten Sekrete aufnehmen und ins Reservoir R1 leiten (Abb. 4A, B). Die Kanäle lassen sich in einen fadenförmigen distalen und einen dickeren proximalen Abschnitt unterteilen (Abb. 4B). Betrachtet man Querschnitte durch das Gewebe von D1 im Transmissionselektronenmikroskop, so wird ersichtlich, dass der distale Kanalbereich im intakten Gewebe von einer lang gestreckten Drüsenzelle umgeben ist und eine ca. 50 nm dicke, poröse Wandung aus epicuticulärem Material aufweist (QUENNEDEY, 1998) (Abb. 4B, C). Die Drüsenzelle bildet um den Kanal eine extrazelluläre Höhle, deren Lumen durch eine Zellmembran vom Zellplasma getrennt ist. Über zahlreiche Mikrovilli kann von der Drüsenzelle produziertes Sekretmaterial durch Exocytose aus intrazellulären Vesikeln in den zentralen Extrazellulärraum abgegeben werden, wo es durch die poröse Epicuticula ins Innere des Kanals gelangt und zum Reservoir R1 geleitet wird. In Dünnschnitten ist eine um den Tubulus akkumulierende Masse sichtbar, welche nach HAPP et al. (1966) bei Terpenproduzierenden Phasmiden-Wehrdrüsen als Sekret oder Sekretvorstufe zu interpretieren ist (Abb. 4C; Publ. I, Abb. 3C, D). Die zur Synthese der Sekretkomponenten nötige Energie wird offensichtlich durch eine Vielzahl von Mitochondrien bereitgestellt, welche sowohl um die extrazelluläre Höhle als auch innerhalb der Mikrovilli angeordnet sind (Abb. 4B, C).

Der proximale Teil der Tubuli stellt eine sekretableitende Verbindung zwischen der Drüsenzelle und dem Reservoir R1 her und endet in einer Pore in der Reservoirmembran. Diese Tubulusregion befindet sich innerhalb einer lang gestreckten Kanalzelle, die die Drüsenzelle penetriert und meist komplett von dieser umgeben ist (Abb. 4B). Da ein Austritt der bioaktiven Abwehrverbindungen aus dem Kanal in das Cytoplasma fatale Folgen für die umliegenden Zellen und Gewebe hätte, liegt hier eine 150-200 nm starke, epicuticuläre Wandung des Tubulus vor, die zusätzlich mit einer etwa 10 nm dicken Cuticulin-Auskleidung

verstärkt ist (QUENNEDEY, 1998). Die Verbindung zwischen Kanal- und Drüsenzelle wird mittels *septate junctions* hergestellt. Bei dieser Form der Zell-Zell-Verknüpfung sind die beteiligten Zellen von Proteingürteln umgeben, welche über leiterförmig angeordnete Proteinbrücken („Septen“) verknüpft werden (LANE, 1982; Publ. I, Abb. 3E). Auch in der Kanalzelle liegt der Tubulus nicht frei im Zellplasma, sondern ist in einem schmalen Extrazellulärraum im Inneren der Zelle lokalisiert. Da die Kanalzelle keine sekretorische Aktivität aufweist, beinhaltet sie keine Mikrovilli und ist neben einem Zellkern und wenigen Mitochondrien generell arm an Zellstrukturen.

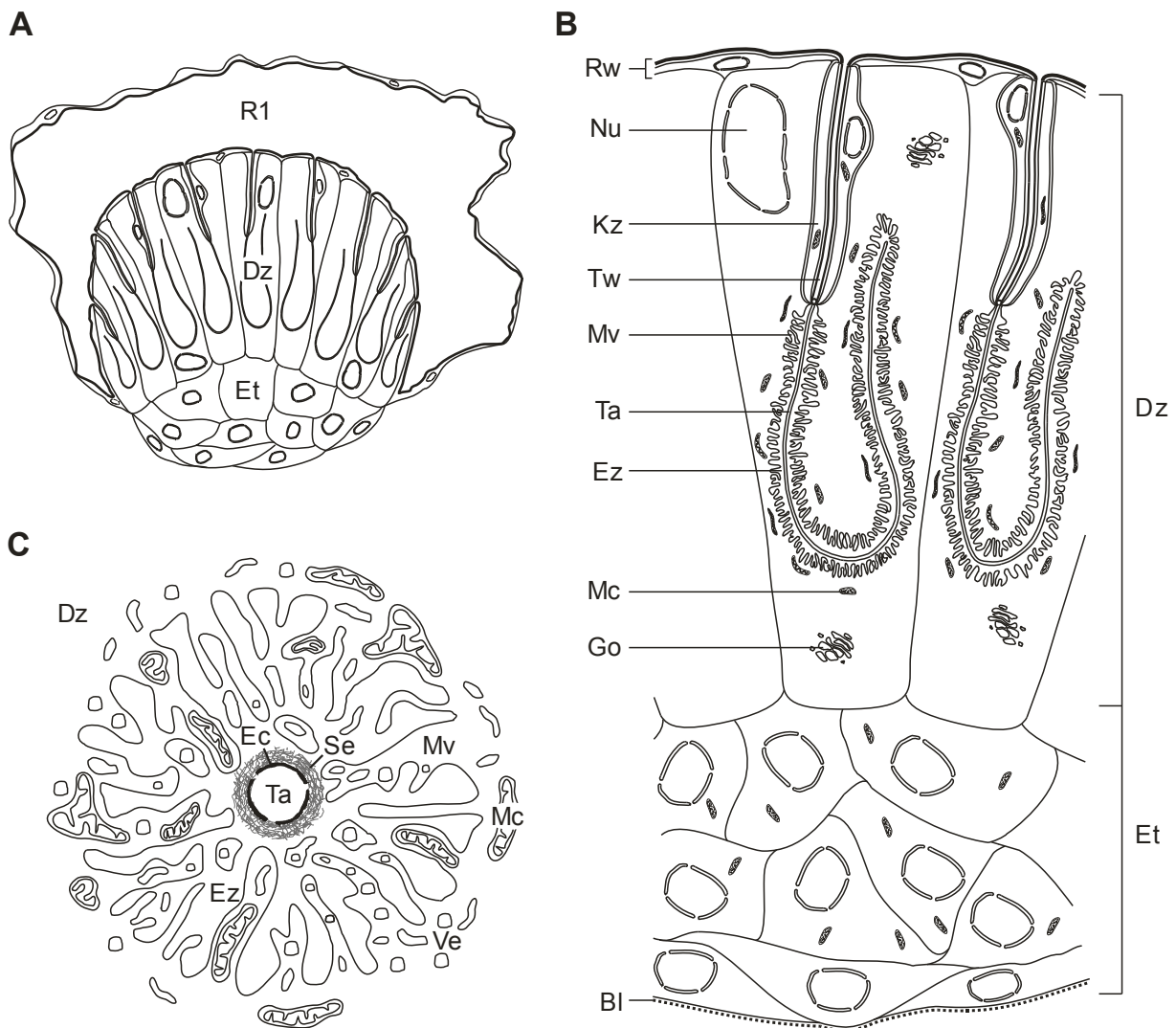


Abb. 4 Morphologie und Ultrastruktur des Pygidialdrüzensystemteils R1/D1 von *Stenus comma* und *S. biguttatus* (Schematische Darstellung). (A) Querschnitt durch R1/D1. (B) Vergrößerung eines Teilausschnitts von (A). (C) Querschnitt durch eine D1-Drüsenzelle im Bereich der extrazellulären Höhlung und der sekretaufnehmenden Tubulusstruktur.

Bl Basallamina, **Dz** Drüsenzelle, **Ec** innere Epicuticula, **Ez** Extrazellulärraum, **Et** schützende Epithelzellen, **Go** Golgi-Apparat, **Kz** Kanalzelle, **Mc** Mitochondrien, **Mv** Mikrovilli, **Nu** Nucleus, **Rw** Reservoirwand von R1, **Se** um den sekretaufnehmenden Tubulusteil akkumulierendes Sekret, **Ta** sekretaufnehmender Tubulusteil, **Tw** sekretweiterleitender Tubulusteil, **Ve** Sekretvesikel. Die schematischen Darstellungen der Strukturen geben die tatsächlichen Größenverhältnisse nicht maßstabsgetreu wieder.

Da das gebildete Sekret mittels eines cuticulären Kanals abgeleitet wird, und die sekretorische Zelle somit nicht in direktem Kontakt mit einer sekretspeichernden Struktur oder dem Ort der Sekretausscheidung steht, ist die Drüsenzelle als terminale Drüsenzelle des Typs III t nach NOIROT & QUENNEDEY (1974, 1991) sowie QUENNEDEY (1998) zu klassifizieren. Der Komplex aus Drüsen- und Kanalzelle ist als Drüseneinheit zu bezeichnen (NOIROT & QUENNEDEY, 1991).

Die Drüseneinheiten liegen der Reservoirmembran in einer Einfaltung einschichtig auf und werden zur Hämolymphe hin durch ein mehrschichtiges, nicht sekretorisch aktives Epithel mit aufgelagerter Basallamina abgegrenzt (Abb. 4A, B). Die Wandung der Reservoirs selbst ist mit einer 70-100 nm dicken Intima aus epicuticulären Material ausgekleidet (Abb. 4B). In den nicht durch Drüsenzellen bedeckten Bereichen ist die Reservoirwand von einem dünnen, elastischen Muskelepithel mit quer und längs verlaufenden Myofibrillen umgeben (Publ. I, Abb. 3F). An ihrer Basis verzweigen sich die großen Reservoirs R1 zunächst zu schmalen Ausführungsgängen, um sich kurz vor der Mündung nach außen wieder stark zu den ausstülpbaren Membranbereichen zu erweitern (Abb. 3).

2.1.3 Ultrastruktur und Funktion der kleinen Reservoirs und des zugehörigen Drüsengewebes von *S. comma* und *S. biguttatus*

Die bis zu 330 μm langen kleineren Reservoirs R2 münden im Bereich der basalen Ausführungsgänge in die großen Reservoirs R1 ein. Ihnen genau gegenüber liegen die in bisherigen Arbeiten stets übersehenen sekretorischen Gewebe D2 (Abb. 3, 5A), welche die Terpen-Komponenten des Pygidialdrüsensekrets produzieren (SCHILDKNECHT et al., 1975; NEUMANN, 1993). Das Drüsengewebe D2 ist in Funktion und Grundbauplan weitgehend identisch mit D1, feinstrukturell ergeben sich jedoch gravierende morphologische Unterschiede.

D2 besteht aus zahlreichen einzelnen Drüseneinheiten, die je aus einer sekretorisch aktiven Zelle des Typs III t nach NOIROT & QUENNEDEY (1974, 1991) und QUENNEDEY (1998) sowie mindestens einer sekretableitenden Kanalzelle aufgebaut sind. Durch Zusammenballung vieler Drüseneinheiten entsteht eine „Blumenkohl-ähnliche“ Gesamtstruktur, die dem Ausführungsgang von R1 aufgelagert ist und diesen weitgehend umschließt (Abb. 5A). Nach Mazeration in 10 % KOH bleiben auch hier zahlreiche Kanalstrukturen zurück, die jedoch mit einer durchschnittlichen Gesamtlänge von etwa 60 μm deutlich länger als die in D1 beobachteten Tubuli ausfallen (Publ. I, Abb. 5). Auch hier kann zwischen einem proximalen und distalen Kanalbereich unterschieden werden. Der distale Tubulusteil liegt im D2-Gewebe

als verdickte, relativ kurze sekretaufnehmende Struktur vor (Abb. 5). Die Wandung dieses Tubusbereichs besteht aus einer etwa 60 nm dicken Epicuticula und ist mit zahlreichen Poren zur Sekretaufnahme ausgestattet (QUENNEDEY, 1998). Der distale Kanalabschnitt ist, wie auch in D1, in einer Drüsenzelle lokalisiert, die hier aber eine nahezu runde Form aufweist (Abb. 5B). Die produzierten Verbindungen werden via Exocytose über eine mit Mikrovilli ausgestattete Zellmembran in einen extrazellulären Hohlraum im Inneren der Drüsenzelle abgegeben und über den Tubulus abgeleitet (Abb. 5B). Die Drüsenzelle beinhaltet große Mengen an glattem Endoplasmatischem Reticulum sowie vereinzelt Golgi-Apparate, Ribosomen und Mitochondrien.

Ähnlich wie in D1 ist der sekretaufnehmende Tubulusbereich auch in D2 von Filamenten umgeben (Abb. 5B; Publ. I, Abb. 6). Da hier jedoch statt einer mehr oder weniger homogenen Masse deutlich voneinander unterscheidbare Filamente in einer schwammartigen Struktur vorliegen, wird diesen Filamenten ein cuticulärer Ursprung unterstellt. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Auftreten von Plaques an den Apizes vieler Mikrovilli, wie sie auch während der Neubildung der Epicuticula bei der Insektenhäutung zu beobachten sind (LOCKE & HUIE, 1979). Cuticuläre Filamente im Bereich des sekretaufnehmenden Tubulus sind bereits für diverse Arthropodendrüsen beschrieben worden (z.B. HAPP & HAPP, 1973; BIEMONT et al., 1992; DRILLING et al., 2010) und könnten das Sekret modifizierende Enzyme enthalten. Während der Passage von wenig bioaktiven Sekretvorstufen durch die Filamente würde hierbei die Toxizität der Verbindungen schrittweise erhöht und somit die volle Aktivität der Endprodukte erst außerhalb der sekretorischen Zellen hergestellt. Auf diese Weise könnte eine „Selbstvergiftung“ durch die produzierten Abwehrverbindungen und eine damit einhergehende Schädigung des Drüsengewebes verhindert werden (BIEMONT et al., 1992).

Der proximale, sekretableitende Tubulusteil stellt mit ca. 50 μm Länge den größten Teil eines D2-Tubulus dar. Er weist eine 60 nm dicke, kompakte Epicuticula mit innen aufgelagerter Cuticulinschicht auf (QUENNEDEY, 1998). Über den gesamten proximalen Tubulusbereich verstreut befinden sich zahlreiche ovale Ausstülpungen, die ebenfalls modifizierende Enzyme beinhalten könnten (Abb. 5B) (EISNER et al., 1964). Der proximale Kanalteil ist von mindestens einer lang gestreckten, nicht sekretorisch aktiven Kanalzelle umgeben, und dort ebenfalls in einer schmalen extrazellulären Höhlung lokalisiert. Die Kanalzelle penetriert die Drüsenzelle, ist jedoch zum größten Teil nicht von dieser umschlossen (Abb. 5B). Beide Zellen sind über *septate junctions* fest miteinander verbunden.

Die ableitenden Bereiche aller Tubuli münden auf einem Porenfeld gesammelt in den Ausführang von R1 ein, welches sich exakt gegenüber der R2-Öffnung befindet (Abb. 5A). Da in R1 keine Terpen-Komponenten nachweisbar sind, muss ein zuverlässiger Sekrettransfer

über den Ausführgang zum Reservoir R2 erfolgen. Dieser ist vermutlich durch ein Kollabieren der R1-Ausführgänge im Ruhezustand gewährleistet, wodurch die Porenplatte mit den Mündungen der Tubuli direkt auf die Öffnung des Reservoirs R2 gepresst wird (Abb. 5A; Publ. I, Abb. 7E). Bei Erhöhung des Hämolympdruckes strömt Sekret aus den Reservoirs aus, wodurch sich die R1-Ausführgänge öffnen und die Sekretabgabe aus beiden Reservoirtypen möglich wird.

Die Reservoirwand der kleinen Reservoirs R2 besteht aus einer inneren epicuticulären Intima, gefolgt von einer Schicht dicht gepackter, cuticulärer Filamente. Beide innere Schichten liegen bei nicht prall gefülltem Reservoir in Falten, wodurch eine gewisse Elastizität der Reservoirwand gewährleistet wird. Zur Hämolymphe hin wird die Reservoirwand durch ein einschichtiges Epithel mit Basallamina abgegrenzt (Publ. I, Abb. 7F).

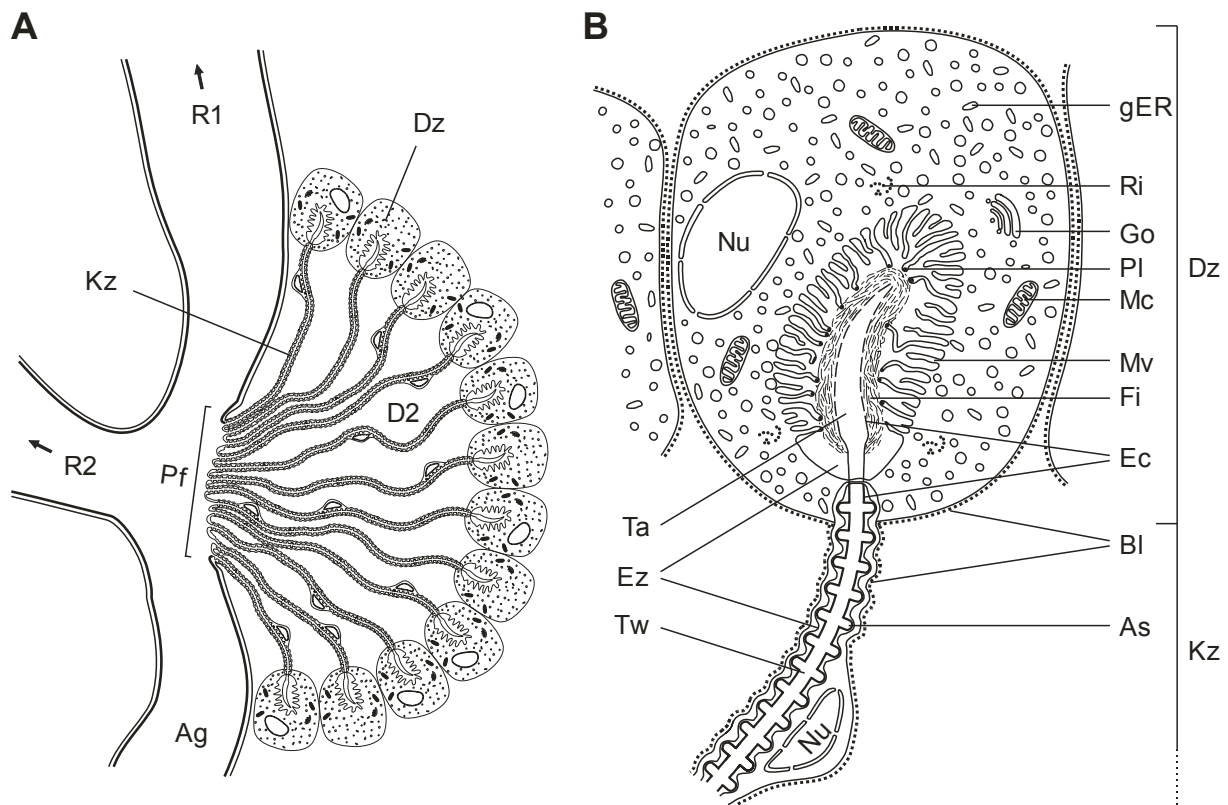


Abb. 5 Morphologie und Ultrastruktur des Pygidialdrüsen-systemteils R2/D2 von *Stenus comma* und *S. biguttatus* (Schematische Darstellung). (A) Morphologie und Position von R2/D2 am Ausführgang von R1. (B) Ultrastruktur einer Drüseneinheit aus D2.

Ag Ausführgang von R1, **As** Ausstülpungen des ableitenden Tubulusteils, **BI** Basallamina, **Dz** Drüsenzelle, **Ec** innere Epicuticula, **Ez** Extrazellulärraum, **Fi** Schicht cuticulärer Filamente, **gER** glattes Endoplasmatisches Reticulum **Go** Golgi-Apparat, **Kz** Kanalzelle, **Mc** Mitochondrien, **Mv** Mikrovilli, **Nu** Nucleus, **Pf** Porenfeld, **PI** Plaques an den Apizes der Mikrovilli **Ri** Ribosomen, **Ta** sekretaufnehmender Tubulusteil, **Tw** sekretweiterleitender Tubulusteil. Die schematischen Darstellungen der Strukturen geben die tatsächlichen Größenverhältnisse nicht maßstabsgetreu wieder.

2.1.4 Morphologie des Pygidialdrüsensystems weiterer Steninae

Während die Morphologie der großen Reservoirs R1 und den zugehörigen Drüsengeweben D1 in der Literatur bei allen Arten als identisch beschrieben werden, sind die kleinen Reservoirs R2 bislang lediglich bei *S. comma* und *S. biguttatus* bekannt (SCHILDKNECHT, 1970; SCHILDKNECHT et al., 1976, LUSEBRINK, 2007). Durch die genaue Betrachtung der Pygidialdrüsenmorphologie zahlreicher Steninen-Spezies mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Methoden konnte sowohl bei jeder in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Stenus*-Art als auch bei *D. coerulea* ein vollständiges Drüsensystem R2/D2 identifiziert werden. Dieses unterliegt jedoch bei allen untersuchten Arten mit Ausnahme von *S. comma* und *S. biguttatus* mehr oder weniger starken Reduktionen und funktionellen Einschränkungen. Während der Mündungsbereich der sekretleitenden Tubuli bei *S. comma* und *S. biguttatus* stets genau gegenüber des zugehörigen Reservoirs R2 lokalisiert ist, liegt dieser bei allen weiteren Steninae in Richtung R1 verschoben vor. Weiterhin werden die Tubuli nicht auf einem kompakten Porenfeld gebündelt, sondern münden über einen lang gestreckten Bereich in den Ausführungsgang von R1 ein (Abb. 6). Hierdurch kann offenbar ein Sekrettransfer zwischen D2 und R2 nicht mehr kontrolliert erfolgen, und die von D2 produzierten Sekretkomponenten ergießen sich in den Ausführungsgang von R1. Das somit funktionslos gewordene kleine Reservoir R2 ist meist massiv zurückgebildet und bei vielen Arten nur noch rudimentär vorhanden.

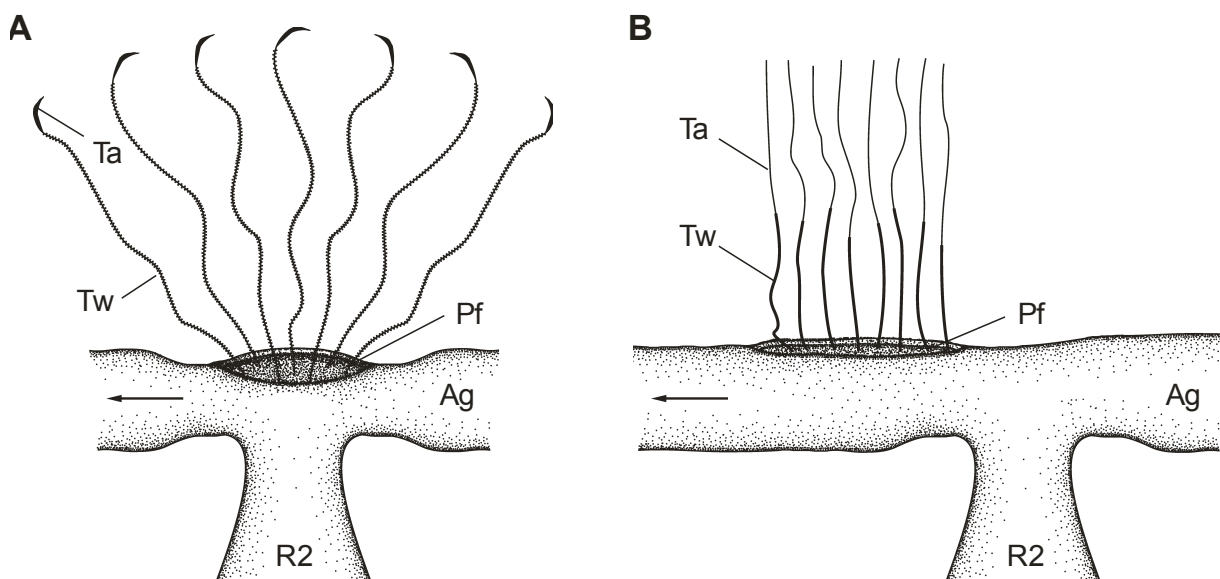


Abb. 6 Abwandlungen und Reduktionen des Drüsensystems R2/D2 bei weiteren Steninen. Schematische Darstellung nach Mazeration. (A) R2/D2 bei *S. comma* und *S. biguttatus*. (B) Modifiziertes R2/D2 von *S. bimaculatus*.

Ag Ausführungsgang von R1, **Pf** Porenfeld, **Ta** sekretaufnehmender Tubulusteil, **Tw** sekretweiterleitender Tubulusteil. Die Pfeile geben die Lage von R1 an.

Die Tubuli des D2-Gewebes aus reduzierten R2/D2-Systemen zeigen nicht die charakteristischen Ausstülpungen, wie sie auf denen von *S. comma* und *S. biguttatus* zu finden sind, sondern weisen eine glatte Oberfläche auf. Der sekretaufnehmende Tubulusteil ist nicht verdickt und liegt als fadenförmiger Fortsatz des sekretableitenden Teils vor, wodurch die Gesamtmorphologie der Tubuli praktisch identisch zu den entsprechenden Strukturen in D1 erscheint (Abb. 6).

2.2 Zusammensetzung der Pygidialdrüsensekrete verschiedener Steninae

Wie bereits von LUSEBRINK (2007) beschrieben wurde, ist die qualitative Zusammensetzung des Pygidialdrüsensekrets der Steninae artspezifisch konserviert und kann somit für chemotaxonomische Zwecke herangezogen werden. Aus vorangegangenen Arbeiten sind bereits diverse Komponenten aus den Pygidialdrüsensekreten vieler Steninen-Arten identifiziert (Abb. 2). Zur Charakterisierung der Sekretkomposition weiterer Steninae und zur Suche nach bislang unbekanntem Verbindungen wurden die Sekrete diverser Arten qualitativ analysiert. Da in späteren Experimenten neben der biologischen Wirkung reiner Sekretkomponenten auch die natürlicher bzw. naturidentischer Sekrete überprüft werden sollte, wurde weiterhin eine quantitative Analyse von Sekreten der Arten *S. comma*, *S. similis* HERBST, 1784 und *S. solutus* ERICHSON, 1840 vorgenommen.

Die qualitative Untersuchung von Steninen-Sekreten der bereits von LUSEBRINK (2007) untersuchten Arten ergab kaum neue Ergebnisse (Publ. II, Tabelle 1). Geringfügige Abweichungen waren lediglich bezüglich einiger Spurenkomponenten ersichtlich und können auf saisonale Schwankungen in der Sekretkomposition zurückzuführen sein. Da die ermittelten Ergebnisse weitestgehend denen von LUSEBRINK (2007) entsprechen, werden diese hier nicht weiter ausgeführt.

Bislang unbekanntem Verbindungen konnten im Sekret des in Norditalien häufigen *Stenus scaber* FAUVEL, 1871 nachgewiesen werden. Dessen Sekretzusammensetzung unterscheidet sich sowohl qualitativ als auch quantitativ deutlich von allen bisher analysierten Steninen-Sekreten. Die meist als Hauptkomponenten auftretenden Alkaloide Stenusin und Norstenusin stellten hier nur Neben- oder Spurenkomponenten dar. An deren Stelle finden sich im Sekret von *S. scaber* hauptsächlich die entsprechenden Dehydro-Komponenten, die im Massenspektrometer leicht abweichende, meist um 2 u leichtere Fragmentationen liefern (Abb. 7). Die Lage der Doppelbindung konnte mittels Synthese authentischen Dehydronorstenusins von J. Kaldun (AG Prof. Seifert, Organische Chemie, Universität

Bayreuth) und anschließendem GC/MS-Vergleich der natürlichen und synthetischen Verbindung auf die 1',3-Position bestimmt werden. Aufgrund der übereinstimmenden Fragmentmuster der Massenspektren von 1',3-Dehydrostenusin und 1',3-Dehydronorstenusin ist anzunehmen, dass auch im Dehydrostenusin-Molekül die Doppelbindung identisch positioniert vorliegt. Aus LUSEBRINK (2007) war bereits eine in den Sekreten diverser Steninae in Spuren vorkommende Dehydrostenusin-Komponente bekannt, die aber im Massenspektrometer anders fragmentierte. Die Doppelbindung wird in dieser Verbindung in der 5,6-Position des Piperidin-Rings vermutet (LUSEBRINK, 2007).

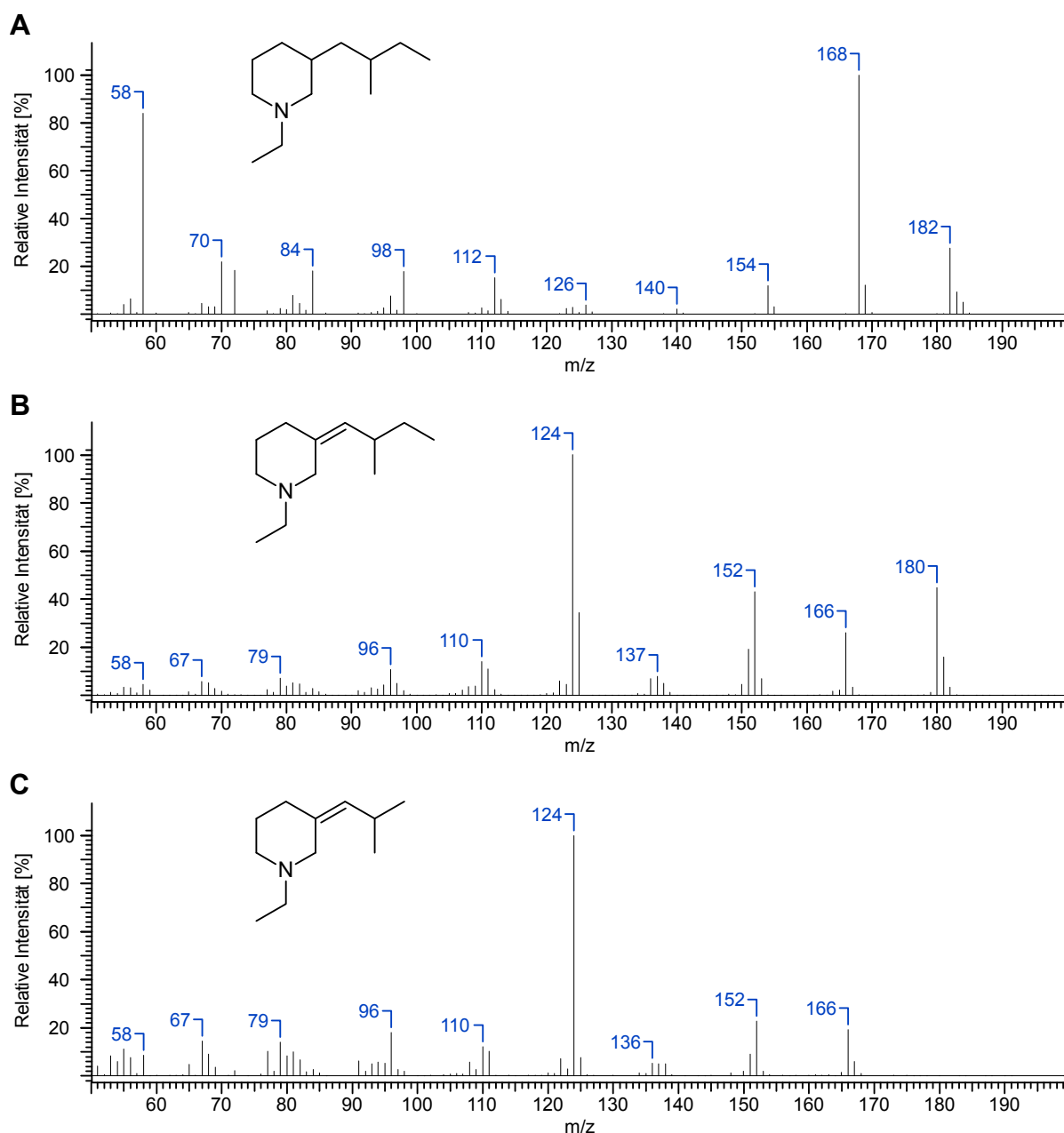


Abb. 7 Massenspektren von Stenusin und den Dehydroverbindungen aus *S. scaber* (Elektronenstoßionisation). (A) Stenusin (*S. comma*), (B) 1',3-Dehydrostenusin, (C) 1',3-Dehydronorstenusin (*S. scaber*).

In der quantitativen Komposition der Steninen-Sekrete zeigten sich, wie auch in der qualitativen, deutliche artspezifische Unterschiede (Tabelle 1). Je nach analysierter Art werden die Hauptkomponenten von Stenusin (*S. comma*, *S. similis*), 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (*S. similis*, *S. solutus*) oder Cicindeloin (*S. solutus*) gestellt. Das im Sekret von *S. comma* als weitere Hauptkomponente auftauchende Norstenusin ist bei *S. similis* nur als Neben- und bei *S. solutus* als Spurenkomponente vorhanden. Genauso ist das im Sekret von *S. comma* und *S. similis* in hoher Konzentration vorhandene Stenusin bei *S. solutus* kaum nachweisbar. Die Terpene tauchen mit 1,8-Cineol als am stärksten vorhandene Komponente im Sekret von *S. comma* auf, scheinen aber über *S. similis* bis hin zu *S. solutus* zu Neben- oder Spurenkomponenten reduziert zu werden.

Tabelle 1 Quantitative Zusammensetzung der Pygidialdrüsensekrete ausgewählter Steninae [%] (10 analysierte Individuen/Art).

Art	1	2	3	5	6	7	8
<i>S. comma</i>	83,3	12,2	-	-	5,5	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>
<i>S. similis</i>	73,8	0,8	23,6	-	1,80	-	-
<i>S. solutus</i>	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	24,5	75,5	-	-	-

1 Stenusin, **2** Norstenusin, **3** 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, **5** Cicindeloin, **6** 1,8-Cineol, **7** α -Pinen, **8** 6-Methyl-5-hepten-2-on, *n.q.* nicht quantifizierbare Spurenkomponente.

2.3 Biologische Wirkung der Pygidialdrüsensekrete der Steninae

Die Pygidialdrüsen der Steninae enthalten diverse bioaktive Verbindungen, die die Käfer auf vielseitige Art und Weise einsetzen. Neben der Fortbewegungsmöglichkeit einiger Arten auf der Wasseroberfläche durch Spreitungsschwimmen ist eine antimikrobielle Aktivität sowie eine Deterrent-Wirkung des Sekrets gegen diverse Prädatoren bekannt (LINSENMAIR, 1963; LINSENMAIR & JANDER, 1963; CONNERT, 1974; NEUMANN, 1993; LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2008b, 2009; LANG et al., 2012). Da viele der Sekretkomponenten erst seit Kurzem identifiziert und für Biotests verfügbar sind, existieren nur wenige Angaben über die biologische Wirkung der Sekretverbindungen. Weiterhin ist bislang nicht geklärt, inwieweit die Einzelkomponenten eine spezifische Aktivität für die erwähnten Einsatzgebiete aufweisen, oder ob Verbindungen existieren, die in allen relevanten Bereichen wirksam sind.

2.3.1 Fraßhemmende Wirkung der Pygidialdrüsensekrete

Durch ihre geringe Größe sowie die reduzierten Elytren stellen die Steninae eine potentielle Beute für diverse räuberische oder parasitoide Organismen dar. Als Prädatoren kommen neben Arthropoden wie Ameisen, Laufkäfer und Spinnen auch Wirbeltiere wie Fische, Amphibien, Vögel und Kleinsäuger in Frage. Da der Einsatz des Pygidialdrüsensekrets die einzige Verteidigungsmöglichkeit der Steninae darstellt, ist eine multiple Wirkung gegen verschiedenste Angreifer nötig.

Zur Analyse der Deterrent-Aktivität der einzelnen Sekretkomponenten gegen Arthropoden wurden *Two-Choice*-Biotests mit der Ameisenart *Lasius flavus* FABRICIUS, 1782 (Hymenoptera, Formicidae) durchgeführt. Hierzu wurden die ausnahmslos hydrophoben Sekretkomponenten in leicht gezuckerter (0,75 g Saccharose/100 ml) fettarmer H-Milch emulgiert und den Ameisen in Form eines kleinen Tropfens auf einem Objektträger direkt in einer Ameisenkolonie angeboten (LUSEBRINK et al., 2009). Als Kontrolle diente ein weiterer Tropfen gezuckerter Milch ohne Sekretverbindungen auf demselben Objektträger. Berührte eine Ameise einen Tropfen mit den Mandibeln, so wurde dieser Kontakt registriert und die Ameise zur Vermeidung von Autoreplikationen aus der Kolonie entfernt.

Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Milch ergab sich hierbei für alle getesteten Sekretkomponenten ein signifikantes Meidungsverhalten der Ameisen bezüglich der mit den Sekretverbindungen präparierten Testtropfen, während die Kontrolltropfen stets als Futterquelle akzeptiert wurden (Abb. 8A). Als außerordentlich wirksam erwiesen sich die Alkaloid-Komponenten des Sekrets und hierunter besonders das 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, welches, wenn überhaupt, nur zufällig von den Ameisen berührt wurde. Nach Kontakt mit einem der Alkaloid-Testtropfen zogen sich die Ameisen meist mit ungerichteten, panikartigen Bewegungen zurück, wobei die Mandibeln über das Substrat geschliffen wurden. Anschließend erfolgte ein ausdauerndes Putzverhalten. Diese Reaktionen sind nach EISNER et al. (1961) sowie DETTNER et al. (1996) als typisches Ablehnungsverhalten zu klassifizieren und unterstützen somit die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Biotests. Die mit den Terpen-Komponenten versetzten Milchtropfen wurden zwar ebenfalls signifikant gemieden, jedoch blieben die deutlichen, bei Alkaloid-Kontakt beobachteten Reaktionen aus. Eine wirksame Abwehr von Arthropoden wird somit durch alle analysierten Sekretkomponenten gewährleistet, wobei den Alkaloid-Komponenten eine höhere Effektivität zugesprochen werden kann. Berücksichtigt man die von LUSEBRINK et al. (2008b) ermittelte Menge von 8,35 μg reinen Stenusins pro Käfer (*S. comma*), so scheint die natürlich vorhandene Alkaloid-Menge für eine zuverlässige Deterrent-Wirkung problemlos auszureichen.

Um die als Deterrent wirksamste Komponente der Sekrete zu ermitteln, wurde die Aktivität der Alkaloide Stenusin, 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloïn direkt verglichen, indem den Ameisen in diesem Fall zwei mit je einem Alkaloid versehenen Milchtropfen gleichzeitig angeboten wurden. Um eine völlige Ablehnung beider Tropfen zu umgehen, wurde die Substanzkonzentration für diesen Versuch auf 30 µg/ml Milch reduziert. Wie bereits nach den ersten Biotests vermutet, konnte das Alkaloid 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin als wirksamste Komponente identifiziert werden (Abb. 8B). Weiterhin zeigte sich Cicindeloïn in seiner Deterrent-Aktivität gegen *L. flavus* Stenusin überlegen.

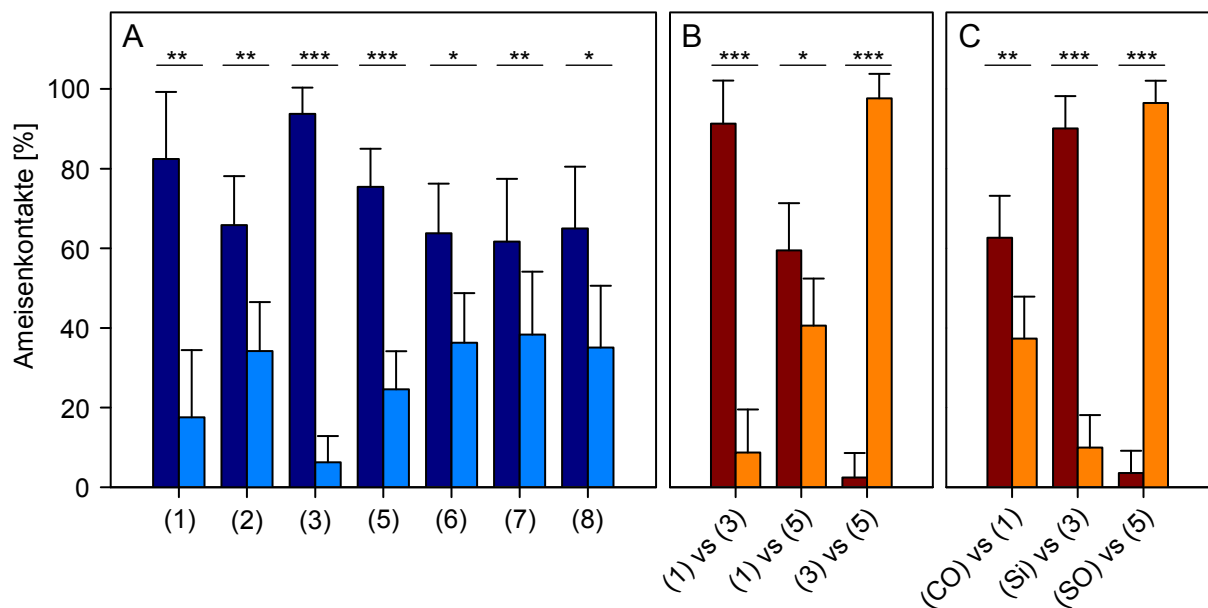


Abb. 8 Two-Choice-Biotests zur Ermittlung der Deterrent-Aktivität der synthetischen Drüsensekretkomponenten und -sekrete gegen die Ameise *Lasius flavus*. Dargestellt ist die Verteilung der Ameisenkontakte mit den Test- und Kontrolltropfen mit Standardabweichung. (A) Test der Sekretkomponenten (hellblau) gegen Kontrolle (dunkelblau). (B) Vergleich der Deterrent-Aktivität der Sekrethauptkomponenten. (C) Vergleich der Deterrent-Aktivität der Sekrethauptkomponenten mit naturidentischen Sekretmischungen. 1 Stenusin, 2 Norstenusin, 3 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, 5 Cicindeloïn, 6 1,8-Cineol, 7 α-Pinen, 8 6-Methyl-5-hepten-2-on, CO Sekret von *Stenus comma*, SI Sekret von *S. similis*, SO Sekret von *S. solutus*. Eingesetzte Substanzkonzentrationen: A 100 µg/ml Milch, B 30 µg/ml, C 80 µg/ml.

Da die Einzelkomponenten einiger Staphylinidensekrete durch synergistische oder quasi-synergistische Effekte in ihrer natürlichen Gesamtkomposition eine bessere biologische Wirksamkeit als ihre Einzelkomponenten aufweisen, wurden Käfersekrete in natürlicher Zusammensetzung bei einer Konzentration von 80 µg/ml gegen die darin als Hauptkomponente vorliegenden Alkaloide getestet (DETTNER, 1987, 1993; FRANCKE & DETTNER, 2005). Es zeigte sich, dass das Sekret von *S. comma* in seiner Deterrent-Aktivität dem Stenusin und das Sekret vom *S. similis* dem 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin unterlegen war (Abb. 8C). Hier liegen demnach keine synergistischen Effekte vor. Das Sekret von

S. solutus zeigte im Biotest eine höchst signifikant bessere Deterrent-Wirkung, als die Einzelkomponente Cicindeloin. Da das natürliche Sekret dieser *Stenus*-Art jedoch große Mengen des hochwirksamen 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin enthält, ist die bessere Wirkung des Sekrets wohl auf die Aktivität dieser Komponente zurückzuführen und ein Synergismus auch hier auszuschließen.

Einige Arten der Steninae (z.B. *S. comma*, *S. biguttatus*, *D. coerulescens*) halten sich bisweilen auf der Oberfläche von durch Fische besiedelten Gewässern auf. Da sich die Tiere kraulend oder durch Spreitungsschwimmen auf der Wasseroberfläche fortbewegen, sind sie einer hohen Gefahr durch Fischprädation ausgesetzt. Bewegliche Objekte auf der Wasseroberfläche werden von Fischen meist als Beute interpretiert und sind deshalb für diese von hohem Interesse. Wasserkäfer der Familie der Gyrinidae können auf Fischteichen beispielsweise dabei beobachtet werden, wie sie oft mehrfach hintereinander von Fischen gepackt, jedoch dank ihrer potenten Wehrsekrete meist unversehrt wieder ausgespuckt werden (BENFIELD, 1972; DETTNER, 1985; EISNER & ANESHANSLEY, 2000). Obwohl eine derartige Situation für Steninae bislang nicht beschrieben wurde, scheint eine Konfrontation mit Fischen realistisch. Aus diesem Grund wurden die Sekretkomponenten der Steninae auf ihre Deterrenteigenschaften gegen Fische der Art *Xiphophorus helleri* HECKEL, 1848 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) überprüft. Hierzu wurden in fettarmer H-Milch emulgierte Sekretverbindungen mit kalt löslicher Gelatine verfestigt, die entstehende Masse in kleine Pellets geschnitten und den Fischen in einem Aquarium angeboten. Um die Attraktivität der Pellets für die Fische zu steigern wurde zusätzlich 0,1 g pulverisiertes Fischfutter/1 g Gelatine zugegeben. Als Kontrolle wurden gleichzeitig Pellets ohne Drüsensekretkomponenten verfüttert.

Bei einer Substanz-Konzentration von 3,2 mg/ml unverfestigter Milchlösung konnte für alle eingesetzten Drüsenkomponenten auch beim Test mit *X. helleri* eine signifikant fraßhemmende Wirkung nachgewiesen werden (Abb. 9). Im Gegensatz zu den Ameisenbiotests wurden hier jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung der Einzelkomponenten deutlich. Um Wirbeltiere wie Fische abzuwehren, scheint die qualitative Zusammensetzung des Sekrets weniger relevant zu sein, als die abgegebene Gesamtsekretmenge. Die für die Fischbiotests eingesetzte Substanzmenge liegt deutlich über der einem Käfer zur Verfügung stehenden (LUSEBRINK et al., 2008b). Da aber ein Großteil der Wirkstoffe im Inneren der Pellets festgesetzt und für die Fische nur der auf der Pelletoberfläche lokalisierte Anteil zugänglich war, ist davon auszugehen, dass ein Käfer bei

Abgabe des unverdünnten Sekrets durchaus in der Lage sein sollte, Angriffe durch Fische abzuwehren.

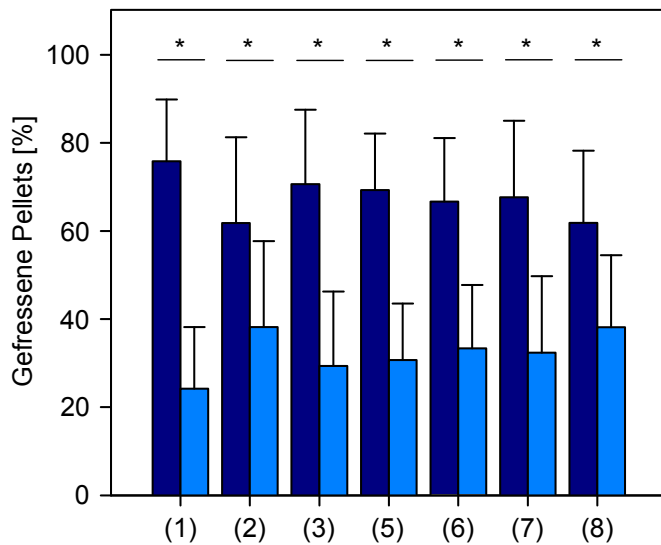


Abb. 9 Two-Choice-Biotests zur Ermittlung der Deterrent-Aktivität der synthetischen Drüsensekretkomponenten gegen den Fisch *Xiphophorus helleri*. Dargestellt ist die Verteilung der gefressenen Kontroll- (dunkelblau) und Testpellets (hellblau) mit Standardabweichung. 1 Stenusin, 2 Norstenusin, 3 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, 5 Cicindeloin, 6 1,8-Cineol, 7 α -Pinen, 8 6-Methyl-5-hepten-2-on. Eingesetzte Substanzkonzentration: 3,2 mg/ml unverfestigter Milchlösung.

2.3.2 Antimikrobielle Wirkung der Pygidialdrüsensekrete

Beobachtet man Steninae in ihrer natürlichen Umgebung, so fällt auf, dass die Tiere ein intensives Putzverhalten aufweisen. Hierbei wird mit den Hinterbeinen Pygidialdrüsensekret von der Hinterleibsspitze abgenommen, auf die Mittel- und Vorderbeine übertragen und auf der gesamten Körperoberfläche verteilt (BETZ, 1999). Ein derartiges Verhalten ist als „*Secretion Grooming*“ („Sekreteputzen“) bekannt und erstmals für Wasserinsekten (Coleoptera: Hydradephaga, Heteroptera: Pleidae) beschrieben worden (MASCHWITZ, 1967, KOVAC & MASCHWITZ, 1989, 1990). Durch das Einreiben mit Sekret sollen Bakterien, Pilze und anderer epibiontischer Aufwuchs entfernt und von der Besiedelung der Körperoberfläche abgehalten werden. Aus diesem Grund wurde dem Pygidialdrüsensekret der Steninae bereits in DETTNER (1985, 1993) und BETZ (1999) eine antimikrobielle Wirkung unterstellt, welche später für Stenusin, Norstenusin und 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin experimentell bestätigt werden konnte (LUSEBRINK, 2007; LUSEBRINK et al., 2008b, 2009). Die Einsatzmöglichkeit von 1,8-Cineol als Antiseptikum in der Humantherapie ist, unabhängig von den Drüsensekreten der Steninae, ebenfalls seit geraumer Zeit bekannt (SCHILDKNECHT, 1976).

Um auch eine Aussage über die antimikrobiellen Eigenschaften der weiteren Verbindungen treffen zu können, wurden Agardiffusionstests mit den entomopathogenen Bakterien *Bacillus sphaericus* (Gram-positiv) und *Serratia entomophila* (Gram-negativ) sowie mit *Escherichia coli* (Gram-negativ), dem insektenparasitären Pilz *Lecanicillium lecanii* (ehemals *Verticillium*

lecanii) und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Hierbei wurde soweit möglich das Protokoll zur Durchführung von Agardiffusionstests nach LUSEBRINK (2008a) verwendet. Die Mikroorganismen wurden aus Dauerkulturen entnommen, in Flüssigkultur vermehrt und anschließend auf Agarplatten ausgestrichen. Direkt nach der Inokulation wurden kleine Baumwollplättchen auf die Agaroberfläche aufgelegt, welche in reinem Ethanol gelöste Pygidialdrüsen-Verbindungen oder naturidentische Sekrete enthielten (1,6 mg/Testplättchen). Als Kontrolle wurde ein Testplättchen mit reinem Ethanol hinzugefügt. Nach Inkubation der präparierten Platten wurden die erzeugten Hemmhöfe vermessen und die Ergebnisse auf den ganzen Millimeter gerundet notiert.

Tabelle 2 Agardiffusionstests zur Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivitäten von Sekretkomponenten und synthetischen Sekreten. Mittlere Hemmhofdurchmesser (MW) in Millimeter mit Standardabweichung (SA). Bei deutlicher Aktivität der Verbindungen gegen die Testorganismen sind die Hemmhofdurchmesser farblich hinterlegt.

Verbindung/ Sekret	<i>E. coli</i>		<i>S. entomophila</i>		<i>B. sphaericus</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>L. lecanii</i>	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA
EtOH	11	1,29	10	1,50	13	0,50	9	0,00	9	0,00
1	21	1,41	18	0,96	20	1,00	13	0,58	12	0,50
2	12	0,82	12	0,82	13	0,82	11	0,58	12	0,50
3	18	0,82	20	3,50	20	2,38	12	0,00	23	1,89
5	20	0,21	22	0,12	21	0,08	12	0,82	30	1,26
6	11	0,50	11	0,00	13	0,82	11	0,58	10	0,58
7	15	1,15	13	2,00	17	0,96	43	0,82	42	1,91
8	11	0,82	11	0,96	12	0,96	11	0,96	10	0,50
<i>S. comma</i>	15	0,82	16	0,96	15	0,82	11	0,50	13	0,96
<i>S. similis</i>	16	0,58	16	0,96	16	0,82	12	0,00	13	0,00
<i>S. solutus</i>	17	0,96	<i>n.d.</i>	-	<i>n.d.</i>	-	12	0,58	14	0,58

1 Stenusin, **2** Norstenusin, **3** 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, **5** Cicindeloin, **6** 1,8-Cineol, **7** α -Pinen, **8** 6-Methyl-5-hepten-2-on, *n.d.* Test nicht durchgeführt. ($n = 4$, Durchmesser der Testplättchen: 9 mm, Eingesetzte Substanzmenge: 1,6 mg/Testplättchen).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fraßbiotests, bei denen allen analysierten Verbindungen eine mehr oder weniger deutliche Deterrent-Wirkung nachgewiesen werden konnte, wurden in den Agardiffusionstests zum Teil massive Aktivitätsunterschiede sichtbar (Tabelle 2). Während die Alkaloide Stenusin, 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin das Wachstum der Testbakterien massiv hemmten, konnten um die Norstenusin-Plättchen nur Hemmzonen beobachtet werden, die kaum größer als die der Kontrollen ausfielen. Die Aktivität aller Sekret-Alkaloide gegen *S. cerevisiae* erwies sich als minimal, die von 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin gegen *L. lecanii* jedoch als außerordentlich stark. Stenusin und Norstenusin zeigten hingegen auch gegen *L. lecanii* kaum Hemmwirkung. Den Terpen-Komponenten 1,8-Cineol und 6-Methyl-5-hepten-2-on konnte generell keine

antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. Dies ist verwunderlich, da 1,8-Cineol in der Literatur als antiseptische Verbindung geführt wird (SCHILDKNECHT, 1976). α -Pinen zeigte nur eine moderate Hemmung des Bakterienwachstums, erwies sich aber gegen *S. cerevisiae* und *L. lecanii* mit den größten, während der gesamten Versuchsreihe gemessenen, Hemmhöfen als sehr effizient.

Wie auch bei den Biotest zur Aktivität als *Feeding Deterrent* stellten sich die synthetischen Sekrete von *S. comma*, *S. similis* und *S. solutus* als weniger effektiv heraus, als die entsprechenden Hauptkomponenten-Alkaloide (Tabelle 2). Auch bezüglich der antimikrobiellen Aktivität kann somit eine synergistische Wirkung der Sekretkomponenten in natürlicher Komposition ausgeschlossen werden.

Die antimikrobielle Wirkung von Stenusin und Norstenusin gegen die hier verwendeten Bakterien und den Pilz *L. lecanii* wurde bereits in den Arbeiten von LUSEBRINK (2007) und LUSEBRINK et al. (2008b) untersucht. Hierbei wird von einer enormen Hemmwirkung berichtet, die der kommerziell erhältlicher Antibiotika oder Antimykotika nahe kommt. Gleichzeitig wird in LUSEBRINK (2007) berichtet, dass die beiden Alkaloide in Tests des Hans Knöll Instituts (HKI) in Jena gegen Krankenhauskeime keine nennenswerte Aktivität aufwiesen. Aufgrund dieses Befunds und der oben aufgeführten neuen Ergebnisse scheint das in LUSEBRINK (2007) und LUSEBRINK et al. (2008b) ermittelte enorme antimikrobielle Potential der Sekret-Alkaloide Stenusin und Norstenusin zweifelhaft. Um die beschriebenen Hemmhofdurchmesser zu erzeugen, musste bei unseren Analysen die 200-fache Stenusin-Menge eingesetzt werden, während zur Überprüfung der Ergebnisse aufgelegte, kommerziell gefertigte Testplättchen mit dem Antibiotikum Tygacil (15 μ g/Plättchen) vergleichbare Ergebnisse lieferten. Einzig die in den LUSEBRINK-Arbeiten ermittelte Tendenz der höheren antimikrobiellen Wirkung von Stenusin gegenüber Norstenusin konnte reproduziert werden.

Obwohl die antimikrobielle Wirkung der Pygidialdrüsenkomponenten nicht derart ausgeprägt zu sein scheint, wie in der Literatur beschrieben, sollte das Sekret den Käfern einen zuverlässigen Schutz vor dem Befall durch Mikroorganismen bieten. Bedenkt man die Tatsache, dass das Sekret auf der Körperoberfläche der Tiere unverdünnt vorliegt und durch das häufige Putzverhalten ständig erneuert wird, so ist von einer zur effizienten Wachstumshemmung von Mikroorganismen ausreichenden Sekretmenge auszugehen.

2.3.3 Einfluss der Konfiguration der chiralen Sekretkomponenten Stenusin und Norstenusin auf deren biologische Wirkung

Das Alkaloid-Molekül Stenusin besitzt zwei stereogene Zentren und existiert somit in Form vier verschiedener Stereoisomere (Abb. 10A). Alle vier Isomere kommen in den natürlichen Pygidialdrüsensekreten von Steninen in einer artspezifisch konservierten prozentualen Verteilung vor (LUSEBRINK et al., 2007). Da die biologische Wirkung einer chiralen Verbindung stark mit deren Konfiguration variieren kann (MORGAN, 2004), wurden Ameisen- und Agardiffusionsbiotests mit den reinen Diastereomeren (2'R,3S)- und (2'R,3R)-Stenusin sowie mit den Enantiomeren (3R)- und (3S)-Norstenusin durchgeführt.

Während im Agardiffusionstest keine Unterschiede bezüglich der Wachstumshemmung der Bakterien durch die beiden Stenusin-Diastereomere ersichtlich waren, wurde das (2'R,3R)-Stenusin durch die Ameisen signifikant dem (2'R,3S)-Isomer vorgezogen (Abb. 10B, C). Die gleiche Tendenz war im Biotest mit Norstenusin in (3R)- und (3S)-Konfiguration erkennbar. Die (3S)-konfigurierten Verbindungen weisen somit eine höhere fraßhemmende Wirkung auf, als die (3R)-Isomere. Von 36 untersuchten Stenusin-produzierenden Arten enthalten nach LUSEBRINK et al. (2007) 24 das aktivere (3S)-konfigurierte Stenusin als Hauptkomponente. Unter Berücksichtigung dieser Stereoisomerenverteilung und der Ergebnisse der Ameisenbiotests erscheint die Konfiguration des Stenusins an Position 3 durchaus relevant für die Verteidigung gegen prädatorische Arthropoden. Bei einem Drittel der untersuchten Arten taucht jedoch das weniger aktive (3R)-Stenusin als häufigstes Isomer auf.

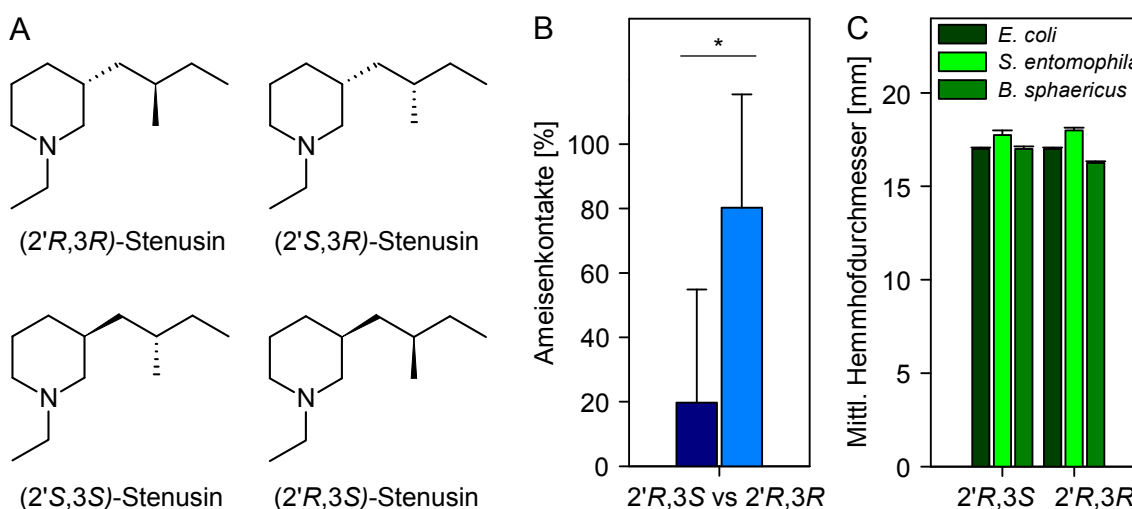


Abb. 10 Einfluss der Konfiguration des Stenusins auf dessen biologische Wirkung. **(A)** Stereoisomere des Stenusins. **(B)** Two-Choice-Biotests mit *Lasius flavus* (Verteilung der Ameisenkontakte an den Test- und Kontrolltropfen mit Standardabweichung, 100 µg/ml Milch). **(C)** Agardiffusionstests (mittlere Hemmhofdurchmesser mit Standardabweichung, 1,6 mg/Testplättchen).

Die stereoselektive Synthese der Alkaloide erfordert mindestens ein spezifisches Enzym für jedes einzelne Stereoisomer (MORGAN, 2004). Darüber hinaus ist im Falle der artspezifisch konservierten Verteilung der einzelnen Stereoisomere des Stenusins im Käfersekret eine exakte Regulierung dieser Enzyme nötig. Trotzdem sind in den Sekreten der Steninae alle vier Stereoisomere zu finden. Dies wirft die Frage nach dem selektiven Vorteil einer derart aufwändig regulierten Stereoisomerenverteilung im Käfersekret auf, in der bei einigen Arten auch die zur Verteidigung weniger geeigneten Isomere signifikant vorkommen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre eine Wirkung des Pygidialdrüsensekrets oder einzelner Komponenten als Pheromon, da in diesem Falle die absolute Konfiguration einer Verbindung von großer Bedeutung für das Auslösen einer Reaktion beim Empfänger ist (MORI, 1999; MORGAN, 2004).

Um eine potentielle Pheromonfunktion des Stenusins nachweisen zu können, wurden elektrophysiologische sowie Verhaltensuntersuchungen mit *Stenus bimaculatus* GYLLENHAL, 1810 durchgeführt. Mittels Elektroantennographie konnte nachgewiesen werden, dass Individuen beider Geschlechter von *S. bimaculatus* Stenusin wahrnehmen können. Während beim Aufblasen des Lösungsmittels Pentan auf eine amputierte, lebendige Antenne keine Reaktion zu beobachten war, wurde mit einer schwach konzentrierten Stenusinlösung (1% in Pentan) eine deutliche Depolarisation der Antenne messbar (Abb. 11). Eine Lockwirkung des Drüseninhalts von *S. bimaculatus* auf das jeweilige andere Geschlecht konnte jedoch sowohl während als auch außerhalb der Paarungszeit weder in einem *Still Air Olfactometer* noch über Barber-Fallen im Freiland festgestellt werden. Im Gegenteil, bei *Two-Choice*-Biotests in einem T-Rohr, das in einem Ast das zerquetschte Drüsensystem eines Käfers auf einem Baumwollplättchen und im anderen ein unbehandeltes Kontrollplättchen enthielt, wählten die Tiere fast ausschließlich den Ast ohne Drüsensekret. Eine Rolle der Sekrete als Sexuallockstoff kann damit, zumindest unter den überprüften Bedingungen, ausgeschlossen werden. Die Klärung der Frage, ob die konservierte Verteilung der Stenusin-Enantiomere im Pygidialdrüsensekret der Steninae einem bestimmten Zweck dient, oder sich lediglich zufällig entwickelte, bleibt somit weiteren Arbeiten vorbehalten.

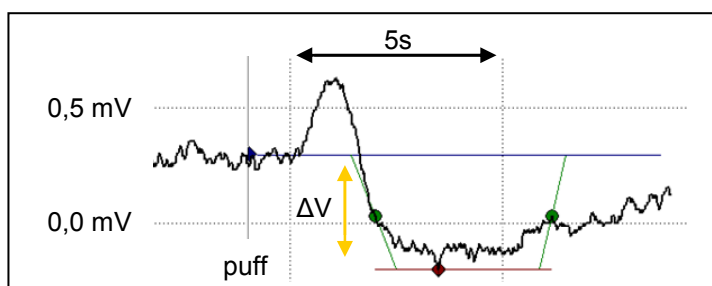


Abb. 11 Elektroantennogramm. Veränderung des Summenpotentials aller Rezeptoren in einer Antenne von *S. bimaculatus* nach Aufblasen von Stenusin (1% in Pentan, 10 μ l auf Filterpapierplättchen, Isomerenzusammensetzung Stenusin: (2'R,3R) 10%; (2'S,3R) 29%; (2'S,3S) 54%; (2'R,3S) 7%).

2.4 Biosynthese der stickstoffhaltigen Sekretkomponenten

Betrachtet man die Molekülstruktur der Alkaloide aus den Pygidialdrüsensekreten der Steninae, so fällt bei allen Verbindungen eine ähnliche Grundstruktur auf (Abb. 2). Stets ist ein mehr oder weniger gesättigter, N-heterocyclischer Sechsring mit einer an Position 3 lokalisierten, 2'-verzweigten Seitenkette vorhanden. Aufgrund der strukturellen Übereinstimmungen dieser Alkaloid-Moleküle scheint die Biosynthese aus identischen Vorläuferverbindungen sehr wahrscheinlich.

Von POUPON et al. (2000) wurde erstmals die Biosynthese von Stenusin durch Reaktion von Metaboliten der Aminosäuren L-Lysin und L-Isoleucin postuliert. Der Piperidin-Ring sei hierbei auf Lysin, die Seitenkette auf Isoleucin zurückzuführen. LUSEBRINK et al. (2008a) gelang einige Jahre später die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese. Nach Fütterung von deuteriummarkiertem Lysin und Isoleucin an *S. bimaculatus*, konnte in den Pygidialdrüsen der Tiere deuteriertes Stenusin nachgewiesen werden.

Um die Hypothese der biogenetischen Verwandtschaft aller Sekret-Alkaloide überprüfen zu können, wurden Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) nach einem modifizierten Protokoll aus LUSEBRINK et al. (2008a) kurz in gesättigte wässrige Lösungen von L-[D₉,¹⁵N₂]-Lysin oder L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin getaucht und täglich an *S. similis* (Stenusin- und 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin-Produzent) sowie *S. solutus* (Cicindeloin- und 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin-Produzent) verfüttert. Nach zweiwöchiger Fütterung der Käfer mit den präparierten Fliegen konnte durch eine massenspektrometrische Analyse der Pygidialdrüsensekrete sowohl bei *S. similis*, als auch bei *S. solutus* eindeutig der Einbau der markierten Aminosäuren in die Alkaloide belegt werden (Abb. 12). In beiden Arten war nach der L-[D₉,¹⁵N₂]-Lysin-Verfütterung eine Erhöhung der Masse des M⁺-Peaks von 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin um 5 u zu beobachten, was dem Einbau von einem ¹⁵N- und vier Deuterium-Atomen entspricht (Abb. 12A, B). Eine Verfütterung von L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin lieferte einen um 8 u schwereren M⁺-Peak und weist somit auf den Einbau von acht Deuterium-Atomen hin (Abb. 12A, C). In den Fragmenten *m/z* 132 und 117 des (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridins ist der stabile Pyridin-Ring noch vollständig vorhanden, die Seitenkette jedoch teilweise abgespalten (Publ. III, Abb. 2). Die identische Massenerhöhung in Molekülion und beiden Fragmentionen nach L-[D₉,¹⁵N₂]-Lysin-Verfütterung belegt somit den Einbau der Markierung in den Pyridin-Ring der Verbindung. Im Gegensatz dazu entstand nach L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin-Verfütterung ein M⁺-Peak *m/z* 155 mit maximal erhöhtem Molekulargewicht, während die Massenzunahme in den Fragmentionen reduziert war. Der Deuteriumeinbau erfolgte hier nur in der Seitenkette des (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridins.

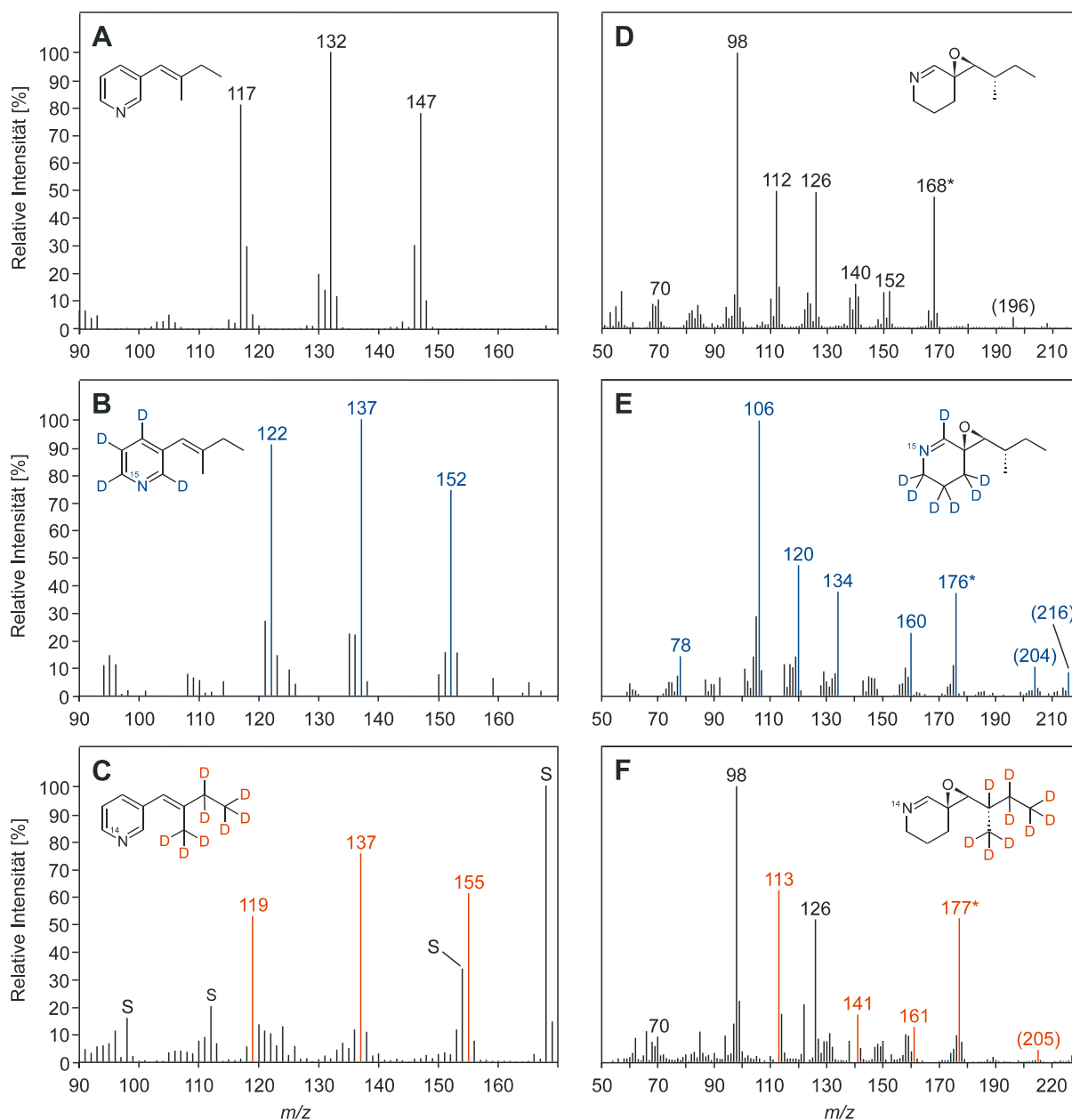


Abb. 12 Massenspektren von 3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridin aus dem Pygidialdrüsensekret von *S. similis* (A-C) und Cicindeloin aus dem Sekret von *S. solutus* (D-F) nach Verfütterung der markierten Aminosäuren L-[D₉, ¹⁵N₂]-Lysin und L-[D₁₀, ¹⁵N]-Isoleucin. (A) (E)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridin nativ, (B) (E)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridin nach L-[D₉, ¹⁵N₂]-Lysin-Einbau, (C) (E)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridin nach L-[D₁₀, ¹⁵N]-Isoleucin-Einbau, (D) Cicindeloin nativ, (E) Cicindeloin nach L-[D₉, ¹⁵N₂]-Lysin-Einbau, (F) Cicindeloin nach L-[D₁₀, ¹⁵N]-Isoleucin-Einbau. (A-C) Elektronenstoßionisation, (E-F) chemische Ionisation (CH₄). S Fragmentionen aus nativem Stenusin, Massen mit Sternchen [M+H]⁺, Massen in Klammern [M+C₂H₅]⁺, [M+C₃H₅]⁺. A-C: Reprinted with permission from Schierling A., Dettner K., Schott M. & K. Seifert (2011) Biosynthesis of the Defensive Alkaloid (Z)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridine in *Stenus similis* Beetles. *Journal of Natural Products* 74:2231-2234. Copyright (2011) American Chemical Society.

Nach Verfütterung von L-[D₉, ¹⁵N₂]-Lysin an *S. solutus* war für Cicindeloin im CIMS ein um 8 u schwereres [M+H]⁺-Ion nachweisbar, was den Einbau von sieben Deuterium-Atomen und einem ¹⁵N-Atom beweist (Abb. 12D, E). Da eine identische Massenerhöhung auch in den Fragmentionen mit intaktem Piperidein-Ring, jedoch vollständig abgespaltener Seitenkette zu

beobachten war (z.B. m/z 98, 112), muss der Einbau hier ebenfalls im Ring erfolgt sein (Publ. IV, Abb. 2). Nach L-[D₁₀, ¹⁵N]-Isoleucin-Aufnahme erhöhte sich die Masse des [M+H]⁺-Ions um 9 u, während die der Fragmentationen ohne Seitenkette nicht größer wurde (Abb. 12D, F). Somit müssen die neun Deuterium-Atome aus dem markierten Isoleucin in die Seitenkette des Cicindeloins eingebaut worden sein.

Im Sekret von *S. similis* konnte darüber hinaus auch deuteriertes Stenusin identifiziert werden. Die L-[D₉, ¹⁵N₂]-Lysin-Behandlung resultierte in dem Einbau von einem ¹⁵N- und sieben Deuterium-Atomen in den Piperidin-Ring, die L-[D₁₀, ¹⁵N]-Isoleucin-Verfütterung im Einbau von acht Deuterium-Atomen in die Seitenkette (Publ. III, Supplement Abb. S3).

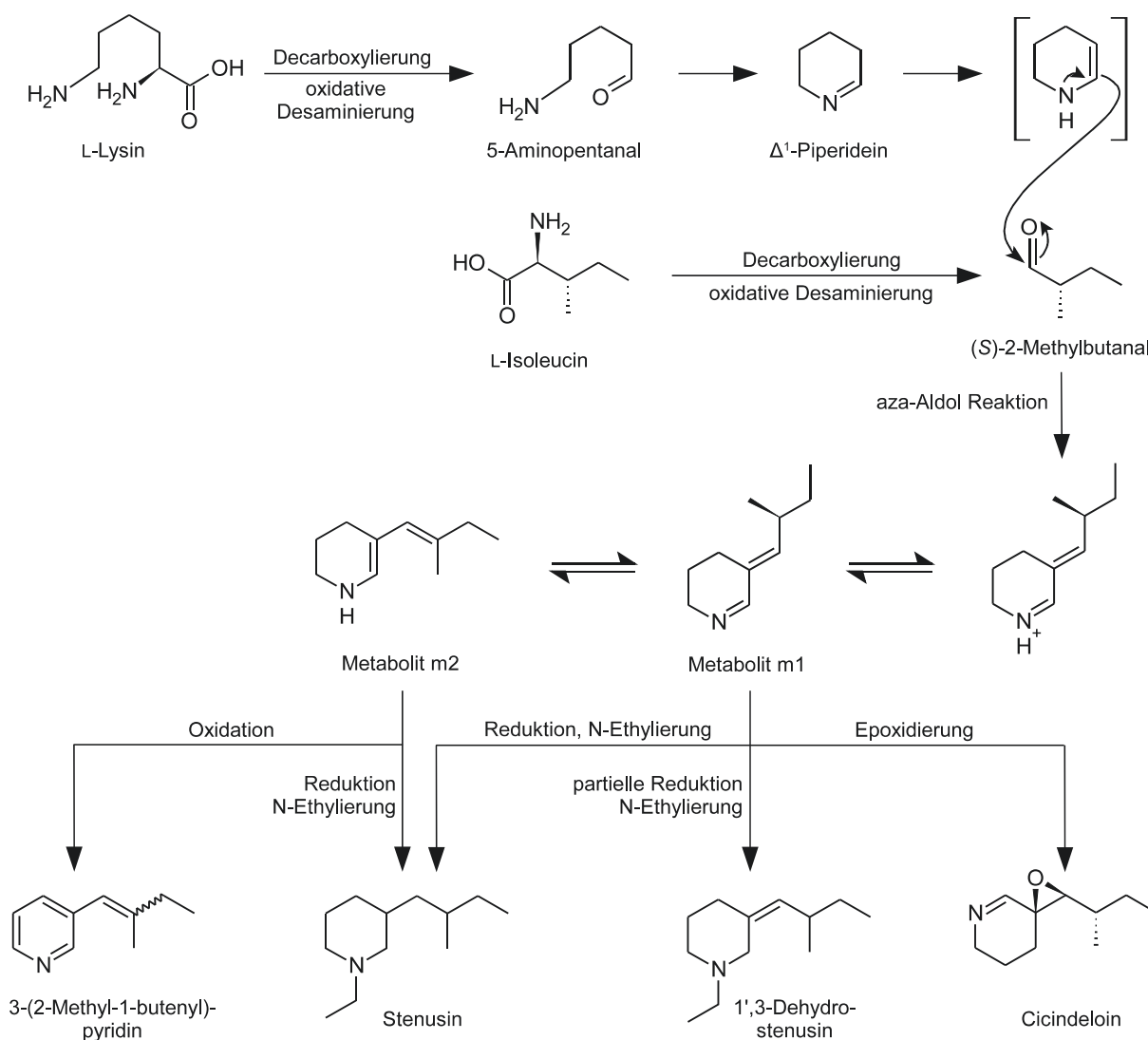


Abb. 13 Biosynthese der Hauptkomponenten-Alkaloide aus den Pygidialdrüsen der Steninae. Die Sekret-Alkaloide entstammen verschiedenen Arten und kommen in natürlichen Sekreten nur teilweise nebeneinander vor.

Wie für Stenusin von LUSEBRINK et al. (2008a) bestätigt, geht somit auch in der Biosynthese von 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin die Ringstruktur auf L-Lysin und die

Seitenkette auf L-Isoleucin zurück. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verläuft die Biosynthese der Alkaloide zu Beginn identisch, bis zu zwei Vorläufermetaboliten m1 und m2, die bereits durch POUPON et al. (2000) postuliert wurden (Abb. 13).

Durch Decarboxylierung und oxidative Desaminierung von L-Lysin entsteht zunächst über das Intermediat 5-Aminopentanal der N-Heterocyclus Δ^1 -Piperidein (Abb. 13). Dieses reagiert nach Isomerisierung der Doppelbindung zum Δ^2 -Piperidein in einer aza-Aldol Reaktion mit dem aus L-Isoleucin analog gebildeten (*S*)-2-Methylbutanal zum protonierten Metaboliten m1. Aus den beiden im Gleichgewicht zueinander stehenden Metaboliten m1 und m2 können anschließend durch Oxidation, Reduktion, N-Ethylierung und Epoxidierung die Sekret-Alkaloide erzeugt werden. Die Bildung des 1',3-Dehydrostenusins aus *S. scaber* wurde nicht mittels Deuterierungs-Experiments überprüft, die Biosynthese aus L-Lysin und L-Isoleucin erscheint jedoch auch hier wahrscheinlich.

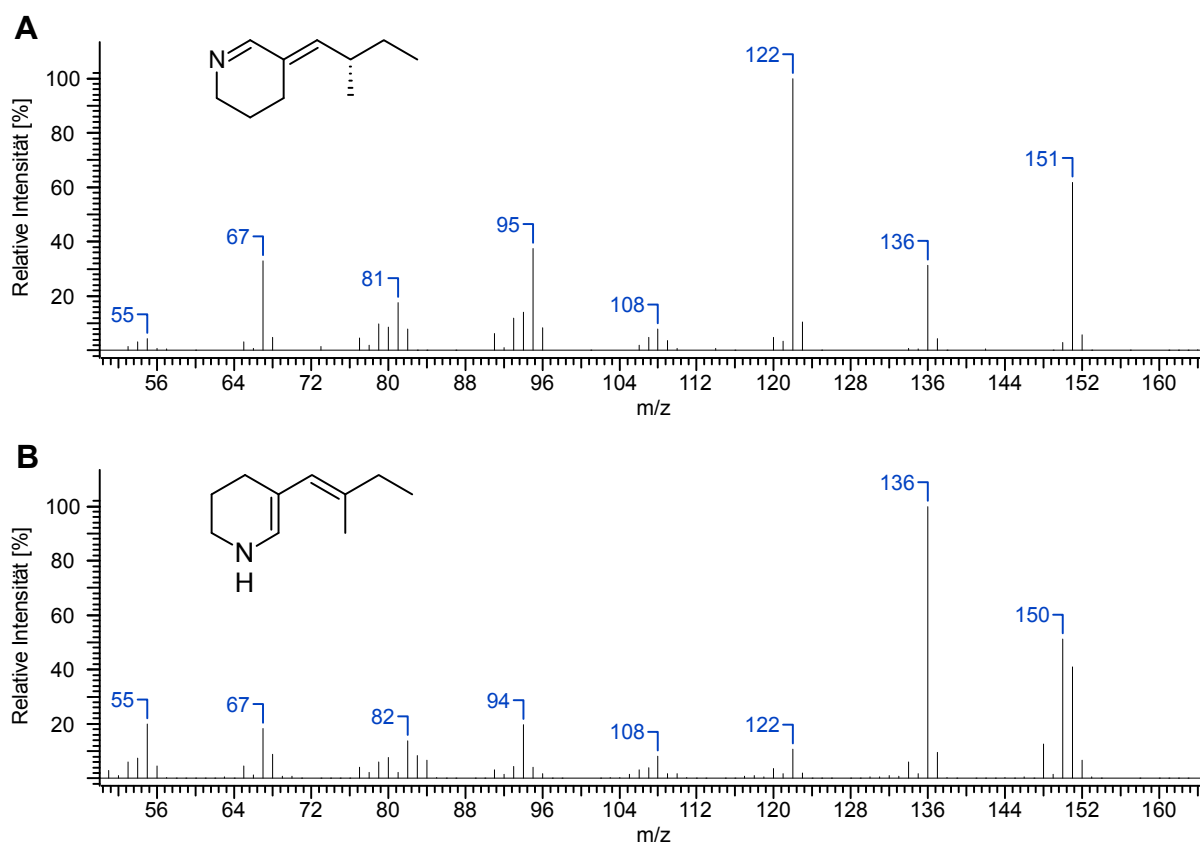


Abb. 14 Massenspektren von Vorläufermetaboliten der Alkaloid-Biosynthese in den Pygidialdrüsen der Steninae (Elektronenstoßionisation). **(A)** Metabolit m1, **(B)** Metabolit m2.

Metabolit m1 ist nachweislich als Nebenkomponente in den Pygidialdrüsensekreten von *S. similis*, *S. solutus* und denen vieler weiterer Steninae enthalten. Die postulierte Struktur wurde durch die Synthese der Verbindung von Isabel Wittmann (AG Prof. Seifert, Organische

Chemie, Universität Bayreuth) und anschließendem GC/MS-Vergleich der natürlichen und synthetischen Verbindung verifiziert (Abb. 14A).

Nach Verfütterung der isotopenmarkierten Aminosäuren an *S. similis* und *S. solutus* ist auch bei m1 der erwartete Isotopeneinbau nachweisbar (Publ. IV, Supplement Abb. 4). In den Piperidein-Ring der Verbindung wurden bei L-[D₉,¹⁵N₂]-Lysin-Behandlung der Futterfliegen ein ¹⁵N-Atom sowie sieben Deuterium-Atome und in die Seitenkette bei L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin-Behandlung neun Deuterium-Atome eingebaut.

Im Gegensatz zu m1 ist Metabolit m2 kaum in Pygidialdrüsensekreten der Steninae zu finden. Im Sekret von *S. flavipes* existiert jedoch eine Komponente in beträchtlicher Menge, deren Massenspektrum dem Metabolit m2 zugeordnet werden könnte (Abb. 14B). Eine Überprüfung der Struktur der Verbindung durch hochauflösende Massenspektrometrie und Synthese steht allerdings noch aus, so dass die Existenz des Metaboliten m2 zwar als wahrscheinlich, jedoch nicht als bewiesen angesehen werden kann.

Stenusin liegt in natürlichen Sekreten sowohl in (2'S)- als auch in (2'R)-Konfiguration vor. Da aus dem (2'S)-konfigurierten Metaboliten m1 nur (2'S)-Stenusin entstehen kann, muss davon ausgegangen werden, dass die Stenusin-Biosynthese zumindest teilweise auch über m2 erfolgt. Metabolit m2 enthält eine Doppelbindung in (1',2')-Position, die nach Reduktion beide Stereoisomere hervorbringen kann. Dass die Biosynthese von (2'R)-Stenusin mit großer Wahrscheinlichkeit über m2 erfolgt, ist durch Ergebnisse von Markierungsexperimenten nachweisbar (Abb. 15). Von LUSEBRINK et al. (2008a) wird bei *S. bimaculatus* vom Einbau von neun Deuterium-Atomen aus zuvor verfüttertem L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin in Stenusin berichtet. Das Pygidialdrüsensekret dieser *Stenus*-Art enthält primär (2'S,3R)-Stenusin (76 %, LUSEBRINK et al., 2007), welches - wie auch Metabolit m1 - nach L-[D₁₀,¹⁵N]-Isoleucin-Verfütterung neunfach deuteriert vorliegt und demnach aus m1 entstanden sein muss. In *S. similis* werden jedoch nach Verfüttern des identisch markierten L-Isoleucins nur acht der insgesamt zehn Deuterium-Atome in die Seitenkette eingebaut (Publ. III, Supplement Abb. S3, LUSEBRINK, 2007). Nach LUSEBRINK et al. (2007) ist in den Pygidialdrüsen von *S. similis* zu 91 % das (2'R,3S)-Stenusin vorhanden. Der Verlust eines Deuteriumatoms ist durch Inversion der (2'S)-Konfiguration von Metabolit m1 über m2 in ein (2'R)-konfiguriertes Stenusin zu erklären (POUPON et al., 2000; MÜLLER, 2011). Bei der Bildung von m2 aus m1 erfolgt neben der Verschiebung der Doppelbindung im Piperidein-Ring auch die Umlagerung der Seitenketten-Doppelbindung aus (1',3)- in (1',2')-Position, wobei das (2')-Deuterium verloren geht. Nach Reduktion von Ring und Seitenkette entsteht in den Pygidialdrüsen von

S. similis aus dem nur achtfach deuterierten Metabolit m2 das $[D_8]$ -(2'*R*,3*S*)-Stenusin (Abb. 15).

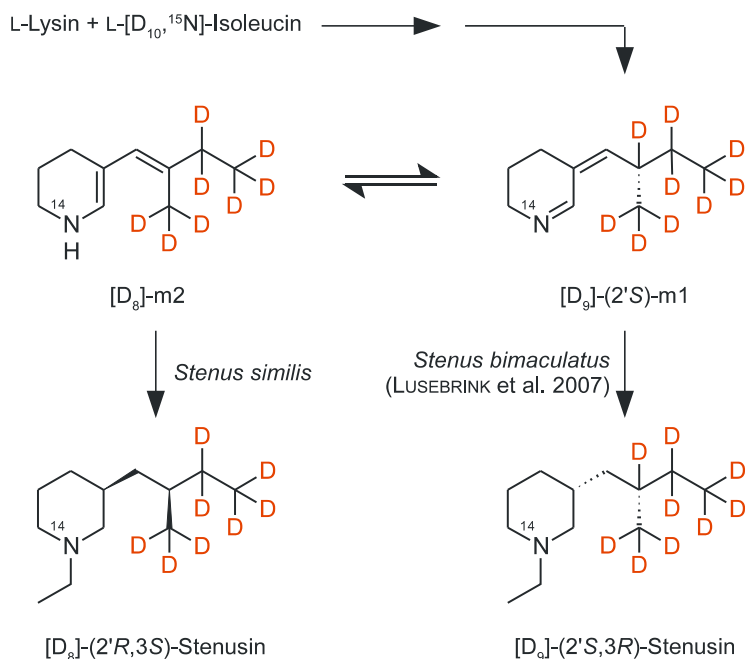


Abb. 15 Stereoselektive Biosynthese des Stenusins in *S. similis* und *S. bimaculatus*.

Im Cicindeloin-Molekül liegt eine (2'*S*)-konfigurierte Seitenkette vor, die eine Biosynthese aus Metabolit m1 vermuten lässt. Wie erwartet ist nach Verfütterung von L-[$D_{10},^{15}N$]-Isoleucin an *S. solutus* auch ein analog zum (2'*S*)-Stenusin neunfach deuteriertes Cicindeloin nachweisbar (Abb. 12F).

Da die Seitenkette des 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridins keine chiralen C-Atome aufweist, wäre eine Synthese der Verbindung aus beiden Vorläufermolekülen m1 und m2 denkbar. Nach Verfütterung markierten Isoleucins an *S. similis* und *S. solutus* liegt die Verbindung achtfach deuteriert vor (Abb. 12C), was eine Synthese aus Metabolit m2 zugrunde legt. Dies erscheint sinnvoll, da die (1',2')-Doppelbindung des 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridins bereits in m2 vorhanden ist und somit nicht erst in späteren Modifikationsschritten eingefügt werden muss. Basierend auf derselben Argumentation ist für das (1',3)-Dehydrostenusin aus *S. scaber* eine Biosynthese über m1 anzunehmen.

Norstenusin wird vermutlich aus den Aminosäuren L-Lysin (Piperidin-Ring) und L-Valin (Seitenkette) ebenfalls nach dem in Abb. 13 beschriebenen Mechanismus gebildet (LUSEBRINK et al., 2008a). Analog werden wahrscheinlich auch die Nor-Verbindungen der anderen Alkaloide in den Pygidialdrüsen der Steninae produziert.

Während eine Biosynthese der Ringstruktur von Piperidin-Akaloiden aus L-Lysin bereits in der Literatur beschrieben ist, ist die Bildung eines Pyridins durch Oxidation einer Piperidein-Vorstufe eher ungewöhnlich (GUPTA & SPENSER, 1969; ROBINSON, 1981; GROSS, 1985; MORGAN, 2004). Ein derartiger Biosyntheseschritt konnte bislang in Insekten noch nicht nachgewiesen werden und kommt nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich in den Pygidialdrüsen der Steninae vor.

2.5 Evolution der Pygidialdrüsenysteme und -sekrete der Steninae

Bis heute sind kaum Daten über die Phylogenie der Steninae erhoben worden. Die wenigen bislang erschienenen Publikationen beschränken sich hauptsächlich auf morphologische Merkmale einiger Gruppen innerhalb der Unterfamilie (z.B. PUTHZ, 1971, 1981, 2006, 2008, 2010). Eine Einteilung der Gattung *Stenus* in Untergattungen erwies sich als unbefriedigend, da die vorgeschlagenen Gruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine monophyletischen Einheiten darstellten (PUTHZ, 2008). Lediglich von KOERNER et al. (2012) wurden erste molekulare Analysen zur Klärung der Phylogenie der Steninae durchgeführt, jedoch mit teilweise kontroversen Ergebnissen. Betrachtet man die Pygidialdrüsenmorphologie der Steninae sowie die Zusammensetzung der Sekrete, so sind jedoch mögliche Evolutionstrends innerhalb der Unterfamilie erkennbar, die Hinweise auf phylogenetische Zusammenhänge liefern können.

In den Untersuchungen zur Morphologie der Pygidialdrüsen verschiedener Steninae zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede bezüglich der Gestalt des kleinen Drüsensystems R2/D2 (Abb. 6). Während bei den Arten *S. comma* und *S. biguttatus* ein deutlich ausgeprägtes Drüsengewebe D2 und Reservoir R2 vorhanden ist, liegen beide Strukturen bei allen anderen untersuchten Arten mehr oder weniger stark reduziert vor. Im Zuge der Reduktion des Drüsensystems R2/D2 verschieben sich die Positionen von Reservoir und Drüsengewebe gegeneinander entlang des Ausführgangs von R1, so dass ein gerichteter Sekrettransfer von D2 zu R2 nicht mehr stattfinden kann (Abb. 6). Das Reservoir R2 verkümmert daraufhin und wird funktionslos. Der Anteil der in R2/D2 produzierten Terpen-Komponenten im Gesamtsekret ist bei *S. comma* und *S. biguttatus* maximal, bei weiteren Arten jedoch nur noch in so geringem Ausmaß vorhanden, dass eine ökologische Signifikanz der Verbindungen im Gesamtsekret angezweifelt werden kann (Publ. II, Tab. 1, Abb. 2). *S. comma* und *S. biguttatus* weisen neben vielen anderen Steninen eine abdominale Seitenrandung (Paratergite) auf, die als anerkanntes, phylogenetisch ursprüngliches Merkmal gilt (PUTHZ, 2006, 2010). Beide

Arten sind somit an der Basis der Steninae einzuordnen. Die Reduktion des Drüsensystems R2/D2 ist zwar auch bei Steninen mit abdominaler Seitenrandung zu beobachten, ein voll funktionsfähiges, gut ausgebildetes R2/D2 ist jedoch bei Arten mit dem abgeleiteten Merkmal fehlender Paratergite nie vorhanden. Aus diesem Grund ist das Pygidialdrüsensystem von *S. comma* und *S. biguttatus* in seiner morphologischen Ausprägung als ursprünglich, das weiterer Arten als abgewandelt zu bezeichnen.

Über morphologische Merkmale hinaus kann auch die Zusammensetzung der Pygidialdrüsensekrete Auskunft über mögliche phylogenetische Zusammenhänge innerhalb der Steninae geben. Da die Sekretkomposition qualitativ und mit gewissen Einschränkungen auch quantitativ als artspezifisch gilt, kann diese für chemotaxonomische Zwecke herangezogen werden (LUSEBRINK, 2007). Bezüglich der Verteilung der Alkaloide in den Pygidialdrüsen können die mitteleuropäischen Steninae in drei große Gruppen eingeteilt werden. Hierbei ist zwischen einer Piperidin-, einer Pyridin- und einer Epoxipiperidein-Gruppe zu unterscheiden (Abb. 16).

Die meisten mitteleuropäischen Steninae gehören der Piperidin-Gruppe an, die die größte der drei Gruppen darstellt. Im Sekret dieser Arten liegt Stenusin als Haupt- und Norstenusin als Nebenkomponekte vor. Weiterhin sind die Monoterpene 1,8-Cineol, α -Pinen, Isopiperitenol und 6-Methyl-5-hepten-2-on je nach Art als Neben- oder Spurenbestandteile vorhanden. Eine derartige Sekretkomposition ist hauptsächlich in den Drüsen von primitiven Steninen mit gerandetem Abdomen zu beobachten. Die Piperidin-Gruppe kann somit als basal innerhalb der Steninae bezeichnet werden (Abb. 16). Aufgrund der entsprechenden Sekretkomposition muss *Dianous coerulescens*, die einzige in Mitteleuropa vorkommende Steninen-Art neben *Stenus*, ebenfalls zur Piperidin-Gruppe gezählt werden. Die Gattung *Dianous* wurde bislang stets als primitiv innerhalb der Steninae geführt, da den Tieren ein Klebfangapparat, wie er bei *Stenus* vorhanden ist, fehlt (LESCHEN & NEWTON, 2003). Neue molekulare Analysen zeigen jedoch, dass der Klebfangapparat bei *Dianous* sekundär verloren gegangen sein könnte und die Gattung vollständig in die Gattung *Stenus* integriert werden sollte (KOERNER et al., 2012). Die starke Reduktion des kleinen Drüsensystems R2/D2 von *D. coerulescens* bestätigt diese Ergebnisse.

Die Pygidialdrüsensekrete von Arten, die der Pyridin-Gruppe zuzuordnen sind, enthalten neben Stenusin große Mengen an 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin als zweite Hauptkomponente. Als Neben- oder Spurenkomponenten sind Norstenusin und 3-(2-Methyl-1-propenyl)-pyridin vorhanden. Eine derartige Sekretkomposition ist primär in Arten ohne abdominale Seitenrandung nachweisbar und somit als abgeleitet einzustufen (Abb. 16).

Cicindeloidin ist nur in den Pygidialdrüsensekreten weniger mitteleuropäischer *Stenus*-Arten zu finden. Die Epoxyperidein-Gruppe umfasst demnach nur eine geringe Anzahl an Arten. Neben der Hauptkomponente Cicindeloidin ist auch das 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin in hoher Konzentration in den Sekreten von Vertretern dieser Gruppe vorhanden. Stenusin, Norstenusin und 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin sind nachweisbar, jedoch stets auf das Niveau von Spurenkomponenten reduziert. Terpene sind in keiner der Arten enthalten. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Anteil des Stenusins im Sekret der Steninae von der Piperidin- über die Pyridin- bis hin zur Epoxyperidein-Gruppe massiv verringert wird, könnte das Pygidialdrüsensekret der Epoxyperidein-Arten als das am höchsten entwickelte bezeichnet werden (Abb. 16). Die im wahrscheinlich primitiven Drüsensystem R2/D2 produzierten und gespeicherten Terpen-Komponenten werden in ihrer Menge deutlich reduziert und sind in der fortschrittlichen Epoxyperidein-Gruppe nicht mehr vorhanden.

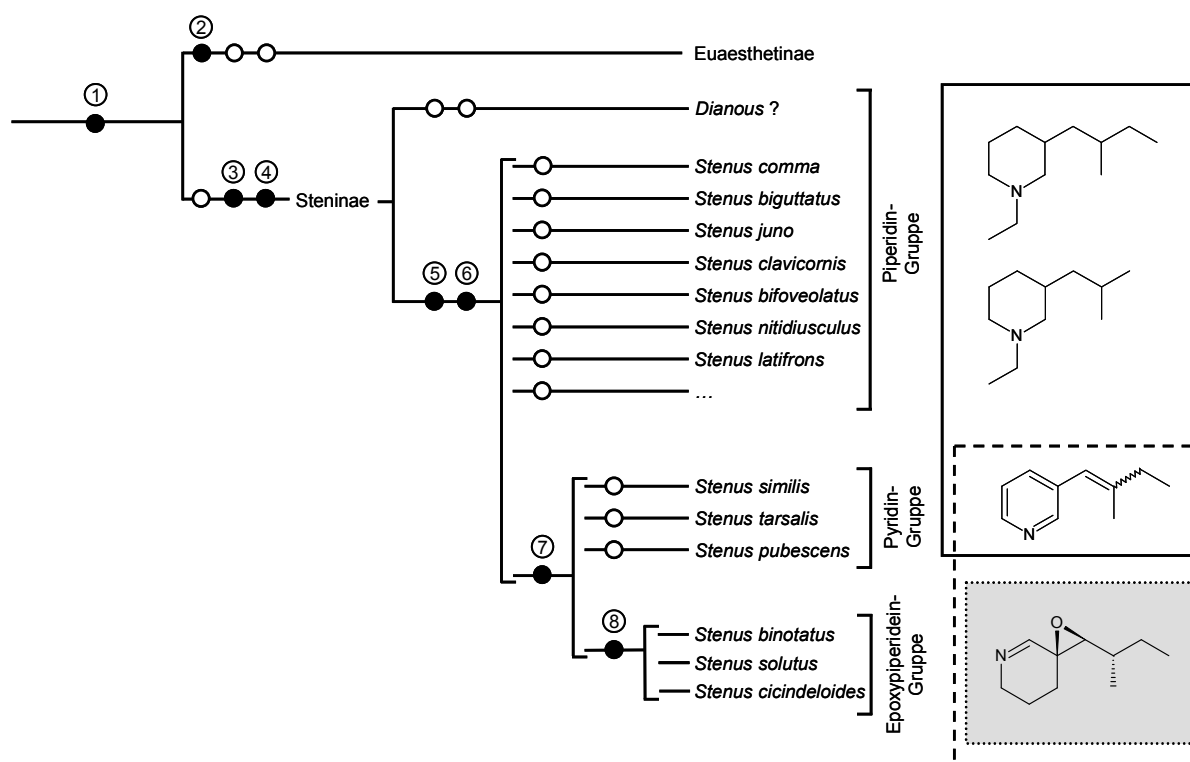


Abb. 16 Möglicher Stammbaum der Steninae basierend auf der Verteilung der Abwehrverbindungen im Pygidialdrüsensekret. Die definierten Gruppen stellen unter Umständen keine monophyletischen Einheiten dar. Die Piperidin-Gruppe umfasst den größten Teil aller mitteleuropäischen Steninae; die hier angegebenen Arten sind nur Beispiele. Die Stellung der Gattung *Dianous* an der Basis der Steninae ist nach Ergebnissen neuester molekularer Analysen der Unterfamilie kritisch zu betrachten (KOERNER et al., 2012).

Molekulare Daten:

- 1 • Molekulare Daten (18S rDNA; GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)
- 2 • Molekulare Daten (18S rDNA; GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)
- 3 • Molekulare Daten (18S rDNA; GREBENNIKOV & NEWTON, 2009)

Apomorphe (●) und plesiomorphe (○) Merkmalsausprägung:

- 4 ● Bildung paariger Komplexdrüsen aus Einfaltungen der Pleuralmembran zwischen dem 9. und 10. Abdominalsegment (NAOMI, 1985); Biosynthese der Alkaloid-Komponenten Stenusin und Norstenusin
 - Komplexdrüsen zwischen dem 9. und 10. Abdominalsegment fehlen
- 5 ● Langes ausstülpbares Labium mit distalem Klebfangapparat (PUTHZ, 1981, LESCHEN & NEWTON, 2003)
 - Kurzes, kaum ausstülpbares Labium ohne Klebfangapparat
- 6 ● Parameren-Innenseite lediglich an den Spitzen beborstet (PUTHZ, 1981)
 - Gesamte Innenseite der Parameren beborstet
- 7 ● Erweiterung des Alkaloid-Repertoires um 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin; Reduktion des Norstenusin- und Terpen-Gehalts zu Spurenkomponenten
 - Nur die Alkaloide Stenusin und Norstenusin vorhanden; Terpen-Gehalt nicht reduziert
- 8 ● Erweiterung des Alkaloid-Repertoires um Cicindeloin; Stenusin und Norstenusin nur in Spuren vorhanden; Terpene vollständig reduziert
 - Nur 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin, Stenusin sowie Spuren von Norstenusin und Terpenen vorhanden; 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Stenusin als Hauptkomponenten

Bei der Analyse der biologischen Wirkung der Pygidialdrüsensekrete einiger Steninae konnten keine synergistischen Effekte der Einzelkomponenten in naturidentischen Sekreten nachgewiesen werden. Die Evolution der Steninen-Sekrete folgt somit nicht dem für Oxytelinae gültigen Modell, wonach die biologische Wirkung des Gesamtsekrets durch verbesserte Formulierung ein und desselben Wirkstoffs gesteigert wird (FRANCKE & DETTNER, 2005). Vielmehr wurden im Laufe der Evolution der Steninen-Sekrete die aktiven Verbindungen an sich sowie die qualitative Sekretzusammensetzung weiterentwickelt und so die Effektivität des Gesamtsekrets erhöht. Entsprechend dieser Hypothese zeigten sich die Alkaloide 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin dem Stenusin in ihrer Deterrent-Wirkung gegen Ameisen sowie hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften meist überlegen, während die in fortschrittlichen Sekreten reduzierten Terpene nur eine geringe Aktivität aufwiesen.

Die Fähigkeit der Steninae zur Fortbewegung auf der Wasseroberfläche mittels Spreitungsschwimmens ist ebenfalls von der Sekretzusammensetzung abhängig. Wie von LANG et al. (2012) berichtet, zeigt das 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin den größten Spreitungsdruck, dicht gefolgt von Stenusin. Cicindeloin spreitet nur sehr schlecht und dürfte zur Fortbewegung auf Wasserflächen kaum geeignet sein. Bei vielen Arten der Steninae besteht nachweislich ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der spreitungsaktiven Alkaloid-Komponenten im Pygidialdrüsensekret und dem Vorkommen freier Wasserflächen im Lebensraum der Käfer (LANG et al., 2012). Trotzdem dürfte die Hauptaufgabe der Pygidialdrüsen der Steninae, und damit das für die Evolution der Sekrete relevanteste selektive Kriterium, die Verteidigung gegen Prädatoren und Mikroorganismen darstellen, wie es auch für viele weitere Staphyliniden-Gattungen vermutet wird (DETTNER, 1991, 1993).

3. Zusammenfassung

Vertreter der Kurzflügelkäfer-Gattungen *Stenus* und *Dianous* weisen, wie die meisten Staphylinidae, einen schlanken Körperbau mit reduzierten Elytren auf. Dies führt zu einer erhöhten Beweglichkeit des Abdomens, wodurch Lückensysteme als Habitate erschlossen werden können. Da die reduzierten Elytren das Abdomen jedoch nur unzureichend schützen können, neigen die Käfer zu einer deutlich größeren Anfälligkeit gegen Prädation und Parasitierung. Um diesen Nachteil zu kompensieren, produzieren und speichern Steninae in abdominalen Wehrdrüsen hochgradig biologisch aktive Abwehrverbindungen, die sie auf vielfältige Art und Weise einsetzen.

Um neue Einblicke in die komplexe chemische Ökologie der Steninae zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Dissertation die Morphologie, Ultrastruktur und Funktion der Pygidialdrüsen sowie die biologische Aktivität der Abwehrkomponenten und -sekrete untersucht. Durch Analyse der Biosynthese der stickstoffhaltigen Sekretkomponenten und deren Verteilung über verschiedene Arten wurden ferner Aussagen über potentielle evolutive Trends und phylogenetische Zusammenhänge innerhalb der Steninae möglich.

Die paarig angelegten Pygidialwehrdrüsen der Steninae erstrecken sich lateral des Darmes und dorsal der Geschlechtsorgane über die letzten drei bis vier Abdominalsegmente. Sie bestehen aus zwei großen Reservoirien mit bandförmig aufgelagertem sekretorischen Gewebe sowie zwei weiteren kleinen Reservoirien mit zugehörigem Drüsengewebe an der Basis der Großen. In beiden sekretorisch aktiven Geweben erfolgt die Sekretproduktion in Drüsenzellen, die einen länglichen inneren Extrazellulärraum aufweisen. Die synthetisierten Produkte werden über zahlreiche Mikrovilli der Drüsenzellenmembran in den Extrazellulärraum abgegeben, wo sie von einem cuticulären Tubulus aufgenommen und zum entsprechenden Reservoir abgeleitet werden. Außerhalb der Drüsenzelle ist der sekretableitende Tubulus von einer Kanalzelle umgeben, die zusammen mit der Drüsenzelle eine Drüseneinheit bildet. Während die großen Reservoirie mit den entsprechenden Drüsengeweben in Struktur und Funktion bei allen Steninen konserviert vorliegen, unterliegen die kleinen Reservoirie und sekretorischen Gewebe meist starken Reduktionen, die bis hin zur Funktionslosigkeit einzelner Strukturen führen können.

Die Sekrete in den großen Reservoirien bestehen aus den Alkaloiden Stenusin, 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin sowie zum Teil aus deren Dehydro- oder Nor-Verbindungen, wobei sowohl die qualitative, als auch die quantitative Zusammensetzung je nach Art unterschiedlich ausfallen kann. Die kleinen Reservoirie enthalten Monoterpene, wie

unter anderem 1,8-Cineol, α -Pinen und 6-Methyl-5-hepten-2-on. In Biotests zeigten alle Sekretkomponenten eine signifikante Aktivität als *Feeding Deterrent* gegen die Ameise *Lasius flavus* und den Fisch *Xiphophorus helleri*. Weiterhin war bei den meisten Verbindungen eine deutliche wachstumshemmende Wirkung gegen Bakterien und Pilze feststellbar. Sowohl bezüglich der fraßhemmenden als auch der antimikrobiellen Wirkung zeigten sich hierbei die Alkaloid-Komponenten den Terpenen meist überlegen. In Tests mit zwei reinen Diastereomeren des in vier Stereoisomeren vorkommenden Stenusins zeigte sich über die biologische Aktivität eines Isomerengemisches hinaus, dass Ameisen zwischen verschiedenen Stereoisomeren diskriminieren, während bei Bakterien stets die gleiche Hemmwirkung zu beobachten ist.

Die in den großen Reservoirien gespeicherten Alkaloide weisen alle ein identisches Grundgerüst mit N-heterocyclischem Sechsring und verzweigter Alkyl-Seitenkette auf. Über Verfütterung deuterierter Aminosäuren konnte die biogenetische Verwandtschaft der drei Alkaloid-Hauptkomponenten Stenusin, 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin und Cicindeloin nachgewiesen werden. In allen drei Fällen wird der N-Heterocyclus aus der Aminosäure L-Lysin, die Seitenkette aus L-Isoleucin gebildet. Die Biosynthese der Alkaloide erfolgt hierbei zunächst identisch, bis hin zu zwei Vorläuferverbindungen, die letztendlich durch wenige chemische Modifikationen in die Sekret-Alkaloide überführt werden können.

Bezüglich der Morphologie der Pygidialdrüsen sowie der qualitativen und quantitativen Sekretkomposition sind evolutive Trends innerhalb der Steninae zu erkennen. In den phylogenetisch basalen Arten *S. comma* und *S. biguttatus* liegt ein stark ausgeprägtes, voll funktionsfähiges kleines Reservoir und Drüsengewebe an der Basis der großen Reservoirie vor. Das Drüsensekret enthält Stenusin, Norstenusin und die im kleinen Reservoir gespeicherten Terpene. Im Laufe der Evolution der Steninae wurde sowohl das kleine Reservoir, als auch das entsprechende Drüsengewebe reduziert und der Terpen-Gehalt des Sekrets minimiert. Desweiteren wurde das Pygidialdrüsensekret zunächst um 3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (z.B. *S. similis*) und später um Cicindeloin (z.B. *S. solutus*) erweitert, wobei Stenusin und Norstenusin mehr und mehr ersetzt wurden.

4. Summary

As typical Staphylinidae, rove beetles of the genera *Stenus* and *Dianous* possess a slim body shape and strongly reduced elytra. This body form enhances the flexibility of the abdomen that allows the beetles to better colonize habitats with small interstices, but also significantly increases the susceptibility to predation and parasitism due to the missing protection of the elytra. To compensate for this disadvantage, the Steninae synthesize and store several highly effective defensive compounds in abdominal defense glands.

The aim of this dissertation was to gain further insights into the complex chemical ecology of the Steninae. The morphology, ultrastructure and function of the pygidial gland system as well as the biological activity of the defense compounds and secretions were analyzed. Furthermore, hypotheses concerning potential evolutionary trends and phylogenetic relationships within the Steninae were formulated based on analyses of the biosynthesis of the nitrogen containing secretion compounds and their distribution among different species.

With regard to the chemical ecology of the Steninae, the pygidial glands are of greatest importance for these beetles. The paired defense glands are located lateral to the gut and dorsal to the genitals in the last three to four segments of the abdomen. They consist of two big reservoirs with a band of secretory tissue, located on the reservoir surface, together with two smaller reservoirs and the corresponding gland tissue situated at the base of the big reservoirs. In both secretory tissues the secretion is produced by gland cells containing an elongated extracellular cavity. The synthesized compounds are secreted via numerous microvilli in the gland cell membrane into the extracellular cavity, where it collects in a cuticular tubulus and is conducted to the corresponding reservoir. External to the gland cell, the tubulus is surrounded by a canal cell, forming together with the gland cell a glandular unit. The structure and function of the big reservoirs and the band of secretory tissue are identical in all Steninae. The small reservoirs, however, as well as their corresponding gland tissues are often more or less reduced and in many species even functionless.

The secretions of the big reservoirs consist of the alkaloid compounds stenusine, 3-(2-methyl-1-butenyl)pyridine and cicindeloin and sometimes the nor- or dehydro-derivates of these compounds, whereby the qualitative, as well as the quantitative composition of the secretion is species specific. The small reservoirs contain monoterpenes such as 1,8-cineole, α -pinene and 6-methyl-5-hepten-2-one and related compounds. In bioassays all secreted compounds revealed a significant deterrent activity against the ant *Lasius flavus* and the fish *Xiphophorus helleri*. Furthermore, an antimicrobial activity against bacteria and fungi was observed with

most secreted compounds. The deterrent, as well as the antimicrobial activity of the alkaloid compounds turned out to be for the most part more effective than the terpenes. In bioassays with two out of four stereoisomers of the chiral compound stenusine ants discriminated between the tested diastereomers, while antibacterial activity was identical with both stenusine isomers.

All alkaloids stored in the big reservoirs exhibit the same molecular base structure consisting of an N-heterocyclic six-ring, substituted by a branched alkyl side chain. By feeding deuterated amino acids to the beetles, it was possible to demonstrate a biogenetical relationship between the alkaloids stenusine, 3-(2-methyl-1-butenyl)pyridine and Cicindeloine. In all three compounds the heterocyclic ring structure is synthesized out of L-lysine and the side chain out of L-isoleucine. The biosynthesis of the compounds first follows an identical pathway up to two precursor molecules that can be transformed into the alkaloid products by a few chemical modifications.

Concerning the morphology of the pygidial glands, as well as the qualitative and quantitative composition of the Steninae's pygidial gland secretions, some evolutionary trends can be recognized. The phylogenetically primitive species *S. comma* and *S. biguttatus* both possess well developed and completely functional small reservoirs and gland tissue at the base of the big reservoirs. The secretion is made up by stenusine, norstenusine, as well as the terpenes stored in the small reservoirs. During evolution of the Steninae, the small reservoir and the corresponding secretory tissue were reduced and the terpene content of the secretion minimized. Subsequently, the alkaloid repertoire was first extended by 3-(2-methyl-1-butenyl)pyridine and later by cicindeloine, whereas stenusine and norstenusine were step by step replaced by other alkaloids.

5. Literaturverzeichnis

- ANDERSEN, N. M. (1976) A comparative study of locomotion on the water surface in semiaquatic bugs (Insecta, Hemiptera, Gerromorpha). *Vidensk. Meddr. Dansk. Naturh. Foren* **139**: 337-396.
- ARAUJO, J. (1978) Anatomie comparée des systèmes glandulaires de défense chimique des Staphylinidae. *Arch. Biol. Bruxelles* **89**:217-250.
- BENFIELD, E. F. (1972) A defensive secretion of *Dineutes discolour* (Coleoptera: Gyrinidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **65**:1324-1327.
- BETZ, O. (1998) Life forms and hunting behavior of some Central European *Stenus* species (Coleoptera, Staphylinidae). *Appl. Soil. Ecol.* **9**:96-74.
- BETZ, O. (1999) A behavioral inventory of adult *Stenus* species (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Nat. Hist.* **33**:1691-1712.
- BIEMONT, J. C., MAHAMADOU, C. & J. POUZAT (1992) Localization and fine structure of the female sex pheromone-producing glands in *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae). *Int. J. Insect Morphol.* **21**:251-262.
- BILLARD, G. & C. BRUYANT (1905) Sur une mode particulier de locomotion de certains *Stenus*. *C. R. Soc. Biol.* **59**:102-103.
- BLUM, M. R. (1981) Chemical defenses of arthropods. Academic Press, New York. 562 S.
- CARREL, J. E. & T. EISNER (1974) Cantharidin: a potent feeding deterrent to insects. *Science* **183**:755-757.
- CONNERT, J. (1974) Zur Strukturaufklärung des Stenusins. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät der Rupprecht-Karl-Universität Heidelberg.
- DETTNER, K. (1983) Vergleichende Untersuchungen zur Wehrchemie und Drüsenmorphologie abdominaler Wehrdrüsen von Kurzflüglern aus dem Subtribus Philonthina (Coleoptera, Staphylinidae). *Z. Naturforsch.* **38c**:319-328.
- DETTNER, K. (1985) Ecological and phylogenetic significance of defensive glands from pygidial glands of Hydradephaga (Coleoptera). *Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.* **137**:156-171.
- DETTNER, K. (1987) Chemosystematics and evolution of beetle chemical defense. *Annu. Rev. Entomol.* **32**:17-48.
- DETTNER, K. (1991) Chemische Abwehrmechanismen bei Kurzflüglern (Coleoptera: Staphylinidae). *Jber. 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**:143-162.
- DETTNER, K. (1997) Inter- and intraspecific transfer of toxic insect compound cantharidin. *In*: DETTNER, K., BAUER, G. & W. VÖLKL (Hrsg.) Vertical food web interactions. Ecological Studies, Band 130. Springer, Heidelberg.
- DETTNER, K. (2003) Insekten als Nahrungsquelle, Abwehrmechanismen. *In*: DETTNER, K. & W. PETERS (Hrsg.) Lehrbuch der Entomologie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 555-599.
- DETTNER, K. (2007) Gifte und Pharmaka aus Insekten - Ihre Herkunft, Wirkung und ökologische Bedeutung. *Entomol. heute* **19**:3-28.
- DETTNER, K. & G. SCHWINGER (1982) Defensive secretions of three Oxytelinae rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Chem. Ecol.* **8**:1411-1420.
- DETTNER, K., SCHWINGER, G. & P. WUNDERLE (1985) The sticky secretion from two pairs of defensive glands of rove beetle *Deleaster dichrous* (Grav.) (Coleoptera: Staphylinidae). Gland morphology, chemical constituents, defensive functions, and chemotaxonomy. *J. Chem. Ecol.* **11**: 859-883.
- DETTNER, K. & G. SCHWINGER (1986) Volatiles from the defensive secretions of two rove beetle species (Coleoptera: Staphylinidae). *Z. Naturforsch. C* **41**: 366-368.
- DETTNER, K. & F. REISSENWEBER (1991) The defensive secretion of Omaliinae and Proteininae (Coleoptera: Staphylinidae): its chemistry, biological and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**:291-303.
- DETTNER, K., SCHEUERLEIN, A., FABIAN, P., SCHULZ, S. & W. FRANCKE (1996) Chemical defense of a giant springtail *Tetradontophora bielansensis* (Waga) (Insecta: Collembola). *J. Chem. Ecol.* **22**:739 1051–1074.
- DRILLING, K., DETTNER, K. & K. KLASS (2010) Morphology of the pronotal compound glands in *Tritoma bipustulata* (Coleoptera: Erotylidae). *Org. Divers. Evol.* **10**:205-214.
- EDMUNDS, M. (1974) Defence in Animals: a survey of anti-predator defences. Longman Inc., New York. 357 S.
- EISNER, T. (2003) For the love of insects. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge/London. 448 S.
- EISNER, T., MEINWALD, J., MONRO, A. & R. GHENT (1961) Defence mechanisms of arthropods - I. The composition and function of the spray of the whipscorpion, *Mastigoproctus giganteus* (Lucas) (Arachnida, Pedipalpida). *J. Insect. Physiol.* **6**:272–298.

- EISNER, T., MCHENRY, F. & M. M. SALPETER (1964) Defense mechanisms of arthropods XV. Morphology of the quinine-producing glands of a Tenebrionid beetle (*Eleodes longicollis* Lec.). *J. Morphol.* **115**:355-400.
- EISNER, T. & J. MEINWALD (1966) Defensive secretions of arthropods. *Science* **153**:1351-1350.
- EISNER, T. & D. J. ANESHANSLEY (2000) Chemical defense: aquatic beetle (*Dineutes hornii*) vs. fish (*Micropterus salmonides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:11313-11318.
- EISNER, T., EISNER, M. & M. SIEGLER (2005) Secret weapons. Defenses of insects, spiders, scorpions and other many-legged creatures. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge/London. 372 S.
- FRANCKE, W. & K. DETTNER (2005) Chemical signaling in beetles. *In*: SCHULZ, S. (Hrsg.) Topics in current chemistry. Band 240. Springer, Heidelberg. S. 85–166.
- GREBENNIKOV, V. V. & A. F. NEWTON (2009) Good-bye Scydmaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae sensu latissimo (Coleoptera). *Eur. J. Entomol.* **106**:275-301.
- GROSS, D. (1985) Alkaloids derived from nicotinic acid. *In*: MOTHESE, K., SCHÜTTE, H. R. & M. LUCKNER (Hrsg.) Biochemistry of Alkaloids. VCH, Weinheim. S. 163-183.
- GUPTA, R. N. & I. D. SPENSER (1969) Biosynthesis of the Piperidine Nucleus. *J. Biol. Chem.* **244**:88-94.
- HAPP, G. M. & T. EISNER (1961) Hemorrhage in a coccinellid beetle and its repellent effect on ants. *Science* **134**:329-331.
- HAPP, G. M. & C. M. HAPP (1973). Fine structure of the pygidial glands of *Bledius mandibularis* (Coleoptera: Staphylinidae). *Tissue Cell* **5**: 215-231.
- HAPP, G. M., STRANDBERG, J. D. & C. M. HAPP (1966) The terpene-producing glands of a phasmid insect cell morphology and histochemistry. *J. Morphol.* **119**:143-160.
- HUTH, A. & K. DETTNER (1990) Defense chemicals from abdominal glands of 13 rove beetle species of subtribe Staphylinina (Coleoptera: Staphylinidae, Staphylininae). *J. Chem. Ecol.* **16**:2691-2711.
- JEFSON, M., MEINWALD, J., NOWICKI, S., HICKS, K. & T. EISNER (1983) Defense Mechanisms of Arthropods 69 - Chemical defense of a rove beetle (*Creophilus maxillosus*). *J. Chem. Ecol.* **9**:159-180.
- JENKINS, M. F. (1957) The morphology and anatomy of the pygidial glands of *Dianous coerulescens* Gyllenhal (Coleoptera: Staphylinidae). *Proc. Roy. Entomol. Soc. Lond.* **32**:159-169.

- KOCH, K. (1989) Die Käfer Mitteleuropas: Ökologie. Band 1. Goecke and Evers, Krefeld. S. 258-272.
- KOERNER, L., LAUMANN, M., BETZ, O. & M. HEETHOFF (2013). Loss of the sticky harpoon - COI sequences indicate paraphyly of *Stenus* with respect to *Dianous* (Staphylinidae, Steninae). *Zool. Anz.* **252**:337-347.
- KOHLER, P. (1979) Die absolute Konfiguration des Stenusins und die Aufklärung weiterer Inhaltsstoffe des Spreitungsschwimmers *Stenus comma*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät der Rupprecht-Karl-Universität Heidelberg.
- KOVAC, D. & U. MASCHWITZ (1989) Secretion-grooming in the water bug *Plea minutissima*: a chemical defence against microorganisms interfering with the hydrofuge properties of the respiratory region. *Ecol. Entomol.* **14**:403-411.
- KOVAC, D. & U. MASCHWITZ (1990) Secretion-grooming in aquatic beetles (Hydradeptera): a chemical protection against contamination of the hydrofuge respiratory region. *Chemoecology* **1**:131-138.
- LANG, C., SEIFERT, K. & K. DETTNER (2012) Skimming behaviour and spreading potential of *Stenus* species and *Dianous coerulescens* (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften* **99**:937-947.
- LANE, N. J. (1982) Insect intercellular junctions: their structure and development. In: KING, R. & H. AKAI (Hrsg.) Insect ultrastructure. Band 1. Plenum Press, New York/London. S. 402-433.
- LEDERHAUSE, R. C. (1990) Avoiding the hunt: primary defenses of lepidopteran caterpillars. In: EVANS, D. L. & J. O. SCHMIDT (Hrsg.) Insect defenses: Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators. State University of New York Press, New York. S. 175-189.
- LESCHEN, R. A. B. & A. F. NEWTON (2003) Larval description, adult feeding behaviour, and phylogenetic placement of *Megalopinus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Coleopt. Bull.* **57**:469-493.
- LINSENMAIR, K. E. (1963) Eine bislang unbekannte Fortbewegungsart bei Insekten: Das Entspannungsschwimmen. *Kosmos* **59**:331-334.
- LINSENMAIR, K. E. & R. JANDER (1963) Das Entspannungsschwimmen von *Velia* und *Stenus*. *Naturwissenschaften* **50**:231.
- LOCKE, M. & P. HUIE (1979) Apolysis and the turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue Cell* **11**:277-291.

- LUSEBRINK, I. (2007) Stereoisomerie, Biosynthese und biologische Wirkung des Stenusins sowie weitere Inhaltsstoffe der Pygidialdrüsen der Kurzflüglergattung *Stenus* (Staphylinidae, Coleoptera). Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- LUSEBRINK, I., BURKHARDT, D., GEDIG, T., DETTNER, K., MOSANDL, A. & K. SEIFERT (2007) Intrageneric differences in the four stereoisomers of stenusine in the rove beetle genus, *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Naturwissenschaften* **94**:143–147.
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K. & K. SEIFERT (2008a) Biosynthesis of stenusine. *J. Nat. Prod.* **71**:743-745.
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K. & K. SEIFERT (2008b) Stenusine, an antimicrobial agent in the rove beetle genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Naturwissenschaften* **95**:751-755.
- LUSEBRINK, I., DETTNER, K., SCHIERLING, A., MÜLLER, T., DAOLIO, C., SCHNEIDER, B., SCHMIDT, J., & K. SEIFERT (2009). New pyridine alkaloids from rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Z. Naturforsch. C* **64**:271-278.
- MASCHWITZ, U. (1967) Eine neuartige Form der Abwehr von Mikroorganismen bei Insekten. *Naturwissenschaften* **54**:649.
- MORGAN, E. D. (2004) Biosynthesis in insects. RSC, Cambridge. 199 S.
- MORI, K. (1999) Miscellaneous natural products including marine natural products, pheromones, plant hormones, and aspects of ecology. In: BARTON, D., NAKANISHI, K. & O. METH-COHN (Hrsg.) Comprehensive natural product chemistry. Band 8. Elsevier, Oxford. 749 S.
- MÜLLER, T. (2011) Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese von Alkaloiden aus *Stenus* Käfern und der Seeanemone *Heteractis aurora*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- MÜLLER, T., GÖHL, M., LUSEBRINK, I., DETTNER, K. & K. SEIFERT (2012) Cicindeloinine from *Stenus cicindeloides* - isolation, structure elucidation and total synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* 2323-2330.
- NAOMI, S.-I. (1985) The phylogeny and higher classification of the Staphylinidae and their allied groups (Coleoptera, Staphylinoidae). *Esakia* **23**:1-27.
- NEUMANN, S. (1993) Die Analdrüsen der Spreitungsschwimmer (Coleoptera: Staphylinidae). Chemie und biologische Bedeutung. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- NOIROT, C. & A. QUENNEDEY (1974) Fine structure of insect epidermal glands. *Annu. Rev. Entomol.* **19**:61-80.

- NOIROT, C. & A. QUENNEDEY (1991) Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **27**:123-128.
- PAVAN, M. (1975) Sunto delle attuali conoscenze sulla pederina. *Publ. Ist. Entomol. Univ. Pavia* **1**:1-35.
- PIFFARD, A. (1901) Steni gliding on the surface of water. *Entomols. Month. Mag.* **12**:99.
- POUPON, E., KUNESCH, N. & H.-P. HUSSON (2000) An expeditious total synthesis of natural stereoisomeric mixture of stenusine following a possible biogenetic pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **112**:1553–1555.
- PUTHZ, V. (1971) Revision der afrikanischen Steninenfauna und Allgemeines über die Gattung *Stenus* Latreille (Coleoptera, Staphylinidae). *Ann. Mus. Roy. Afr. Centr.* **187**:1-376.
- PUTHZ, V. (1981) Was ist *Dianous* Leach, 1819, was ist *Stenus* Latreille, 1796? Oder: Die Aporie des Stenologen und ihre taxonomischen Konsequenzen (Coleoptera: Staphylinidae) 180. Beitrag zur Kenntnis der Steninen. *Entomol. Abh. Mus. Tierkd. Dresd.* **44**: 87-132.
- PUTHZ, V. (2006) Revision der neotropischen *Stenus* (*Tesnus*) Arten (Coleoptera: Staphylinidae) 288. Beitrag zur Kenntnis der Steninen. *Rev. Suisse Zool.* **113**: 617-674 (incl. persönlicher Kommentare von V. Puthz).
- PUTHZ, V. (2008) *Stenus* Latreille und die segenreiche Himmelstochter (Coleoptera, Staphylinidae). *Linz. Biol. Beitr.* **40**:137-230.
- PUTHZ, V. (2010) *Stenus* Latreille, 1797 aus dem baltischen Bernstein nebst Bemerkungen über andere fossile *Stenus*-Arten (Coleoptera, Staphylinidae) 313. Beitrag zur Kenntnis der Steninen. *Entomol. Bl.* **106**:265-287 (incl. persönlicher Kommentare von V. Puthz).
- PUTHZ, V. (2012) Unterfamilie Steninae. In: ASSING, V. & M. SCHÜLKE (Hrsg.) Freude-Harde-Lohse-Klausnitzer - Die Käfer Mitteleuropas. Band 4: Staphylinidae I, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 286-317.
- QUENNEDEY, A. (1998) Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. In: HARRISON, F. W. & M. LOCKE (Hrsg.) Microscopic Anatomy of Invertebrates. Band 11A. Wiley-Liss, London. S. 177-207.
- ROBINSON, M. H. (1969) Defenses against visually hunting predators. *Evol. Biol.* **3**:225-259.
- ROBINSON, T. (1981) The Biochemistry of Alkaloids. In: KLEINZELLER, A., SPRINGER, G. F. & H. G. WITTMANN (Hrsg.) Molecular Biology Biochemistry and Biophysics. Band 3. Springer, New York. S. 35-48.

- ROTH, L. M. & T. EISNER (1962) Chemical defense of arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **7**:107-136.
- SCHILDKNECHT, H. (1970) The defensive chemistry of land and water beetles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **9**:1-9.
- SCHILDKNECHT, H. (1976) Chemical ecology - chapter of modern natural-products chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **15**:214-222.
- SCHILDKNECHT, H., KRAUSS, D., CONNERT, J., ESSENBREIS, H. & N. ORFANIDES (1975) The spreading alkaloid stenusine from the Staphylinid *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). *Angew. Chem. Int. Ed.* **14**:427-427.
- SCHILDKNECHT, H., BERGER, D., KRAUSS, D., CONNERT, J., GELHAUS, J. & H. ESSENBREIS (1976) Defense chemistry of *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Chem. Ecol.* **2**:1-11.
- SCHMIDT, J. O. (1990a) Predation prevention: chemical and behavioral counterattack. *In*: EVANS, D. L. & J. O. SCHMIDT (Hrsg.) Insect defenses. Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators. State University of New York Press, New York. S. 227-228.
- SCHMIDT, J. O. (1990b) Hymenopteran Venoms: striving toward the ultimate defense against vertebrates. *In*: EVANS, D. L. & J. O. SCHMIDT (Hrsg.) Insect defenses. Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators. State University of New York Press, New York. S.387-419.
- SHOWER, J. A. & D. H. KISTNER (1977) The natural history of the myrmecophilous tribe Pygostenini (Coleoptera: Staphylinidae). Section 4. Glandular anatomy of Pygostenini. *Sociobiology* **2**:305-326.
- STEIDLE, J. L. M. & K. DETTNER (1993) Chemistry and morphology of the tergal gland of freelifing adult Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae) and its phylogenetic significance. *Syst. Entomol.* **18**:149-168.
- TOPPEL, G., WITTE, L. & T. HARTMANN (1988) N-Oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry* **27**:3757-3760.
- WHITMAN, D. W., BLUM, M. S. & D. W. ALSOP. (1990) Allomonones: Chemicals for defense. *In*: EVANS, D. L. & J. O. SCHMIDT (Hrsg.) Insect defenses. Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators. State University of New York Press. New York, S.289-351.

Teil II

Publikationen
und
Publikationsmanuskripte

Publikationen und Publikationsmanuskripte

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System veröffentlicht.

Schierling, A. & Dettner, K. (2013) The Pygidial Defense Gland System of the Steninae (Coleoptera, Staphylinidae): Morphology, Ultrastructure and Evolution. *Arthropod Structure & Development* **42**:197-208.

Schierling, A., Seifert, K., Sinterhauf, S. R., Rieß, J. B., Rupprecht, J. C. & Dettner, K. (2013) The Multifunctional Pygidial Gland Secretion of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): Ecological Significance and Evolution. *Chemoecology* **23**:45-57.

Schierling, A., Schott, M., Dettner, K. & Seifert, K. (2011) Biosynthesis of the Defensive Alkaloid (Z)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridine in *Stenus similis* Beetles. *Journal of Natural Products* **74**:2231-2234.

Schierling, A., Dettner, K., Schmidt, J. & Seifert, K. (2012) Biosynthesis of the Defensive Alkaloid Cicindeloine in *Stenus solutus* Beetles. *Naturwissenschaften* **99**:665-669.

Weitere Publikationen:

Lusebrink, I., Dettner, K., **Schierling, A.,** Müller, T., Daolio, C., Schneider, B., Schmidt J. & Seifert K. (2009). New pyridine alkaloids from rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Zeitschrift für Naturforschung C* **64**:271-278

Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen:

Publikation I:

Schierling, A. & Dettner, K. (2013) The Pygidial Defense Gland System of the Steninae (Coleoptera, Staphylinidae): Morphology, Ultrastructure and Evolution. *Arthropod Structure & Development* **42**:197-208.

Die untersuchten Steninae wurden von mir gesammelt und bestimmt. Alle Methoden zur elektronenmikroskopischen Gewebeanalyse wurden von mir weitestgehend selbstständig durchgeführt. Die Herstellung der Dünnschnitte der in Kunstharz eingebetteten Präparate wurde von Frau Rita Grotjahn (Labor für Elektronenmikroskopie, Universität Bayreuth), die Bedienung des Rasterelektronenmikroskops von Frau Martina Heider (Bayreuther Institut für Makromolekülforschung) übernommen. Die Auswertung aller Aufnahmen wurde von mir ausgeführt und das Manuskript von mir verfasst.

Publikation II:

Schierling, A., Seifert, K., Sinterhauf, S. R., Rieß, J. B., Rupprecht, J. C. & Dettner, K. (2013) The Multifunctional Pygidial Gland Secretion of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): Ecological Significance and Evolution. *Chemoecology* **23**:45–57.

Die untersuchten Steninae wurden von mir gesammelt und bestimmt. Die GCMS-Analysen zur qualitativen Sekretzusammensetzung wurden von mir selbstständig ausgeführt und ausgewertet. Die Biotests wurden von mir etabliert, größtenteils eigenhändig durchgeführt und ausgewertet. Einige der Biotests sowie die quantitative Sekretanalyse wurden im Rahmen von Bachelorarbeiten unter meiner Mitbetreuung durchgeführt. Der Stammbaum der Steninae wurde zusammen mit Prof. K. Dettner (LS Tierökologie II, Universität Bayreuth) entwickelt, das Manuskript von mir eigenhändig verfasst.

Publikation III:

Schierling, A., Schott, M., Dettner, K. & Seifert, K. (2011) Biosynthesis of the Defensive Alkaloid (Z)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridine in *Stenus similis* Beetles. *Journal of Natural Products* **74**:2231-2234.

Die untersuchten Steninae wurden von mir gesammelt und bestimmt, die angewendeten Methoden und Experimente von mir durchgeführt und interpretiert. Die HRESI/MS-Analysen wurden von Matthias Schott und dessen Mitarbeitern (JLU Gießen) durchgeführt. Das

Biosyntheschema wurde zusammen mit Prof. K. Seifert (LS Organische Chemie, Universität Bayreuth) entwickelt, das Manuskript von mir eigenhändig verfasst.

Publikation IV:

Schierling, A., Dettner, K., Schmidt, J. & Seifert, K. (2012) Biosynthesis of the Defensive Alkaloid Cicindeloine in *Stenus solutus* Beetles. *Naturwissenschaften* **99**:665-669.

Die untersuchten Steninae wurden von mir gesammelt und bestimmt, die angewendeten Methoden und Experimente von mir durchgeführt und interpretiert. Die Ermittlung des Fragmentierungsmusters des Cicindeloins unter CI-Bedingungen erfolgte durch Jürgen Schmidt und dessen Mitarbeiter (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle). Das Biosynthese-Schema wurde zusammen mit Prof. K. Seifert (LS Organische Chemie, Universität Bayreuth) entwickelt, das Manuskript von mir eigenhändig verfasst.



**The Pygidial Defense Gland System of the Steninae
(Coleoptera, Staphylinidae): Morphology, Ultrastructure
and Evolution.**

A. Schierling & K. Dettner

Arthropod Structure & Development (2013) **42**:197-208

Link: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1467803913000236>



The Multifunctional Pygidial Gland Secretion of the Steninae (Coleoptera: Staphylinidae): Ecological Significance and Evolution.

A. Schierling, K. Seifert, S. R. Sinterhauf, J. B. Rieß, J. C. Rupprecht & K. Dettner
Chemoecology (2013) **23**:45–57

Link: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00049-012-0118-6>



Biosynthesis of the Defensive Alkaloid (Z)-3-(2-Methyl-1-butenyl)pyridine in *Stenus similis* Beetles.

A. Schierling, M. Schott, K. Dettner & K. Seifert
Journal of Natural Products (2011) **74**:2231-2234

Link: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/np200621d>



Biosynthesis of the Defensive Alkaloid Cicindeloine in *Stenus solutus* Beetles.

A. Schierling, K. Dettner, J. Schmidt & K. Seifert
Naturwissenschaften (2012) **99**:665-669

Link: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00114-012-0945-x>

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen Personen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen oder diese überhaupt ermöglicht haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Konrad Dettner für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die Unterstützung durch zahlreiche Diskussionen und fachliche Hilfen. Weiterhin sei Prof. Dr. Karlheinz Seifert vom Lehrstuhl der Organischen Chemie in Bayreuth für die hervorragende Kooperation und die große Hilfsbereitschaft bei der Lösung diverser chemischen Fragestellungen gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Tierökologie II, besonders bei Matthias Schott, Dr. Siegfried Kehl, Carolin Lang und Stefan Küchler für die stets hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Volker Puthz danke ich für viele wichtige Hinweise bezüglich der Steninen-Phylogenie und der Überlassung mehrerer hilfreicher Publikationen.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls der Organischen Chemie Dr. Tobias Müller, Isabel Wittmann und Johannes Kaldun sei für die Synthese und Bereitstellung der authentischen Sekretverbindungen für Biotests und Strukturaufklärung gedankt.

Den Technischen Angestellten Rita Grotjahn und Martina Heider danke ich für die Hilfe bei der Vorbereitung der Präparate zur Elektronenmikroskopie und der Bedienung der Anlagen.

Größten Dank verdienen auch meine Familie und meine Freundin Martina Elsner, die mich stets bedingungslos unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, im März 2013 - Andreas Schierling

