

4 Methoden

4.1 Histologie

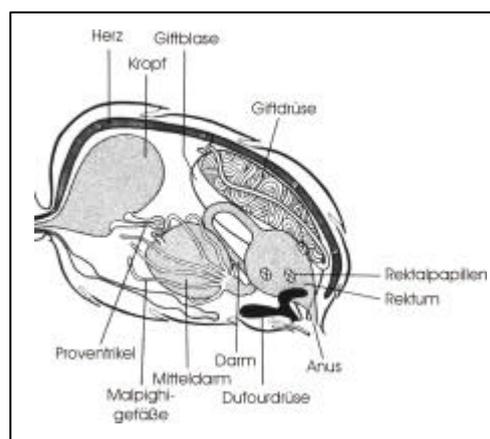
Um nähere Anhaltspunkte über das Vorkommen der hier zu untersuchenden Bakterien in verschiedenen Geweben zu erhalten, müssen diese Gewebe licht- bzw. elektronenmikroskopisch untersucht werden.

4.1.1 Versuchstiere

Für alle histologischen Untersuchungen an Arbeiterinnen bzw. Larven wird die Art *Camponotus floridanus* verwendet, da diese leicht und in großen Mengen im Labor zu halten ist. Die Königinnen dieser Art produzieren ganzjährig Eier, sodass jederzeit alle Entwicklungsstadien verfügbar sind. Für die Gewebe der unterschiedlichen Geschlechtstiere werden zusätzlich Königinnen von *C. herculeanus* und *C. ligniperdus* benutzt, da diese einfach in der näheren Umgebung Würzburgs zu sammeln sind. Die Männchen werden bei allen *Camponotus*-Königinnen nur saisonal produziert. Isoliert man Arbeiterinnengruppen kann man nach ca. 4-6 Wochen Männchen von Arbeiterinnen erhalten. Somit können zwei unterschiedliche Männchentypen von *C. floridanus* untersucht werden. Zusätzlich werden ebenfalls *C. herculeanus* Männchen (von der Königin produziert) betrachtet.

4.1.2 Präparation von unterschiedlichen Geweben

Um die Anwesenheit von Symbionten in den unterschiedlichen Geweben überprüfen zu können, werden die Mitteldärme von Arbeiterinnen, Königinnen und Männchen präpariert. Die Lage des Mitteldarms ist in der nachfolgenden Skizze dargestellt (Sagittalschnitt durch den Gaster einer *Formica*-Arbeiterin, nach Otto 1962; Gösswald 1985). Zusätzlich werden die Ovarien und Spermathecae von Königinnen, bzw. die Hoden von Männchen untersucht. Die entsprechenden Individuen werden hierfür in Graces Insect Medium (Sigma) mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten präpariert. Indem man die Gastersegmente von dorsal und ventral vorsichtig abpräpariert, können die oben erwähnten Organe freigelegt werden. Ovarien, Spermathecae und Hoden werden direkt nach der Präparation weiterverwendet, die Mitteldärme müssen zuerst mehrmals gewaschen werden, um den Darminhalt vollständig zu entfernen.



(nach Otto 1962; Gösswald 1985)

4.1.3 Fixierung für die Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Fixierung von Geweben für die Licht- oder Elektronenmikroskopie dient dazu, die Strukturen der Objekte auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu stabilisieren. Die Wirkweise von Fixierungsmitteln wie Form- oder Glutaraldehyd beruht auf einer Reaktion mit den Aminogruppen von Proteinen und Lipoproteinen, die zu deren Quervernetzung führt. Da die unterschiedlichen Organe sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht werden sollen, wird eine kombinierte Fixierung mit Fixierlösung nach Karnovsky (4% Paraformaldehyd + 1% Glutaraldehyd) und Osmiumtetroxid (OsO_4) angewandt. Osmiumtetroxid reagiert mit ungesättigten Fettsäuren, und führt, genau wie Uranylacetat, zu einer Kontrastierung des Präparats.

Die zu untersuchenden Gewebe werden nach der Präparation über Nacht oder mindestens 3 h in Karnovsky-Fixierlösung bei 4°C fixiert. Anschließend werden die Präparate 5 mal für je 3 min in Sörensenpuffer gewaschen. Als Aufbewahrungsgefäße für die Gewebestücke eignen sich Rollrand-Schnappdeckelgläschen, in welche die jeweiligen Lösungen mit Hilfe einer Pasteurpipette zugegeben und anschließend wieder abgezogen werden können. Die Fixierung in Osmiumtetroxid erfolgt ebenfalls bei 4°C für 90-120 min. Anschließend wird 5 mal für je 5 min mit dest. H_2O gewaschen. Die Kontrastierung erfolgt über Nacht bei 4°C mit 0,5% wässrigem Uranylacetat. Anschließend wird 5 mal für je 3 min mit dest. H_2O gewaschen.

Fixierlösung nach Karnovsky

4 g Paraformaldehyd (PFA) in < 100 ml dest. H_2O rühren
erhitzen auf 60°C

0,45 g NaOH Plätzchen dazugeben
abkühlen lassen

1,9 g NaH_2PO_4 zugeben
mit HCl auf pH 7,2 einstellen
mit dest. H_2O auf 100 ml auffüllen

→ diese Lösung wird in 10 ml-Portionen aliquotiert und ist bei -20°C gelagert unbegrenzt haltbar
nach dem Auftauen eines Aliquots 400 μl 25%iges Glutaraldehyd zugeben

Waschpuffer nach Sörensen

Lösung A: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, autoklavieren

Lösung B: 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, autoklavieren

Lagerung bei RT

jeweils frisch ansetzen: 30,5ml Lösung A + 19,5ml Lösung B (ergibt einen 0,1M Phosphatpuffer mit pH 7,2)

OsO_4 -Fixierlösung

2% OsO_4 in dest. H_2O

Lagerung bei 4°C

Uranylacetat-Lösung

0,5% Uranylacetat in dest. H_2O

Lagerung bei 4°C

4.1.4 Entwässerung

Um Schrumpfung und Deformation der Präparate zu vermeiden, müssen diese vor der Einbettung in Epon Schritt für Schritt entwässert werden. Während der Entwässerung ist eine Austrocknung der Gewebestücke unbedingt zu vermeiden.

Die Präparate werden in den Schnappdeckelgläschen in einer aufsteigenden Ethanolreihe bei 4°C für je 30 min in 50%, 70%, 90%, 96%, 100%, 100% EtOH entwässert. Anschließend nochmals 30 min in 100% EtOH bei Raumtemperatur.

4.1.5 Eponeinbettung

Da Ethanol mit dem Einbettungsharz Epon nicht mischbar ist, muß es vor der Einbettung durch Propylenoxid, ein mit Epon mischbares Zwischenmedium ersetzt werden.

Die in 100% EtOH gelagerten Präparate werden 2 mal für je 30 min bei RT in Propylenoxid gegeben. Danach wird das Propylenoxid schrittweise durch Epon ersetzt. Hierfür gibt man die Gewebestücke nach der Behandlung mit Propylenoxid über Nacht in ein Gemisch aus Propylenoxid:Epon (1:1). Die Schnappdeckelgläser werden nun nicht mehr verschlossen, damit bereits ein Teil des Propylenoxids verdunsten kann. Am nächsten Tag wird die Lösung durch Epon ersetzt, das man nach 2 bzw. 4 h nochmals wechselt. Schließlich werden die Objekte in einer Kunststoffform (Flacheinbettung) mit Epon in die gewünschte Orientierung gebracht. Die Polymerisation des Einbettungsharzes Epon erfolgt bei 70°C für mind. 48 h.

Epon 812

Komponente A (weich): 97,1g Epon 812 + 130,8 g Dodecylsuccinicanhydrid (DDSA)

Komponente B (hart): 90 g Epon 812 + 81,37 g Methyladicanhydrid (MNA)

→ diese Lösungen können bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut werden

Die Mischung wird jeweils frisch angesetzt:

4 Teile Komponente A + 3 Teile Komponente B + 2Vol% Dimethylaminomethylphenol (DMP-30)

Die gehärteten Eponformen werden in eine Präparatehalterung fest eingespannt und mit einer Rasierklinge unter dem Stereomikroskop zu einer vierseitigen Pyramide angespitzt („getrimmt“).

4.1.6 Herstellung und Färbung von lichtmikroskopischen Schnitten

Die lichtmikroskopischen Schnitte werden mit Hilfe eines Leitz Mikrotoms 1516 hergestellt. Von den „getrimmten“ Präparateblöcken werden am Mikrotom 1-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Für diese Schnitte wird ein Glasmesser benutzt. Der Neigewinkel des Glasmessers beträgt während des Schneidens 0,5°. Die erhaltenen Schnitte werden mit Hilfe eines Wassertropfens auf einen mit Gelatine/Chromalaun beschichteten Objektträger aufgebracht, der anschließend zum Trocknen auf eine 70°C warme Heizplatte gelegt wird. Der Objektträger wird auf der Heizplatte belassen und dort ca. 2-3 min mit Methylenblau/AzurII-Färbelösung gefärbt. Durch die Hitze kann der Farbstoff besser in das zu färbende Gewebe eindringen. Anschließend wird die Farblösung unter fließendem, deionisiertem Wasser abgespült und der Objektträger nochmals zum Trocknen auf die Heizplatte gelegt.

Die gefärbten Objektträger werden mit 2-3 Tropfen des Eindeckmediums Entellan (Merck) benetzt und luftblasenfrei mit einem 24 x 60 mm großen Deckgläschen bedeckt. Nach einer 24 stündigen Trockenzeit können die Präparate mikroskopiert werden.

Gelatine/Chromalaun-Lösung

0,5% Gelatine/0,05% Chromalaun in dest. H₂O

Objektträger werden gut gesäubert kurz in die Lösung eingetaucht, 2-3 Tage bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet

Methylenblau/AzurII-Färbelösung

Lösung A: 1% Azur II in dest. H₂O

Lösung B: 1% Methylenblau in 1% Borax

A + B zu gleichen Teilen mischen

Lagerung bei RT

4.1.7 Herstellung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Die Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie werden mit Hilfe eines RMC Ultramikrotoms MT-7000 hergestellt. Mit einem Diamantmesser (Diatome) können Schnitte mit einer Dicke von 40-70 nm erzeugt werden. Die Schnitte werden auf Kupfernetzen mit Lochblende (Plano) aufgebracht. Diese müssen vorher mit 0,4% Pioloformlösung befilmt werden um eine Anhaftung der Schnitte auf den Netzen zu gewährleisten.

Nach Aufnahme der Schnitte werden die Netze mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Hierfür wird ein Stück Parafilm auf eine Glasplatte aufgelegt und darauf Tropfen von 2% methanolischem Uranylacetat (lichtempfindlich!) aufgebracht. Die Kupfernetze werden für 20 min mit der glänzenden Seite auf die Tropfen gelegt. In der Zwischenzeit wird mit dest. H₂O verdünnte Reynolds-Bleicitratlösung (1:1) auf den Parafilm getropft (WICHTIG: Für alle Waschschritte und Verdünnungen wird dest. Wasser verwendet, das mindestens 5 min sprudelnd gekocht haben sollte, um den CO₂-Gehalt so gering wie möglich zu halten!). Die Bleicitratropfen werden mit einigen NaOH-Plätzchen umlegt und sofort mit einer Glaspetrischale abgedeckt (WICHTIG: Nicht auf die Tropfen atmen, da sonst durch das CO₂ unerwünschte Bleicarbonatkristalle auf den Schnitten ausfallen können!). Nach der Uranylacetatbehandlung werden die Netze in Methanol, Methanol:H₂O (1:1) und schließlich dest. H₂O gewaschen, mit abgekochtem Wasser aus der Spritzflasche abgespült und mit der glänzende Seite für 10 min auf die Bleicitratropfen gelegt. Anschließend werden die Netze 2 mal mit dest. H₂O gewaschen, mit abgekochtem dest. Wasser aus der Spritzflasche abgespült und an der Luft getrocknet.

Die trockenen Netze können in einer Gridbox (Plano) aufbewahrt werden.

Pioloformlösung

0,4% Pioloform in Chloroform
Lagerung bei RT

Uranylacetat-Lösung

2% Uranylacetat in Methanol
Lagerung bei 4°C

Reynolds-Bleicitratlösung

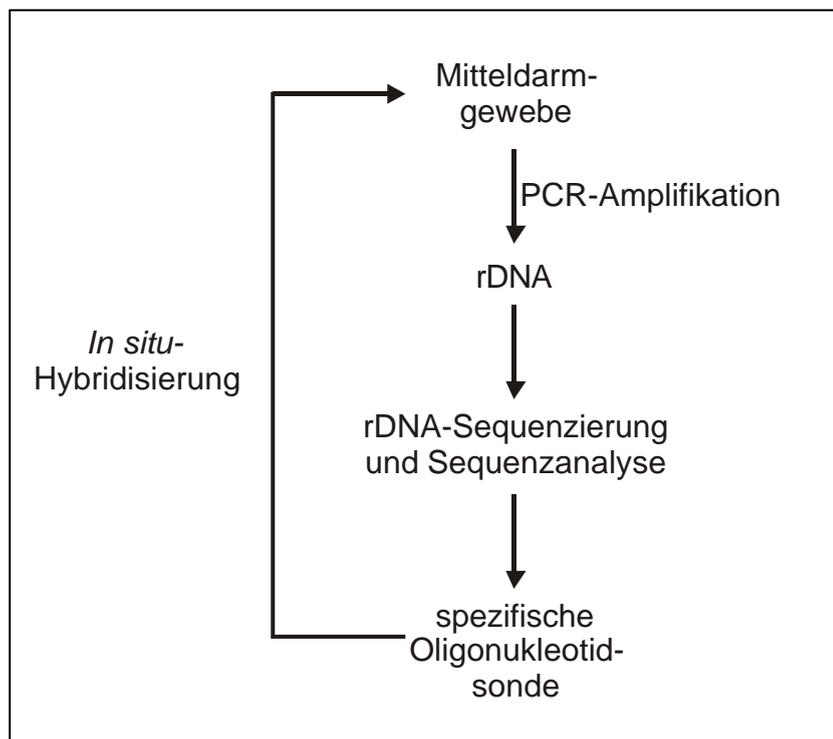
1,33 g Bleizitrat
1,76 g Natriumzitrat x 2 H₂O
30 ml frisch gekochtes dest. H₂O zugeben
schütteln, 30 min stehen lassen, dazwischen öfter kräftig schütteln
8 ml karbonatfreie 1N NaOH zugeben
ad 50 ml dest H₂O
pH ≥ 12
Lagerung bei 4°C, ca. 3 Monate haltbar

4.2 *In situ*-Hybridisierung

Bei *In situ*-Hybridisierungen werden markierte DNA- oder RNA-Sonden nicht, wie bei anderen Hybridisierungstechniken, an isolierte Nukleinsäuren auf Trägermedien wie Nylonmembran oder Nitrocellulose hybridisiert, sondern an ganze fixierte Zellen. Als Sonden dienen gruppen- oder artspezifische DNA- oder RNA-Fragmente, die immunologisch markiert werden und auf Objektträgern mit den Zellen hybridisieren. Mögliche Sonden können Restriktionsfragmente, Transkripte von Restriktionsfragmenten, Fragmente von ribosomaler RNA, die durch Reverse Transkription mit spezifischen Primern erhalten wurden (Olsen et al. 1986), oder synthetische Oligonukleotide sein. Als immunologische Markierungen sind heutzutage Fluoreszenzmarkierungen am weitesten verbreitet. Sie führen schnell zu Ergebnissen und zeigen eine hohe Auflösung, können allerdings eine geringere Sensitivität oder unspezifische Bindungen nach sich ziehen. Um einen Vorteil bezüglich der Sensitivität zu erhalten, können enzymatische Methoden, z. B. Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-DIG Antikörper in Kombination mit DIG-markierten Oligosonden, verwendet werden. Die Größe der Antikörper-Enzymkomplexe stellt wiederum ein Problem für die Durchdringung von Gewebe, oder bakteriellen Zellwänden dar, dem durch eine Vorbehandlung mit Proteinasen (Dubilier et al. 1995) oder Lysozym (Zarda et al. 1991) vorgebeugt werden kann.

Eine enzymatische Methode wird auch für die hier durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen benutzt. Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-DIG Antikörper reagieren mit synthetischen, DIG-markierten Oligonukleotiden. Für die DIG-markierten Oligonukleotide stellt die Permeabilität von Zellwänden kein Problem dar, da sie sehr klein sind (Leitch et al. 1994).

Die für die hier durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen verwendeten Oligonukleotide sind artspezifische Fragmente der 16S rRNA der entsprechenden Symbionten. Je nach Aktivitätszustand enthält eine Zelle 10^3 bis 10^5 Ribosomen (Amann et al. 1995). Da ein Signal ab 50 Kopien pro Zelle detektierbar ist, kann ein genügend starkes Signal erwartet werden (Olsen et al., 1986). Die Identifizierung der Symbionten *in situ* läuft nach dem nachfolgenden Schema ab:



Um an die 16S rDNA der Ameisensymbionten zu gelangen, wird mit dem Mitteldarmgewebe der jeweiligen Art eine PCR mit universellen 16S-Primern durchgeführt. Das amplifizierte DNA-Fragment wird kloniert und sequenziert. Durch Sequenzanalyse können die 16S rDNAs der Symbionten der verschiedenen Ameisenarten verglichen werden. Für jede einzelne Art kann eine spezifische Oligonukleotidsonde entwickelt werden, mit deren Hilfe dann im Gewebe der entsprechenden Art eine *In situ*-Hybridisierung durchgeführt werden kann.

4.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten für DNA *In situ*-Hybridisierungen

Die zu untersuchenden Individuen (Eier und verschiedene Larvenstadien von *C. floridanus*) werden, nachdem sie kurz in EtOH bzw. 25% Saccharoselösung (Gefrierschutz) getaucht werden, in 13% Carboxymethylcelluloselösung (SIGMA) eingebettet. Der Präparatehalter wird dann in flüssigen Stickstoff getaucht um die Carboxymethylcellulose und das darin Eingebettete möglichst schnell einzufrieren. An einem Reichert Jung Gefriermikrotom 2800 Frigocut-E werden mit einem Hartmetallmesser 10-15 µm dicke Schnitte angefertigt und auf mit Polylysin beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser) aufgebracht. Die Temperatur in der Schneidebox des Mikrotoms beträgt -26°C, die Objekttemperatur -30°C. Die Gefrierschnitte dürfen nicht an der Luft getrocknet werden, sondern müssen sofort nach dem Abnehmen vom Messer wieder tiefgefroren werden. Bei -20°C lassen sich die Gefrierschnitte mehrere Monate aufbewahren.

Carboxymethylcelluloselösung

13% Carboxymethylcellulose in dest. H₂O

4.2.2 DIG-Markierung der Oligonukleotidsonden

Um die synthetischen Oligosonden für die *In situ*-Hybridisierung der Kryoschnitte einsetzen zu können, müssen diese zuvor markiert werden. Dies geschieht mit Hilfe des DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Boehringer). Oligonukleotide mit einer Länge von 14 bis 100 Nukleotiden können so mit DIG-ddUTP markiert werden. Auf Eis werden folgende Komponenten gemischt:

4 µl	Reaktionspuffer (Gefäß 1; Boehringer Kit)
4 µl	CoC ₂ -Lösung (Gefäß 2; Boehringer Kit)
100 pmol	HPLC-gereinigtes Oligonukleotid
1 µl	DIG-ddUTP (Gefäß 3; Boehringer Kit)
50U	Terminale Transferase (Gefäß 4; Boehringer Kit)
ad 20 µl	dest. H ₂ O

Der Ansatz wird 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion auf Eis mit 2 µl einer frisch hergestellten Lösung aus 1 µl Glykogen-Lösung (Gefäß 8; Boehringer Kit) in 200 µl 0,2 M EDTA-Lösung, pH 8 gestoppt. Die markierten Oligonukleotide werden durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl gebunden und mit 75 µl eiskaltem Ethanol für 2 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 11000 UpM wird das Pellet mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, nochmals kurz zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 17 µl dest H₂O aufgenommen um, bei einem angenommenen Verlust von 20%, eine Konzentration von 30 ng/µl markierter Sonde zu

erhalten. Für die Hybridisierungen werden jeweils 2µl (=60 ng markierte Sonde) pro Objektträger eingesetzt.

EDTA-Lösung

0,2 M EDTA
pH 8
autoklavieren
Lagerung bei RT

LiCl-Lösung

4 M LiCl
autoklavieren
Lagerung bei RT

4.2.3 *In situ*-Hybridisierung von Gefrierschnitten

Die *In situ*-Hybridisierung wird in 3 unterschiedliche Abschnitte gegliedert:

- A** Vorbereitung der Gefrierschnitte
- B** Hybridisierung
- C** Detektion

Für alle Reaktionsschritte empfehlen sich 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner), die mit je 30 ml der entsprechenden Lösungen gefüllt sind. Die Objektträger können mit Hilfe einer Pinzette einfach in die entsprechenden Lösungen eingetaucht werden. Pro Reaktionsgefäß kann man so 2 Objektträger gleichzeitig verarbeiten, wenn man sie mit den Rückseiten zueinander in das Gefäß hineinstellt.

A Vorbereitung der Gefrierschnitte

Die tiefgefrorenen Objektträger werden, ohne sie vorher aufzutauen, in eine 4%ige PFA/PBS-Lösung, pH 7,2 überführt und für 30 min bei 4°C fixiert. Die nachfolgenden Schritte werden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min in 1xPBS werden die Objektträger für 15 min in 0,5 µg/µl Proteinase K in PBS inkubiert. Das Abstoppen dieser Reaktion erfolgt in 0,2% Glycin/PBS für 2 min. Anschließend werden die Schnitte nochmals für 10 min in 4% PFA/PBS nachfixiert und wieder 2 x je 5 min in 1xPBS gewaschen.

4% PFA/PBS-Lösung

20 g Paraformaldehyd in < 500 ml dest H₂O rühren (entspricht 4% Endkonzentration)
erhitzen auf 60°C
1,8 g NaOH-Plättchen dazugeben (erst jetzt löst sich PFA)
abkühlen lassen
25 ml 20xPBS zugeben
mit HCl auf pH 7,2 einstellen
mit dest H₂O auffüllen auf 500 ml
→ diese Lösung ist als 30 ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert unbegrenzt haltbar
nach dem Auftauen eines Aliquots können darin 2 Objektträger fixiert werden

20xPBS

160 g NaCl
4 g KCl
4 g Na₂HPO₄
ad 1000 ml dest. H₂O
autoklavieren
Lagerung bei RT

0,5 µg Proteinase K/PBS-Lösung

1µl Proteinase K Stammlösung in 40 ml 1xPBS

Proteinase K-Stammlösung

20 mg Proteinase K / ml dest. H₂O

Lagerung bei -20°C

0,2% Glycin/PBS

0,6 ml 10% Glycin-Stammlösung in 29,4 ml 1xPBS

10% Glycin-Stammlösung

10% Glycin in dest. H₂O

sterilfiltrieren

Lagerung bei RT

B Hybridisierung

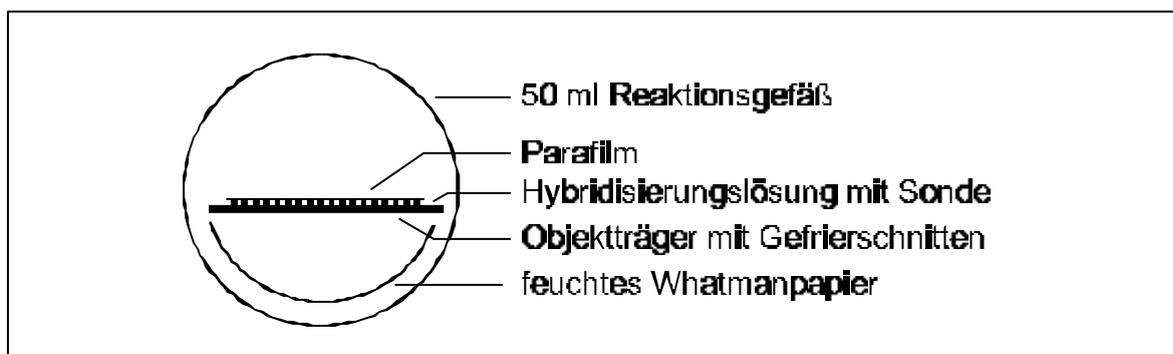
Die fixierten und mit Proteinase K vorbehandelten Gefrierschnitte werden bei einer für das jeweilige Oligonukleotid spezifischen Temperatur mit 500 µl Hybridisierungspuffer 5xSET für 10 min prähybridisiert. Hierfür wird der Puffer auf den Objektträger aufgetropft und dann mit einem auf die Größe des Objektträgers zugeschnittenen Stück Parafilm abgedeckt.

Der Schmelzpunkt T_m bzw. die in der Praxis als gleichwertig gehandhabte Dissoziationstemperatur T_d und damit die Hybridisierungsbedingungen ergeben sich für Oligonukleotide mit Längen zwischen 10 und 50 bp aus nachfolgender Formel (Thomas & Dancis, 1973; Lathe, 1985)

$$T_d = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\% (G+C)) - 820/n$$

wobei n die Anzahl der Basen im Oligonukleotid und M die Konzentration monovalenter Kationen ist.

Nach der Prähybridisierung mit dem Hybridisierungspuffer werden die Schnitte für 10 min auf einem Heizblock bei 95°C denaturiert. Nach der Denaturierung wird der Objektträger auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung der Nukleinsäuren zu verhindern. 20 µl 5xSET + 60 ng der DIG-markierten Oligosonde werden auf den Objektträger gegeben und dieser wiederum mit Parafilm abgedeckt. Um ein Austrocknen des Objektträgers während der Hybridisierung zu verhindern, wird er in einem mit feuchten Whatman-Papier ausgelegten 50 ml Reaktionsgefäß hybridisiert (siehe nachfolgende Skizze).



Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei der jeweils spezifischen Sondentemperatur.

5xSET

0,75 M NaCl
5 mM EDTA
0,1 M Tris
0,2% Blocking Reagent (Boehringer)
autoklavieren
0,025% SDS
Lagerung bei 4°C

C Detektion

Am nächsten Tag wird die Hybridisierungslösung mit 0,2xSET vorsichtig abgespült und 15 min in 0,2xSET bei Raumtemperatur gewaschen. Es erfolgt eine einminütige Equilibrierung in Puffer 1, dann eine 30minütige Inkubation in Puffer 2. Nach wiederum einer Minute in Puffer 1 werden die Schnitte mit dem Anti-DIG-Fab-AP-Konjugat, das 1:500 in Puffer 2 verdünnt wird, für 2 h, bei RT inkubiert. Die Objektträger werden nach dem Aufbringen der Antikörperlösung ebenfalls mit Parafilm abgedeckt. Die Schnitte werden anschließend 2 x 15 min in Puffer 1 gewaschen und 10 min in Puffer 3 equilibriert. Die Farbreaktion erfolgt über Nacht. Hierfür wird eine Färbelösung aus 20 µl NBT/BCIP-Stammlösung (Boehringer) in 1 ml Puffer 3 frisch zubereitet und die Objektträger in einer speziellen Plastikfärbeschale gefärbt. Mit Puffer 4 wird die Reaktion gestoppt. Die Objektträger werden kurz mit dest. H₂O gespült und 10 min in 0,1% Kongorotlösung (Merck) gegengefärbt. Nach erneutem kurzem Spülen in dest. H₂O werden die Schnitte 5 min in 50% EtOH differenziert, je 10 min in EtOH bzw. Xylol entwässert und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt. Das umgebende, nicht hybridisierte Gewebe ist nach der Gegenfärbung rot angefärbt, die Bereiche an denen die markierte Oligosonde gebunden hat sind nach der Farbreaktion blauviolett gefärbt.

Puffer 1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5
autoklavieren
Lagerung bei RT

Puffer 2

1% Blocking Reagent (Boehringer) in Puffer 1

Puffer 3

0,1 M Tris
0,1 M NaCl
50 mM MgCl₂
pH 9,5

da beim autoklavieren eine Komponente ausfällt, werden Stammlösungen hergestellt die getrennt autoklaviert werden und anschließend steril zusammengefüllt werden
Lagerung bei RT

Puffer 4

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0
autoklavieren
Lagerung bei RT

4.2.4 Fixierung und Einbettung von Gefrierschnitten für die Elektronenmikroskopie

Um die erhaltenen Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen überprüfen zu können, werden Gefrierschnitte für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet. Hierfür werden 15-20 µm dicke Gefrierschnitte nicht, wie ursprünglich beschrieben, auf Objektträger, sondern auf runde Deckgläschen (Ø 12 mm) aufgebracht. Nach kurzem Antrocknen werden die Deckgläschen sofort in Karnovsky-Fixierlösung für 20 min, auf Eis fixiert. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Für die Aufbewahrung der Deckgläschen empfehlen sich 12 Napf-Schalen, wie sie für die Zellkultur benutzt werden. Nach der Fixierung werden die Deckgläschen mehrmals mit Sörensenpuffer gewaschen, mit Hilfe einer Pinzette auf eine Glasplatte die mit Parafilm abgedeckt wird überführt und mit einigen Tropfen 2% OsO₄-Lösung für 15-20 min bedeckt. Die Deckgläschen werden mit der Pinzette wieder von der Glasplatte abgenommen, kurz in dest. H₂O getaucht und in die 12 Napf-Schale überführt. Die Gefrierschnitte werden in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 5 min in 50%, 70%, 90%, 96%, 100% EtOH entwässert. Die nun folgenden Schritte finden bei RT statt. Die Deckgläschen werden 2 mal in 100% EtOH gegeben und anschließend in ein Blockschälchen aus Glas überführt. Nun wird 2 mal 5 min mit Propylenoxid behandelt und anschließend werden die Schnitte über Nacht in einem Propylenoxid:Epon-Gemisch (1:1) belassen. Am nächsten Tag wird die Lösung durch Epon ersetzt, das man nach 2 bzw. 4 h nochmals wechselt. Schließlich werden die Deckgläschen auf eine mit Alufolie bezogene Glasplatte gegeben, eine mit Epon gefüllte Gelatine kapsel wird "aufgesetzt" und die Präparate werden für mind. 48 h bei 70°C polymerisiert. Die Weiterverarbeitung der eingebetteten Gefrierschnitte erfolgt wie schon oben beschrieben. Nach der Herstellung von Ultradünnschnitten und der Kontrastierung können die Schnitte mikroskopiert werden.

4.3. Isolierung, Klonierung und Analyse der 16S rDNA

Um die in den Mitteldärmen der *Camponotus*-Ameisen gefundenen Bakterien phylogenetisch einordnen zu können muß die 16S rDNA der Bakterien mit Hilfe universeller 16S Primer amplifiziert, kloniert und sequenziert werden.

4.3.1 Herstellung von Darm-Rohlysaten

Beim Herstellen von Darm-Rohlysaten ist darauf zu achten möglichst steril zu arbeiten, um eine Kontamination der Lysate mit anderen Bakterien zu vermeiden. Die Mitteldärme von ca. 15-20 Tieren werden in Graces Insect Medium (Sigma) präpariert, aufgeschnitten und der Darminhalt durch Spülen mit Medium entfernt. Das Darmgewebe wird in MEM-Zellkulturmedium gepoolt und wenn alle Därme präpariert sind, mit 50 µl Gentamycin pro ml MEM-Medium 4-5 mal je 5 min gewaschen. Gentamycin ist ein Antibiotikum, das nicht membrangängig ist, daher sollten die Bakterien innerhalb der Mycetocyten intakt bleiben. Da die Amplifikation teilweise mit universellen eubakteriellen Primern durchgeführt wird, müssen die Därme sehr gut gewaschen werden. Nach der Gentamycinbehandlung werden die Därme noch mehrmals mit MEM-Medium gewaschen. Mit einem sterilen Eppendorf Homogenisator wird das Gewebe im Eppendorfcap zerrieben. Für die weitere Verwendung für die PCR wird das Lysat vor Gebrauch 10 min bei 110°C im Heizblock erhitzt, um die Zellen aufzuschließen.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung eines DNA-Fragments unter Einsatz zweier flankierender synthetischer Oligonukleotide (Primer), deren Sequenz komplementär zu jeweils einem der beiden Stränge ist. Durch automatisierte Wiederholung eines Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und anschließender DNA-Synthese mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) kommt es zu einer selektiven, exponentiellen Anreicherung des jeweiligen DNA-Fragments.

Reaktionsansatz:	3 µl	Template (Darm-Rohlysate)
	je 2 µl	Primer (0,4 µg/µl)
	1 µl	dNTP's (je 20 mM)
	10 µl	10 x PCR-Puffer
	7,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	0,7 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	ad 100 µl	dest. H ₂ O (steril)

Nach dem Zusammenpipettieren durchläuft der Ansatz in einem Thermocycler 30-40 Reaktionszyklen mit folgenden Bedingungen:

1. Denaturierungsschritt: 1 min bei 94°C
2. Hybridisierungsschritt: 1 min bei 55°C
3. Strangverlängerung (Extension): 1 min bei 72°C

Zu Beginn der Reaktionszyklen wird die DNA für 3 min bei 94°C in einem sog. „first step delay“ denaturiert und am Ende der Zyklen wird nochmals die Extensionsphase für 3 min bei 72°C im sog. „last step delay“ verlängert.

Die Standardbedingungen können in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Oligonukleotid/DNA-Hybride und der Länge des zu amplifizierenden Fragments variiert werden. Die Kontrolle der PCR-Reaktion erfolgt durch Auftragung von 5 µl des PCR-Produkts auf ein Agarosegel.

4.3.3 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgt unter Verwendung des QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen) nach beiliegender Gebrauchsanweisung.

4.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, werden diese durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe gemäß aufgetrennt. Die Agarosekonzentration variiert je nach Größe der erwarteten Fragmente zwischen 0,7% (große Fragmente) und 1,2% (kleine Fragmente). Durch Zugabe von Etidiumbromid, das in DNA-Doppelstränge interkaliert, in das Gel, fluoreszieren die aufgetrennten DNA-Fragmente bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 200-250 nm als rote Banden und können photographisch festgehalten werden.

Zur Herstellung eines Gels wird die Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie sich gelöst hat. Nach Abkühlen auf ca. 45°C werden 7 µl Etidiumbromid-Stammlösung zugegeben (Endkonzentration 7×10^{-4} µg/ml). Die Agarose wird in die abgedichtete Gelkammer der Elektrophoreseapparatur gegossen und vor dem Aushärten wird ein Kamm mit gewünschter Taschenbreite (0,5-1,5 cm) eingesteckt. Nachdem die Agarose fest geworden ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in der Elektrophoresekammer einige mm hoch mit 1 x TAE als Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden mit 1/10 Vol des HSE-Probenpuffers versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Eine Spannung von 100-150 V wird angelegt. Nach dem Lauf wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und mit Hilfe eines Video-Printers dokumentiert.

50 x TAE-Laufpuffer

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
ad 1000 ml dest. H ₂ O	

HSE-Probenpuffer

4 M Harnstoff
50% Saccharose
50 mM Na ₂ EDTA
0,1% Bromphenolblau

Etidiumbromid-Stammlösung

10 mg EtBr in 1 ml dest. H ₂ O

4.3.5 Ligation

Alle hier durchgeführten Ligationen werden mit Hilfe des Ready-To-Go™pUC18Sma I/BAP + Ligase Kit (Pharmacia Biotech), nach beiliegender Gebrauchsanweisung durchgeführt.

4.3.6 Transformation

1-4 µl eines Ligationsansatzes werden mit einem Aliquot frisch, auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen vermischt. Dieser Ansatz wird mind. 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird 1 min auf 42°C erhitzt, 5 min auf Eis gestellt und anschließend wird 1 ml 37°C warmes LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension werden auf Agarselektionsplatten ausplattiert. Die restliche Lösung wird kurz zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl abgenommen, das Pellet wird darin resuspendiert und ebenfalls auf eine Agarplatte ausplattiert.

4.3.7 Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 100-200 µl einer *E. coli* DH5α-ÜNK angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Hat die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,4 (ca. 80 Klett) erreicht, wird sie 15 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 4°C und 4000 UpM zentrifugiert (Heraeus-Minifuge). Das Bakterienpellet wird in 0,2 Vol eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und wiederum mind. 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation werden die Zellen in 0,1 Vol 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20% Glycerin aufgenommen, in Aliquots zu je 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C aufbewahrt.

4.3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Analytischer Maßstab (Minipräparation)

2 ml einer *E. coli*-ÜNK werden durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 UpM pelletiert, in 100 µl Lösung 1 aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Man vortext den Ansatz mit 200 µl Lösung 2, denaturiert 5 min bei RT und gibt 150 µl Lösung 3 hinzu. Nach weiteren 5 min werden bakterielle DNA und Zelltrümmer bei 4°C, 14000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 2 Vol EtOH versetzt. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wird die DNA durch Zentrifugation (s.o.) präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in 30 µl dest. H₂O aufgenommen.

Minipräparation für automatische Sequenzierung

Da man für die automatische Sequenzierung besonders reine Plasmid-DNA benötigt, wird aus 2 ml einer *E. coli*-ÜNK mit Hilfe des Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Biorad) Plasmid-DNA isoliert. Die erhaltene DNA muß mit sterilem bidest. H₂O eluiert werden.

Präparativer Maßstab (Midipräparation)

Zur Präparation größerer Plasmid-DNA-Mengen können aus einem Kulturvolumen von 100 ml mit Hilfe des Nucleobond Nucleotrap AX 100 Kit (Macherey-Nagel) ca. 50 µg Plasmid-DNA pro ml erhalten werden.

4.3.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA innerhalb bestimmter Nukleotidsequenzen. Die Spaltung der DNA erfolgt entweder in beiden DNA-Strängen symmetrisch, wobei Fragmente mit stumpfen Enden gebildet werden, oder aber um 1-4 Nukleotide versetzt, wobei überstehende 3'- oder 5'-Enden gebildet werden.

Ein Restriktionsansatz (Reaktionsvolumen 20 µl) enthält 0,1 bis 1 µg/µl DNA (=0,7 Vol des Gesamtreaktionsvolumens), 0,1 Vol 10-fach konzentrierten Restriktionspuffer und die entsprechende Restriktionsendonuklease (2-5 U pro µg Plasmid-DNA). Das im Lagerpuffer des Restriktionsenzym enthaltenes Glycerin kann in zu hoher Konzentration die Spaltfähigkeit des Enzyms hemmen, weshalb das Enzymvolumen ein Zehntel des Gesamtreaktionsvolumens nicht überschreiten sollte. Die für das Restriktionsenzym optimale Pufferkonzentration bzw. die Inkubationstemperatur richten sich nach den Empfehlungen des Enzym-Herstellers.

In dieser Arbeit wurde eine DNA-Spaltung der isolierten Plasmid-DNA durchgeführt um zu überprüfen, ob der verwendete pUC 18 Vektor wirklich ein Insert besitzt.

4.3.10 Automatische Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob das amplifizierte und klonierte PCR-Produkt wirklich ein 16S rDNA Gen darstellt muß es ansequenziert werden. Dies geschieht mit Hilfe des ABI PRISM™-Sequenziersystems (Perkin Elmer).

Es gibt viele Methoden für die Sequenzierung von DNA. Die bisher meistverwendete klassische Methode nach Sanger et al. (1977) beruht auf einer enzymatischen Kettenverlängerung von einer definierten Startsequenz aus. Durch Zugabe jeweils eines 2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphats (ddNTP) zu den vier zur DNA-Synthese benötigten Deoxyribonukleotiden (dNTPs), kommt es zu einem Kettenabbruch, sobald ein ddNTP anstelle eines dNTP eingebaut wird. Den ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, die zur Kettenverlängerung nötig ist. Dies führt dazu, dass man ein Gemisch von DNA-Fragmenten mit identischem 5'-Ende erhält. Setzt man der Reaktion ein radioaktiv markiertes dNTP zu, so läßt sich die gesuchte Sequenz nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Polyacrylamid-Gel durch Autoradiographie ermitteln. Der Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit der radioaktiv markierter dNTPs, um eine Schwärzung des Röntgenfilms zu erreichen. Außerdem bedarf es eines wesentlich größeren Zeitaufwandes, da alle Arbeitsschritte von Hand durchgeführt werden müssen.

Eine neuere Sequenzierungsmethode bedient sich eines automatischen ABI PRISM™-Systems. Als Enzym wird eine AmpliTaq®-Polymerase verwendet. Diese Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* das durch eine Mutation seine 5'-3' Nuklease-Aktivität verloren hat. Eine zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms führt zu einer Veränderung seiner Akzeptanz gegenüber Dideoxynukleotiden, die dadurch leichter eingebaut werden können. Es handelt sich hier um eine Fluoreszenz-Sequenzierung, was einen enormen Vorteil gegenüber der herkömmlichen radioaktiven Sequenzierung mit sich bringt. Bevor DNA-Fragmente mit dem ABI PRISM™-System automatisch analysiert werden können, müssen sie mit einem Fluoreszenz-Farbstoff für die Detektion markiert werden. Für die Sequenzier-Reaktionen dieser Arbeit wird der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit (Perkin Elmer) verwendet. Die PCR-Reaktionen, sowie deren weitere Verarbeitung wird nach beiliegender Gebrauchsanweisung durchgeführt.

4.3.11 Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes der Symbionten und ihrer Wirte

Die Sequenzen des nahezu kompletten 16S-Gens der jeweiligen Symbiontenart wird mit schon bekannten 16S rRNA Sequenzen, die im Ribosomal Database Project (RDP) gespeichert sind, verglichen (Maidak et al. 1997). Für die Konstruktion des phylogenetischen Stammbaumes wird eine Kombination aus drei statistischen Programmen verwendet (Square Distance Methode; Maximum Likelihood; Neighbour Joining), die im Programmpaket PHYLIP (phylogeny interference package), Version 3.5c (Felsenstein 1993; Saitou und Nei 1987) enthalten sind. Für die Errechnung der bootstrap values werden die Programme NJFIND und NJBOOT benutzt. Diese Arbeiten wurden von Prof. Dr. Erko Stackebrandt (DSMZ Braunschweig) durchgeführt.

Für die Erstellung des Stammbaumes werden 385 Basenpaare der CytochromOxidase Untereinheit I der Ameisenwirte verwendet (Gadau et al. 1999). Die phylogenetischen Analysen (Parsimonie) dieser Teilsequenzen werden mit Hilfe des Computerprogrammes PAUP*4.0b1 (Swofford 1998) durchgeführt. Die angegebenen bootstrap-Werte beruhen auf 1000 Replikationen. Den phylogenetischen Stammbaum der Wirte erstellte Dr. Jürgen Gadau (Universität Würzburg).

4.4 Fütterungen mit Antibiotika

Frühere Untersuchungen an Blattläusen zeigten, dass Fütterversuche mit Antibiotika zu einem teilweisen, oder gänzlichen Verlust der Bakterien führen können. Die Ameisen werden daher mit gängigen, aus der Literatur (Wilkinson, 1998) bekannten Konzentrationen unterschiedlicher Antibiotika gefüttert, um ein möglichst optimales Ergebnis zu erzielen.

4.4.1 Vorbereitung der Ameisen

In frisch gegipste, mit 70% EtOH ausgewaschene Plastikbehälter (19 x 19 x 9 cm³) mit Nesthöhle (siehe Material, Ameisenhaltung) werden je 200 „minor“ (kleine) und 200 „major“ (große) Arbeiterinnen eingesetzt. Die Nestboxen werden in einen separaten, geschlossenen, desinfizierten Klimaschrank mit einer konstanten Temperatur (25°C) und konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gestellt (Beleuchtung zwischen 7:00 und 19:00).

4.4.2 Antibiotika-Konzentrationen

Für die Testreihe werden folgende Antibiotika-Konzentrationen verwendet:

Antibiotikum	Menge [mg/ml]	Endkonzentration
Rifampicin	10	1%
	50	5%
Chloramphenicol	10	1%
	50	5%
Tetrazyklin	10	1%
	50	5%
	100	10%
	Menge [μ l/ml]	
Ciprobay 200®	5	0,5%
	10	1%

Die pulverförmigen Antibiotika werden mit der entsprechenden Menge Honigwasser jeweils frisch angesetzt. Da die drei Antibiotika Rifampicin, Chloramphenicol und Tetrazyklin nur schwer wasserlöslich sind, für die Versuche jedoch mit Honigwasser angesetzt werden müssen, müssen die Ansätze sehr kräftig gerührt werden, um die gewünschte Endkonzentration einzustellen. Ciprobay 200® ist eine Antibiotikumlösung, die den Wirkstoff Ciprofloxacin enthält und in Kliniken als Zusatz für Infusionen genutzt wird. Bei den angegebenen Mengen handelt es sich um Erfahrungswerte aus der Zellkultur (pers. Mitteilung: L. Greiffenberg), bei der das Antibiotikum erfolgreich gegen Mykoplasmenkontaminationen angewendet wird.

4.4.3 Durchführung der Fütterungen

Um eine Bakterienkontamination der Tiere durch äußere Einflüsse zu vermeiden, müssen Futtertiere, Honigwasser und Trinkwasser autoklaviert werden, ebenso Futterschälchen und Pinzetten, mit denen man in die Boxen hineinfasst. Es ist darauf zu achten, dass die ausgegipsten Plastikbehälter in denen sich die Versuchstiere befinden, so sauber wie möglich gehalten werden. Nachdem die Tiere 2 Tage gehungert haben, beginnt man mit der ersten Antibiotika-Fütterung, die nach nachfolgendem Schema abläuft:

Woche	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
1	Antibiotika-Fütterung	-	-	Antibiotika-Fütterung	-
2	Heimchen/Honigwasser	Heimchen/Honigwasser	Heimchen/Honigwasser	Heimchen/Honigwasser	Heimchen/Honigwasser
3	siehe Woche 1				

Die Testgruppen werden jeweils 2 x pro Woche (Montag und Donnerstag) für 4 h mit je 1 ml Antibiotikum-Honigwasser-Suspension gefüttert. Die Kontrollgruppen erhalten jeweils 1 ml Honigwasser. Zwischen den Fütterungen erhalten die Tiere keine weitere Nahrung. Täglich wird frisches Trinkwasser nachgefüllt und der Gips befeuchtet, außerdem werden tote Ameisen aus der Nestbox genommen, um zu verhindern, dass die Tiere kanibalistisch Nahrung erhalten. In der darauffolgenden Woche werden die Tiere täglich 4 h mit Honigwasser und autoklavierten Heimchenteilen gefüttert. In der dritten Woche beginnt man wieder mit den Antibiotika-Fütterungen. Dieser Rhythmus sollte 6-8 Wochen durchgeführt werden.

4.5 Isolierung und Kultivierung der Symbionten

4.5.1 Isolierung von Endosymbionten aus Mitteldärmen

Da die Endosymbionten in spezialisierten Zellen, den Mycetocysten, lokalisiert sind, muß eine Möglichkeit gefunden werden, das Mitteldarmgewebe zu entfernen, ohne die Bakterien zu zerstören. Dies ist mit einer einfachen Methoden möglich, die bereits zur Isolierung von Mitochondrien erfolgreich benutzt wird. Man verwendet einen Glashomogenisator um das Gewebe zu zerstören, die Bakterien bleiben dabei intakt. Um eine ausreichend große Menge Bakterien zu erhalten, müssen ca. 200 Mitteldärme möglichst steril präpariert werden. Die Därme werden auf Eis in MEM-Medium gesammelt und anschließend 5 mal je 5 min in 50 µl Gentamycin pro ml MEM-Medium gewaschen. Nach der Gentamycinbehandlung werden die Därme noch 3 mal je 5 min gewaschen und anschließend in 1 ml eiskalten Isolierungspuffer aufgenommen und in einen sterilen 2 ml Glashomogenisator (GLW) überführt. Die Mitteldärme werden mehrere Minuten homogenisiert. Anschließend wird die Mitteldarm-Puffer-Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C 10 min bei 2200 UpM zentrifugiert um die Gewebeteile abzutrennen. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues steriles Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 4°C und 9700 UpM zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in 1 ml Isolationspuffer resuspendiert und die oben beschriebenen Zentrifugationsschritte werden nochmals wiederholt um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen. Anschließend wird das erhaltene Pellet in einer entsprechenden Menge Isolationspuffer resuspendiert und kann dann entsprechend weiterverarbeitet werden. Die Suspension enthält neben vielen Mitochondrien auch die intakten Endosymbionten.

Isolierungspuffer

25 mM HEPES
250 mM Saccharose
2 mM EDTA
52 µM BSA
pH 7,4
sterilfiltrieren
Lagerung bei 4°C

4.5.2 Kultivierung in verschiedenen Nährmedien

Mit 100 µl der isolierten Endosymbionten-Isolierungspuffer-Suspension werden in 100 ml Erlenmeyerkolben (Schott) je 50 ml der verschiedenen Flüssigmedien angeimpft. Die Ansätze werden sowohl aerob, als auch mikroaerophil (Flüssigmedium wird überschichtet mit 5 ml sterilem Paraffinöl) bei RT inkubiert. Folgende Medien werden benutzt (Rezepte siehe 3.5):

Müller-Hinton-Yeast-Glucose-Fructose-Pyruvat-Medium

Müller-Hinton-Yeast-Glucose-Fructose-Saccharose-Pyruvat-Medium

Müller-Hinton-Yeast-Saccharose-Pyruvat-Medium

Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI-Medium)

2 x YT-Medium

NB-Glucose-Fructose-Saccharose-Medium

NB-Glucose-Fructose-Medium

NB-Saccharose-Medium

LB-Medium

SOB-Medium

Grace's Insect Medium (Sigma)

Schneider's Insect Medium (Life Technologies)

4.5.3 Insektenzellkultur

Insektenzellen haben den Vorteil, dass sie ohne CO₂ bei 28°C inkubiert werden können. Sie sind weniger anfällig für Kontaminationen, daher bedarf es auch keiner Antibiotikumzugabe ins Medium.

Für die Kultivierungsversuche der Symbionten werden Schneider's Drosophila- und SF9-Zellen (*Spodoptera frugiperda*-Zellen) in Kultur gehalten. Der Nachteil bei Schneider's Drosophila-Zellen ist, dass sie nur teilweise adhärent, d.h. für Infektionsversuche nicht besonders gut geeignet sind. SF9-Zellen dagegen sind adhärent und lassen sich auf Deckgläschen anziehen, was ein späteres Färben zur Infektionskontrolle möglich macht.

4.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden in Gegenwart des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren, um eine intrazelluläre Eisbildung zu verhindern. In flüssigem Stickstoff ist eine Lagerung über mehrere Jahre möglich.

Einfrieren

Um Zellen dauerhaft aufzubewahren werden Aliquots von kultivierten Zellen eingefroren. Hierzu werden die Zellen in Medium auf Eis vorgekühlt, die Lebendzellzahl wird bestimmt und anschließend werden die Zellen in Medium + 10% DMSO überführt. Ein Milliliter Zell-Medium-10% DMSO-Suspension wird jeweils in ein Kryo-Röhrchen gegeben. Die fest verschlossenen Kryo-Röhrchen werden zwischen zwei Styropor-Ständer über Nacht bei -80°C eingefroren um eine schonende Einfriergeschwindigkeit zu erzielen. Am nächsten Tag werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und sind dort unbegrenzt haltbar. Es sollten zwischen 4×10^5 und 4×10^6 Zellen pro ml eingefroren werden.

Auftauen

Im Gegensatz zum Einfrieren von Zellen muß das Auftauen rasch geschehen. Nach der Entnahme der Zellen aus flüssigem Stickstoff werden die Zellen schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das Kryo-Röhrchen mit den darin enthaltenen Zellen wird mit 70% EtOH desinfiziert. Der Inhalt wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Dann wird 5 min bei 100 UpM zentrifugiert, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und je 5 ml in eine kleine T-Flasche gegeben. Die Deckel der T-Flaschen können zugeschraubt werden, da die Insektenzellen kein Kohlendioxid zum wachen benötigen.

4.5.5 Zählen von Zellen

50 µl der Zellsuspension werden mit 50 µl Trypanblau in einem Eppendorf-Cap gemischt. Trypanblau ermöglicht die Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen, indem tote Zellen durch den Farbstoff blau gefärbt werden. In einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer werden die lebenden Zellen in drei Großquadraten ausgezählt. Die Mittelwerte werden mal zwei genommen (Verdünnung mit Trypanblau!) und mit 10^4 multipliziert. Daraus ergibt sich die Lebendzellzahl/ml.

4.5.6 Splitten von Schneider's Drosophila-Zellen und SF9-Zellen

Da die adhärennten Insektenzellen nicht sehr empfindlich sind, kann man sie mit mechanischen Mitteln ablösen. Das Zellkulturmedium wird zunächst aus der T-Flasche abgesaugt. Die Flasche wird 1-2 mal kräftig auf die Arbeitsfläche aufgeschlagen, und mit 2 ml frischem Medium werden die so gelösten Zellen abgeschwemmt. Die 2 ml Zellsuspension werden mit Hilfe einer Pipette aufgenommen und auf zwei neue T-Flaschen mit je 5 ml frischem Medium aufgeteilt.

4.5.7 Infektion von Schneider's Drosophila Zellen oder SF9-Zellen mit isolierten Endosymbionten

Die Symbionten werden direkt vor der Infektion isoliert. Eine 24-Napfschale wird mit runden Deckgläschen (Ø 12 mm) bestückt. In eine T-Flasche mit 2 Tage alten SF9-Zellen werden, nach ablösen der Zellen (siehe oben), 10 ml frisches Medium gegeben. Je 1 ml Zell-Medium-Suspension wird pro Napf pipettiert. Die Zellen wachsen ÜN zu einem dichten Zellrasen. Diese Zellen können mit frisch isolierten Symbionten infiziert werden. Hierfür wird das Zellkulturmedium abgezogen und durch Zellmedium-Symbionten-Suspension unterschiedlicher Konzentrationen ersetzt.

Ansatz	Bakteriensuspension [µl]	Mediummenge [µl]
1	50	950
2	100	900
3	200	800
4	500	500

Die Infektion erfolgt ÜN. Am nächsten Tag werden Kontrollfärbungen durchgeführt, um den Infektionserfolg zu überprüfen. Hierfür werden die Zellen 3 mal 5 min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend werden die Deckgläschen aus den Napfschalen herausgenommen und 5 min auf einem Tropfen eiskaltem Methanol fixiert. Danach werden sie 30 min mit 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung (Merck) gefärbt, kurz in H₂O dest. gewaschen, 2 mal 5 min in Aceton entwässert und in Entellan eingedeckelt. Nach dem Trocknen können die gefärbten Zellen lichtmikroskopisch untersucht werden.

20xPBS

160 g NaCl
 4 g KCl
 4 g Na₂HPO₄
 ad 1000 ml dest. H₂O
 autoklavieren
 Lagerung bei RT