

5.2 Histologische Untersuchung der Endosymbiose

Schroeder und Kollegen (1996) konnten zeigen, dass die Endosymbionten sowohl im Mitteldarmepithel von Arbeiterinnen als auch in den Oocyten von Königinnen zu finden sind.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Lokalisation der Endosymbionten innerhalb aller adulten Ameisenkasten genauer zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Weg der Symbionten während der Embryonalentwicklung genauer analysiert werden.

Für die Untersuchungen an adulten Individuen wurden zuerst die Mitteldärme von Arbeiterinnen, Männchen und begatteten bzw. unbegatteten Königinnen mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Bei Männchen die von Arbeiterinnen abstammen, konnten im Mitteldarm bisher (Schröder 1996) nur sehr wenige Endosymbionten gefunden werden. Daher wurden die Mitteldärme von Männchen, die von Arbeiterinnen bzw. Königinnen produziert waren, untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 9-13 dargestellt. Aufgrund der Annahme, dass die Bakterien ausschließlich vertikal übertragen werden, wurden anschließend die Ovarien von begatteten bzw. unbegatteten Königinnen sowie von Arbeiterinnen genauer betrachtet (Abb. 12-14). Ein weiterer, theoretisch denkbarer Übertragungsweg besteht darin, dass die Königin die Bakterien während der Paarung mit den Spermien erhält. Dies würde bedeuten, dass die Weitergabe der Bakterien durch die Männchen erfolgt. Diese Hypothese sollte durch die Untersuchung der Spermatheka begatteter Königinnen näher analysiert werden (Abb. 15).

Um Infektions- und Übertragungsweg innerhalb von Eiern und Larven verschiedener Größe zu verfolgen, wurden *In Situ*-Hybridisierungen mit artspezifischen Oligonukleotidsonden an Kryoschnitten von Eiern und Larven vorgenommen (Abb. 17). Zusätzlich wurden einige dieser Schnitte für elektronenmikroskopische Untersuchungen eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt (Abb. 18 und 19).

Als Untersuchungsobjekte dienten, bis auf wenige Ausnahmen, Tiere der Art *Camponotus floridanus*.

5.2.1 Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Gewebepräparate adulter Ameisen

5.2.1.1 Mitteldarmpräparate

Nachfolgend werden Mitteldarmpräparate von Arbeiterinnen, Männchen und begatteten bzw. unbegatteten Königinnen dargestellt. Die Mitteldarmepithelien konnten nach Karnovsky/Osmiumtetroxid-Fixierung und einer Einbettung in Epon sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht werden. Es war möglich, nach Anfertigung von 1 μm dicken Schnitten für die Lichtmikroskopie, vom selben Präparat Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie anzufertigen. Hiermit war eine vergleichende Analyse der Mitteldärme mit beiden mikroskopischen Techniken möglich.

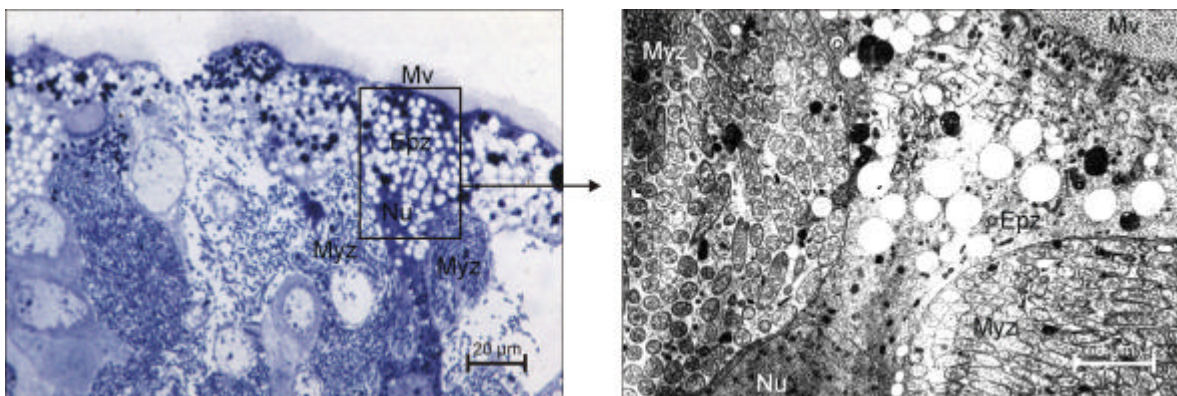


Abb. 9: Querschnitt durch das Mitteldarmepithel einer *C. floridanus* Arbeiterin. Man sieht Myzetozyten (Myz), die deutlich von den umgebenden Darmepithelzellen (Epz) abgegrenzt sind. Die Myzetozyten sind mit längs und quer angeschnittenen Bakterien gefüllt. An der apikalen Seite der Epithelzellen befindet sich der Mikrovillisaum (Mv). links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Nu: Nukleus der Epithelzelle.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Arbeiterinnen (Abb. 9) zeigten, dass das Mitteldarmepithel aus zwei unterschiedlichen Zellarten besteht. An der apikalen Seite typische Epithelzellen und an der Basalseite Zellen, die zwischen die Epithelzellen interkalieren und große Mengen stäbchenförmiger Bakterien enthalten. Die Darmepithelzellen tragen den Mikrovillisaum an ihrer apikalen Seite, sie besitzen einen Zellkern und enthalten zahlreiche sekretorische Vesikel. Die bakterientragenden Zellen werden Myzetozyten genannt. Sie sind von einer Membran umgeben, besitzen einen eigenen Zellkern und grenzen sich deutlich von den umgebenden Darmepithelzellen ab. Die darin enthaltenen Bakterien liegen frei im Zytoplasma der Zellen vor. Bisher konnten

keine Myzetozyten gefunden werden, die wie die Epithelzellen einen Mikrovillisaum tragen. Sowohl in großen, als auch in kleinen Arbeiterinnen zeigt sich die gleiche Mitteldarm-Morphologie.

In den Mitteldärmen von begatteten und unbegatteten Königinnen (Abb. 10 und 11) fanden sich die gleichen Zelltypen wie bereits für die Arbeiterinnen beschrieben. Auffällig war jedoch, dass die Mitteldarmepithel älterer Königinnen ($n=3$) weniger Myzetozyten enthielten (Abb. 10), als die der jüngeren Königinnen ($n=2$) (Abb. 11) und der Arbeiterinnen (Abb. 9). Es wurden auch Myzetozyten gefunden, die gar nicht oder nur mit sehr wenigen Endosymbionten gefüllt waren (Abb. 10; rechts).

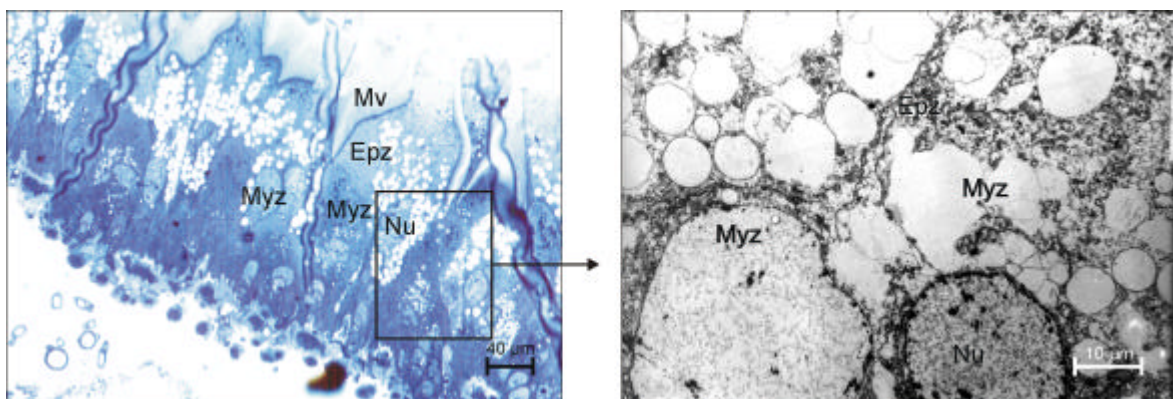


Abb. 10: Querschnitt durch das Mitteldarmepithel einer mehrere Jahre alten, begatteten *C. floridanus* Königin. Man sieht Myzetozyten (Myz), die von einer eigenen Membran umgeben sind, jedoch keine Bakterien enthalten. links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Mv: Mikrovillisaum, Epz: Epithelzelle, Nu: Nukleus der Epithelzelle.

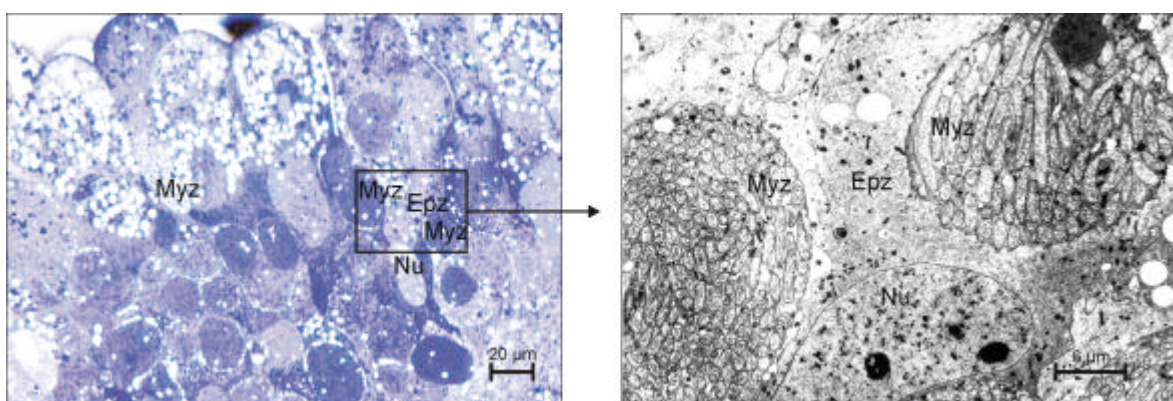


Abb. 11: Querschnitt durch das Mitteldarmepithel einer jungen, erst einige Wochen alten, unbegatteten *C. floridanus* Königin. Man sieht Myzetozyten (Myz), die mit längs und quer angeschnittenen Bakterien gefüllt und von einer eigenen Membran umgeben sind. Die Myzetozyten interkalieren in die Epithelzellen des Mitteldarms (Epz). links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Nu: Nukleus der Epithelzelle.

Aufgrund der haplo-diploiden Geschlechtsbestimmung der *Hymenopteren*, bei der sich aus befruchteten Eiern weibliche Individuen und aus unbefruchteten Eiern Männchen entwickeln, sind auch Ameisenarbeiterinnen in der Lage, unter bestimmten Voraussetzungen, haploide „Männcheneier“ zu produzieren. Werden Arbeiterinnengruppen isoliert von ihrer Königin gehalten, so wird die Entwicklung ihrer Ovarien induziert. Aus den nach wenigen Wochen gelegten Eiern entwickeln sich fertile, lebensfähige Männchen. Unabhängig davon, ob ein Männchen von der Königin oder von einer Arbeiterin produziert wurde, konnten in ihren Mitteldärmen bakteriengefüllte Myzetozyten gefunden werden, die sich in Morphologie und Symbiontengehalt nicht unterscheiden. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnten in den vesikelreichen Mitteldarm-Epithelzellen der von Königinnen produzierten Männchen ebenfalls Symbionten gefunden werden. Bei den von Arbeiterinnen produzierten Männchen findet man die gleichen Verhältnisse. Auch sie besitzen Symbionten innerhalb ihrer Mitteldarm-Epithelzellen (Abb. 13).

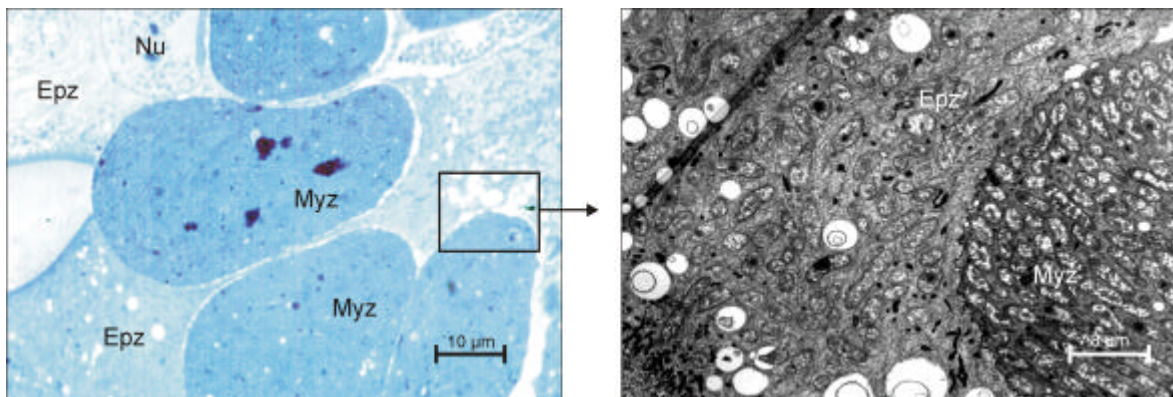


Abb. 12: Querschnitt durch das Mitteldarmepithel eines *C. floridanus* Männchens, das von einer Königin produziert wurde. Man sieht Myzetozyten (Myz), die mit längs und quer angeschnittenen Bakterien gefüllt sind. Die Myzetozyten sind durch eine Membran von den sie umgebenden Darmepithelzellen (Epz) abgegrenzt. Innerhalb der Epithelzelle sieht man längs und quer angeschnittene Bakterien. links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Nu: Nukleus der Epithelzelle.

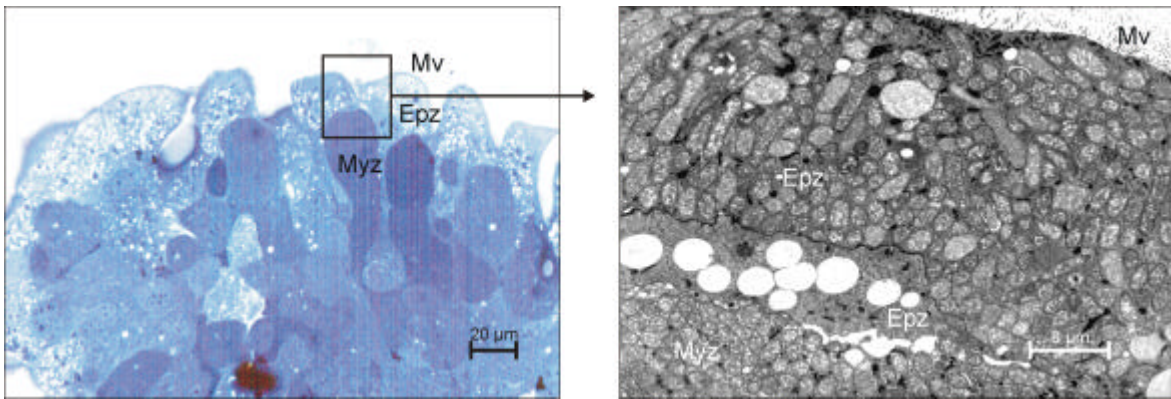


Abb. 13: Querschnitt durch das Mitteldarmepithel eines *C. floridanus* Männchens, das von einer Arbeiterin produziert wurde. Man sieht eine bakteriengefüllte Myzetozyte (Myz), die sich durch eine Membran von den sie umgebenden Epithelzellen (Epz) abgrenzen. Innerhalb der Epithelzelle (Epz) findet man längs und quer angeschnittene Bakterien. An ihrer apikalen Seite trägt diese Zelle den Mikrovillisaum (Mv). links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme.

5.2.1.2 Ovarienpräparate

Alle untersuchten adulten Individuen enthielten innerhalb ihres Mitteldarmepithels Symbionten. Um Hinweise auf die angenommene transovariable Weitergabe der Symbionten zu erhalten, wurden auch die Ovarien von Königinnen und Arbeiterinnen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei konnten sowohl bei Arbeiterinnen als auch bei den Königinnen große Bakterienmengen innerhalb der Oocyten gefunden werden (Abb. 14 und 15).

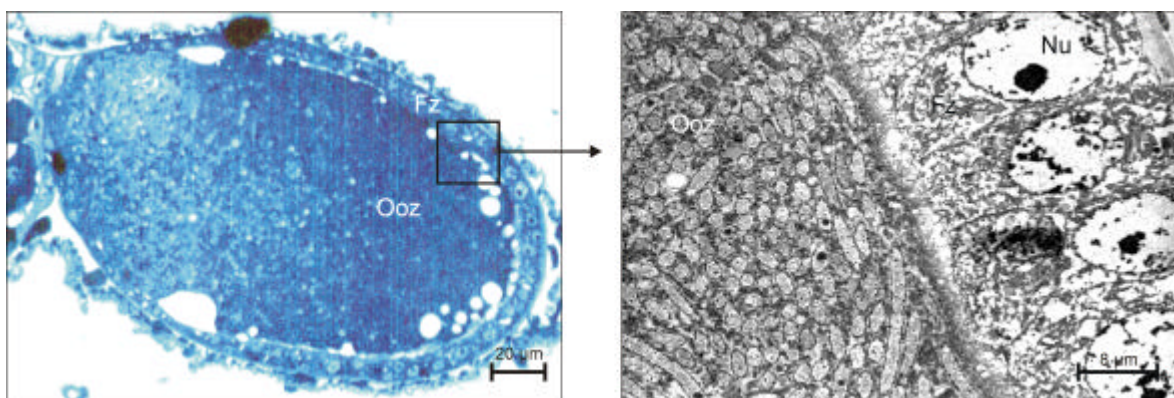


Abb. 14: Längsschnitt durch das Ovar einer *C. ligniperdus* Königin. Innerhalb der Oozyte (Ooz) befinden sich große Mengen, längs und quer angeschnittener Bakterien. Die an die Oozyte angrenzenden Follikelzellen (Fz) sind bakterienfrei. links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Nu: Nukleus der Follikelzelle.

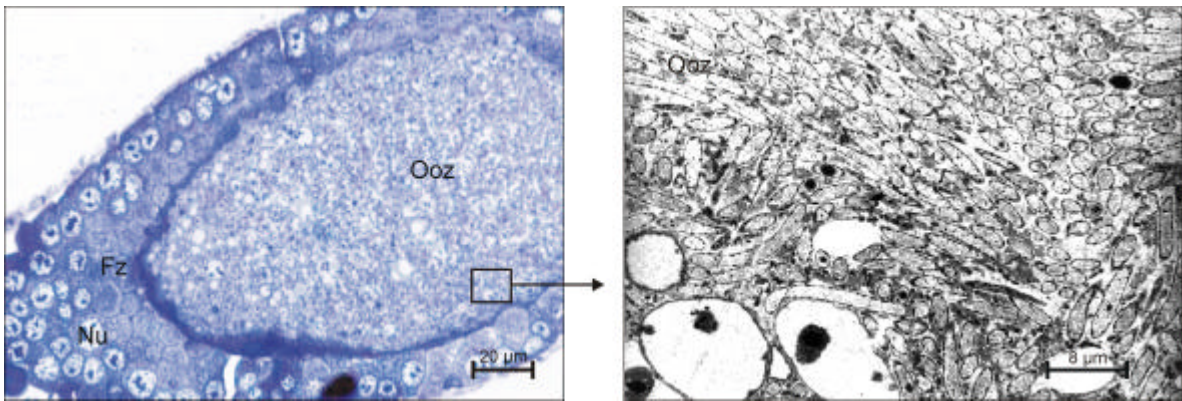


Abb. 15: Längsschnitt durch das Ovar einer *C. floridanus* Arbeiterin. Innerhalb der Oozyte (Ooz) befinden sich große Mengen längs und quer angeschnittener Bakterien. links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Fz: Follikelzelle, Nu: Nukleus der Follikelzelle.

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen Längsschnitte durch Arbeiterinnen- bzw. Königinnenovarien. Wie in beiden Fällen zu sehen ist, sind sowohl die Eizellen von Königinnen, als auch die von Arbeiterinnen prall mit Symbionten gefüllt. Die den Eizellen benachbarten Follikelzellen sind bakterienfrei.

Auch an den Ovarienenden findet man Oozyten, die zwar noch lange nicht „reif“ sind, jedoch schon Symbionten tragen (Abb. 16). Im umliegenden Gewebe der Ovarien konnten keine Symbionten gefunden werden.

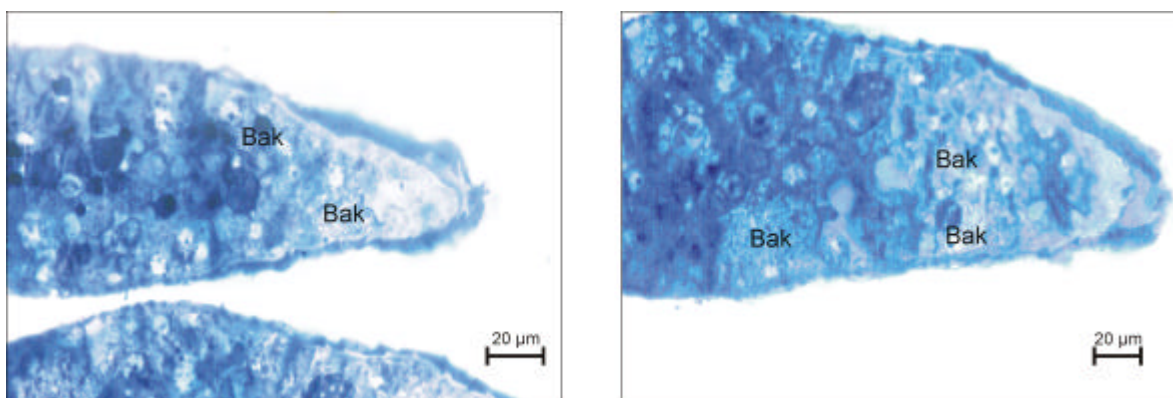


Abb. 16: Längsschnitt durch den Endbereich des Ovars einer *C. ligniperdus* Königin. Man sieht innerhalb der „unreifen“ Oozyte große Bakterienmengen (Bak).

5.2.1.3 Spermathekapräparate

Bisher gibt es keine Hinweise auf eine mögliche Wirkung der *Camponotus*-Symbionten auf die Reproduktivität ihres Wirtes. Denkbar wäre jedoch, dass die Männchen ähnlich wie bei den beschriebenen, *Wolbachia*-infizierten Hymenopterenarten, durch Weitergabe ihrer Symbionten auf die Weibchen einen Einfluß auf ihre eigene Fitness nehmen könnten. Die Untersuchung männlicher Geschlechtsorgane mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gestaltete sich sehr schwierig, da nach Fixierung und Einbettung der Präparate nicht mehr bestimmt werden konnte, um welchen Teil der Geschlechtsorgane es sich genau handelte. Dennoch wurde in keinem der elektronenmikroskopischen Präparate Bakterien gefunden (ohne Abbildung). Eine einfache Lösung dieses Problems war daher die Untersuchung von Spermatheken der Königinnen, die auf das Vorhandensein von Symbionten überprüft wurden (Abb. 17).

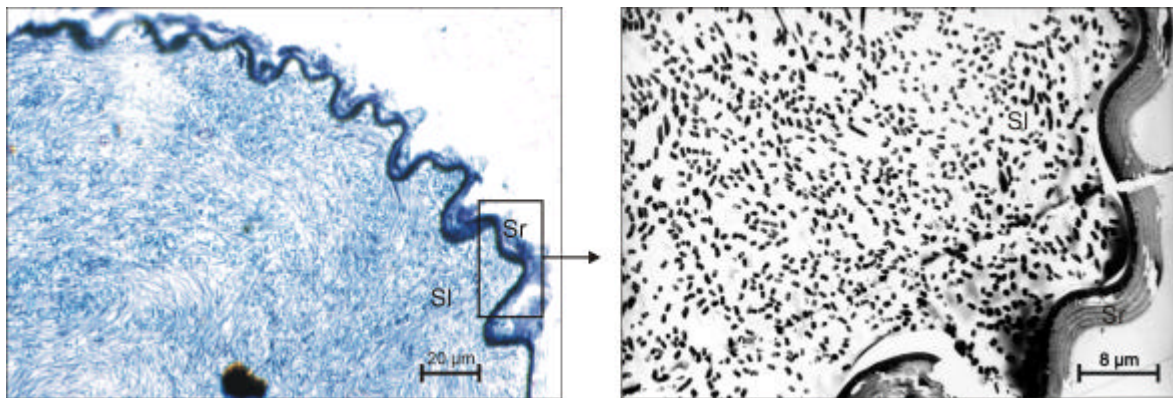


Abb. 17: Querschnitt durch die Spermatheka einer *C. floricornis* Königin. Innerhalb des Spermathekalumens (Sl) befinden sich riesige Spermienmengen. Bakterien können nicht gefunden werden. links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Sr: Spermathekarand.

Eine *Camponotus*-Königin paart sich nur einmal in ihrem Leben. Sie erhält dabei von einem oder mehreren Männchen Spermien, die sie in ihrer Spermatheka aufbewahrt. Über die Konservierung der Spermien innerhalb der Spermatheka gibt es noch keine genaueren Untersuchungen, jedoch bleiben sie bis ans Lebensende der Königin befruchtungsfähig. Um zu untersuchen, ob die Königin von Männchen mit Bakterien infiziert wird, wurden die Spermatheken mehrerer Königinnen untersucht. Da die Spermatheka der einzige Ort ist, mit dem der männliche Samen in Kontakt kommt, sollten dort, im Falle einer Infektion durch das männliche Sperma, Bakterien zu finden sein. Im Lumen aller untersuchten

Spermatheken (n = 4) konnten jedoch niemals Symbionten gefunden werden (Abb. 17; rechts).

5.2.2 Detektion der Endosymbionten durch *In situ*-Hybridisierungen innerhalb verschiedener Entwicklungsstadien der Ameisen

Durch *In situ*-Hybridisierungen an Quetschpräparaten von Mitteldärmen konnte schon gezeigt werden, dass die mittels PCR erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen des phylogenetischen Stammbaumes der Symbionten (Abb. 3) tatsächlich von diesen Bakterien stammen (Schroeder et al. 1996, Schröder 1996). Durch die Entwicklung von artspezifischen Oligonukleotidsonden war es möglich, die Symbionten der einzelnen *Camponotus*-Arten spezifisch und gezielt im Gewebe nachzuweisen. Leider gelang es damals nicht, die Hybridisierungen an mikroskopischen Gewebeschnitten durchzuführen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Infektionsweg der Symbionten mit Hilfe mikroskopischer Techniken näher zu untersuchen. Über den weiteren Weg den die Symbionten innerhalb des Eies bzw. der unterschiedlichen Larvenstadien nehmen, gab es bisher kaum detaillierte Untersuchungen. Um sich die genaue Lage der Symbionten während der Embryogenese der Ameisen anzuschauen eignete sich die *In situ*-Hybridisierung sehr gut. Mit ihrer Hilfe gelang es, die Symbionten der jeweiligen zu untersuchenden *Camponotus*-Art spezifisch sichtbar zu machen. Hierfür wurden Kryoschnitte von Eiern und vier unterschiedlichen Larvenstadien der Ameisenart *C. floridanus* angefertigt (Abb. 18). Mit Hilfe der spezifischen DIG-markierten Oligonukleotidsonde *flori3* wurde an den Kryoschnitten eine *In situ*-Hybridisierung durchgeführt und so die genaue Position der Symbionten innerhalb der unterschiedlichen Entwicklungsstadien bestimmt (Abb. 19). Durch eine Enzym-katalysierte Farbreaktion kommt es an den Stellen im Gewebe, wo der Anti-DIG-Antikörper an die markierte Oligonukleotidsonde bindet zu einem blauen Farbniederschlag. Als Negativkontrolle diente die DIG-markierte Oligonukleotidsonde *hercu2*, welche nur die Symbionten von *C. herculeanus* spezifisch nachweist, d.h. keine Färbung bei *C. floridanus* erzielt.

Die *In Situ*-Hybridisierungen mit der *flori3*-Oligonukleotidsonde an den unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Art *Camponotus floridanus* (Abb. 18) sollte neue Erkenntnisse über den Weg der Symbionten während der Embryogenese bringen.

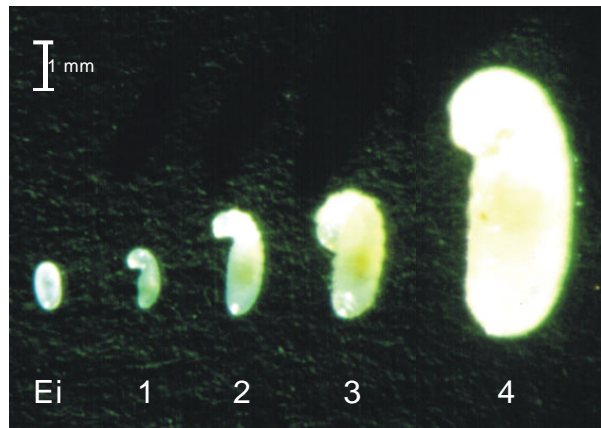


Abb. 18: Für *In situ*-Hybridisierungen verwendete Entwicklungsstadien; die Larven wurden anhand ihrer Größe in 4 verschiedene Stadien eingeteilt: Stadium 1: 1 mm, Stadium 2: 2 mm, Stadium 3: 3 mm, Stadium 4: 6 mm (nach Kolb 1959)

Es zeigte sich, dass die Bakterien im Eistadium ringförmig im Inneren des Eies angeordnet sind (Abb. 19; A). Während des ersten Larvenstadiums kommt es zu einer „Auswanderung“ der Bakterien in die umliegenden Larvalgewebe (Abb. 19; B). Im Larvenstadium 2 sind die Symbionten fast über das gesamte Larvengewebe ausgebreitet (Abb. 19; C), wohingegen man sie in Larvenstadium 3 nur noch in den umliegenden Geweben des Darms finden kann (Abb. 19; D). Interessanterweise findet man die Bakterien sogar innerhalb der Epidermiszellen der Larven. Im größten untersuchten, vierten Larvenstadium findet man innerhalb des Darms die gleichen Verhältnisse wie in adulten Tieren (Abb. 19; E). Die Bakterien befinden sich an der Basalseite des Darms in speziellen Myzetozytenzellen. Im restlichen Larvalgewebe sind keine Symbionten mehr zu finden. Auffällig war, dass bei keinem der untersuchten Larvenstadien Symbionten im Darmlumen gefunden werden konnten. Die gezeigte Negativkontrolle wurde an einer *C. floridanus*-Larve des ersten Larvenstadiums durchgeführt (Abb. 19; F).

Um sicher zu sein, dass es sich bei den gefärbten Bakterien um endosymbiontische Bakterien der Ameisengattung *Camponotus* handelt, mussten die Kryoschnitte elektronenmikroskopisch untersucht werden. Durch ein spezielles Einbettungsverfahren ist es gelungen, Kryoschnitte für diese Untersuchungen zu präparieren. Somit war es möglich, *In Situ*-Hybridisierungen und Ultradünnschnitte von Kryoschnitten ein und desselben Präparates zu untersuchen. Die Ergebnisse hierzu sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

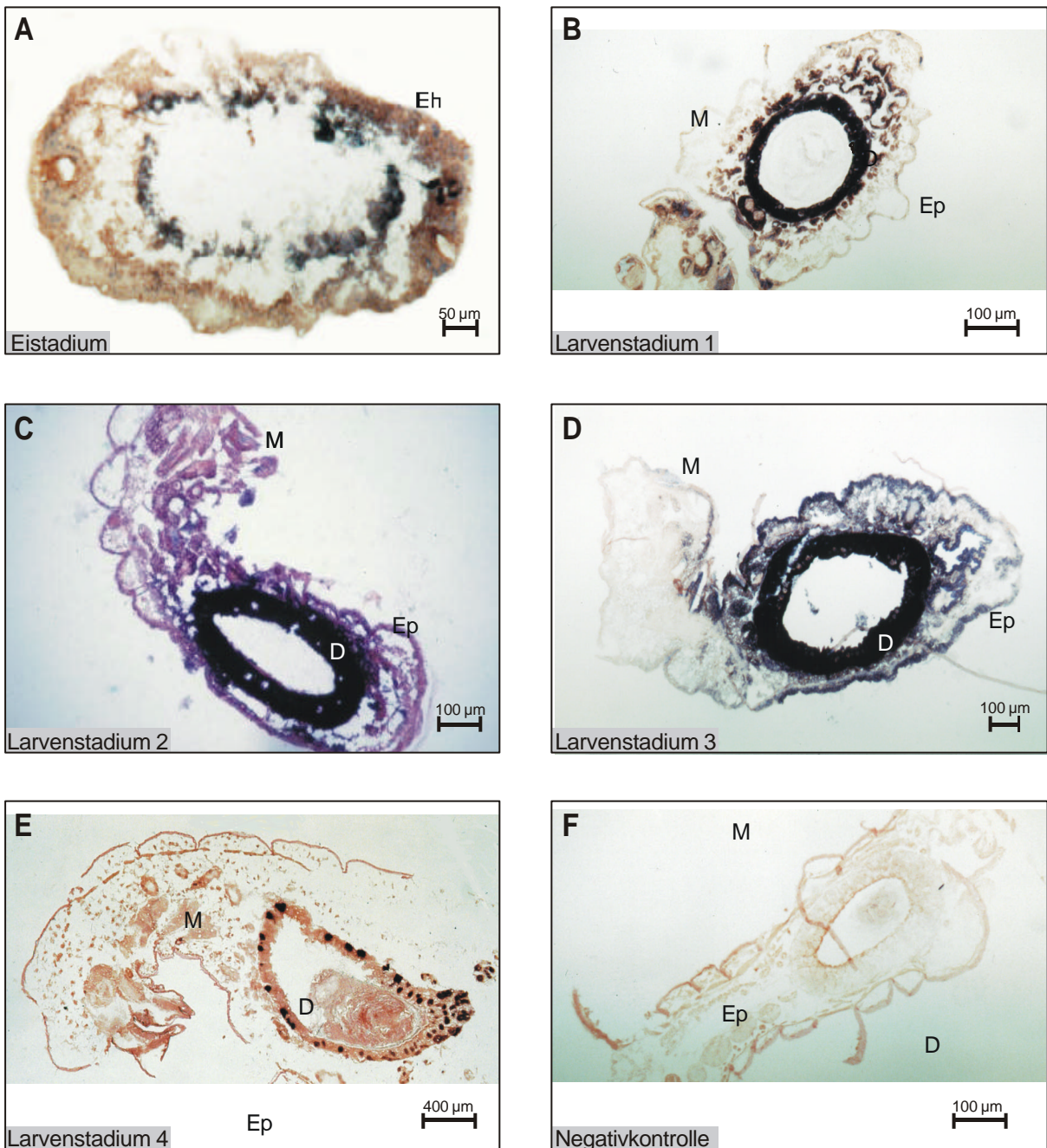


Abb. 19: *In Situ*-Hybridisierungen mit *flori3*-Oligonukleotidsonden, durchgeführt an Kryoschnitten von unterschiedlichen Entwicklungsstadien; D: Darm, Ep: Epidermis, M: Mundbereich, Eh: Eihülle

A (Eistadium): Die Symbionten (blau) sind ringförmig im Eiinneren angeordnet.

B (Larvenstadium 1): Es kommt zur Auswanderung der Bakterien (blau) ins umliegende Mesoderm.

C (Larvenstadium 2): Die Symbionten (blau) sind im gesamten Larvalgewebe zu finden.

D (Larvenstadium 3): Die Symbionten sind auf den Darm und das den Darm umgebende Mesoderm begrenzt. Auch in der Epidermis (Ep) sind Bakterien zu finden.

E (Larvenstadium 4): Die Bakterien (blau) befinden sich an der Basalseite des Darmes. Sie sind schon in Myxozysten lokalisiert. Im restlichen Gewebe sind keine Bakterien mehr zu finden.

F (Negativkontrolle): *In Situ*-Hybridisierung mit einer *hercu2*-Oligonukleotidsonde, durchgeführt an einer Larve aus Larvenstadium 1.

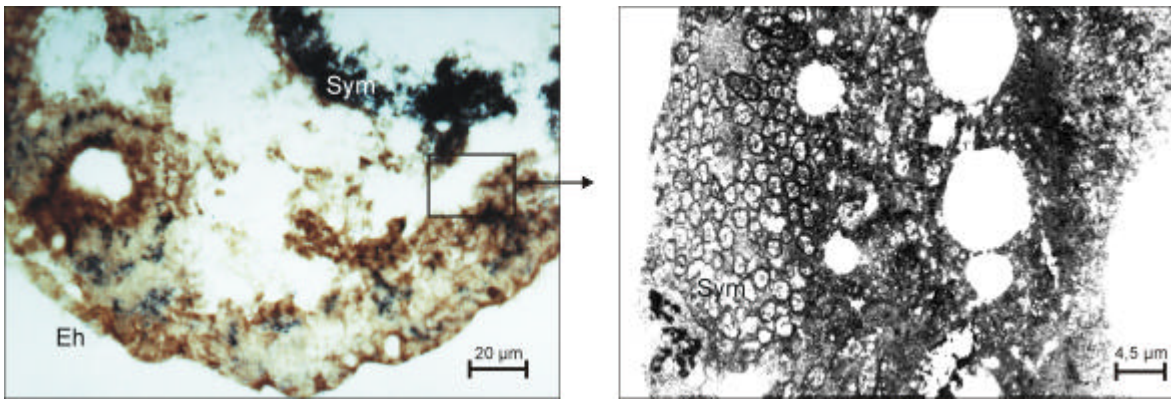


Abb. 20: Kryoschnitt durch ein *C. floridanus* Ei. Die Symbionten (Sym) befinden sich ringförmig angeordnet im Inneren des Eies. links: Lichtmikroskopische Aufnahme einer *In Situ*-Hybridisierung, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Eh: Eihülle.

Innerhalb des *C. floridanus* Eies sind die Bakterien ringförmig angeordnet (Abb. 20). Sie befinden sich frei im Zytoplasma. In Ultradünnschnitten von Kryoschnitten an Eiern konnten die endosymbiontischen Bakterien ebenfalls nachgewiesen werden. Zelluläre Strukturen, oder Membranen sind nicht zu erkennen (Abb. 20; rechts). Bei den Larvenstadien 1-3 findet man die gleichen Verhältnisse wie innerhalb der Eier (ohne Abbildung).

Innerhalb von Larven des vierten Stadiums befinden sich die Symbionten bereits in Myzetozyten, die an der basalen Seite des Darmes angeordnet sind. Wie schon in adulten Individuen gezeigt, interkalieren die Myzetozyten auch beim vierten Larvenstadium zwischen die Epithelzellen des Darmes (Abb. 21). Die Myzetozyten sind außerdem von einer eigenen Membran umgeben (Abb. 21; rechts).

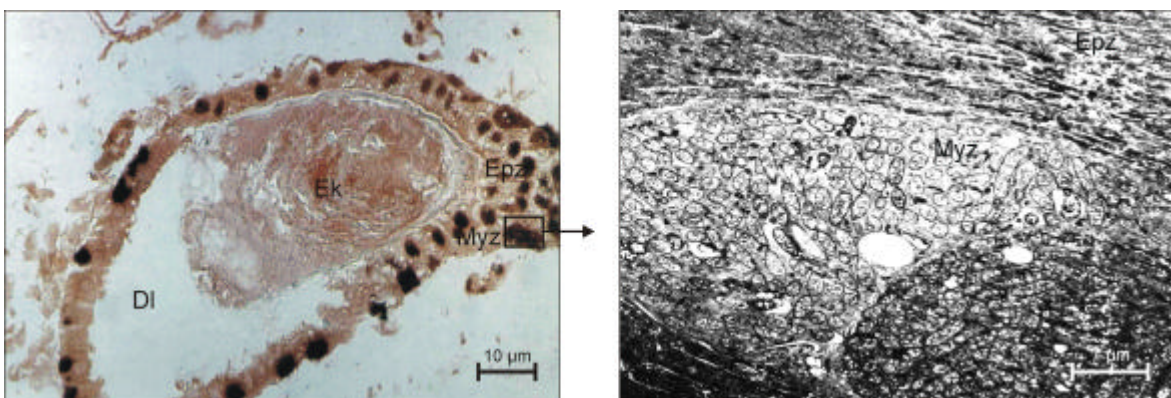


Abb. 21: Kryoschnitt durch eine *C. floridanus* Larve (Larvenstadium 4). Die Symbionten befinden sich innerhalb der Myzetozyten (Myz). Die Myzetozyten sind von Darmepithelzellen (Epz) umgeben. links: Lichtmikroskopische Aufnahme einer *In Situ*-Hybridisierung, rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme; Ek: Exkrement, DI: Darmlumen.