

## 2 Einleitung

### 2.1 Konkurrenz – Parasitismus – Kommensalismus - Symbiose

In der Natur gibt es zwischen pflanzlichen und tierischen Organismen viele unterschiedliche Formen des Zusammenlebens. Je mehr Arten innerhalb eines Ökosystems koexistieren, desto vielfältiger sind die Möglichkeiten kausaler Vernetzung. Die vier wichtigsten Wechselbeziehungen, die zwischen verschiedenen Organismengruppen auftreten, sind Konkurrenz, Parasitismus, Kommensalismus und Symbiose (Czihak et al. 1990).

Unter Konkurrenz versteht man eine Situation, in der zwei oder mehr Arten im Wettbewerb um limitierende Umweltfaktoren bzw. Ressourcen stehen, die sie für ihr Wachstum bzw. ihre Vermehrung gemeinsam benötigen.

Parasitismus liegt vor, wenn einer der Partner sich durch das Ausnützen des anderen Vorteile verschafft. Parasitische Beziehungen können in unterschiedlichen Formen auftreten. Ein Parasit befällt seinen Wirt zur Gewinnung von Nahrung und lebt zu diesem Zweck an oder in dessen Körper. Dementsprechend unterscheidet man zwischen Ektoparasiten und Endoparasiten. Parasiten zeichnen sich durch eine sehr hohe Wirtsspezifität aus und befallen nur ganz bestimmte Tierarten, bei denen sie häufig auf spezielle Körperregionen beschränkt bleiben. Beispielsweise findet man die zu den Ektoparasiten gehörigen Haarläuse (*Pediculus*, *Phthirus*) nur an bestimmten Körperstellen des Menschen, ebenso verhält es sich mit den Mallophagen im Federkleid der Vögel. Auch Endoparasiten sind meist auf bestimmte Gewebe oder Organe ihrer Wirtsarten beschränkt. So leben manche Endoparasiten z.B. intrazellulär (*Plasmodium*, *Leishmania*) oder extrazellulär (*Ascaris*, *Enterobius*) im Darmlumen, im Blutplasma (*Trypanosoma*, *Schistosoma*), oder im Bindegewebe (Muskeltrichinen, Finnen) (Wehner und Gehring 1990).

Kommensalismus beschreibt eine Koexistenz, bei der sich die Partner nur wenig beeinflussen und stellt eine Zwischenform von Parasitismus und Symbiose dar.

Unter Symbiose versteht man seit De Bary (1878) das enge Zusammenleben zweier Partner, die beide einen Nutzen daraus ziehen. „Symbiose“ beinhaltet ursprünglich die beiden Begriffe Mutualismus und Parasitismus. Später wurde der Begriff Symbiose jedoch mit dem des Mutualismus gleichgestellt und damit gegenüber dem Parasitismus und dem Kommensalismus

abgegrenzt (Schwemmler 1989). Auch bei Symbiosen unterscheidet man zwei unterschiedliche Formen, die Ekto- bzw. Endosymbiose. Ektosymbiosen finden z.B. zwischen Pflanzen (Pilze und Pflanzenwurzeln), zwischen Tieren (Ameisen und Blattläuse) und zwischen Pflanzen und Tieren (*Macaranga*-Bäume und Ameisen) statt (Vogel und Angermann 1984; Hölldobler und Wilson 1990; Fiala et al. 1989). Ist eine symbiontische Partnerschaft so eng, dass der eine Symbiosepartner in dem anderen lebt, handelt es sich um eine Endosymbiose. Extra- oder intrazelluläre Endosymbiosen bestehen häufig zwischen Prokaryonten und Tieren. Vertebraten, Pflanzen, Einzeller, marine Invertebraten und Insekten können in solchen Symbiosen mit intrazellulären, prokaryontischen Mikroorganismen leben (Henry 1966, 1967). Huftiere, Nager und Termiten ernähren sich z.B. von Gras oder Holz. Sie besitzen in ihren Därmen symbiontische Bakterien, die für sie den unverdaulichen Nahrungsbestandteil Zellulose in den verwertbaren Zucker Glukose spalten. Wanzen, Blatt- und Schildläuse saugen eiweißarme Pflanzensäfte, wohingegen sich Egel, Zecken, Läuse und Stechmücken von Blut ernähren. Die bakteriellen Endosymbionten dieser Individuen leben meist intrazellulär und liefern ihnen essentielle Aminosäuren oder Vitamine (Vogel und Angermann 1984).

Die vorliegende Untersuchung richtet ihr Hauptaugenmerk auf die Endosymbiose von Ameisen und intrazellulären Bakterien. Schätzungsweise 15-20% aller Insekten leben in symbiontischen Beziehungen mit Bakterien (Dasch et al. 1984). Bei bestimmten Insektenordnungen wie z.B. *Blattaria*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* und *Hymenoptera* beobachtet man besonders häufig die Ausbildung von Endosymbiosen (Buchner 1965). Interessant ist bei den Insekten-Bakterien-Symbiosen die Art und Weise, wie die Bakterien innerhalb der Insekten leben und welche Einflüsse sie auf ihre Wirte ausüben. Zwei unterschiedliche Formen der Koexistenz zwischen Bakterien und Wirtsorganismus werden nachfolgend erläutert. Abhängig davon, ob die intrazellulären Endosymbionten in speziellen Zellen (Myzetozyten) lokalisiert sind oder frei innerhalb der tierischen Zellen vorliegen, unterscheidet man zwischen nicht Myzetozyten-assoziierten und Myzetozyten-assoziierten Endosymbiosen.

## 2.2 Nicht Myzetozyten-assoziierte Endosymbiosen

### *Wolbachia* - Symbiont oder Parasit?

Eine gut untersuchte, nicht Myzetozyten-assoziierte Endosymbiontengattung ist *Wolbachia*. Diese Bakteriengattung ist in vielen Invertebraten, wie z.B. Crustaceen, Milben, Nematoden und in Insekten zu finden. So sind schätzungsweise 15% aller Insekten mit *Wolbachia* infiziert. Diese Endosymbionten befallen viele unterschiedliche Insektenarten und können z.B. Einfluß auf deren Reproduktion nehmen (Stouthamer et al. 1999).

*Wolbachia* gehört zur  $\alpha$ -Subklasse der Proteobakterien und steht den Rickettsien sowohl phylogenetisch als auch morphologisch sehr nahe. Die Bakterien sind in ihrer Morphologie und Größe sehr variabel. Sie können stäbchenförmig (0,5-1,3  $\mu\text{m}$  Länge) oder kugelig (0,25-1,8  $\mu\text{m}$  Durchmesser) sein (Hertig 1936). *Wolbachien* sind im Gegensatz zu den Rickettsien hauptsächlich in den reproduktiven Organen der entsprechenden Wirte zu finden (Stouthamer et al. 1999). Rickettsien leben ebenfalls intrazellulär, konnten jedoch bisher nur im Blut bzw. im Darm nachgewiesen werden (Brock und Madigan 1991). Gelegentlich kann man *Wolbachia* in den Malpighigefäßen oder im Muskelgewebe von Insekten finden. In der Fliege *Drosophila simulans* (Louis und Nigro 1989), der parasitischen Wespenart *Dahlbominus fuscipennis* (Byers und Wilkes 1970) und der Holzlaus *Armadillidium vulgare* (Rigaud et al. 1991) konnte *Wolbachia pipientis* auch im Nervengewebe nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der Bakterien in neuronalen Geweben der Wirte könnte einen Einfluß auf deren Verhalten ausüben.

Über die Einflüsse, die *Wolbachia pipientis* auf ihren Wirt ausübt, gibt es einige neuere Untersuchungen. Eine interessante Funktion der Bakteriengattung *Wolbachia* beschrieb Stouthamer (1999). Die Symbionten sind die Ursache für eine zytoplasmatische Inkompatibilität in Arthropoden, die zu einer Kreuzungsinkompatibilität zwischen *Wolbachia*-infizierten Männchen und nicht-infizierten Weibchen führt. Die väterlichen Chromosomen werden nach der Befruchtung eliminiert, was zum Absterben des nun haploiden Embryos innerhalb der diploiden Insektenart führt. In haplodiploiden Insektenarten dagegen (z.B. Wespen) entwickeln sich daraus haploide Männchen. Die zytoplasmatische Inkompatibilität führt daher entweder zum Tod der Embryonen, oder zu einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Männchen, bzw. der infizierten Weibchen. Auch im umgekehrten Fall, bei einer Kreuzung von infizierten Weibchen mit

nicht-infizierten Männchen, kann es zu dieser zytoplasmatischen Inkompatibilität kommen. Über den Mechanismus der Interaktionen, die zwischen Wolbachien und Wirt ablaufen und zu diesem Phänomen führen, ist bisher noch nichts bekannt.

Ein weiterer Effekt, den *Wolbachia* in seinem Wirt hervorruft, ist die Induktion von Parthenogenese (Stouthamer et al. 1993). Parthenogenese-induzierende Wolbachienstämme findet man nur in der Insektenordnung *Hymenoptera*. Der Mechanismus, der es z.B. infizierten Weibchen der Wespe *Trichogramma* erlaubt, weiblichen Nachwuchs aus nicht befruchteten Eiern zu produzieren, ist noch nicht verstanden, liegt aber in einer Modifikation der ersten mitotischen Teilung (Stouthamer und Kazmer 1994).

In Amphipoden, Isopoden und einer Lepidopterenart konnten Wolbachien gefunden werden, die zu einer Verweiblichung einzelner Individuen führen (Stouthamer et al. 1999). Es gibt außerdem *Wolbachia*-Stämme, die zum Absterben männlicher Embryonen während der Embryogenese führen. Dieser Effekt wurde von Lus (1947) entdeckt und konnte seither in mehr als 20 Insektenarten nachgewiesen werden (Hurst et al. 1997). Bestimmte *Wolbachia*-Stämme modifizieren die Fertilität und Fekundität ihres Wirtes und begünstigen somit ihre eigene Ausbreitung, indem sie die Fortpflanzungsrate ihrer Wirte steigern (Girin und Bouletreau 1995).

Bei all den erwähnten Phänomenen wird deutlich, dass Wolbachien in der Lage sind, die Reproduktion ihrer Wirte zu ihren Gunsten zu beeinflussen. Für die Wirte bringt eine *Wolbachia*-Infektion hingegen keinen ersichtlichen Vorteil, daher könnte man von einer parasitischen Assoziation zwischen diesen beiden Partnern sprechen.

Andererseits deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass zwischen Nematoden und Wolbachien eine echte mutualistische Beziehung besteht. Mit Antibiotika behandelte, *Wolbachia*-freie Würmer waren unfruchtbar und zeigten schlechtes Wachstum (Hoerauf et al. 1999).

Um die Rolle von *Wolbachia pipientis* innerhalb des Insektenreiches aufzuklären, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Die vielfältigen Modifikationen, die *Wolbachia* in seinen Wirten hervorruft, machen die Komplexität der Wirkungsweise dieses Organismus deutlich und lassen die Frage, ob *Wolbachia* ein Symbiont oder Parasit ist, weiterhin offen.

## 2.3 Myzetozyten-assoziierte Endosymbiosen

Eine Myzetozyten-Symbiose ist durch drei charakteristische Merkmale gekennzeichnet: a) die Mikroorganismen sind intrazellulär in spezialisierten Zellen, sog. Myzetozyten, lokalisiert; b) sie werden ausschließlich maternal übertragen und c) Wirt bzw. Symbiont können ohne einander längerfristig nicht existieren (Douglas 1998).

Unabhängig voneinander haben sich viele Insekten-Bakterien-Assoziationen entwickelt. Zwei Myzetozyten-assoziierten Endosymbiosen von Bakterien und Insekten sollen hier ausführlicher betrachtet werden. Es handelt sich um engverwandte Bakteriengattungen der  $\gamma$ -Subklasse der Proteobakterien: *Buchnera*, den Symbionten der Blattlaus (Baumann et al. 1998; Baumann et al. 1995; Baumann et al. 1995) und *Wigglesworthia*, den Symbionten der Tsetsefliege (Aksoy et al. 1995; Cheng und Aksoy 1999).

Die primären Symbionten (P-Symbionten) von Aphiden sind wohl innerhalb der beiden Gattungen am besten untersucht. Sie befinden sich innerhalb der Blattlaus in einem speziellen Organ, dem sog. Myzetom (Buchner 1965). Dieser symbiontengefüllte, polyploide Zellverband besteht aus 60-90 Zellen und enthält Gram-negative, stäbchenförmige, 2-5  $\mu\text{m}$  große Bakterien, die von Vesikelmembranen eingeschlossen werden, welche der Plasmamembran entstammen. (Griffiths und Beck 1973; McLean und Houk 1973). Diese Membranstrukturen werden als Symbiosomen bezeichnet. Die P-Endosymbionten der Tsetsefliegen sind Gram-negative, 8-10  $\mu\text{m}$  große Stäbchenbakterien und befinden sich in Myzetozyten, die im Zellverband ebenfalls ein eigenständiges Organ (Myzetom) bilden (Aksoy et al. 1995). Die Symbionten der Blattläuse sind in allen Aphidenmorphen vertreten, kleine Männchen und sterile, weibliche Soldaten ausgenommen (Fukatsu und Ishikawa 1992). Die Symbionten der Tsetsefliegen konnten in allen adulten Individuen gefunden werden.

*Buchnera* ist eine genetisch sehr gut untersuchte Symbiontengattung, deren Genomsequenz mittlerweile vollständig bekannt ist (Charles und Ishikawa 1999; <http://buchnera.gsc.riken.go.jp/>). Das *Buchnera*-Genom umfasst 675 kb und bislang wurden 130 ORFs (open reading frames) charakterisiert, die alle eng verwandte Gene in *E. coli* besitzen. Obwohl die Gattung *Buchnera* phylogenetisch eng mit den Enterobakterien verwandt ist, ist ihr Genom jedoch in etwa ein siebtel kleiner als das von *E. coli*, was bedeuten könnte, dass das *Buchnera*-Genom sich aus einem gemeinsamen Vorläufer mit *E. coli* durch bloße Reduktion des Genoms entwickelt hat. Interessanterweise können *Buchnera*-Zellen jedoch, im Gegensatz zu

*E. coli*, ca. 120 Genomkopien pro Zelle besitzen (Komaki und Ishikawa 1999). Die Reduktion der Genomgröße ist für Endosymbionten, obligate Parasiten und Organellen, die kleine Populationsgrößen und kaum Rekombinationsmöglichkeiten haben, ein bereits mehrfach belegtes Phänomen (Andersson und Kurland 1998). Da ihr Lebensraum, das intrazelluläre Milieu, meist von biochemischen und physikalischen Schwankungen verschont bleibt, muß erwartet werden, dass eine Anpassung an dieses Milieu langfristig zu einem Verlust von nicht mehr benötigten metabolen Eigenschaften führt.

Durch die isolierte Lage der Aphiden-Symbionten innerhalb des Bakterioms, können diese einfach isoliert werden (Ishikawa 1982). Aus genomischer *Buchnera*-DNA konnten, mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion bereits vor der Annotation des Genoms, eine Reihe von Genen identifiziert werden. Neben der Charakterisierung von essentiellen Genen, die für Proteine der DNA-Synthese (*dnaA*, *dnaG*, *dnaN*, *dnaQ*, *gyrB*, *rnh*) und der Replikation (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*) codieren (Lai und Baumann 1992a, 1992b; Clark et al. 1992), konnten auch Gene die für Proteine der Translation codieren (*rrs*, *rri*, *rriI*, *argS*, *cysS*, *thrS*, *rpsA*, *rpsD*, *rpsK*, *rplL*, *rplT*, *rpmH*, *rpmI*, *infC*, *rpnA*), gefunden werden (Baumann et al. 1995). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass *Buchnera* mit freilebenden Eubakterien näher verwandt ist, als mit Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien oder Chloroplasten (Baumann et al. 1995). Ein weiteres interessantes Ergebnis der genetischen Untersuchung von *Buchnera* ergab die Betrachtung des rRNA Operons der Symbionten. Das Operon ist nicht, wie bei den meisten Bakterien, in der Reihenfolge *rrs-rri-rriI* (16S-, 23S-, 5S- rDNA) angeordnet, sondern besteht bei *Buchnera* aus zwei Transkriptionseinheiten *rrs* und tRNA<sup>Glu</sup>-*rri-rriI* (Munson et al. 1993; Rouhbakhsh und Baumann 1995). Diese untypische Anordnung der rRNA-Gene konnte für eine Identifikation von *Buchnera* mittels PCR-Technik verwendet werden (Rouhbakhsh et al. 1994). Die Tsetsefliegensymbionten besitzen eine „normale“ Operon-Struktur, wie die freilebenden Enterobakterien (Aksoy 1995a; Aksoy et al. 1995). Darüber hinaus wurden bei *Wigglesworthia* bisher noch keine weiteren Untersuchungen des Genoms vorgenommen.

Über die Funktion der beiden beschriebenen Endosymbiontengattungen innerhalb ihrer jeweiligen Wirtsorganismen sind gesicherte Aussagen nur bei den Aphiden möglich. Generell wird jedoch angenommen, dass Myzetozyten-assoziierte Symbiosen eine Bedeutung für die Ernährung der Wirtstiere besitzen, da sie häufig bei Nahrungsspezialisten gefunden werden.

Blattläuse ernähren sich von Pflanzensaft, der zwar reich an Kohlenhydraten, dafür aber arm an Stickstoffverbindungen ist (Dixon 1973; Minks 1987). Aufgrund des niedrigen

Stickstoffgehalts nehmen die Tiere große Pflanzensaftmengen auf und sondern den überschüssigen Zucker als Honigtau ab (Houk und Griffiths 1980).

Wie alle Tiere benötigen auch Insekten 10 essentielle Aminosäuren, die sie nicht selbst herstellen können. Diese Aminosäuren können bei den Aphiden wenigstens teilweise von den Symbionten synthetisiert und supplementiert werden (Mittler 1988). Durch Hitze- und Antibiotikabehandlung der Blattläuse konnten symbiontenfreie Tiere erzeugt werden (Campbell 1990; Ohtaka und Ishikawa 1991, Wilkinson 1998), welche ein geringeres Gewicht und eine verminderte Wachstumsrate aufwiesen. Studien mit symbiontenfreien Aphiden und synthetischer, definierter Nahrung zeigten, dass essentielle Aminosäuren wie z.B. Tryptophan und Leucin von den Symbionten hergestellt werden (Douglas und Prosser 1992). Eine Beteiligung der Symbionten an der Synthese von Phenylalanin und schwefelhaltigen Aminosäuren wird ebenfalls diskutiert (Mittler 1971; Baumann 1995). Teilweise konnte dies durch metabolische Studien mit radioaktiv markierten, nicht essentiellen Aminosäuren bzw. metabolischen Vorstufen dieser gezeigt werden. Diese markierten Moleküle dienten bei den Versuchen als Vorläufer für die Synthese essentieller Aminosäuren (Douglas 1998). Auch durch molekularbiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Buchnera* in der Lage ist, essentielle Aminosäuren herzustellen. Bisher wurden in *Buchnera* dreizehn Gene identifiziert, die direkt an der Aminosäuresynthese mitwirken: die Gene *aroA*, *aroH* und *aroE*, sind an der Synthese aromatischer Aminosäuren beteiligt (Kolibachuk et al. 1995), *leuABCD* codieren für Enzyme der Leucin-Synthese (Bracho et al. 1995) und *trpEGDC(F)BA* für die Tryptophan-Synthese (Lai et al. 1994; Munson und Baumann 1993). Da diese Gene jedoch in allen Bakterien zur „Grundausstattung“ gehören, ist ihre Identifikation noch kein stichhaltiger Beweis für eine Aminosäureproduktion, die über den Eigenbedarf hinausgeht. Die Gene *leuABCD* und *trpEG* sind allerdings teilweise auf Plasmiden lokalisiert, die amplifiziert werden und den Symbionten ermöglichen, die Syntheserate von Leucin- und Tryptophan enorm zu steigern (Douglas 1998). Diese Überproduktion der Aminosäuren führt innerhalb der *Buchnera*-Symbionten allerdings nicht, wie bei anderen Bakterien, zu einer allosterischen Hemmung, sondern besitzt eine andere, noch nicht untersuchte Regulationsart.

Interessanterweise findet man in *Buchnera*-Zellen hohe Konzentrationen des Chaperonproteins GroEL (Baumann et al. 1996). Dieses Protein wird bei anderen Bakterien als „Stressprotein“ produziert, und sein codierendes Gen wird normalerweise durch die jeweiligen Stressfaktoren reguliert. *Buchnera* produziert GroEL ständig in großen Mengen, und auch in

diesem Fall scheint keine Regulation stattzufinden. Warum dies bei den Aphidensymbionten so ist, ist noch nicht geklärt. Bemerkenswert ist jedoch, dass GroEL sogar in der Hämolymphe der Blattläuse gefunden wurde (van den Heuvel et al. 1994). Da es bisher keine Hinweise auf einen Transportweg von GroEL aus den Symbionten gibt, könnte das in der Hämolymphe gefundene Protein aus lysierten *Buchnera*-Zellen zu stammen (Fukatsu und Ishikawa 1992a). Ein Nebeneffekt, den die Anwesenheit von GroEL in der Hämolymphe mit sich bringt, ist die Stabilisierung pflanzenpathogener Luteoviren innerhalb der Blattlaus, bis diese Viren mit Hilfe der Blattlaus wieder Pflanzen infizieren können (Douglas 1998). Stoppt man die Proteinsynthese der Bakterien mit Hilfe eines Antibiotikums, wird die Übertragung des Pflanzenvirus reduziert (van den Heuvel 1994).

Das Stressprotein GroEL wird auch von den Tsetsefliegensymbionten im Überschuss produziert (Aksoy 1995). Allerdings wurde hier, ebenso wie bei *Buchnera*, bisher noch keine spezielle Aufgabe des Proteins beschrieben. Auch eine mögliche Funktion der *Wigglesworthia*-Symbionten für die Ernährung ihres Wirtes ist noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass die Bakterien für die blutsaugenden Tsetsefliegen Vitamine des B-Komplexes als Metabolit zur Nahrungsergänzung produzieren (Nogge 1981; Dasch et al. 1984). Mit Antibiotika behandelte Fliegen reagierten mit vermindertem Wachstum und einer rückläufigen Eiablage rate (Nogge 1976, 1978, 1980; Hill und Campbell 1973).

Eine weitere gut charakterisierte Myzetozyten-assoziierte Nahrungssymbiose besteht zwischen Schaben und ihren Symbionten, die zu den Flavobakterien gehören (Bandi et al. 1994). Die Schabensymbionten sind ebenfalls in speziellen Zellen lokalisiert, befinden sich allerdings im Gegensatz zu den anderen drei Myzetozyten-assoziierten Symbiontengattungen, nicht im Darm oder in einem speziellen Organ, sondern im Fettkörper der Tiere. Sie scheinen essentiell für das Wachstum und die Reproduktion der Schaben zu sein (Dasch et al. 1984; Douglas 1998; Sacchi und Grigolo 1989). Für Schabensymbionten wurde nachgewiesen, dass sie Stickstoff aus dem Abfallprodukt Harnsäure wiederverwerten können (Philippe und Landureau 1988).

Bei Blattläusen und Tsetsefliegen kann man zusätzlich zu den primären P-Symbionten noch sekundäre S-Symbionten finden, die jedoch innerhalb der Organismen in anderen Zellen lokalisiert sind als die P-Symbionten. Bei den Aphiden kann man die S-Symbionten hauptsächlich in jungen Individuen, bei denen das Bakteriom noch von einer Zellhülle umgeben ist, finden. Innerhalb dieser Hüllzellen befinden sich wenige 0,5-1,5 µm große, Gram-negative Stäbchen, die von einer eigenen Membran umgeben sind (Houk und Griffiths 1980). Die S-Symbionten der

Tsetsefliegen sind 1-2  $\mu\text{m}$  lange, Gram-negative Stäbchen, die in den Epithelhüllzellen des Mitteldarms zu finden sind. Zusätzlich zu den sekundären Symbionten kann man in den reproduktiven Organen der Tsetsefliegen noch Bakterien der Gattung *Wolbachia* finden.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen an intrazellulär lebenden Myzetozyten-assoziierten oder nicht Myzetozyten-assoziierten Endosymbionten wurde der Frage nach dem evolutiven Ursprung, den parasitische oder mutualistische Lebensgemeinschaften besitzen, noch nicht weiter nachgegangen. Da dies sehr schwierig und auch oft nur spekulativ möglich ist, soll diese Fragestellung nachfolgend eingehender betrachtet werden.

## 2.4 Evolution von Bakterien-Insekten-Symbiosen

Insektengruppen, die Endosymbionten besitzen, scheinen im Tierreich sehr erfolgreich zu sein. Einige der symbiontischen Bakterien von Insekten sind phylogenetisch eng mit pathogenen Mikroorganismen verwandt und haben sich wahrscheinlich aus gemeinsamen Vorläufern entwickelt. Dies ist z.B. innerhalb der  $\gamma$ -Subklasse der Proteobakterien der Fall: Die nächstverwandte Bakteriengruppe der primären Symbionten von Blattläusen, Tsetsefliegen und Ameisen sind die Enterobakterien. Zu diesen gehören fakultativ intrazelluläre Krankheitserreger, wie z.B. Salmonellen oder Shigellen. Weitere, der  $\gamma$ -Untergruppe zugehörige Symbionten, findet man in Zecken. Diese sind eng verwandt mit pathogenen Keimen wie z.B. *Coxiella burnetii*, dem Erreger des Q-Fiebers oder dem Tularämieerreger *Francisella tularensis* (Corsaro et al. 1999).

Die Gattung *Rickettsia* gehört der  $\alpha$ -Subklasse der Proteobakterien an, der ebenfalls viele symbiontische Bakterien angehören (Weisburg et al. 1985; Corsaro et al. 1999; Raoult und Roux 1997). In dieser Gruppe findet man z.B. pflanzenpathogene Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) gemeinsam mit Pflanzensymbionten (Rhizobien). Das interessanteste Beispiel stellt sicherlich der aerobe Vertreter der  $\alpha$ -Subklasse der Proteobakterien dar, aus dem sich nach der Endosymbiontentheorie die Mitochondrien der Eukaryonten entwickelten (Margulis 1999).

In den einzelnen Prokaryonten-Gruppen haben sich sowohl Parasitismus als auch Mutualismus häufig entwickelt, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass einige Symbiosen eventuell aus ursprünglich parasitären Beziehungen entstanden sind oder umgekehrt.

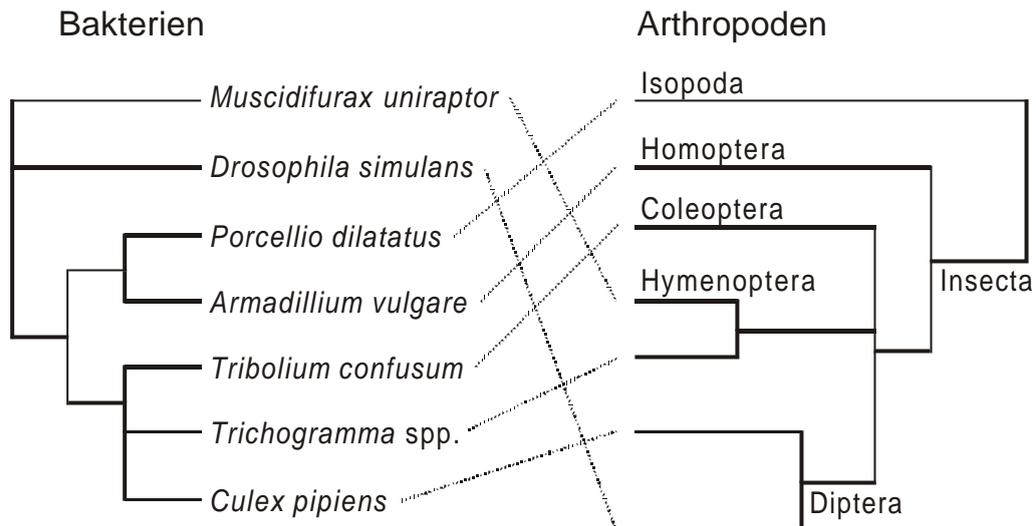
Für den parasitischen Mikroorganismus könnte es ein Selektionsvorteil gewesen sein, der Morbidität oder Mortalität des Wirtes entgegen zu wirken. Die Virulenzfaktoren der parasitischen Mikroorganismen verschwanden mit der Zeit, und aus den ehemals schädigenden Bakterien entstanden harmlose, teilweise sogar nützliche Mitbewohner. Auch der umgekehrte Prozess ist denkbar. So könnte sich aus einem symbiontischen oder kommensalen Miteinander eine parasitäre Beziehung entwickelt haben. Vermutlich entstanden auf diesem Wege z.B. pathogene Salmonellen. Aus ursprünglich kommensalen Darmbakterien entwickelten sich durch horizontalen Transfer von Pathogenitätsinseln diese Krankheitserreger (Groisman und Ochman 2000).

## **2.5 Kospeziation von nicht Myzetozyten-assoziierten Bakterien mit ihren Wirtstieren**

Die Untersuchung der 16S rDNA von *Wolbachia*, brachte einige unerwartete phylogenetische Ergebnisse mit sich. Betrachtet man die Stammbäume von Wolbachien und ihren entsprechenden Arthropodenwirten, so fällt auf, dass einige *Wolbachia*-Arten in unterschiedlichen Wirten zu finden sind (Abb. 1). Die Übertragung von Wolbachien auf die nächste Generation erfolgt normalerweise vertikal, d.h. durch das Eizytoplasma infiziert die Mutter ihre Nachkommen (Guillemaud und Rousset 1997; Mc Graw und O'Neill 1999) mit Bakterien, was über einen bestimmten Zeitraum zu einer kongruenten Entwicklung von Wirt und Symbionten führen sollte.

Es gibt allerdings Beispiele, bei denen die Entwicklung nicht kongruent erfolgt sein kann (Abb. 1), was einen horizontalen Übertragungsweg der Endosymbionten nahe legt (Breeuwer et al. 1992; O'Neill et al. 1992).





**Abb. 1:** Der Vergleich der phylogenetischen Stammbäume von Wolbachien (linker Stammbaum) und deren Wirtstieren (rechter Stammbaum) zeigt eine mehrfache horizontale Übertragung der Bakterien (gestrichelte Linien). Die phylogenetischen Abstände sind nur schematisch und nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Über die Art und Weise, wie dies bei den unterschiedlichen Arten geschieht, gibt es noch keine genaueren Untersuchungen. Werren und Kollegen (1995) konnten z.B. zeigen, dass die Fliege *Sarcophaga* und deren Insektenparasit, die Wespe *Nasonia* Wolbachien besitzen, die sich phylogenetisch sehr ähnlich sind. Es ist anzunehmen, dass die Infektion mit Wolbachien bei *Sarcophaga* durch ihren Parasiten *Nasonia* erfolgt. Die Parthenogenese-induzierenden *Wolbachia*-Symbionten, die in vielen Wespenarten der Gattung *Trichogramma* gefunden werden, sind eng miteinander verwandt und bilden eine monophyletische Gruppe. Vergleicht man jedoch die Phylogenie von Wirten und Symbionten zeigt sich, dass eng verwandte *Trichogramma*-Wespen kaum verwandte Wolbachien besitzen, was ein weiteres Indiz für einen horizontalen Transfer ist (Schilthuizen und Stouthamer 1997).

## 2.6 Kospeziation von Myzetozyten-assoziierten Bakterien mit ihren Wirtstieren

Munson und Kollegen (1991) nutzten 16S rRNA-Analysen, um die primären *Buchnera*-Symbionten von Blattläusen phylogenetisch einzuordnen. Die *Buchnera*-Symbionten und ihre Wirte entwickeln sich streng kongruent (Abb. 2) (Moran et al. 1993). Evolutiv betrachtet, begann diese Kospeziation vor ca. 160-280 Mio. Jahren (Moran et al. 1993), als ein

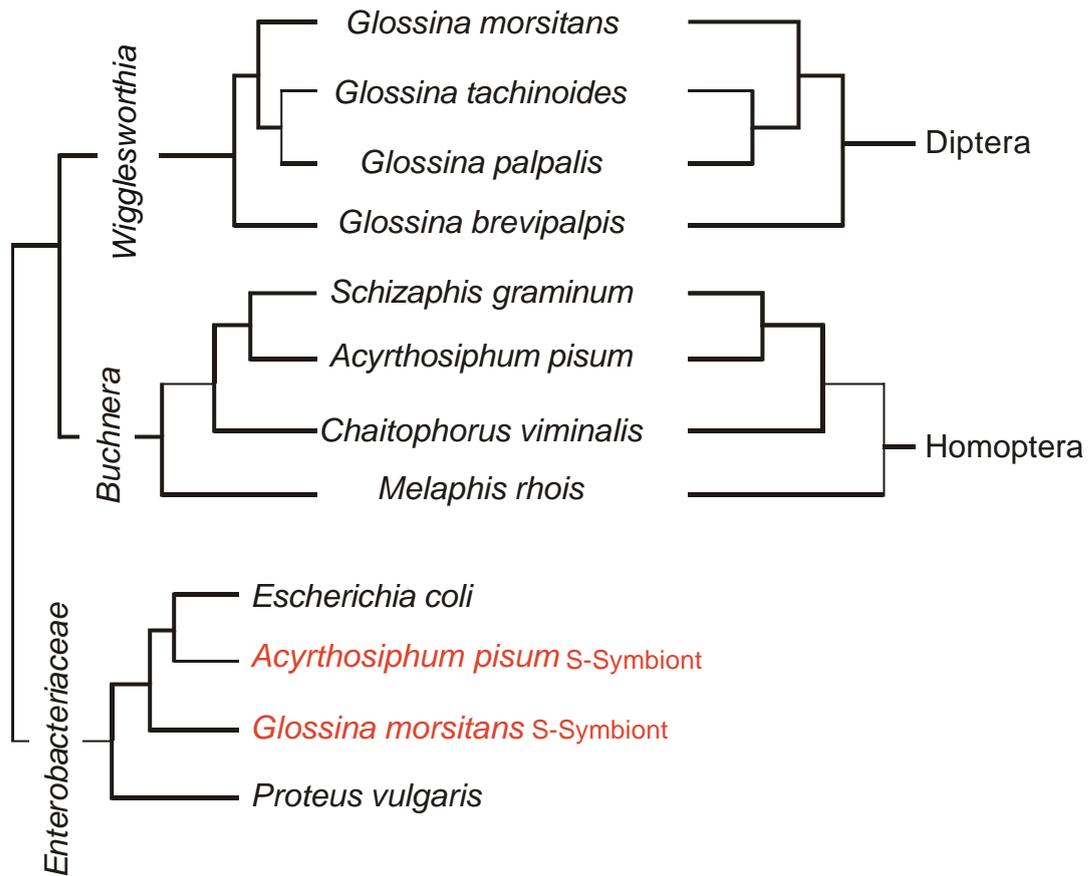
Blattlausvorfähr mit einem freilebenden Eubakterium infiziert wurde (Harada und Ishikawa 1993; Baumann et al. 1995). Die phylogenetische Einordnung der primären Symbionten der Tsetsefliegen, wurde ebenfalls mit 16S rRNA-Analysen durchgeführt (Aksoy et al. 1995). Auch die Bakterien der Gattung *Wigglesworthia* und deren Wirte entwickeln sich streng kongruent (Abb. 2) (Moran et al. 1993; Chen et al. 1999). Über den Ursprung der Koexistenz von *Wigglesworthia* (Aksoy 1995) mit den Tsetsefliegen ist weniger bekannt, jedoch wird hier angenommen, dass die symbiontische Assoziation seit ca. 40 Mio. Jahren (Aksoy et al. 1995) existiert. Die Myzetozyten-assoziierten Schabensymbionten entwickeln sich ebenfalls kongruent mit ihren Wirten. Sie werden maternal an die Nachkommen weitergegeben, und die Partnerschaft zwischen Schaben und Bakterien existiert seit ca. 135-300 Mio. Jahren (Bandi et al. 1995).

Die streng kongruente Entwicklung der drei hier beschriebenen endosymbiontischen Partnerschaften ist ein wichtiger Hinweis auf einen ausschließlich maternalen Übertragungsweg der Bakterien. Dies stützt die Hypothese, dass sich eine vertikale Vererbung von Endosymbionten langfristig neutral oder sogar positiv auf den Wirtsorganismus auswirken kann (Herre et al. 1999).

Die Verfügbarkeit von fossilen Funden oben erwähnter Arthropodenarten erlaubte die Kalibrierung einer molekularen Uhr, die auf die Nukleotidsubstitutionsrate in der 16S rDNA der Symbionten rückschließen ließ. Dabei erwies sich die Mutationsrate bei den Symbionten als etwa doppelt so hoch wie der für freilebende Bakterien bestimmte Wert (Lambert und Moran 1998). Eine Erklärung für diese beschleunigte Mutationsrate könnte im maternalen Übertragungsweg begründet liegen, der zu einer ständig wiederkehrenden starken Reduktion der Populationsgröße führt. Somit können sich Mutationen bei den so übertragenen Symbionten eher manifestieren, als bei freilebenden Bakterien mit großen Populationen (Andersson und Kurland 1998; Baumann et al. 1998; Lambert und Moran 1998).

16S rRNA-Analysen an den, nicht in Myzetozyten lokalisierten, sekundären S-Symbionten der Gattungen *Buchnera* und *Wigglesworthia* zeigen eine enge Verwandtschaft zu den Enterobakterien (Abb. 2). Man nimmt an, dass es sich bei diesen Symbionten um horizontal übertragene Bakterien handelt, die erst vor relativ kurzer Zeit in die Wirtstiere gelangten (Moran und Baumann 1994).





**Abb. 2:** Die kongruente Entwicklung der Mycetozysten-assoziierten Bakterien der Gattungen *Buchnera*, *Wigglesworthia* und ihrer Wirtstiere wird durch den Vergleich der phylogenetischen Stammbäume der Bakterien (links) und der Wirte (rechts) deutlich. Die systematische Stellung zweier sekundärer Symbionten (S-Symbiont) ist ebenfalls dargestellt (rot). Die phylogenetischen Abstände innerhalb dieses Schemas sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Durch die Erforschung der mutualistischen Beziehungen zwischen Aphiden und *Buchnera* bzw. Tsetsefliegen und *Wigglesworthia* konnten bereits wichtige Erkenntnisse über den Sinn und Zweck einer Insekten-Bakterien-Symbiose gewonnen werden. Der Zusammenschluss der Mycetozysten zu eigenständigen Organen (Myzetomen), innerhalb der Blattläuse bzw. Tsetsefliegen erleichtert die Forschung an *Buchnera* und *Wigglesworthia*. Die in den Bakteriomen enthaltenen Endosymbionten lassen sich schnell und sauber für physiologische oder molekularbiologische Untersuchungen isolieren. Schwieriger wird das Arbeiten mit Mycetozysten-assoziierten Endosymbionten, die kein eigenständiges Organ ausbilden, wie es z.B. bei Schaben oder Ameisen der Fall ist. Die hier vorliegende Arbeit soll zur Charakterisierung von Mycetozysten-assoziierten Symbionten, die nicht in einem eigenständigen Organ leben, beitragen.

## 2.7 Endosymbionten von Ameisen

Schon vor über hundert Jahren fand Friedrich Blochmann (1882) in den Ovarien von zwei einheimischen Ameisenarten *Camponotus ligniperdus* und *Formica fusca* „bakterienähnliche Strukturen“. Diesen gab Wheeler (1889) den Namen „Blochmann bodies“. Erst dreißig Jahre später wurden die 12-25 µm langen Stäbchen im Mitteldarmepithel von Arbeiterinnen und Königinnen von *Camponotus ligniperdus* näher beschrieben (Hecht 1924; Lilienstern 1932; Buchner 1965). Die meisten Untersuchungen beschäftigten sich damals allerdings mit entwicklungsbiologischen Aspekten.

Es gibt einige Arbeiten über die Embryonalentwicklung der Ameisen, mit dem Ziel, die Herkunft der Myzetozytenzellen zu klären (Hecht 1924; Lilienstern 1932; Buchner 1965). Auch wurde die Bakterieninfektion der Oozyten innerhalb des Ovars verfolgt. Buchner (1918, 1921) gab eine genaue Beschreibung des Eindringens der Bakterien durch die Follikelzellen in die wachsenden Oozyten. Otto Hecht (1924) beschäftigte sich mit der Lage der Symbionten innerhalb des Eies während der Embryonalentwicklung. Er fand, dass die Endosymbionten im abgelegten Ei dichtgedrängt als wirre Bündel, an dessen Hinterpol lokalisiert sind. Mit fortschreitender Eireifung kommt es zu einer Umlagerung der Bakterien. Zwischen primäre Bakteriozyten werden „Zwischenzellen“ eingelagert, die später zu endgültigen Bakteriozyten werden. Bei den Untersuchungen von Otto Hecht (1924) ging es vorwiegend um Fragen der Ameisenembryologie und nicht um die Beschaffenheit oder die Physiologie der Symbionten.

Die Symbiontenmorphologie innerhalb von Larven, Puppen und Jungimagineen untersuchte erstmals Gertrud Kolb (1959). Durch sie wurden die Mikroorganismen näher charakterisiert, und ihre bakterielle Struktur wurde eindeutig bewiesen. Mit gängigen Farbstoffen angefärbt erwiesen sie sich als Gram-negativ.

Außer in den Gattungen *Camponotus* und *Formica* konnten bisher auch in den Gattungen *Plagiopsis* (Jungen 1968), *Colobopsis* und *Polyrhachis* (Sameshima et al. 1999) endosymbiontische Bakterien gefunden werden. Alle Ameisengattungen, die Endosymbionten tragen, gehören zur Unterfamilie der *Formicinae*.

Dasch stellte 1975 weitere Nachforschungen über die *Camponotus*-Endosymbionten an. So untersuchte er elektronenmikroskopisch die Ultrastruktur der Symbionten. Dabei fand er ebenfalls die typische doppelte Membran der Gram-negativen Bakterien. Außerdem zeigte er,

dass die Symbionten frei im Zytoplasma der Myzetozytenzelle vorliegen und nicht, wie viele andere Endosymbionten (z.B. *Buchnera*, *Wigglesworthia*), von einer Wirtszellmembran umgeben sind. Bei seinen nachfolgenden Untersuchungen konnte er in den Mitteldärmen 20 weiterer *Camponotus*-Arten Gram-negative, stäbchenförmige Endosymbionten finden (Dasch et al. 1984).

D. Schröder (1996) charakterisierte die Endosymbionten der vier Arten *C. herculeanus*, *C. ligniperdus*, *C. floridanus* und *C. rufipes* mit modernen histologischen und molekularbiologischen Methoden. Die Entwicklung einer auf *In situ-Hybridisierung* beruhenden Detektionsmethode machte detaillierte Untersuchungen möglich. So konnte bestätigt werden, dass 16S rRNA-Sequenzen, die durch Amplifikation mit universellen Primern aus einem Darmlysat erhalten wurden, tatsächlich von den Endosymbionten stammten. Mit Hilfe dieser 16S rRNA-Sequenzen wurde ein phylogenetischer Stammbaum der vier analysierten *Camponotus*-Endosymbionten erstellt. Dieser Stammbaum legt die Vermutung nahe, dass die Endosymbionten innerhalb der Subklasse der  $\gamma$ -Proteobakterien eine neue Gattung darstellen (Schroeder et al. 1996; Schröder 1996) und eine Schwestergattung zu *Buchnera* und *Wigglesworthia* sind.

Kultivierungsversuche der *Camponotus*-Symbionten mit gängigen Bakterienmedien (Schröder 1996) schlugen auch hier, wie schon bei Dasch (1975), fehl.

## **2.8 Die Gattung *Camponotus*: Vorkommen – Koloniestruktur - Lebensgewohnheiten**

Die Ameisengattung *Camponotus* ist innerhalb der Formicidae eine der größten Gattungen. Sie ist ubiquitär verbreitet und umfasst ca. 1000 beschriebene Arten (Bolton 1995).

Die Arbeiterinnen dieser Gattung sind polymorph und lassen sich anhand der Kopfgröße deutlich in „Minors“ und „Majors“ unterscheiden (Sanders 1964). Die Kolonien der meisten

Arten sind monogyn und können sehr groß werden. So wurde z.B. eine *C. herculeanus* Kolonie beschrieben, die mehr als 12000 Individuen umfaßte (Akre et al. 1994). Bezüglich der Koloniestruktur gibt es auch einige polygyne Ausnahmen, wie z.B. *C. planatus* (Carlin et al. 1993). Eine besondere Art der Koloniestruktur stellt die Oligogynie dar, die Hölldobler (1962) bei zwei europäischen Vertretern, *Camponotus herculeanus* und *Camponotus ligniperdus*, entdeckte. Diese besondere Polygynieart setzt sich von der „normalen“ Polygynie dadurch ab, dass die Königinnen einer Kolonie räumlich voneinander getrennt sind und es bei gegenseitigen Kontakten zu aggressiven Interaktionen beider Königinnen kommt. Die Arbeiterinnen verhalten sich kämpfenden Königinnen gegenüber neutral und greifen nicht in deren aggressive Handlungen ein (Hölldobler 1962a).

Viele europäische und nord- und südamerikanische Arten der Gattung *Camponotus* bewohnen tote oder lebende Bäume und schaffen sich Nistplatz, indem sie in das Weichholz der Bäume Gangsysteme graben (Hansen und Akre 1990). So können große Wohnflächen entstehen. Die Nester der einheimischen Roßameise (*Camponotus herculeanus*) können in Fichtenstämmen z.B. eine vertikale Ausdehnung von 6-10 m haben und sind oft durch tiefgehende Einschlüge des Spechtes kenntlich, welcher der größte Fraßfeind dieser Ameisen ist (Seifert 1996).

Als Nahrung dienen den Tieren Pflanzensäfte, von Blattläusen abgesonderter Honigtau und totes Tiermaterial. Teilweise erbeuten die Ameisen aber auch aktiv Insekten (Hansen und Akre 1990). Geschlechtstiere werden bei den meisten Arten nur saisonal produziert. Sie schlüpfen am Saisonende und überwintern mit der Kolonie (Hölldobler und Wilson 1990). Im Frühsommer findet der Hochzeitsflug statt, wenn eine bestimmte Tagestemperatur erreicht wird. Die Flüge sind sehr ausgedehnt, und die Paarung findet wahrscheinlich in der Luft statt (Hölldobler und Maschwitz 1965). Die Männchen sterben kurz nach der Paarung. Die Jungköniginnen werfen ihre Flügel ab und beginnen alleine mit der Koloniegründung. Aus der ersten Brut, um die sich die junge Königin selbst kümmert, können bis zu 25 kleine Arbeiterinnen schlüpfen, die dann die Versorgung der Königin übernehmen. Die Größe einer Kolonie nimmt nur sehr langsam zu, und es kann bis zu 10 Jahre dauern bis erstmals Geschlechtstiere produziert werden (Hölldobler und Wilson 1990).

## 2.9 Zielsetzung

Diese Arbeit hatte als Zielsetzung die Charakterisierung der intrazellulären, bakteriellen Endosymbionten in Ameisen der Gattung *Camponotus*.

Der phylogenetische Stammbaum der Endosymbionten sollte dabei um *Camponotus*-Arten aus verschiedenen Erdteilen erweitert werden und somit die Einordnung der Symbionten als eigenständige Gattung ermöglichen. Darüber hinaus stellte sich aus evolutiver Sicht die Frage, ob sich die Symbionten wirklich kongruent mit ihrem Wirt entwickelt haben. Um dies zu beantworten, wurde ein phylogenetischer Stammbaum der jeweiligen Wirte benötigt.

Da man von einem rein vertikalen Übertragungsweg der Endosymbionten ausgeht, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe mikroskopischer Techniken und *In situ*-Hybridisierungen konnten unterschiedliche Gewebeteile adulter Ameisenindividuen, aber auch Eier und Larven untersucht werden. Die bisher kaum erforschte räumliche Organisation der Bakterien während der Ameisenembryogenese konnte so näher beleuchtet werden was zusätzlich neue Erkenntnisse zu deren Übertragungsweg erbringen sollte.

Die Fütterung der Tiere mit Antibiotika sollte Aufschluss über die Funktion der Symbionten innerhalb des Ameisenorganismus bringen und klären, ob die *Camponotus*-Endosymbionten ähnlich, wie bei z.B. *Buchnera* einen Einfluß auf die Ernährung ihres Wirtes haben.