

**Untersuchungen zur genetischen Transformation des  
obligaten *Paramecium*-Endosymbionten *Caedibacter*  
und  
zur Induzierbarkeit dessen RebC-Promotors**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

DISSERTATION  
(D386)

vorgelegt von

**Lars Czubatinski**

Vorsitzender:	Prof. Dr. H. Zankl
1. Berichterstatter:	PD Dr. J. Kusch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J.W. Deitmer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache  
15. Januar 2004

Kaiserslautern 2004

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<hr/>	
1.1 ENDOBIOTISCHE BAKTERIEN	6
1.2 <i>CAEDIBACTER</i> -ARTEN ALS ENDOSYMBIONTEN VON <i>PARAMECIUM</i>	9
1.3 HETEROLOGE EXPRESSION VON BTI-TOXINEN IN <i>PARAMECIUM</i> -ENDOSYMBIONTEN	13
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<hr/>	
2.1 CHEMIKALIEN	19
2.2 MEDIEN	19
2.2.1 MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	19
2.2.2 MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON <i>PARAMECIUM</i>	21
2.2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	23
2.2.3.1 Antibiotika-Stammlösungen	23
2.2.3.2 Weitere Puffer und Lösungen	24
2.3 OLIGONUKLEOTIDE	31
2.4 PLASMIDE	32
2.5 ORGANISMEN	32
2.6 ENZYME	32
2.7 VERMEHRUNG UND KULTIVIERUNG VON PROTOZOEN UND BAKTERIEN	33
2.7.1 KULTIVIERUNG VON <i>PARAMECIUM</i>	33
2.7.1.1 Kultivierung von <i>Paramecium</i> -Dauerkulturen	33
2.7.1.2 Kultivierung von <i>Paramecium</i> -Massenkulturen zur Gewinnung von Endosymbionten	33
2.7.1.3 Kultivierung von <i>Paramecium</i> -Zelllinien	34
2.7.1.4 Kultivierung von <i>Paramecium</i> mit Antibiotika-Selektion	34
2.7.2 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	35
2.7.2.1 Kultivierung der Futterbakterien	35
2.7.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35
2.7.2.3 Glycerinkulturen	35
2.7.2.4 Versuche zur in vitro Kultivierung von Endosymbionten	35
2.8 METHODEN ZUR ISOLIERUNG VON ENDOSYMBIONTEN UND R-KÖRPERN	37
2.8.1 DICHTEGradientENZENTRIFUGATION	37
2.8.2 ECTEOLA-SÄULE	40
2.9 FÄRBEMETHODEN UND MIKROSKOPIE	42
2.9.1 UNTERSUCHUNG VON OBJEKTEN MIT GFP	42
2.9.2 ORCEIN-ESSIGSÄURE-FÄRBUNG	42

## INHALT

---

2.9.3	DAPI-FÄRBUNG VON <i>PARAMECIUM</i> -ENDOSYMBIONTEN	43
<b>2.10</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>44</b>
2.10.1	PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN	44
2.10.1.1	Plasmid Mini-Präparation	44
2.10.1.2	Plasmid Maxi-Präparation	45
2.10.1.3	Ultrafiltration von Plasmid-DNA	45
2.10.1.4	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-Präparationen	46
2.10.2	RESTRIKTION UND GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN	46
2.10.2.1	Restriktion von DNA	46
2.10.2.2	Gelelektrophorese von DNA	47
2.10.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
2.10.3	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	47
2.10.3.1	PCR mit symbiontenhaltigen <i>Paramecium</i> -Zellen	49
2.10.3.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen	50
2.10.4	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	51
2.10.5	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> UND HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	51
2.10.6	SEQUENZIERUNG VON DNA	52
<b>2.11</b>	<b>METHODEN ZUR TRANSFORMATION VON <i>CAEDIBACTER</i></b>	<b>52</b>
2.11.1	ELEKTROPORATION ISOLIERTER <i>CAEDIBACTER</i>	52
2.11.2	REINFEKTION APOSYMBIONTISCHER <i>PARAMECIEN</i>	53
2.11.3	ELEKTROPORATION VON <i>CAEDIBACTER</i> IN <i>PARAMECIUM</i>	54
2.11.4	PARTIKELBOMBARDEMENT VON <i>CAEDIBACTER</i> IN <i>PARAMECIUM</i>	55
2.11.5	SELEKTION VON <i>PARAMECIEN</i> MIT TRANSGENEN ENDOSYMBIONTEN MIT HILFE DER RESISTENZ GEGEN SYMBIONTENTOXINE	57
<b>2.12</b>	<b>METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON PROMOTORAKTIVITÄTEN</b>	<b>58</b>
2.12.1	MESSUNG DER GFP-FLUORESZENZ IN BAKTERIENSUSPENSIONEN	58
2.12.2	BESTIMMUNG DER PROMOTORAKTIVITÄTEN IN HUNGERNDEN <i>E. COLI</i>	58
2.12.3	BESTIMMUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT IN WACHSENDEN <i>E. COLI</i>	60
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>ISOLIERUNG VON ENDOSYMBIONTEN AUS <i>PARAMECIUM</i></b>	<b>62</b>
3.1.1	DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION	63
3.1.2	SÄULENCHROMATOGRAPHIE	65
<b>3.2</b>	<b>HERSTELLUNG APOSYMBIONTISCHER ZELLEN</b>	<b>66</b>
<b>3.3</b>	<b>TRANSFORMATION MIT ANTIBIOTIKARESISTENZ-MARKER</b>	<b>68</b>
3.3.1	DETEKTION UND SELEKTION DER TRANSFORMANTEN	68
3.3.1.1	Selektion durch Toxizität der „Killerparamecien“	69
3.3.1.2	Selektion mit R-Körpern und Killerextrakten	72

## INHALT

---

3.3.1.3	Detektion von Transformanten mittels PCR-Nachweis	73
3.3.2	TRANSFORMATION ISOLIERTER CAEDIBACTER	75
3.3.2.1	Elektroporation isolierter <i>Caedibacter</i> und direkte Reinfektion	75
3.3.2.2	In vitro Kultivierung von <i>Caedibacter</i>	77
3.3.3	IN SITU TRANSFORMATION VON <i>CAEDIBACTER</i> IN <i>PARAMECIUM</i>	78
3.3.3.1	In situ Elektroporation	78
3.3.3.2	Biolistik	81
<b>3.4</b>	<b>TRANSFORMATION MIT GFP-MARKERGENEN</b>	<b>83</b>
3.4.1	TRANSFORMATION MIT PASV2	84
3.4.1.1	Signalintensität von <i>E. coli</i> /pASV2	84
3.4.1.2	Elektroporation mit pASV2	84
3.4.2	TRANSFORMATION MIT GFP MUT2-MARKERGENEN	85
3.4.2.1	Konstruktion der pLC-Plasmide	85
3.4.2.2	Signalintensität der pLC-Konstrukte	88
3.4.2.3	Elektroporation mit pLC5	90
3.4.2.4	Biolistik mit pLC5	90
<b>3.5</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES REB-PROMOTORS</b>	<b>91</b>
3.5.1	DIE UNTERSCHIEDLICHEN PLC-KONSTRUKTE	91
3.5.2	STRESSINDUKTION DES REB-PROMOTORS	93
3.5.2.1	Messung der Promotoraktivitäten in hungernden <i>E. coli</i>	93
3.5.2.2	Messung der Promotoraktivitäten in wachsenden <i>E. coli</i>	95
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>ISOLIERUNG VON ENDOSYMBIONTEN</b>	<b>104</b>
<b>4.2</b>	<b>HERSTELLUNG APOSYMBIONTISCHER ZELLEN</b>	<b>105</b>
<b>4.3</b>	<b>TRANSFORMATION MIT ANTIBIOTIKARESISTENZMARKER</b>	<b>106</b>
4.3.1	DETEKTION UND SELEKTION VON TRANSFORMANTEN	109
4.3.2	TRANSFORMATION ISOLIERTER CAEDIBACTER	112
4.3.3	IN SITU TRANSFORMATION VON <i>CAEDIBACTER</i>	117
<b>4.4</b>	<b>TRANSFORMATION MIT GFP-MARKERGENEN</b>	<b>123</b>
4.4.1	TRANSFORMATION MIT PASV2	126
4.4.2	TRANSFORMATION MIT GFP MUT2-MARKERGENEN	127
<b>4.5</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES REB-PROMOTORS</b>	<b>130</b>
4.5.1	DIE UNTERSCHIEDLICHEN PLC-KONSTRUKTE	132
4.5.2	STRESSINDUKTION DES REB-PROMOTORS	133
4.5.2.1	Messung der Promotoraktivitäten in hungernden <i>E. coli</i>	134
4.5.2.2	Messung der Promotoraktivitäten in wachsenden <i>E. coli</i>	137

## INHALT

---

<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>139</b>
--------------------------	------------

---

<b>6 LITERATUR</b>	<b>141</b>
--------------------	------------

---

<b>7 DANKSAGUNGEN</b>	<b>157</b>
-----------------------	------------

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Endobiotische Bakterien

Die Klassifizierung einer Bakterienart mit Hilfe herkömmlicher mikrobiologischer Methoden setzt in der Regel die Kultivierbarkeit des betreffenden Bakteriums voraus. Eine sehr große Zahl von Bakterienarten, möglicherweise sogar der überwiegende Teil, lässt sich allerdings nicht kultivieren. Dazu zählen vor allem Bakterien, die als Endobionten in einem anderen Organismus leben. Die nichtkultivierbaren Bakterienarten, deren systematische Einordnung gar nicht oder nur schwierig zu treffen ist, entziehen sich für uns erst recht einer gezielten gentechnischen Nutzung. Der sich rasant weiterentwickelnden Gentechnik bleibt damit ein enormes Potential verschlossen. Da weiterhin auch viele sehr bedeutende Humanpathogene endobiotisch oder sogar endocytisch leben, bleiben auch sie für uns mehr oder weniger unzugänglich. Als Beispiel seien hier die Gattungen *Chlamydia* und *Rickettsia* angeführt.

Unter den Vertretern der Chlamydien finden sich die Erreger unterschiedlicher Infektionskrankheiten des Menschen (SCHLEGEL, 1992). Dazu zählen das Trachom, das weltweit die Hauptursache für Erblindung beim Menschen darstellt, epidemische Fleckfiebererkrankungen, verschiedene Ornithosen wie die Psittakose („Papageienkrankheit“) sowie verschiedene Infektionskrankheiten der Lunge und des Urogenitaltraktes (MADIGAN ET AL., 1997). Neuere Erkenntnisse deuten sogar darauf hin, dass ultrachronische Chlamydieninfektionen für die Genese der Arteriosklerose verantwortlich sind (BAUER-KRYLOV ET AL., 2000; BLASI ET AL., 1996; FONG, 2000; STILLE & DITTMANN, 1998; THEEGARTEN ET AL., 2000). Bei allen genannten Krankheitserregern handelt es sich um obligat intrazellulär lebende Bakterien, die bis auf wenige Ausnahmen nicht außerhalb lebender Zellen vermehrt werden können (MADIGAN ET AL., 1997). Die endocytische Lebensweise geht bei Chlamydien und Rickettsien mit extremen

Anpassungen und Reduktionen einher. Da die obligat intrazellulär lebenden Parasiten auf die Metabolite der Wirtszellen zurückgreifen können, wurde ihr Genom stark reduziert. Das Chlamydiengenom ist mit ca. 1 kb eines der kleinsten bisher bekannten Bakteriengenome. Diesen Bakterien fehlt die Fähigkeit zur eigenen Synthese von Metaboliten der komplexen Stoffwechselwege, über die freilebende Bakterien verfügen. Im Gegensatz dazu verfügen sie aber über spezielle Transportsysteme, die es ihnen erlauben, sich aus dem Stoffwechsel der Wirtszelle zu „bedienen“. Bei Chlamydien und Rickettsien wurden beispielsweise Transportproteine nachgewiesen, mit deren Hilfe die Parasiten ATP aus dem umgebenden Cytoplasma aufnehmen und im Gegenzug ADP abgeben (TJADEN ET AL., 1999). Die Bakterien profitieren so vom Energiestoffwechsel des Wirtes. Als weitere Anpassung an die intrazelluläre Lebensweise konnten bei den genannten Bakterien auch Transportproteine nachgewiesen werden, die einen Nettoimport aller Nukleoside aus dem Cytoplasma der Wirtszelle ermöglichen.

Obligat intrazelluläre Bakterien finden sich nicht nur als Parasiten in höheren Tieren, sondern sind ebenso bei Protozoen sehr häufig. Die weitgehende Anpassung an die intrazelluläre Lebensweise ist Ursache dafür, dass auch diese Bakterien in der Regel nur in entsprechenden Wirtszellen kultiviert werden können.

Grundvoraussetzung für die genetische Transformation einer bestimmten Bakterienart ist zunächst, dass das betreffende Bakterium auch kultiviert werden kann. Lassen sich Bakterien wie zum Beispiel *E. coli* auf Festmedien anziehen, so ist die Selektion der gewünschten Mutanten leicht möglich. Durch den Einsatz entsprechender Markergene, in der Regel Antibiotikaresistenz-Gene, wachsen nur diejenigen Zellen, die bei der Transformationsprozedur ein entsprechendes DNA-Konstrukt aufgenommen haben, auf dem Medium an. Da die Aufnahme von fremder DNA bei jedem Transformationsverfahren ein eher seltenes Ereignis ist, lässt sich durch den Einsatz solcher Resistenzgene die große Zahl der nichttransformierten Zellen eliminieren. Die auf dem Festmedium heranwachsenden Kolonien entstehen

jeweils als Nachkommenschaft einer einzelnen ausgestrichenen Bakterienzelle. Die gewünschten Klone lassen sich dann leicht isolieren. Die Selektion von Transformanten lässt sich mit der berühmten „Suche nach der Nadel im Heuhaufen“ vergleichen. Im beschriebenen Fall von *E. coli* und bei vielen anderen entsprechend kultivierbaren Bakterien, lässt sich diese in der beschriebenen Weise elegant lösen.

Die Transformation von obligat intrazellulär lebenden Bakterien stellt uns dagegen vor prinzipielle Probleme. Zunächst muss für eine Transformation eine ausreichend große Zahl von Bakterienzellen angezüchtet werden. Isoliert man die Bakterien dann aus ihren Wirtszellen, so müssen erstere nach der Transformation wieder auf eine entsprechende Zelle übertragen werden. Dabei kann noch nicht zwischen Transformanten und nichttransformierten Zellen unterschieden werden. Versucht man die Bakterien direkt in ihren Wirtszellen zu transformieren, so muss ein Verfahren gefunden werden, dass einerseits zu einer ausreichend großen Zahl von transformierten Bakterien führt, andererseits aber möglichst geringen Schaden bei den Wirtszellen hinterlässt. Stirbt eine Wirtszelle ab, so gehen auch die in ihr enthaltenen möglichen Transformanten verloren. Die Detektion der gewünschten Transformanten ist ebenfalls problematisch. Macht man sich Antibiotikaresistenzgene zu Nutze, so besteht dann zwar die Möglichkeit nichttransformierte Bakterienzellen abzutöten, die betroffenen Wirtszellen bleiben dabei aber erhalten. Schließlich bleibt noch das Problem, dass jede Wirtszelle eine große Zahl von intrazellulären Bakterien enthalten kann. Die Vereinzelung eines gewünschten Klones ist damit schwierig.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Transformation von in *Paramecium* obligat intrazellulär lebenden Bakterien durchgeführt, um diese für eine gezielte gentechnische Nutzung zu erschließen.

Intrazellulär in Protozoen lebende Bakterien werden traditionell als Endosymbionten bezeichnet (GÖRTZ & BRIGGE, 1998). Der Begriff Symbiose wird damit in Anlehnung an De Bary in erweitertem Sinne verwendet. Er schließt alle Abstufungen der interspezifischen Wechselbeziehung vom Mutualismus bis zum Parasitismus ein (BALL, 1969). Man trägt damit der

Tatsache Rechnung, dass die physiologischen Beziehungen zwischen Wirt und Bakterium oft noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

## 1.2 *Caedibacter*-Arten als Endosymbionten von *Paramecium*

Bei Ciliaten der Gattung *Paramecium* finden sich zahlreiche Arten, die bakterielle Endosymbionten beherbergen, die ihre Wirte zu einem sogenannten „Killer“-Stamm werden lassen. Befinden sich Paramecien eines solchen „Killer“-Stammes im selben Medium mit Paramecien, die keine oder Symbionten einer anderen Art in sich tragen, so werden diese innerhalb weniger Stunden bis Tage abgetötet. Man nennt diese Zellen dann „sensitive Paramecien“. Dieses Phänomen wurde bereits 1938 entdeckt (SONNEBORN, 1938). Die damaligen Untersuchungen zeigten, dass die Killereigenschaft an im Cytoplasma befindliche Partikel gebunden ist. Diese Partikel wurden *kappa*-Partikel genannt (AUSTIN, 1948; SONNEBORN, 1943). Dass es sich bei den *kappa*-Partikeln um endosymbiontische Bakterien handelt, war zunächst noch unklar. Neben mikroskopischen Untersuchungen brachten insbesondere molekularbiologische Analysen bis 1970 den Beweis dafür, dass es sich bei den Partikeln um Bakterien handelt (PREER, 1975). Unter Verwendung des International Code of Nomenclature of Bacteria wurden die *kappa*-Partikel unter der Gattung *Caedibacter* zusammengefasst (LAPAGE ET AL., 1975). Sie wurden als gramnegative, unbewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchen beschrieben. Durch die Sequenzanalyse der 16S rDNA konnte die Gattung *Caedibacter* auch phylogenetisch eingeordnet werden. Sie wird dem Stamm der Proteobakterien („Purpurbakterien“) zugeordnet (SPRINGER ET AL., 1993).

Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop ergaben, dass *kappa*-Populationen meistens aus zwei morphologisch deutlich unterscheidbaren Formen bestehen. Die sogenannte „bright“-Form enthält einen großen stark lichtbrechenden Einschlusskörper, der refrakter Körper oder kurz R-Körper genannt wird. In der anderen morphologischen Form fehlt ein solcher

Einschlusskörper, sie wird „nonbright“-Form genannt. Oft wird auch einfach von „Brights“ bzw. „Nonbrights“ gesprochen. Bei dem R-Körper handelt es sich um ein Proteinband, das ähnlich einer Papierrolle aufgewickelt ist.

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass für die Killereigenschaft die „bright“-Form verantwortlich ist (PREER ET AL., 1953; SMITH-SONNEBORN & VAN WAGTENDONK, 1964; DILTS & QUACKENBUSH, 1986). Die „nonbright“-Form kann sich im Gegensatz zur „bright“-Form vermehren und unter Bildung von R-Körpern in die „bright“-Form umwandeln (MUELLER, 1963).

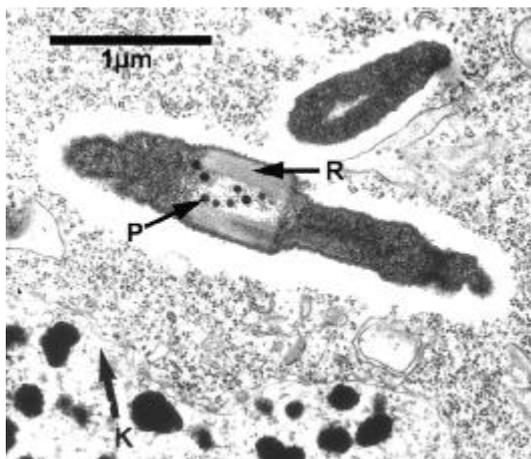
Die *kappa*-Partikel werden von den „Killer“-Zellen über die Cytopyge ausgeschieden (PREER ET AL., 1974 A). Nimmt eine andere Paramecienzelle Brights auf, so werden diese zunächst in der Nahrungsvakuole verdaut und so der R-Körper freigelegt. Das Milieu der Nahrungsvakuole ( $\text{pH} \leq 6,5$ ) führt zu einem teleskopartigen Entrollen des Proteinbandes (PREER ET AL., 1974 A). Das Band durchstößt dann die Membran der Nahrungsvakuole und der Inhalt der Vakuole kann in das Cytoplasma der Zelle gelangen (JURAND ET AL., 1971, 1978). Die Zelle stirbt dann innerhalb weniger Stunden bis Tage ab. Der R-Körper dient dabei allerdings nur als Vehikel für das eigentliche Toxin, das ebenfalls in die Nahrungsvakuole mitaufgenommen wird. Das Toxin selbst ist noch unbekannt. Zahlreiche Untersuchungen zeigten aber, dass es sich auch um ein Protein handelt (PREER & PREER, 1967).

Nehmen Paramecien „bright“-Formen der eigenen Symbionten auf, so werden sie nicht abgetötet. Die Bakterien werden verdaut. Die Ursache für diese Immunität ist noch unbekannt. Sie ist aber eng mit dem Vorhandensein der Symbionten in dem jeweiligen *Paramecium* verknüpft. Befreit man Paramecien durch die Applikation von Antibiotika von ihren Symbionten, so werden sie sensitiv für die toxische Wirkung der „bright“-Formen ihrer ehemaligen Symbionten.

Wird die reproduktive, nicht-toxische „nonbright“-Form von einem sensitiven *Paramecium* aufgenommen, wird diese entweder verdaut oder es erfolgt eine Infektion der betreffenden Paramecien-Zelle mit dem Symbionten (MUELLER, 1963, 1964; SONNEBORN, 1943; TALLAN, 1959, 1961). Voraussetzung für eine Infektion ist das Vorhandensein des K-Allels bei der Wirtszelle. Ist nur das

kodominant exprimierte k-Allel vorhanden, kann keine Infektion erfolgen. Die Infektion kann auch durch Konjugation erfolgen. Im Verlauf der Konjugation bildet sich eine Cytoplasmabrücke zwischen den Konjugationspartnern aus, über die Endosymbionten in eine andere Wirtszelle gelangen können.

Über die Häufigkeit einer Infektion finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben (MUELLER, 1963, 1964; PREER ET AL., 1974 A). Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ist sowohl von der Symbiontenart als auch von der Paramecienart abhängig. Insgesamt gesehen scheint es sich aber um ein seltenes Ereignis zu handeln (LANDIS, 1981, 1987; PREER ET AL., 1974 A). Der Erhalt der Endosymbiontenpopulation scheint also eher vom Konkurrenzvorteil aufgrund der Killereigenschaft abzuhängen, als von einer Infektion neuer Wirtszellen (LANDIS, 1987). Es wurde bereits postuliert, dass Endosymbionten ihren Wirtszellen unter bestimmten natürlichen Umweltbedingungen einen Selektionsvorteil verschaffen (PREER ET AL., 1974 A). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich Paramecien, die Symbionten beherbergen, in Mischkulturen gegenüber symbiontenfreien Paramecien des gleichen Stammes durchsetzen (LANDIS, 1981).



**Abb. 1-1:**

Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Caedibacter caryophilus* im Cytoplasma von *Paramecium novaurelia*.

Eine „bright“-Form wurde longitudinal angeschnitten.

K: Kernhülle; R: R-Körper,  
P: Phagenkapsid.

(STREMMEL, 1995)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von Endosymbionten verwendet, die in unterschiedlichen Arten von *Paramecium* leben. Zum einen handelte es sich um *Caedibacter taeniospiralis* aus *Paramecium tetraurelia* Stamm 298 (POND ET AL., 1989). Zum anderen um *Caedibacter caryophilus* aus *Paramecium novaurelia* Stamm BGD19 (KUSCH ET AL., 2000). Beide Symbionten befinden sich im Cytoplasma ihrer Wirtszellen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass bei *Caedibacter caryophilus*, wie bei den meisten Arten der Gattung *Caedibacter*, der R-Körper jeweils mit ikosaedrischen Phagenkapsiden assoziiert ist. Die R-Körpersynthese wird bei diesen Arten vermutlich vom Phagengenom kodiert (PREER & PREER, 1967; PREER & JURAND, 1968; GRIMES & PREER, 1971; PREER ET AL., 1974 A). Im Gegensatz dazu liegen die Gene zur R-Körpersynthese bei *Caedibacter taeniospiralis* auf einem Plasmid. Die R-Körper-kodierende Region des ca. 43 kb großen Plasmids konnte bereits in *E. coli* kloniert und exprimiert werden (QUACKENBUSH & BURBACH, 1983). Der ca. 2,7 kb große Bereich des Plasmids pKAP47 wurde sequenziert. Sequenzanalysen lassen in diesem Bereich drei ORFs erkennen. Die 3 codierenden Bereiche wurden RebA, RebB und RebC genannt. Die Sequenzen der regulatorischen Regionen sowie die RBS entsprechen denen von *E. coli* (HERUTH ET AL., 1994). Die Regulation der R-Körpersynthese ist noch unklar. Die Umweltfaktoren, die die Synthese des R-Körpers steuern, sind ebenfalls noch weitgehend unbekannt. Hunger der Wirtszellen scheint ein Faktor zu sein der eine vermehrte Ausbildung der „bright“-Form induziert. Die Bestrahlung mit UV-Licht induzierte ebenfalls die vermehrte Bildung von „Brights“ (SONNEBORN, 1970; PREER ET AL., 1974 B). Die Bildung von R-Körpern kann damit als Antwort auf physiologische Stressbedingungen der Wirtszellen gedeutet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die weiteren Aufschluss über die genetische Regulation der R-Körpersynthese geben. Die Tatsache, dass bei der Ausbildung von R-Körpern große Mengen an Proteinen unter Kontrolle der Reb-Loci gebildet werden, macht diese Sequenzen als mögliche Kontrollregionen für eine Expression von

Fremdproteinen in *Caedibacter* sehr interessant. Eine gezielte gentechnische Expression von Fremdproteinen unter Kontrolle der R-Körperpromotoren setzt ein genaues Verständnis der Regulation der R-Körpersynthese voraus. Darin liegt ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

### **1.3 Heterologe Expression von Bti-Toxinen in *Paramecium*-Endosymbionten**

Viele der weltweit für den Menschen bedrohlichsten Erkrankungen werden von Moskitos übertragen. Neben Gelbfieber, Filariose, Dengue-Fieber und Aboviren fordert dabei die Malaria die meisten Opfer. Sie ist damit die bedeutendste von Parasiten übertragene Krankheit (KAIN ET AL., 2001). Im Jahr 1998 wurden weltweit ca. 300 Millionen klinischer Malariafälle registriert (WHO, 1999). Über eine Million Menschen starben dabei an der Krankheit. Mehr als 90 % dieser Fälle waren im südlich der Sahara gelegenen Afrika zu beklagen. Der größte Teil davon waren Kinder (WHO, 1999).

Die Bekämpfung der Malaria erfolgt am effektivsten durch die Bekämpfung der jeweiligen Überträger (MILLER, 1992). Als Vektoren der unterschiedlichen *Plasmodium*-Arten fungieren Dipteren der Gattungen *Anopheles*, *Culex* und *Aedes*. Zur Bekämpfung werden in erster Linie chemische Insektizide wie z. B. Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), Malathion, Gammoxan, Chlordan und Organophosphate eingesetzt. Zusätzlich konnte die Zahl der Todesfälle durch den Einsatz von Medikamenten wie Chloroquin und Pyrimethamin-Sulfadoxin gemindert werden. Die Nachteile dieser Bekämpfungsverfahren wurden aber schon deutlich. Die schädlichen Langzeitwirkungen, die Anreicherung in der Nahrungskette sowie das Auftreten von Resistenzen (es treten Resistenzen bei Mücken gegenüber Insektiziden als auch Resistenzen bei Plasmodien gegen die eingesetzten Medikamente auf) fordern alternative Bekämpfungsmethoden. Die biologische Bekämpfung der Überträger mit Hilfe von Bakterientoxinen ist dabei sehr vielversprechend. Besonders geeignet sind die von *Bacillus thuringiensis israelensis* produzierten Bti-

Toxine. Die Bakterien bilden bei der Sporenbildung einen großen, mikroskopisch deutlich zu erkennenden parasporalen Kristall. Wird dieser von einer Mückenlarve aufgenommen, findet im alkalischen Milieu des Darms der Mückenlarve eine Konformationsänderung statt, aus den den Kristall bildenden Proteinen wird ein Toxin gebildet, das spezifisch an Rezeptoren des Darmepithels bindet und einen Flüssigkeitseinstrom in die Zellen des umgebenden Gewebes bewirkt. Die Larven sterben ab (KNOWLES & ELLAR, 1987). Aus dem relativ breiten Spektrum an bisher bekannten *B. thuringiensis*-Toxinen, können Toxine ausgewählt werden, deren Wirkungsspektrum sich sehr eng auf die gewünschten Mückenlarven beschränkt. Die Bti-Toxine sind hoch wirksam und töten Mückenlarven zum Teil in geringeren Dosen als vergleichbare Insektizide. Die Toxine werden sehr schnell wieder in der Natur abgebaut und zeigen keinerlei toxische Wirkung bei anderen Insekten und höheren Tieren (DAVIDSON, 1982; LAIRD ET AL., 1990). Nachteilig ist allerdings, dass das ausgebrachte Bti-Toxin nur wenige Tage bis Wochen im Habitat aktiv bleibt. Insbesondere die Larven von *Anopheles* halten sich im Oberflächenfilm der Stillgewässer auf (MERITT ET AL., 1992). Die ausgebrachten Bti-Sporen sedimentieren aber relativ schnell und werden auch durch die Einstrahlung von UV-Licht inaktiviert. Es wurden schon zahlreiche Ansätze zur Verlängerung der Persistenz der Toxine im Habitat verfolgt (PORTER ET AL., 1993). Durch die Entwicklung unterschiedlicher Formulierungen konnten dabei schon Fortschritte erzielt werden. Von der KABS<sup>1</sup> werden z.B. die abgetöteten Bacilli in Eisstücke eingefroren in die Gewässer ausgebracht. Die Eisstücke schwimmen auf der Wasseroberfläche und geben so beim Auftauen die toxischen Partikel langsam in den Oberflächenfilm ab. Sehr vielversprechend sind auch Untersuchungen, bei denen die *Bacillus*-Sporen zunächst an den Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* verfüttert wurden. Die Toxine wurden in den Ciliaten zunächst in den Nahrungsvakuolen angereichert. Mittels der so mit Toxinen „befruchteten“ Einzeller konnte die Aktivität des Giftes im Habitat deutlich

---

<sup>1</sup> KABS: Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage am Oberrhein.

verlängert werden (MANASHEROB ET AL., 1998). Das „Verpacken“ der Sporenkristalle in einen größeren Organismus, der sich zu dem noch selbstständig in der gleichen Zone wie die Mückenlarven bewegt, erhöht zusätzlich die Wahrscheinlichkeit der Ingestion durch die Larven. Noch effektiver wäre es aber, wenn die Toxine direkt an ihrem „Einsatzort“ von entsprechenden Organismen produziert werden würden. Die Zellen von *B. thuringiensis* verbleiben aber nur sehr kurze Zeit an der Wasseroberfläche, sie sinken sehr schnell ab und sedimentieren. Weiterhin erreichen sie im natürlichen Habitat keine hohen Zelldichten und sind auch empfindlich gegenüber Wasserverschmutzungen (PORTER ET AL., 1993). Die heterologe Expression in Organismen, die an der Wasseroberfläche leben, liegt deshalb nahe. Es wurden daher bereits Versuche mit *Caulobacter* und Cyanobakterien durchgeführt. Die Versuche hatten aber leider nicht den erwünschten Erfolg. Ursache dafür war entweder eine zu geringe Toxinproduktion oder die Tatsache, dass die heterolog exprimierte Proteine keine toxische Wirkung hatten (DE MARSAC ET AL., 1987; ANGSUTHANASOMBAT & PANYIM, 1989; THANABALU ET AL., 1992; CHUNGJATUPORCHNAI, 1990).

Im Rahmen eines von PD Dr. J. Kusch geleiteten und von der DFG geförderten Projektes sollten Bti-Toxine heterolog in den intrazellulär in *Paramecium* lebenden Endosymbionten exprimiert werden. Da die obligat intrazellulären Symbionten der Gattung *Caedibacter*, wie bereits oben beschrieben, bei der Ausbildung der R-Körper sehr große Mengen an Proteinen produzieren, sollten sie auch in der Lage sein, die gewünschten Toxine erfolgreich zu synthetisieren. Ähnlich der Bildung des toxischen parasporalen Kristalls bei *B. thuringiensis israelensis*, werden die R-Körperproteine als unlöslicher Proteinkristall in der Zelle eingelagert. In beiden Fällen ist die Proteinproduktion so groß, dass mikroskopisch deutlich sichtbare Einschlüsse in den jeweiligen Bakterienzellen entstehen. Die Tatsache, dass das Toxin in einem *Paramecium*-Endosymbionten gebildet werden würde, hätte aber auch noch weitere Vorteile. Gleichsam in den Paramecien „verpackt“ würde das Toxin permanent den Mückenlarven in ihrem Habitat angeboten werden. Paramecien können in allen erdenklichen

Stillgewässern und langsam fließenden Gewässern leben. Sie kommen auch in Reisfeldern und Brackwässern vor. Gerade in stehenden, stark eutrophierten Gewässern mit anoxischen Bedingungen im Sediment sucht *Paramecium* die Nähe zur Oberfläche und steht damit als Beute für die Mückenlarven zur Verfügung. Mit der Aufnahme einer *Paramecium*-Zelle würde eine Mückenlarve sofort eine größere Zahl von toxischen Bakterien aufnehmen. Die Zahl der Symbionten pro Wirtszelle beträgt ca.  $10^2$ - $10^3$ . Bei erfolgreicher Toxinproduktion durch die Symbionten sollte die Aufnahme eines *Paramecium* ausreichen eine Mückenlarve abzutöten. Die „Darreichung“ der Bti-Toxine eingeschlossen in einem Ciliaten hat sich, wie im Falle von *Tetrahymena* bereits zitiert, schon als sehr effizient erwiesen. Würde das Toxin aber darüberhinaus noch direkt durch einen gentechnisch erzeugten Endosymbionten in dem Einzeller produziert werden, wäre die biologische Bekämpfung der Malaria-Vektoren sehr einfach und kostengünstig. Paramecien lassen sich problemlos in großen Mengen züchten. Da weder aufwendige Medien noch sterile Anzuchtbedingungen notwendig sind, wäre die Produktion auch in tropischen Entwicklungsländern leicht durchführbar. Einmal im Habitat ausgebracht wären die toxischen Einzeller unter Umständen über Jahre gegen die Mückenlarven wirksam. Auf den Einsatz von teuren und umweltbelastenden chemischen Insektiziden könnte dann verzichtet werden. Die Problematik der Ausbringung rekombinanter Organismen in die Umwelt muss dabei allerdings beachtet werden. Dieses soll aber an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden.

Im Gegensatz zu unter Laborbedingungen kultivierten Bakterien muss die Expression von Fremdproteinen bei gentechnisch veränderten Organismen, die ins Freiland entlassen wurden, unter der genetischen Regulation von Umweltsignalen erfolgen, die in dem gewählten Habitat auch tatsächlich auf den Organismus einwirken und so die gewünschte heterologe Expression induzieren. Es gilt also universelle Signale zu finden, die unter natürlichen Bedingungen möglichst starke Promotoren zur Proteinexpression aktivieren (DE LORENZO, 1994). Im Falle von *Caedibacter* bietet es sich an, Fremdproteine unter der Kontrolle der Promotoren des Reb-Locus zu

exprimieren. Die Synthese der R-Körper der „bright“-Formen zeigt, dass unter Kontrolle dieser Promotoren prinzipiell eine sehr hohe Proteinexpression möglich ist. Die Tatsache, dass immer ein gewisser Anteil einer Symbiontenpopulation R-Körper bildet, spricht weiterhin dafür, dass dieser Promotor mit einer gewissen Sicherheit unter natürlichen Bedingungen aktiv ist. Die Bildung der Bti-Toxine in *Caedibacter* unter Kontrolle der Reb-Promotoren sollte zumindest bei einem bestimmten Teil der Symbionten eine starke Proteinexpression sicherstellen. Die Faktoren, die in *Caedibacter* die R-Körpersynthese triggern, sind noch weitgehend unbekannt. Sollte sich zeigen lassen, dass beispielsweise Hunger oder allgemein physiologischer Stress den Reb-Promotor aktiviert, stünde damit ein Regulationssystem zur Verfügung, das wie gefordert durch ein universelles Signal gesteuert wird. Da Bakterien unter Freilandbedingungen im Gegensatz zu exponentiell, unter Nährstoffüberschuss wachsenden Kulturen immer Hunger und Stressbedingungen ausgesetzt sind, ist Hunger als Signal zur Steuerung der Genexpression unter Freilandbedingungen besonders geeignet (DE LORENZO, 1994). Der Reb-Promotor aus *Caedibacter* könnte dann auch zur Konstruktion anderer gentechnisch modifizierter Organismen eingesetzt werden, deren Genexpression unter Freilandbedingungen reguliert werden soll.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Einerseits sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem sich *Caedibacter* erfolgreich mit einem Plasmid transformieren lässt. Andererseits sollte untersucht werden, inwieweit die Promotoren des Reb-Locus aus *C. taeniospiralis* durch Stresssignale induziert werden können.

Zur Transformation von *Caedibacter* wurden unterschiedliche Strategien verfolgt, die sich zunächst grundlegend in der Wahl der Markergene unterschieden. In einem Fall wurden Antibiotikaresistenz-Gene verwendet. Im zweiten Ansatz dienten verschiedene GFP-Gene als genetische Marker.

Bei der Selektion mit Antibiotika sollte dabei als erstes ein Verfahren entwickelt werden, mit dem es möglich ist, effizient symbiontenhaltige von symbiontenfreien Paramecien zu trennen. Dies ist notwendig, da nach einer Antibiotikaselektion der in *Paramecium* lebenden Bakterien die Wirtszellen, die keine Transformanten beherbergen (nichttransformierte *Caedibacter* werden durch das Antibiotikum abgetötet), von den Paramecien, die die gesuchten Transformanten enthalten, getrennt werden müssen. Dies sollte durch die toxische Wirkung, die von den Symbionten selbst ausgeht, geschehen. Symbiontenhaltige Paramecien sind resistent gegen die Symbiontentoxine, symbiontenfreie Paramecien werden abgetötet. Weiterhin wurde getestet, inwieweit sich nach einer Antibiotikaselektion die gewünschten Transformanten durch spezifische PCR-Techniken detektieren lassen.

Zur Transformation selbst wurde die Elektroporation und die sogenannte Biolistik, also der Beschuss mit mikroskopischen Partikeln, die mit DNA beschichtet wurden, eingesetzt. Die Elektroporation sollte sowohl mit isolierten als auch mit in den Wirtszellen befindlichen *Caedibacter* erfolgen. Die Transformation mit GFP-Markergenen sollte im Gegensatz zu der mit Antibiotikaresistenzen den Vorteil haben, dass transformierte *Caedibacter* kurze Zeit nach Aufnahme schon direkt in den Paramecien detektiert werden könnten.

Die Untersuchungen zur Induzierbarkeit des Reb-Promotors sollten mit Hilfe eines speziellen Promotor-Sondenvektors durchgeführt werden. Das entsprechende DNA-Fragment musste dazu vor ein GFP-Gen in das Plasmid inkloniert werden. Mit dem erhaltenen Konstrukt sollte dann in *E. coli* der Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf die GFP-Synthese bestimmt werden. So sollte untersucht werden, inwieweit sich der Reb-Promotor aus *Caedibacter* durch universelle Stresssignale aktivieren lässt, und wie stark dieser Promotor im Vergleich zu anderen bekannten Promotoren ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden analysenrein von den folgenden Firmen bezogen:

Baker	(Deventer, Niederlande)
Boehringer Mannheim	(Mannheim)
Difco	(Detroit, USA)
Gibco	(Paisley, Schottland)
ICN	(Eschwege)
Merck	(Darmstadt)
Roth	(Karlsruhe)
Serva Feinbiochemika	(Heidelberg)
Sigma	(Deisenhofen)

### 2.2 Medien

#### 2.2.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

##### Standard-Nähragar

37 g Standard-Nähragar (Merck, Darmstadt) wurde in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bis zur vollständigen Lösung aufgekocht.

### **LB-Medium**

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt und das Medium autoklaviert.

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar hinzugefügt.

### **Selektivmedien**

Durch die Zugabe von Antibiotika zu Fest- bzw. Flüssigmedien wurden entsprechende Selektionsbedingungen für Bakterien geschaffen. Die in den Medien eingestellten Endkonzentrationen sind bei den verwendeten Antibiotika angegeben (s. 2.2.3.1). Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums.

### **SOC-Medium**

Trypton	2	g
Hefeextrakt	0,5	g
NaCl 1 M	1	ml
KCl 1 M	0,25	ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M	0,5	ml
MgSO <sub>4</sub> 1 M	0,5	ml
Glucose 2 M	1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml	

Trypton, Hefeextrakt, NaCl, KCl wurden in 97 ml Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Glucose- und die Magnesium-

Lösungen zugegeben, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 100 ml aufgefüllt und das Medium sterilfiltriert (0,2 µm). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### **Medium zur in vitro Kultivierung von *Caedibacter***

Wie Respirationspuffer (COLLOMBET ET AL., 1997) oder LB, aber zusätzlich mit:

Glucose-6-phosphat	6	mM
Malat	6	mM
ATP ,CTP, UTP, GTP	6	mM
Zellextrakt (s. 2.7.2.4)		1/25

### **Minimalmedium (für Promotorstudien)**

Salzlösung	200	ml
Glucose	1	%
Casamino Acids	0,2	%
Kanamycin	50	µg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1 l

Für die Promotorstudien wurden ebenso Minimalmedien hergestellt, denen Glucose oder Aminosäuren fehlten.

## **2.2.2 Medien zur Kultivierung von *Paramecium***

### **WGP (wheat grass powder-Medium)-Stammlösung**

Zur Herstellung der Stammlösung wurden jeweils 100 g der wheat grass powder-Trockensubstanz in 2 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> für 15 min aufgekocht. Die erhaltene Lösung wurde abdekantiert und über 8 Lagen Gaze filtriert. Das Filtrat wurde in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Frankfurt) bei maximaler

Drehzahl von Schwebstoffen befreit. Die erhaltene Flüssigkeit wurde mittels Büchnertrichter bis zur vollständigen Klärung filtriert (Whatman, Filter-Nr. 4). Das Volumen der erhaltenen Stammlösung wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 2 l eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### **WGP-Medium**

WGP-Stammlösung	500 ml
WGP-Puffer	500 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 l

Das Medium wurde direkt auf die benötigten Kulturgefäße verteilt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Vor Gebrauch wurde das Medium mit *Klebsiella minuta* von Schrägagar beimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Für schnell wachsende Kulturen wurde vor dem Verfüttern  $\beta$ -Sitosterol (Endkonzentration 0,8  $\mu$ g/ml) zugegeben.

### **Volvic**

Als Wasch- bzw. Hungermedium für *Paramecium* wurde das stille Mineralwasser der Firma Volvic verwendet.

## 2.2.3 Puffer und Lösungen

### 2.2.3.1 Antibiotika-Stammlösungen

#### Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin 0,5 g

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 50 ml

sterilfiltrieren (0,2 µm), Lagerung bei –20 °C.

Endkonzentration: 50 µg/ml

#### Tetracyclin-Stammlösung

Tetracyclin 50 mg

Ethanol (100 %) ad 50 ml

Lagerung bei –20 °C.

Endkonzentration: 15 µg/ml

#### Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin 0,5 g

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 50 ml

sterilfiltrieren (0,2 µm), Lagerung bei –20 °C.

Endkonzentration: 150 µg/ml

### Streptomycin-Stammlösung

Streptomycin	0,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50 ml

sterilfiltrieren (0,2 µm), Lagerung bei -20 °C.

Endkonzentration: 100 µg/ml bzw. 30 µg/ml (bei *Paramecium*)

### 2.2.3.2 Weitere Puffer und Lösungen

#### WGP-Puffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	27,8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	35,6 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

#### Respirationspuffer (COLLOMBET ET AL., 1997)

Saccharose	225	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	mM
KCl	10	mM
EDTA	1	mM
Tris-HCl	10	mM

Es wurde pH 7,4 eingestellt.

**3x PBS (phosphate buffered Saline)**

NaCl	24	g
KCl	0,6	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,32	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,72	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800	ml

pH 7,4 wurde mit HCl eingestellt.

**1x PBS**

3x PBS	333	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	666	ml

**1x PBS mit NaCl (Stressinduktion)**

wie 1 x PBS, zusätzlich noch 33 g NaCl pro Liter.

**McIlvaine-Puffer**

0,1 M Zitronensäure:

Zitronensäure	1,92	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100	ml

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,2	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1	l

18 ml 0,1 M Zitronensäure und 82 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ergeben einen Puffer mit pH 7.

### 50x TAE

Tris	243	g
EDTA	37,2	g
Essigsäure	57,1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l	

243 g Tris wurden in 800 ml Wasser gelöst. Es wurden 57,1 ml Essigsäure und 37,2 g EDTA (Di-Natriumsalz) hinzugefügt und der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 7,5-7,8 eingestellt. Das Volumen der so erhaltenen Lösung wurde mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

### 1x TAE

50x TAE	20	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	980	ml

### Lysis-Puffer

Tris	0,60	g
KCl	1,86	g
MgCl <sub>2</sub>	0,25	g
Tween 20	2,25	g
Nonidet P40	2,25	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml	

0,60 g Tris wurden mit 490 ml destilliertem Wasser verrührt und mit verdünnter Salzsäure auf pH 8,3 eingestellt. Die restlichen Substanzen wurden darin gelöst und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Lysis-Puffer autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurden jeweils Aliquots von 10 ml mit 6 µl Proteinase K versetzt, über ein 0,2 µm Sieb sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei –20 °C gelagert.

### 10x Phosphat-Puffer

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM

Durch Mischen beider Komponenten wurde pH 7 eingestellt.

### 1x Phosphat-Puffer

10x Phosphat-Puffer 100 ml

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> 900 ml

### KP-Puffer (Kalium-Phosphat-Puffer)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,74 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,36 g

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 1 l

### β-Sitosterol-Stammlösung

β-Sitosterol 80 mg

Ethanol p. a. ad 10 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

### Orcein-Essigsäure-Lösung

Orcein 1 g

Essigsäure 50 % 100 ml

Die Lösung wurde unter Reflux gekocht (30 min), filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4 % PFA-Lösung (Paraformaldehyd in PBS)**

In 60 ml auf 60 °C vorgewärmtes destilliertes Wasser wurden 4 g PFA eingerührt und unter Zugabe von 2-3 Tropfen 1 N NaOH gelöst (Abzug!). Zu der klaren Lösung wurden 33 ml 3x PBS zugegeben und pH 7,2 mit verdünnter HCl eingestellt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C (maximal 5 Tage).

#### **Pepsin-Lösung**

Pepsin	10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	10	ml

pH 2 wurde mit HCl eingestellt.

#### **DAPI-Lösung**

DAPI	10	µg/l
McIlvaine-Puffer	10	ml

Lagerung bei -20 °C (dunkel).

#### **20x SSC**

NaCl	175,4	g
Na <sub>3</sub> -Citrat	88,24	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1	l

pH 7 wurde mit HCl eingestellt.

#### 4x SSC

20x SSC	200	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800	ml

#### 4x SSC/Tween

Tween 20 (0,2 %)	2	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1	l

#### Agarose-Lösung (0,08 %)

Agarose	0,08	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100	ml

Die Lösung wurde jeweils frisch aufgekocht.

#### Ethanol-Lösungen

80 % Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

50 % Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

#### 10 % Ficoll

Ficoll	10	g
1x Phosphat-Puffer	90	ml

#### Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid	5	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1	l

### **Spermidin-Lösung (4,5 M)**

Spermidin	6,7	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	10	ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei –20 °C gelagert.

### **Calciumchlorid-Lösung (3 M)**

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,4	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	10	ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei –20 °C gelagert.

### **Salzlösung (für Minimalmedium)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	g
NaCl	2,5	g
NH <sub>4</sub> Cl	5	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l	

Die Lösung wurde autoklaviert.

### **Glucose-Stammlösung (für Minimalmedium)**

Glucose	200	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800	ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

### Casamino acid-Stammlösung (für Minimalmedium)

Casamino acids	100 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	900 ml

Die Lösung wurde autoklaviert.

### 2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

**TPR1R** 5'-CGT ATT TGA TGT TGT TTC-3'

**TPR1F** 5'-TGG CGA CTA CTA CTT C-3'

(Primer zum Nachweis bakterieller Endosymbionten (ALBRECHT, 1999)).

**RSF1010F** 5'-TCT GAC TGG TTG CCT-3'

**RSF1010R** 5'-ATC TGC TGT TCC GAG-3'

(Primer zum Nachweis von RSF1010)

**TS902F** 5'-ATG CTA AAA TAA TGC CA-3'

**TS1430R** 5'-TTA CTT GAT TAT CCC AT-3'

(Primer zur Amplifikation des RebC-Promotors)

**TS902F(EcoRI)** 5'-TAA TGC TTA TGA ATT CAT GCT AAA ATA ATG CCA-3'

**TS1430(HindIII)** 5'-TCT ATA TCC GAA GCT TAC TTG ATT ATC CCA T-3'

(Primer zur Amplifikation des RebC-Promotors mit Restriktionsschnittstellen)

**AF3017F** 5'-AAT TTC CAT TGG CCA TTC AG-3'

**AF4146R** 5'-TTG TGC CCA TTA ACA TCA CC-3'

(Primer zum Screening von pPROBE-NT'-Konstrukten)

## 2.4 Plasmide

**RSF1010** (SCHOLZ ET AL., 1989)

Sequenz-Zugangsnummer: NC001740.

**pASV2** (SUAREZ ET AL., 1997)

**pPROBE-NT'** (LEVEAU ET AL., 2000)

Sequenz-Zugangsnummer: AF286454.

## 2.5 Organismen

### Bakterien

*Escherichia coli* JM109

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

*Klebsiella minuta*

### Protozoen

*Paramecium novaurelia* BGD19K

*Paramecium tetraurelia* 298K

## 2.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sowie die zugehörigen Reaktionspuffer stammten von der Firma Promega (Mannheim) und der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot). Bei allen Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer verwendet.

## **2.7 Vermehrung und Kultivierung von Protozoen und Bakterien**

### **2.7.1 Kultivierung von *Paramecium***

#### **2.7.1.1 Kultivierung von *Paramecium*-Dauerkulturen**

Die Kultivierung von *Paramecium*-Stämmen als Dauer- und Stammkultur erfolgte im Reagenzglasmaßstab. Die ungefähr halbgefüllten Reagenzgläser wurden bei 15 °C kultiviert. Einmal pro Woche wurde die Kultur unter dem Binokular auf Dichte und Fütterungszustand der Zellen hin geprüft. Als Futterorganismus diente *Klebsiella minuta*. Bei Bedarf wurde die Kultur mit frisch bewachsenem WGP gefüttert. Dabei wurde jeweils die Hälfte des Kulturmediums durch neues Medium ersetzt.

#### **2.7.1.2 Kultivierung von *Paramecium*-Massenkulturen zur Gewinnung von Endosymbionten**

*Paramecium*-Massenkulturen wurden entweder in 5 l-Erlenmeyerkolben oder 20 l-Glasfermentern angelegt. Die Kultivierungsgefäße wurden dabei höchstens zur Hälfte gefüllt, um eine ausreichende Belüftung der Standkulturen zu gewährleisten. Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur in WGP mit *Klebsiella minuta* als Futterorganismus. Zelldichte und Fütterungszustand der Kultur wurden täglich durch die Entnahme von Aliquots, die unter dem Binokular untersucht wurden, kontrolliert. Die Fütterung der Kultur wurde so gewählt, dass höchstens eine Teilung/Tag erfolgte. Dem Medium wurde  $\beta$ -Sitosterol in einer Endkonzentration von 0,8  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt.

Vor dem Abernten wurde die Kultur einer Hungerphase unterzogen. Zur Gewinnung von Endosymbionten wurde die Kultur für eine Woche nicht gefüttert, um eine möglichst hohe Zahl von Symbionten pro Wirtszelle zu

gewährleisten. Sollten R-Körper gewonnen werden, wurde die Hungerphase um eine weitere Woche verlängert.

### **2.7.1.3 Kultivierung von *Paramecium*-Zelllinien**

Die Kultivierung von Zelllinien, die von isolierten Einzelzellen abgeleitet wurden, erfolgte in 24-Lochplatten. Pro Loch wurden maximal 1000 µl Medium eingesetzt. Einzelzellen wurden in 250 µl Medium pro Loch gegeben. Die Fütterung der Zelllinien erfolgte durch den Austausch von 250-500 µl des Kulturmediums der einzelnen Kulturen. Fütterung, Kultivierungstemperatur und Steroidzugabe richteten sich nach den erforderlichen Teilungsraten. Zelllinien, die von ihren Endosymbionten befreit werden sollten, wurden durch eine Kultivierungstemperatur von 30 °C, maximaler Fütterung und Zugabe von Steroiden zu schnellem Wachstum stimuliert. Kulturen, deren Endosymbionten möglichst hohe Dichten erreichen sollten oder deren Regeneration nach Transformationsversuchen gewährleistet werden sollte, wurden wenig gefüttert und bei 15 °C gehalten.

### **2.7.1.4 Kultivierung von *Paramecium* mit Antibiotika-Selektion**

Zur Selektion von *Paramecium*-Endosymbionten wurde Streptomycin in einer Konzentration von 30 µg/ml verwendet. Andere Antibiotika (Ampicillin, Tetracyclin) bzw. höhere Streptomycin-Konzentrationen haben sich in Vorversuchen als toxisch für die Wirtszellen erwiesen. Aufgrund der geringen Antibiotika-Konzentrationen musste die Selektion über mehrere Wochen ausgedehnt werden. Es erfolgte eine wöchentliche Untersuchung der *Paramecien* auf Endosymbionten durch Mikroskopie bzw. PCR-Nachweis.

## **2.7.2 Kultivierung von Bakterien**

### **2.7.2.1 Kultivierung der Futterbakterien**

Als Futterbakterium für die *Paramecium*-Kulturen wurde *Klebsiella minuta* verwendet. Die Bakterien wurden auf Schrägagar (Standard-Nähragar, Merck, Darmstadt) kultiviert und aufbewahrt. Die inokulierten Reagenzgläser wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und bis zur Verwendung der Bakterien bei 4 °C gelagert. Zur Aufrechterhaltung der Kultur wurden die Bakterien alle 2 Wochen überimpft.

### **2.7.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli***

Die *E. coli*-Stämme wurden für die unterschiedlichen Anwendungen jeweils in LB-Medium angezogen. Das Medium wurde mit dem erforderlichen Antibiotikum versetzt und mit *E. coli* beimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (350 rpm).

### **2.7.2.3 Glycerinkulturen**

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurden 1,7 ml dicht bewachsene Bakteriensuspension in einem Eppendorfgefäß mit 0,3 ml Glycerin (99 %) durch Vortexen gut gemischt und bei –70 °C schockgefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei –70 °C.

### **2.7.2.4 Versuche zur in vitro Kultivierung von Endosymbionten**

Zur in vitro Kultivierung der obligaten Endosymbionten aus *Paramecium novaurelia* BGD19 wurde ein Medium hergestellt dem alle Zusätze zugefügt werden sollten, die für das Überleben und die Vermehrung der endocytischen Symbionten außerhalb ihrer Wirtszellen notwendig sind.

Als Basis für das Medium diente entweder der Respirationspuffer nach Collombet et al. (1997) oder LB-Medium. Diesen Lösungen wurden Glucose-6-phosphat, Malat sowie die Nucleoside ATP, CTP, GTP und UTP in physiologischen Konzentrationen zugefügt. Desweiteren erfolgte die Zugabe von Zellextrakten aus aposymbiontischen Paramecien des Wirtsstammes.

Die Herstellung der Zellextrakte aposymbiontischer Paramecien erfolgte wie folgt:

1. 1 l Kultur (1000 Zellen/ml) wurden über 8 Lagen Gaze filtriert.
2. Kulturfiltrat wurde in Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde) eingeeengt.
3. Retentat wurde 3 x mit 100 ml Volvic in der Öltestbecherzentrifuge (Damon, IEC Division) gewaschen (3500 rpm, 1 min).
4. Zellsuspension aus Öltestbecherzentrifuge wurde in Tischzentrifuge (Hermle, Wehingen) pelletiert (13 000 rpm, 0 °C) und in 200 µl Respirationspuffer resuspendiert.
5. Zellsuspension wurde durch mehrfaches Aufziehen in Injektionskanüle (0,33 x 13 mm, Becton-Dickinson, Dublin) homogenisiert.
6. Homogenat wurde durch Zentrifugenfilter (4 µm, Roth, Karlsruhe) filtriert (10 min, 0 °C, 13000 rpm).

Die Medien (5 ml) wurden durch Zellhomogenate symbiontenträger Wirtszellen mit Endosymbionten beimpft.

Die Herstellung der Zellhomogenate symbiontenträger Paramecien zum Animpfen der Kulturen geschah wie folgt:

1. 1 l Kultur (1000 Zellen/ml) wurden über 8 Lagen Gaze filtriert.
2. Kulturfiltrat wurde in Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde) eingeeengt.
3. Retentat wurde 3 x mit 100 ml Volvic in der Öltestbecherzentrifuge (Damon, IEC Division) gewaschen (3500 rpm, 1 min).
4. Gewaschene Kultur (400 ml) wurde 3 Tage bei 15 °C inkubiert.

5. Kultur wurde in Ölttestbecherzentrifuge pelletiert (3500 rpm, 1 min) und 5 x mit Respirationspuffer gewaschen.
6. Pellet (200-300 ml) wurde durch mehrfaches Aufziehen in eine Injektionskanüle (0,33 x 13 mm, Becton-Dickinson, Dublin) homogenisiert.

Es erfolgte eine tägliche Zugabe der instabilen bzw. verbrauchten Metabolite in Form von Stammlösungen bis zur jeweils angegebenen Konzentration sowie des Zellhomogenates.

Täglich wurden Proben zur Untersuchung des Bakterienwachstums unter dem Phasenkontrastmikroskop entnommen. Die Zelldichten wurden mit einer Zählkammer (Neubauerkammer) bestimmt.

## **2.8 Methoden zur Isolierung von Endosymbionten und R-Körpern**

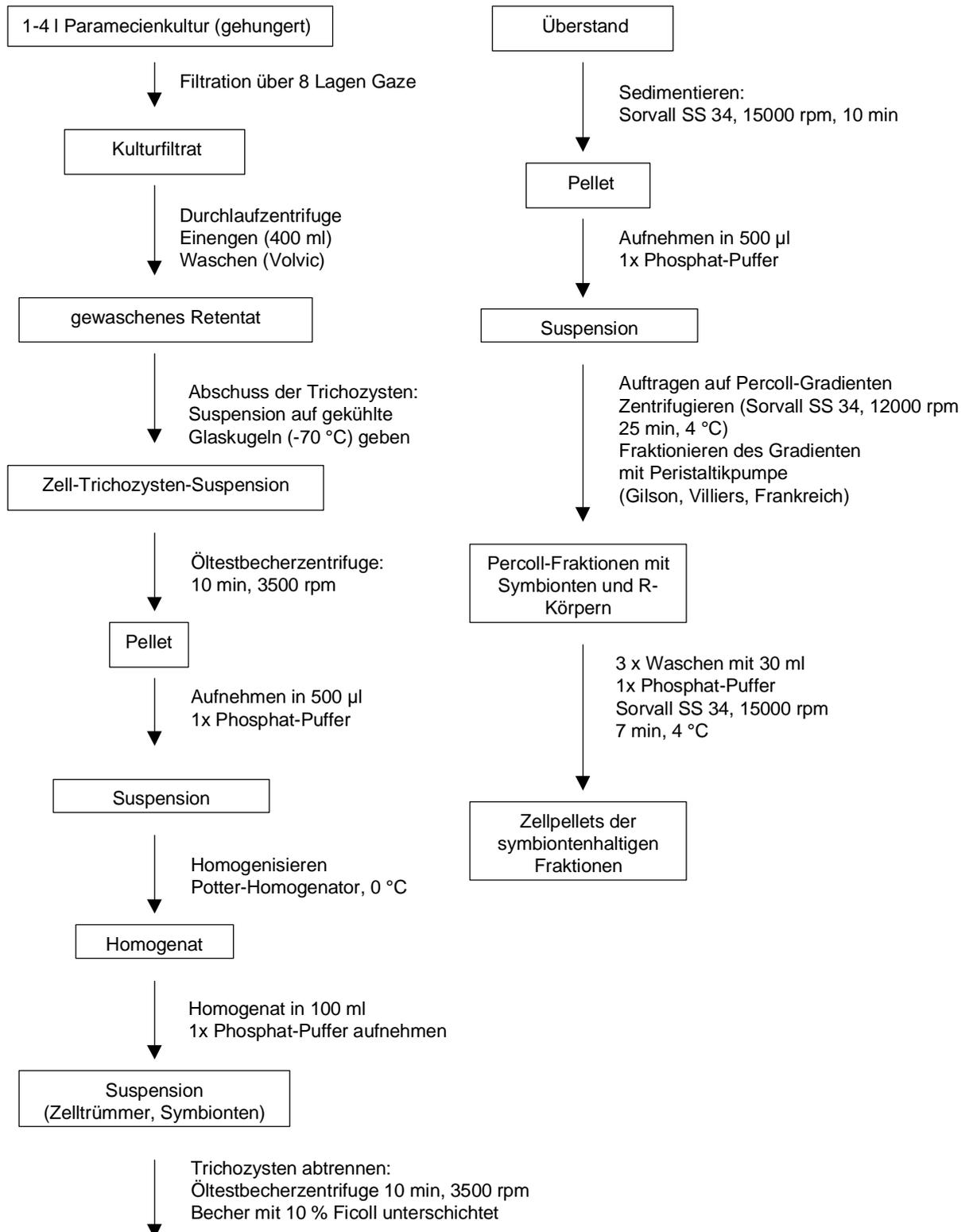
### **2.8.1 Dichtegradientenzentrifugation**

Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentation in einem Dichtegradienten voneinander getrennt. Der Dichtegradient wird durch das Übereinanderschichten von Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichten in einer Zentrifugenröhre erreicht. Die dabei verwendeten Flüssigkeiten müssen sich daher übereinanderschichten lassen ohne sich stärker zu vermischen und einen entsprechenden Dichteunterschied aufweisen. Eine gängige Substanz zur Herstellung von Dichtegradienten ist Percoll. Bei dem Stoff handelt es sich um ein mit Polyvinylpyrolidon beschichtetes Kieselgel (Durchmesser ca. 20 nm). Es wird zur Sedimentationstrennung von Zellen, Viren u. subcellularen Partikeln verwendet.

Mit Hilfe des Dichtegradienten wurden Homogenate symbiontenträger Paramecien in Zelltrümmer, Brights, Nonbrights und R-Körper aufgetrennt.

Zur Isolierung von Symbionten aus *Paramecium novaurelia* BGD19 bzw. *Paramecium tetraurelia* 298K wurden die Verfahren von Schmidt et al. (1988), Dankbar (1991) und Szallis (1995) modifiziert. Die Zusammensetzung des Gradienten sowie die Zentrifugationsdauer wurden dabei variiert. Der Gradient wurde durch Übereinanderschichten von Percoll-Lösungen (in 1x Phosphat-Puffer) mit unterschiedlicher Percoll-Konzentration (30 %, 40 %, 50 %, 65 %, 80 %, 90 %) hergestellt. Die einzelnen Percoll-Fractionen müssen sehr vorsichtig übereinandergeschichtet werden, um ein Vermischen der Schichten zu verhindern. Zur Markierung der unterschiedlichen Dichtezonen im Gradienten wurden farbige Markerbeads (Pharmacia, Uppsala) mit definierten Dichten verwendet. Jeweils 20 µl der Markerbead-Suspension wurden vorsichtig auf den Gradienten gegeben. Der so vorbereitete Gradient wurde zentrifugiert (Sorvall SS 34, 20000 rpm, 10 min, 4 °C). Der fertige Gradient wurde dann zur Isolierung der unterschiedlichen Bakterienpartikel aus den Wirtspamecien verwendet. Im folgenden Schema sind alle weiteren Arbeitsgänge des Verfahrens dargestellt:

## MATERIAL UND METHODEN



Die erhaltenen Fraktionen wurden nach dem Auswaschen des Percoll vor der weiteren Verwendung unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Reinheit und Zelldichte hin untersucht.

### **2.8.2 ECTEOLA-Säule**

Bei ECTEOLA handelt es sich um einen Cellulose-Ionenaustauscher. Der Stoff resultiert als Kondensationsprodukt aus Epichlorhydrin, Triethanolamin und Cellulose. Es wird zur Säulen- und Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Auf mit ECTEOLA beschickte Säulen wurden Homogenate aus symbiontenträgenden Paramecien aufgetragen. Die bakteriellen Endosymbionten wurden mit 1x Phosphatpuffer von den Säulen gewaschen. Zelltrümmer und Debris aus dem Kulturmedium sollten vom Säulenmaterial zurückgehalten werden. Das Verfahren wurde in Anlehnung an Sonneborn (1970) und Schmidt et al. (1988) an die zu bearbeitenden Organismen angepasst. Zu diesem Zweck wurden die Dimensionen der Säule sowie die Menge des pro Säule aufgetragenen Zellhomogenates variiert. Zur Beschleunigung des Vorgangs wurde nach Auftragung des Homogenats mit Hilfe eines Spritzenkolbens ein leichter Überdruck an der Säule erzeugt.

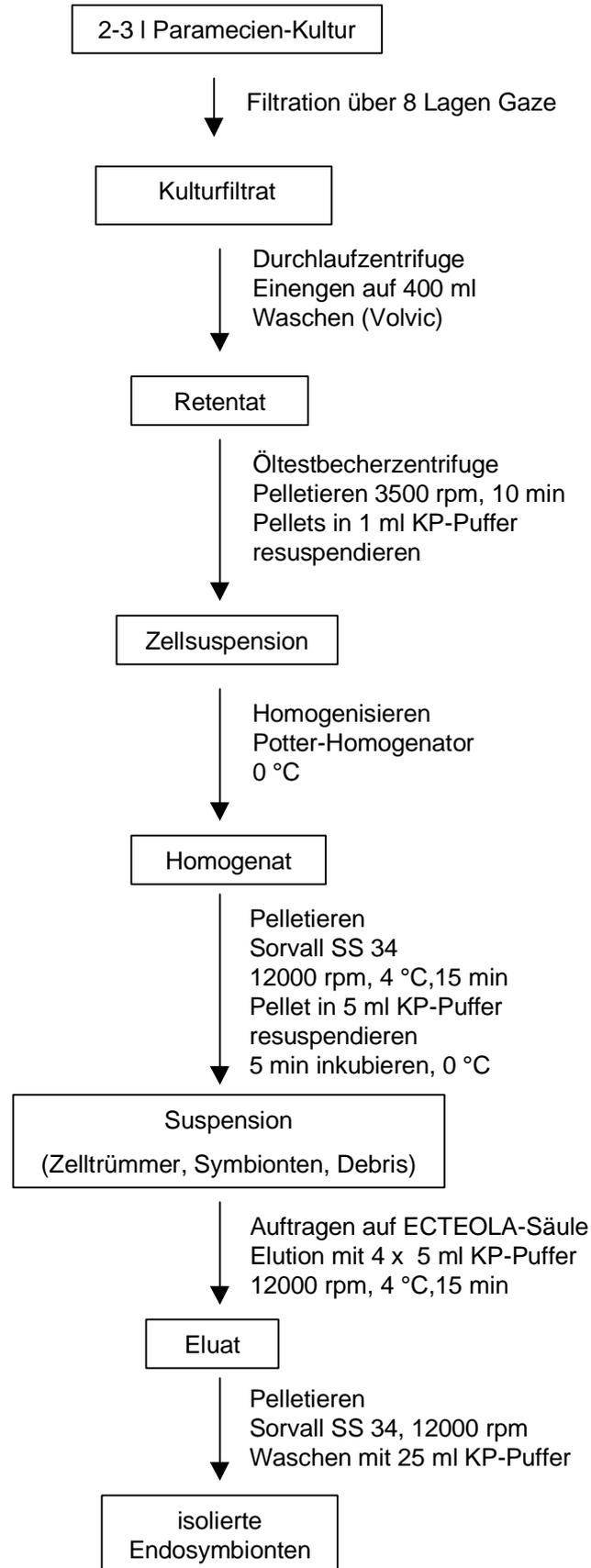
#### **Präparation der Säule:**

Zunächst wurden 0,5 g ECTEOLA in 20 ml 0,01 M KP-Puffer aufgenommen und 15 min quellen gelassen. Der Ausfluss der Säule wurde mit etwas Glaswolle versehen, um das Säulenmaterial in der Säule zurückzuhalten. Die ECTEOLA-Suspension wurde in die Säule gefüllt und 5 x mit 20 ml KP-Puffer gewaschen. Die Säulen wurden mit KP-Puffer überschichtet bei 4 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Das folgende Diagramm zeigt eine schematische Darstellung des weiteren Isolierungsverfahrens:

## MATERIAL UND METHODEN

---



Die Isolate wurden vor der weiteren Verwendung mit dem Phasenkontrastmikroskop auf Zelldichte und Reinheit hin untersucht.

## **2.9 Färbemethoden und Mikroskopie**

### **2.9.1 Untersuchung von Objekten mit GFP**

Es wurden entweder Bakteriensuspensionen mit GFP-haltigen Bakterien oder Paramecien mit potentiell GFP-exprimierenden Symbionten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) untersucht. Zur Mikroskopie von GFP wurde der Filter Nr. 09 der Firma Zeiss verwendet. Das Anregungslicht stammte von einer Quecksilberdampflampe (HB0 100) mit einer Leistung von 100 W. Es wurden fixierte als auch unfixierte Präparate untersucht. Die Fixierung erfolgte jeweils mit 4 % PFA. Die fixierten Präparate wurden mit dem Antibleichmittel Vectashield versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.9.2 Orcein-Essigsäure-Färbung**

Orcein stellt ein Gemisch aus Flechten-Farbstoffen dar, das in saurer Lösung eine tief rote Farbe zeigt. Durch die Orcein-Essigsäure-Lösung wird das Plasma artifiziell verändert, das Kernmaterial sowie im Plasma vorhandene Symbionten werden rot angefärbt.

Zur Färbung wurden 15 µl konzentrierte Zellsuspension der zu untersuchenden Zellen auf einen Objektträger gegeben. Neben die Suspension wurden 5 µl der Orcein-Essigsäure-Lösung pipettiert. Durch Auflegen des Deckglases wurde die Farbstofflösung mit der Zellsuspension vermischt. Die durch die Zellsuspension hindurchdiffundierende Farbstofflösung färbte die Zellen an. Durch dieses Verfahren entstand unter dem Deckglas ein Farbstoffgradient, in dem in bestimmten Bereichen immer optimale Färbeargebnisse erzielt wurden.

Die mikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte im Durchlicht bzw. im Differentialinterferenzkontrast (DIC). Die Durchlichtbeleuchtung lieferte in der Regel bessere Ergebnisse als DIC. Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Lichtmikroskop vom Typ Axioskop (Zeiss, Oberkochen) oder dem Fotomikroskop Axioplan-II durchgeführt.

### **2.9.3 DAPI-Färbung von *Paramecium*-Endosymbionten**

DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in AT-reiche Bereiche der DNA durch Interkalation anbindet. Durch DAPI können daher sehr gut die Nuklei der Paramecien als auch die im Cytoplasma liegenden Endosymbionten angefärbt werden. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass das von den relativ kleinen bakteriellen Endosymbionten im Cytoplasma ausgehende Fluoreszenz-Signal relativ schwach ist und bei unbehandelten Zellen vom Fluoreszenzhintergrund des Cytoplasmas überdeckt wird. Durch einen leichten Verdau des Cytoplasmas mit Pepsin kann dieses Problem aber beseitigt werden. Das Verfahren erlaubt die Darstellung einzelner Symbionten-Partikel im Plasma fixierter Zellen. Die Methode wurde in Anlehnung an Wegmann (2001) durchgeführt.

#### **Fixierung der Zellen:**

Zur Fixierung wurden 20 µl Zellsuspension der zu färbenden Zellen in einem Dreilochobjekträger zuerst in 4 %-PFA (0 °C, 200 µl) und dann in 0,08 %-Agarose-Lösung pipettiert (0 °C, 200 µl). Je 5 µl der fixierten Zellen wurden auf einen gereinigten Objekträger gegeben und getrocknet (1 h, 37 °C). Es folgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden ethanolischen Reihe (50 %, 80 %, 100 %) und wiederum Trocknen (1 h, 37 °C).

### **Pepsin-Behandlung und Färbung der fixierten Zellen:**

Die Objektträger mit fixierten Zellen wurden mit 200 ml Pepsin-Lösung überschichtet und für 15 min inkubiert (37 °C). Es folgte ein Waschschrift mit 1x PBS und das Überschichten mit 100 µl DAPI-Lösung (10 min, dunkel). Anschließend wurde zunächst mit 4x SSC/Tween und dann mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen. Die Präparate wurden mit dem Antibleichmittel Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckelt.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte mit dem Fotomikroskop Axioplan-II (Zeiss, Oberkochen) mit Quecksilberdampfampe HBO 103 (100 W) und Fluoreszenzfilter Zeiss-Nr. 02.

## **2.10 Molekularbiologische Methoden**

### **2.10.1 Präparation von Nukleinsäuren**

#### **2.10.1.1 Plasmid Mini-Präparation**

Die Gewinnung von Plasmid-DNA im Maßstab bis 20 µg erfolgte mit Hilfe des „GenElute (HP) Plasmid MiniPrep Kit“ der Firma Sigma (Deisenhofen) gemäß Herstellerangaben. Die verwendeten Bakterienkulturen wurden wie folgt angezogen:

1. Inokulierung von 5 ml LB-Medium mit Bakterien von Festmedium.
2. Inkubation über Nacht unter Schütteln (37 °C, 350 rpm).
3. Verwendung von jeweils 1,5 ml Übernachtskultur für die Plasmid-Präparation.

### **2.10.1.2 Plasmid Maxi-Präparation**

Die Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA, insbesondere für die Transformationsversuche, erfolgte entweder mit dem „Wizard Plus Megaprep DNA Purification System“ der Firma Promega (Mannheim) oder dem „GenElute (HP) Plasmid MiniPrep Kit“ der Firma Sigma (Deisenhofen). Die Verfahren wurden jeweils gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Mit dem Produkt der Firma Promega konnten jeweils 250 ml Übernachtskultur aufgearbeitet werden. Bei Verwendung des Kits von Sigma wurden jeweils 100 ml Übernachtskultur eingesetzt. Bei der Anzucht der Übernachtskulturen wurde wie folgt verfahren:

1. Animpfen von 5 ml LB-Medium mit Bakterien von Festmedium.
2. Inkubation unter Schütteln für 6-8 h (37 °C, 350 rpm).
3. Animpfen von Übernachtskultur mit 2-5 ml Vorkultur.
4. Inkubation über Nacht unter Schütteln (37 °C, 350 rpm).

### **2.10.1.3 Ultrafiltration von Plasmid-DNA**

Das Aufkonzentrieren großer Mengen von DNA (bis 1 mg) erfolgte mittels Ultrafiltration. Für die Transformationsversuche mittels Elektroporation waren DNA-Präparate erforderlich, die eine möglichst geringe elektrische Leitfähigkeit besitzen. Die Ultrafiltration bietet sich zur Herstellung solcher Lösungen an, da im Gegensatz zur Fällung von DNA keine Salze zugesetzt werden müssen. Weiterhin können die noch aus der Isolierung der DNA stammenden Ionen bei der Ultrafiltration entfernt werden. Bei diesem Verfahren wird die DNA-Lösung durch Zentrifugation durch eine Membran gepresst, die das Lösungsmittel passieren lässt, Makromoleküle, wie die enthaltene DNA, aber zurückhält.

Für die Ultrafiltration wurden die Zentrifugenfilter Microcon 100 der Firma Whatman verwendet. Das Verfahren wurde in Anlehnung an die

Herstellerangaben modifiziert: Je Filter wurden 500 µl DNA-Lösung eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei (2300 rpm) für 3 min bei 6 °C. Das Volumen des Rückstandes wurde so auf 50-80 µl reduziert. Betrug das Volumen des Rückstandes nach einer ersten Zentrifugation noch deutlich mehr so wurde um weitere 1-2 min unter ansonsten gleichen Bedingungen zentrifugiert.

### **2.10.1.4 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-Präparationen**

Die Konzentrationsbestimmung bei DNA-Lösungen erfolgte mit dem GeneQuant RNA/DNA Calculator der Firma Pharmacia (Freiburg). Die Messungen wurden mit Proben von 7 µl Lösung in den geräteeigenen Quarzküvetten durchgeführt. Durch die Messung der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm konnte mit dem Gerät neben der DNA-Konzentration auch die Konzentration von Proteinen in der Probe bestimmt werden. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  (RATIO) wurde als Maß für die Reinheit der extrahierten DNA herangezogen. Der Wert sollte bei aufgereinigter DNA 1,8-2,0 betragen.

### **2.10.2 Restriktion und Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

#### **2.10.2.1 Restriktion von DNA**

Die Restriktionen wurden nach den gängigen Vorschriften nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Bei den Restriktionen wurden die von den Herstellern der Restriktionsendonukleasen empfohlenen Inkubationspuffer verwendet und die jeweiligen spezifischen Bedingungen eingehalten. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug üblicherweise 20 µl. Die Enzymreaktion wurde für 1-3 h bei 37 °C durchgeführt und durch eine folgende Hitzeinaktivierung (20 min, 65 °C) der eingesetzten Enzyme beendet.

### **2.10.2.2 Gelelektrophorese von DNA**

Die Gelelektrophorese von DNA erfolgte mittels Agarosegelen. Die Technik wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-2 % hergestellt. Ebenso wurde abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente die Größe und somit die Laufstrecke der Gele verändert. Es wurden dazu Mini- bzw. Midigele hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit einem Ladepuffer aufgetragen, der anhand beigemengter Farbstoffe eine Orientierung für die zurückgelegte Wanderungstrecke der DNA gab. Die Größenbestimmung der aufgetrennten DNA erfolgte durch Vergleich mit einem geeigneten Molekulargewichtsmarker. Die Elektrophorese erfolgte bei Feldstärken von 5-6 Volt/cm.

Nach dem Färben der Gele in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) für 15-30 min und anschließendem Waschen in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wurden die DNA-Banden mittels UV-Illuminator bei einer Wellenlänge von 270 nm sichtbar gemacht. Je nach Anwendung wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten.

### **2.10.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Elektrophorese erfolgte dabei wie unter 2.10.2.2 beschrieben. Nach dem Färben des Gels wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des „Nukleotrap-Extractions-Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben extrahiert.

### **2.10.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zu unterschiedlichen Zwecken angewandt. Sie diente zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, zur Klonierung, zum Nachweis bakterieller Endosymbionten in *Paramecium* und

zum Screening von Plasmiden auf den erfolgreichen Einbau von DNA-Fragmenten bei der Klonierung.

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung wurden Primer gewählt, die neben den zur Template-DNA homologen Sequenzen noch Restriktionsschnittstellen für geeignete Restriktionsenzyme enthielten. Die mit diesen Primern gewonnenen Fragmente verfügten somit nach dem Restriktionsverdau über die für die Ligation in einen entsprechenden Vektor geeigneten Enden.

Zum Screening von Plasmiden nach der Ligation wurden Primer verwendet, die homolog zu den die Klonierungsstelle flankierenden Sequenzen waren. Der erfolgreiche Einbau eines DNA-Fragments führte dann bei der PCR zu Fragmenten, die um die Länge des eingebauten Fragments verlängert waren.

Der Nachweis bakterieller Endosymbionten erfolgte nach dem von Albrecht (1999) etablierten Verfahren (s. 2.10.3.1).

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in Anlehnung an Innis et al. (1990) durchgeführt.

Die allgemeine Zusammensetzung der Ansätze stellte sich wie folgt dar:

10x PCR-Puffer:	5	µl
dNTP-Mix (2 mM je dNTP)	1	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	µl
Primer 1 (50 pM)	1	µl
Primer 2 (50 pM)	1	µl
Template-DNA (50-100 ng)	x	µl
Taq-DNA-Polymerase (1 u)	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50	µl

Bei den Versuchen zur Etablierung einer Multiplex-PCR, die zum parallelen Nachweis von Endosymbionten und dem Plasmid RSF1010 dienen sollte, wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration variiert. Dabei wurden den PCR-Ansätzen 1,5-4 µl der MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugefügt.

Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet, um die Verdunstung zu vermeiden.

Die Auswahl der PCR-Primer sowie die Bestimmung der Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) für die PCR-Reaktion geschah mit Hilfe der Software Primer 3 V.0.2c (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, [www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)).

Zur Optimierung einzelner Anwendungen (Multiplex-PCR) wurde die berechnete Annealing-Temperatur in geringem Umfang variiert.

Für die PCR wurde der Uno-Thermoblock der Firma Biometra (Tampa, USA) verwendet. Die folgenden Temperaturschritte wurden für die PCR programmiert:

- Denaturierung:	5 min	95 °C
- 30 Zyklen:		
Denaturierung	1 min	94 °C
Annealing	1 min	$T_A$
Elongation	2 min	72 °C
- abschließende Elongation:	5 min	72 °C
- Abkühlen der Ansätze:		4 °C

### 2.10.3.1 PCR mit symbiontenhaltigen *Paramecium*-Zellen

Zu den PCR-Reaktionen, die zum Nachweis von Endosymbionten in *Paramecium* oder zur Amplifikation von Sequenzen aus dem Symbionten-Genom dienen, wurden jeweils ganze *Paramecium*-Zellen als Quelle für die Template-DNA verwendet. Die in sterilem Volvic gewaschenen Zellen wurden zunächst lysiert und der erhaltene Lysis-Ansatz für die folgende PCR-Reaktion verwendet.

Die Lysis-Ansätze setzten sich jeweils wie folgt zusammen:

Lysis-Puffer	22,5	µl
<i>Paramecium</i> -Zellen in Volvic	2,5	µl

Die Lyse erfolgte im Uno-Thermoblock der Firma Biometra (Tampa, USA) nach dem folgenden Programm:

Lyse	90 min	56 °C
Inaktivierung der Proteinase	10 min	94 °C
Abkühlen der Ansätze		4 °C

Die PCR-Ansätze, die mit Lysis-Ansätzen hergestellt wurden, hatten die folgende Zusammensetzung:

10x PCR-Puffer	5	µl
dNTP-Mix (2 mM je dNTP)	1	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	µl
Primer 1 (50 pM)	1	µl
Primer 2 (50 pM)	1	µl
Lysis-Ansatz	25	µl
Taq-DNA-Polymerase (1 u)	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50	µl

Das weitere Verfahren bei der PCR erfolgte wie bereits unter 2.10.3 beschrieben.

### **2.10.3.2      Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen erfolgte mit Hilfe des „Nukleotrap-Extractions-Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben.

#### **2.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Ligase (1,5-2 u; Promega, Mannheim). Zur Ligation wurden DNA-Mengen von ca. 0,1 µg eingesetzt. Das Verhältnis Vektor zu Insert lag bei 1:5. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 2-3 h.

#### **2.10.5 Transformation von *E. coli* und Herstellung kompetenter Zellen**

Die Transformation von *E. coli* erfolgte entweder mittels Elektroporation oder durch Hitzeschock.

Die Elektroporation wurde gemäß den Anleitungen von Dower et al. (1988) zur „high efficiency transformation“ ausgeführt. Die Herstellung der kompetenten Zellen richtete sich ebenfalls nach diesen zitierten Literaturangaben (DOWER ET AL., 1988). Die Elektroporation von *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „Gen Pulser II“ der Firma Biorad (München) unter Verwendung von Küvetten (Hercules, USA) mit einer Spaltbreite von 0,1 bzw. 0,2 cm.

Zur Transformation durch Hitzeschock wurden kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109 der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Das Hitzeschock-Verfahren wurde in Anlehnung an die Angaben der Firma Promega durchgeführt. Das folgende Schema zeigt das Vorgehen bei diesem Verfahren:

1. Kompetente Zellen (Promega, Mannheim) langsam auf Eis auftauen.
2. 50 µl Zellsuspension (vorsichtig) mit 1 µl Ligationsansatz vermischen.
3. Präinkubation: 30 min, 0 °C.
4. Hitzeschock: 50 sec, 42 °C.
5. Inkubation: 2 min, 0 °C.
6. Zugabe von 1 ml LB-Medium oder SOC-Medium (37 °C).
7. Inkubation: 1 h, 37 °C.

## 8. Ausplattieren auf Selektivmedium.

Es wurden jeweils 50 µl bzw. 100 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden Festmedien mit den zur Selektion notwendigen Antibiotika ausplattiert (s. 2.2.3.1).

### 2.10.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA sowie die Synthese der erforderlichen Sequenzierprimer wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

## 2.11 Methoden zur Transformation von *Caedibacter*

### 2.11.1 Elektroporation isolierter *Caedibacter*

Die Isolierung der Bakterien erfolgte bei diesen Versuchen zunächst wie unter 2.8.2 beschrieben mittels ECTEOLA-Säule. Die verwendeten *Paramecium*-Kulturen wurden bis zu einem Volumen von 5-20 l bei möglichst hohen Teilungsraten herangezogen und bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 1000 Zellen/ml in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde) mit Volvic gewaschen und abgeerntet oder bei 15 °C für eine Woche inkubiert.

Die isolierten *Caedibacter* wurden 5 x mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> in der Tischzentrifuge (Hermle, Wehingen) gewaschen (3 min, 4 °C, 10000 rpm). Die Zelldichte der Bakteriensuspension wurde durch Auszählen in der Zählkammer (Neubauer-Kammer) unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt und auf 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> Zellen/ml äquilibriert.

Die für die Elektroporationsversuche verwendete DNA war durch Ultrafiltration aufkonzentriert (s. 2.10.1.3), von störenden Ionen befreit und lag in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> vor. Die DNA-Konzentrationen lag bei 1-5 µg/µl.

Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm und 0,2 cm (Biorad) mit dem „Gene Pulser II“-Apparat der Firma Biorad. Bei beiden Elektrodenabständen wurden die Elektroporationen mit 1,8 kV und 2,5 kV durchgeführt. Der Parallelwiderstand wurde jeweils auf 200  $\Omega$  eingestellt. Bei einem Elektrodenabstand von 0,1 cm wurden 25  $\mu$ l Zellsuspension verwendet, bei einem Elektrodenabstand von 0,2 cm jeweils 100  $\mu$ l. Die im Elektroporationsansatz eingesetzten DNA-Konzentrationen lagen jeweils zwischen 50  $\mu$ g/ml und 250  $\mu$ g/ml.

Zellsuspension, DNA-Lösung, Küvette und Küvettenhalter wurden vor der Elektroporation auf Eis gekühlt. Zellsuspension und DNA-Lösung wurden in der vorgekühlten Küvette zusammenpipettiert und gemischt.

Bei jeder Elektroporation wurde die Zeitkonstante des erfolgten Pulses gemessen. Es wurde nur mit Elektroporationsansätzen weitergearbeitet, die Zeitkonstanten von 3-5 msec aufwiesen.

Die elektroporierten Bakterien wurden sofort zur Reinfektion in entsprechende Wirtszellen eingesetzt (s. 2.11.2).

### **2.11.2 Reinfektion aposymbiontischer Paramecien**

Zur Reinfektion potentiell transformierter *Caedibacter* wurden die elektroporierten Bakteriensuspensionen an aposymbiontische Wirtszellen verfüttert. Dazu wurden 200-500  $\mu$ l in Volvic gewaschene Wirtszellen (500-1000 Zellen/ml) in der Vertiefung eines Dreilochobjektträgers mit den Elektroporationsansätzen vermischt. Die Zellsuspension wurde für 48-72 h bei 15 °C inkubiert.

Die Reinfektion der elektroporierten *Caedibacter* sollte weiterhin mittels Mikroinjektion getestet werden. Die Versuche erfolgten mit einer Mikroinjektionsanlage, die freundlicherweise von der Firma Eppendorf (Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde. Die Vorversuche erfolgten mit Einzelzellen des Stammes BGD19apo. Zur Injektion wurden gemäß 2.8.2 isolierte *Caedibacter* verwendet. Die Injektionsversuche wurden entsprechend dem Vorgehen bei der *in vitro* Fertilisation ausgeführt. Die zu

injizierende Zelle wurde durch Ansaugen mit einer Kapillare festgesetzt und mit einer zweiten Kapillare angestoßen.

### **2.11.3 Elektroporation von *Caedibacter* in *Paramecium***

Die zu diesen Versuchen eingesetzten *Paramecium novaurelia* BGD19-Massenkulturen wurden bei maximalen Teilungsraten bis zu einem Volumen von 5-20 l herangezogen (Raumtemperatur) und anschließend für 3-7 Tage bei 15 °C nicht mehr gefüttert.

Die verwendete DNA wurde durch Ultrafiltration aufkonzentriert, von Ionen befreit und in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen. Die Lösungen hatten DNA-Konzentrationen von 1-5 µg/µl.

Es wurden Küvetten (Biorad) mit Elektrodenabständen von 0,1 cm bzw. 0,2 cm verwendet. Zur Elektroporation diente der „Gene Pulser II“ (Biorad).

Das Vorgehen bei diesen Versuchen war wie folgt:

1. Filtrieren und Abernten der Massenkulturen (5-15 l) in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde).
2. Aufkonzentrieren der Zellen auf 100 ml in der Öltestbecherzentrifuge (Damon/IEC Division).
3. 3 x Waschen der Zellen mit 150 mM Saccharose in der Öltestbecherzentrifuge.
4. Konzentrieren der Zellen auf ca. 3 ml; Zelldichte ca. 10<sup>5</sup> Zellen/ml.
5. Elektroporationsküvette auf Eis vorkühlen.
6. DNA-Lösung (> 1 mg/ml) in gekühlte Küvette pipettieren.
7. Sofort Zellsuspension zugeben und durch Auf- und Abpipettieren mischen.
8. Puls auslösen.
9. Unmittelbar nach Puls Zellen in halbkonzentriertem WGP-Medium aufnehmen.
10. Vereinzelung in Zelllinien.

Alle variablen elektrischen Parameter (Elektrodenabstand, Kapazität des Kondensators, Spannung, Widerstand des Parallelwiderstands) wurden so variiert, dass daraus ein Doppelpuls resultierte, bei dem der erste Puls den Bedingungen zur Elektroporation von *Paramecium* (FRAGA ET AL., 1998; BOILEAU ET AL., 1999) und der zweite Puls den für die Elektroporation von Bakterien (s. z.B. DOWER, 1990) gerecht werden sollte. Schließlich musste die Prozedur durch Variation der elektrischen Parameter ein Überleben der Paramecien erlauben.

#### **2.11.4 Partikelbombardement von *Caedibacter* in *Paramecium***

Die zu den Versuchen verwendeten Paramecien stammten aus Massenkulturen, die bei 15 °C bis zum Erreichen des Endvolumens (10-20 l) bei 15 °C kultiviert wurden.

Die eingesetzten DNA-Lösungen von RSF1010 bzw. pLC5 hatten Konzentrationen von 1-5 µg/µl.

Zum Beschuss der Zellen wurden Wolframpartikel (M5 Tungsten) der Firma Biorad verwendet.

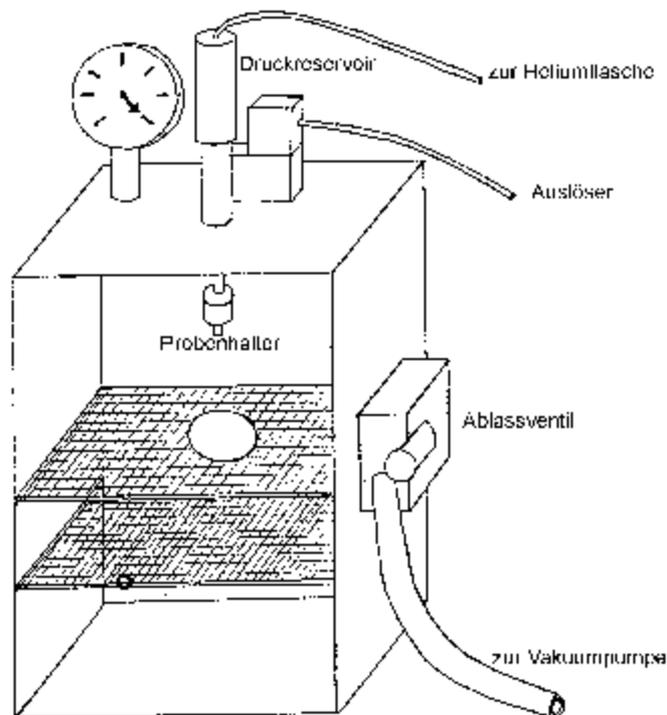
Bei der Beschichtung der Mikroprojekte wurde wie folgt vorgegangen:

1. 10 µl Wolframpartikel-Suspension (600 µg/µl) in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorlegen.
2. 40 µl Plasmid-DNA (1-5 µg/µl) zugeben und 10 sec vortexen.
3. 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zugeben.
4. 75 µl CaCl<sub>2</sub> (3 M) zugeben und 10 sec vortexen.
5. 40 µl Spermidin zugeben und 3 min vortexen.
6. Inkubation (20 min, Raumtemperatur).
7. Abzentrifugieren (1500-2000 rpm, 30 sec) in Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg), Überstand verwerfen.
8. Partikel mit 300 µl Ethanol (70 %) waschen.
9. Partikel in 100 µl Ethanol (100 %) resuspendieren.

Die Gewinnung der Zellen erfolgte nach Optimierung in folgender Weise:

1. Filtrieren und Abernten der Massenkulturen (10-20 l) in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde).
2. Aufkonzentrieren der Zellen auf 100 ml in der Ölttestbecherzentrifuge (Damon/IEC Division) bei 2500 rpm für 45 sec.
3. Waschen der Zellen mit Volvic in der Ölttestbecherzentrifuge (2500 rpm, 45 sec).
4. Konzentrieren der Zellen auf max. 3 ml; Zelldichte ca.  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml.

Der Beschuss erfolgte mit einer „particle inflow gun“, die freundlicherweise von der Abteilung für Pflanzenphysiologie der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt wurde. Bei dem Gerät handelte es sich um eine Sonderanfertigung mit folgendem Aufbau:



**Abb. 2-1**

Aufbau der verwendeten „particle inflow gun“. Sonderanfertigung der Abteilung für Pflanzenphysiologie der Universität Kaiserslautern.

Der Beschuss erfolgte jeweils in der evakuierten Kammer.

Die zu beschießenden Zellen wurden auf Gazestücke mit unterschiedlicher Größe und Maschenweite auf einem Volvic-Festmedium in einer Petrischale

(50 mm) aufgebracht. Die Menge der Zellsuspension sowie der Abstand zum Probenhalter und zum Streunetz wurden variiert (s. 3.3.3.2). Nach dem Beschuss wurden die Zellen mit WGP-Medium von Gaze und Festmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß überführt.

#### **2.11.5 Selektion von Paramecien mit transgenen Endosymbionten mit Hilfe der Resistenz gegen Symbiontentoxine**

Bei diesen Versuchen wurde getestet, inwieweit sich symbionttragende Paramecien von aposymbiontischen Zellen aufgrund ihrer Resistenz gegen die Symbiontentoxine trennen lassen.

In einem Teil der Versuche wurden dazu symbionttragende Paramecien mit aposymbiontischen Zellen des Stammes *P. novaurelia* BGD19 gemischt und nach 6 Wochen mittels PCR der Anteil symbionttragender Paramecien ermittelt. Die Kultivierung der Zellen in diesen Mischansätzen erfolgte dabei in jeweils 500 µl WGP-Medium pro Loch einer 24-Lochplatte (Firma Greiner). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur kultiviert und wöchentlich durch den Austausch von 250 µl des Kulturmediums gefüttert. Die Mischkulturen wurden mit jeweils 20 Zellen begonnen. Als Mischungsverhältnisse von „Killern“ zu „Sensitiven“ wurden 1:1, 1:9 und 9:1 gewählt. Die Ansätze wurden jeweils 5fach angesetzt. Es wurden weiterhin Kontrollansätze angelegt, die nur „Killer“ oder nur „Sensitive“ enthielten. Aus jedem Ansatz wurden 20 Einzelzellen mittels PCR untersucht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, wie selektiv die toxische Wirkung von isolierten R-Körpern bzw. Homogenaten von Killerparamecien ist. Diese Tests erfolgten mit symbionttragenden und symbiontfreien Paramecien der Stämme *P. novaurelia* BGD19 und *P. tetraurelia* 298. Jeweils 20 Zellen wurden in 200 µl WGP-Medium in den Vertiefungen von 3-Lochobjektträgern für eine Woche kultiviert.

Die Zellhomogenate aus „Killerparamecien“ wurden analog dem unter 2.7.2.4 beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Homogenaten aus „Killerparamecien“ hergestellt. Die Gewinnung der isolierten R-Körper

erfolgte durch die unter 2.8.1 beschriebene Dichtegradientenzentrifugation. Die Homogenate und die isolierten R-Körper-Suspensionen wurden jeweils in den folgenden Verdünnungen den Kulturen zugesetzt: 1:5, 1:10, 1:15, 1:50 und 1:100. Jeder Versuch erfolgte in 5 Parallelansätzen.

Zusätzliche Versuche sollten Aufschluss über die ökologische Bedeutung der Killersymbionten geben und erfolgten in Kulturen von 2 ml, die nicht gefüttert wurden. Es wurden jeweils infizierte und nichtinfizierte Zellen der Stämme *P. novaurelia* BGD19 und *P. tetraurelia* 298 verwendet. Es wurden die Mischungsverhältnisse von Killern zu Sensitiven von 2:8 und 5:5 getestet.

## **2.12 Methoden zur Bestimmung von Promotoraktivitäten**

### **2.12.1 Messung der GFP-Fluoreszenz in Bakteriensuspensionen**

Zur Messung der GFP-Fluoreszenz in Bakteriensuspensionen wurde das Fluoreszenzspektrometer Viktor der Firma Wallac (Freiburg) verwendet. Die Messung erfolgte jeweils in 96-Lochplatten, in denen 200 µl Bakteriensuspension pro Loch eingesetzt wurden. Die aus Übernachtskulturen in LB-Medium stammenden Bakterien wurden für 5 min bei 9500 rpm in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1x PBS aufgenommen. Die OD<sub>600</sub> der erhaltenen Suspension wurde im UV/Vis Spektrometer (Perkin Elmer, Langen) gemessen und für die Fluoreszenzmessungen auf  $0,5 \pm 0,02$  eingestellt. Als Referenz wurden Proben des 1x PBS-Puffers gemessen.

### **2.12.2 Bestimmung der Promotoraktivitäten in hungernden *E. coli***

Die Messungen von Promotoraktivitäten in hungernden *E. coli* wurden nach dem von Cha et al. (1999) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Es wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme angelegt. Jeweils 2 ml Übernachtskultur wurden in 250 ml temperiertes LB-

Medium überführt und bei 33 °C geschüttelt (350 rpm). Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,5 wurden die Kulturen abzentrifugiert (Sorvall GSA, 9000 rpm, 10 min) und das Pellet mit sterilem 1x PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 25 ml sterilem 1x PBS resuspendiert und jeweils 0,5 ml dieser Suspension wurden in den Stressansatz überführt. Die Stressansätze bestanden aus 5 ml 1x PBS, dem zur Erzeugung von physiologischem Stress unterschiedliche Zusätze beigefügt wurden bzw. der eine erhöhte Temperatur hatte. Im Folgenden sind die unterschiedlichen Stressfaktoren aufgelistet:

NaCl	40	g/l
Essigsäure	10	g/l
Ethanol	4	%
IPTG	5	mM
Hitzeschock	42	°C

Neben den Ansätzen mit den aufgelisteten Stressfaktoren wurden noch Ansätze mitgeführt, die nur 1x PBS mit einer Temperatur von 33 °C enthielten, bei denen lediglich der Hungerzustand selbst als Stressfaktor wirkte.

Alle Ansätze wurden sowohl mit Bakterien (*E. coli* JM109/pLC3), die das Promotorsondenplasmid mit dem aus *Caedibacter* isolierten Promotor enthielten, als auch mit Bakterien (*E. coli* JM109/pPROBE-NT'), die nur das promotorlose Ausgangsplasmid enthielten, angelegt. Zu jedem Ansatz wurden 5 Parallelansätze erstellt.

Die Stressansätze wurden für 6-10 Stunden bei 33 °C bzw. 42 °C inkubiert (350 rpm). Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte vor und nach der Inkubation. Gemessen wurden Proben von 200 µl in 96-Lochplatten mit dem Fluoreszenzspektrometer Viktor der Firma Wallac (Freiburg). Als Referenz diente jeweils 1x PBS mit den entsprechenden Zusätzen. Die Messung jedes Ansatzes erfolgte anhand von 3 Parallelproben. Neben der Fluoreszenzintensität wurde in jeder Probe auch die  $OD_{600}$  bestimmt.

Zur Auswertung der Daten wurde zunächst die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) bestimmt. Sie stellt die gemessene Fluoreszenzintensität dividiert durch die OD<sub>600</sub> der Probe dar. Zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) wurden die Differenzen der spezifischen Fluoreszenzintensitäten der Bakterien mit promotorlosem Vektor von den Fluoreszenzintensitäten der Zellen mit dem *Caedibacter*-Promotor im Promotorsondenvektor subtrahiert:

$$RFI = (SFI_t - SFI_{t0})_{E. coli/pLC3} - (SFI_t - SFI_{t0})_{E. coli/pPROBE-NT}$$

Die Werte SFI<sub>t</sub> und SFI<sub>t0</sub> stellen dabei die Werte für die spezifischen Fluoreszenzintensitäten vor und nach der Stressinduktion dar.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Excel 7.0 der Firma Microsoft.

### **2.12.3 Bestimmung der Promotoraktivität in wachsenden *E. coli***

Nach dem von Leveau & Lindow (2001) beschriebenen Verfahren wurde auch in wachsenden *E. coli* die Promotorstärke des RebC-Promotors bestimmt. Es wurde die Induzierbarkeit dieses Promotors durch Mangelzustände sowie durch Hitzeschock gemessen. Die Mangelzustände wurden durch Kultivierung der Zellen in Minimalmedium, dem entweder Glucose oder Aminosäuren fehlten, herbeigeführt. Der Hitzeschock wurde durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 33 °C auf 42 °C erzeugt.

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in Übernachtskulturen in LB-Medium mit Kanamycin (33 °C, 350 rpm) herangezogen. Jeweils 1 ml der Übernachtskultur wurde in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert (3 min, 9500 rpm) und das Pellet 3 x mit Minimalmedium gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Minimalmedium resuspendiert. 500 µl der Suspension wurden in 10 ml des entsprechend zusammengesetzten Minimalmediums überführt. Diese Kulturen wurden bei 33 °C oder 42 °C

kultiviert (350 rpm). Es wurden jeweils Kulturen der Bakterienstämme mit promotorlosem Plasmid (*E. coli* JM109/pPROBE-NT') sowie dem Promotorsondenvektor mit RebC-Promotor (*E. coli* JM109/pLC3) untersucht. Bei den Versuchen wurden jeweils 5 Parallelkulturen angelegt. Zu Beginn der Untersuchungen sowie über einen Zeitraum von 400-600 min wurden in Intervallen von 100-120 min aus den Kulturen Proben zur spektrometrischen Messung entnommen. Die Messung erfolgte in 96-Lochplatten mit 200 µl Probe pro Loch im Fluoreszenzspektrometer Viktor der Firma Wallac (Freiburg). Die Messungen erfolgten anhand von 3 Parallelproben. Neben der GFP-Fluoreszenz wurde in jeder Probe auch die OD<sub>600</sub> gemessen. Als Referenz diente jeweils ein entsprechend zusammengesetztes Minimalmedium.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand der von Leveau & Lindow (2001) hergeleiteten Gleichungen für die Promotorstärke basierend auf einem mathematischen Modell für die Akkumulation von GFP in den Einzelzellen.

Die erforderlichen Berechnungen wurden mit der Software Excel 7.0 der Firma Microsoft ausgeführt.

Die fluoreszenzspektrometrischen Messungen erfolgten mit der freundlichen Genehmigung von Fr. Prof. Anke am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung von Endosymbionten aus *Paramecium*

Für die Bearbeitung isolierter Symbionten musste zunächst ein Verfahren entwickelt werden, mit dem die hier verwendeten Symbionten möglichst rein und in den benötigten Mengen aus den entsprechenden Wirtsstämmen isoliert werden konnten. Für die Isolierung von *Paramecium*-Endosymbionten wurden prinzipiell zwei Verfahren beschrieben: Die Dichtegradientenzentrifugation und die Isolierung mittels ECTEOLA-Säulen. Beide Verfahren mussten entsprechend der Belange dieser Arbeit und der spezifischen Eigenschaften der verwendeten Stämme angepasst werden.

Die Isolierung mittels ECTEOLA-Säule (s. 2.8.2) hat sich als schneller und einfacher erwiesen. Das Säulenmaterial ist weiterhin wesentlich günstiger als das Percoll, das zur Herstellung der Dichtegradienten (s. 2.8.1) benötigt wird. Die mit Hilfe der ECTEOLA-Säule gewonnenen Symbiontenfraktionen waren von ihrer Reinheit her mit denen aus den Dichtegradienten zu vergleichen. Das etwas langwierigere Auswaschen des Percolls aus den gewonnenen Fraktionen entfällt bei der säulenchromatografischen Methode ebenfalls. Zur routinemäßigen Isolierung von Symbionten wurde daher die ECTEOLA-Säule verwendet. Lediglich zur Isolierung von R-Körpern wurde weiterhin noch der Dichtegradient eingesetzt.

### 3.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die Methode wurde nach den bereits beschriebenen Verfahren modifiziert (SCHMIDT ET AL., 1988; DANKBAR, 1991; SZALLIS, 1995).

Die folgende Zusammensetzung des Gradienten hat sich bei Verwendung von 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen (für Sorvall SS-34) unter den unter 2.8.1 beschriebenen Bedingungen als optimal erwiesen:

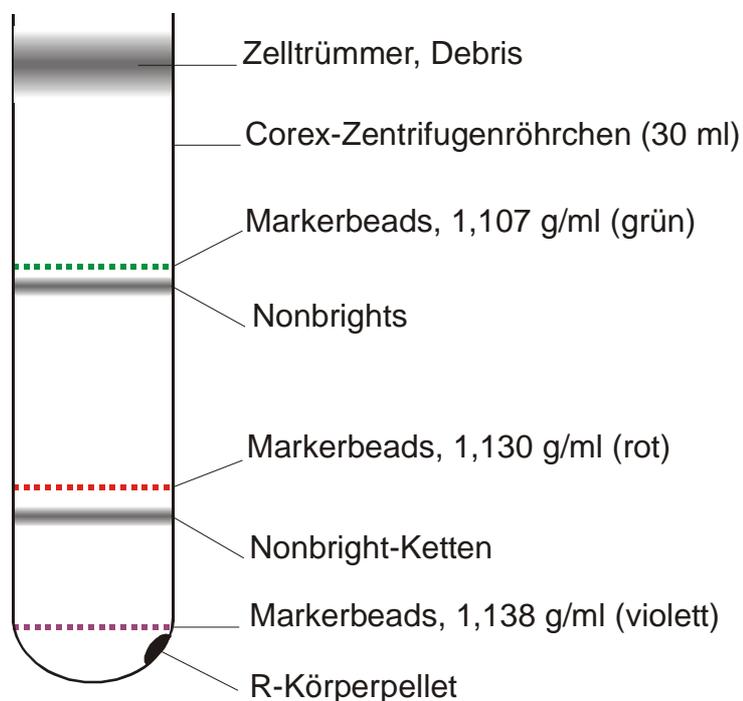
Percoll 90 %ig:	3	ml
Percoll 80 %ig:	4,5	ml
Percoll 65 %ig:	4,5	ml
Percoll 50 %ig:	4,5	ml
Percoll 40 %ig:	4	ml
Percoll 30 %ig:	2	ml

Eine gute Markierung der Phasen erreichte man durch die Zugabe von Markerbeads der Dichten 1,138 g/ml (violett), 1,130 g/ml (rot) und 1,107 g/ml (grün).

Auf einen so zusammengesetzten Gradienten konnten 2 ml Zellhomogenat, das aus bis zu 10 l gut bewachsener Paramecien-Kultur hergestellt war, aufgetragen werden. Die Aufreinigung mit dem Dichtegradienten ermöglichte eine getrennte Isolierung von Nonbrights, Nonbright-Ketten und R-Körpern. In keinem Fall konnten Bright-Formen als getrennte Fraktion isoliert werden, diese befanden sich immer nur vereinzelt in tieferen Fraktionen der Gradienten. Weder bei Isolierungen von *Caedibacter caryophilus* aus *Paramecium novaurelia* BGD19 noch bei der Isolierung von *C. taeniospiralis* aus *P. tetraurelia* 298K konnten ausgeprägte Bright-Banden isoliert werden. Auch bei länger gehungerten Kulturen (10 Tage) waren die Brights noch selten im Vergleich zu Nonbrights. In jedem Falle sedimentierten aber sehr reine R-Körperpellets.

Starken Einfluss auf die Reinheit der gewonnenen Endosymbionten hatte die Art der Fraktionierung des Gradienten. Besonders hoch konzentrierte

Fractionen erhielt man, wenn direkt mit einer Kapillare die gewünschte Bande vorsichtig von oben nach unten abgesaugt wurde. Dies kann sowohl mit einer Pasteurpipette als auch mit einer Schlauchpumpe durchgeführt werden. Zu einer möglichst vollständigen Isolierung aller Fraktionen und besonders zur Gewinnung von schwach konzentrierten Fraktionen, die keine sichtbaren Banden bildeten, war es notwendig, den gesamten Gradienten von oben nach unten zu fraktionieren. Abbildung 3-1 zeigt einen Dichtegradienten nach der Zentrifugation.



**Abb. 3-1:**

Dichtegradient zur Isolierung von *C. caryophilus* aus *P. novaurelia* BGD19 nach Zentrifugation (Sorvall SS34, 12 000 rpm, 25 min, 4 °C).

### 3.1.2 Säulenchromatografie

Dieses Verfahren wurde in Anlehnung an die bereits beschriebenen Methoden abgewandelt (SONNEBORN, 1970; SCHMIDT ET AL., 1988).

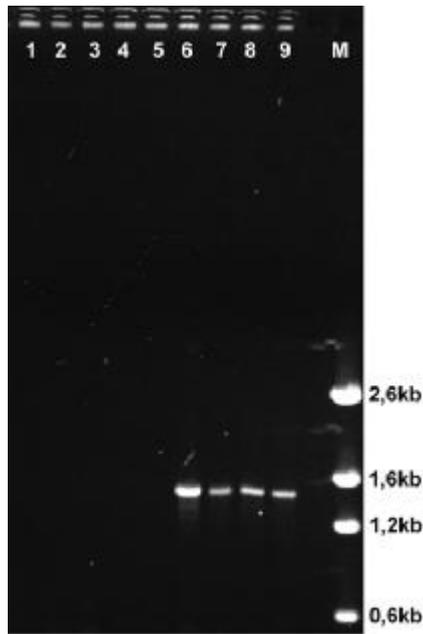
Die Verwendung einer Säule mit einem Innendurchmesser von 5 mm, die mit 0,5 g vorgequollenem ECTEOLA gepackt war, hat sich als geeignet erwiesen (s. 2.8.2). Für eine effektive Isolierung war es wichtig, das Zellhomogenat vor dem Auftragen auf die Säule für mindestens 5 min in Phosphatpuffer zu inkubieren. Es zeigte sich, dass auf eine solche Säule maximal das Zellhomogenat von 5 l dicht bewachsener Paramecien-Kultur aufgetragen werden konnte. Wurden die Säulen mit mehr Zellmaterial beladen, nahmen die Kontaminationen der isolierten Symbionten mit Futterbakterien und Zelltrümmern zu. Der Durchfluss durch die Säule konnte durch das Erzeugen von leichtem Überdruck mit einem Spritzenkolben stark beschleunigt werden. Die Reinheit der isolierten Bakterienfraktionen wurde dadurch nicht gemindert.

Insgesamt gesehen waren die so isolierten Endosymbionten von vergleichbarer Reinheit wie die mit dem Dichtegradienten gewonnenen Bakterien.

### 3.2 Herstellung aposymbiontischer Zellen

Aus den Stämmen *Paramecium tetraurelia* 298K (K für „Killer“) mit *Caedibacter taeniospiralis* und *P. novaurelia* BGD19K mit *C. caryophilus* konnten durch Antibiotikabehandlung die Endosymbionten entfernt werden (s. 2.7.1.4). Es resultierten daraus die aposymbiontischen Stämme *P. tetraurelia* 298apo und *P. novaurelia* BGD19apo. Als Antibiotikum wurde Streptomycin verwendet. Die Antibiotikabehandlung wurde über mehrere Wochen hinweg durchgeführt. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml Streptomycin konnten die Zelllinien in der Regel aber nur wenige Tage kultiviert werden. Das Streptomycin wirkte in dieser Konzentration toxisch. Die Streptomycinkonzentration wurde deshalb auf 30 µg/ml herabgesetzt. Bei dieser Konzentration konnten die Zellen problemlos über längere Zeit kultiviert werden. Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C wurde die toxische Wirkung des Streptomycin verstärkt. 4 Wochen nach Beginn der Antibiotikabehandlung konnten bei Zelllinien beider Stämme mittels PCR-Nachweis (s. 2.10.3.1) keine symbiontenhaltigen Paramecien mehr nachgewiesen werden, während vor dieser Behandlung beim PCR-Nachweis noch deutliche Banden zu sehen sind (s. Abb. 3-2). Der Test wurde nach 8 Wochen wiederholt und führte zum gleichen Ergebnis. Die Streptomycinbehandlung wurde daraufhin eingestellt. Nach weiteren 4 Wochen Kultivierung ohne Antibiotikum blieb der PCR-Test weiterhin negativ (s. Abb. 3-2).

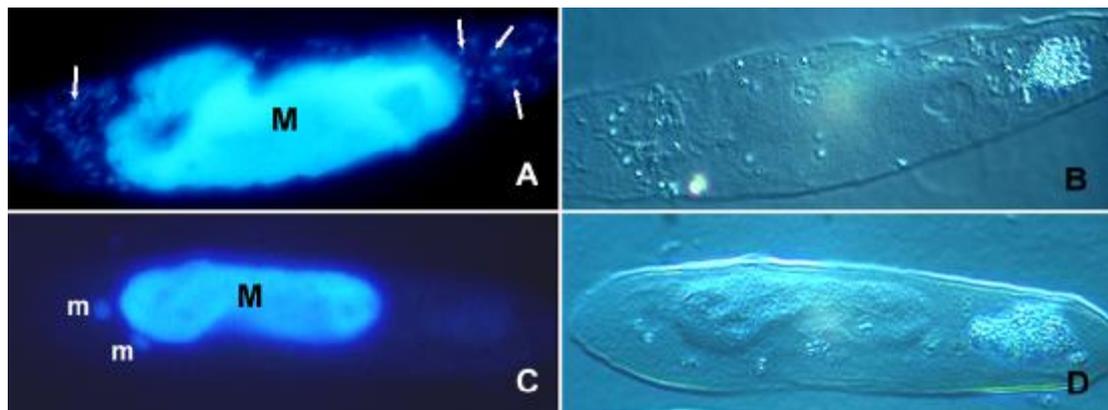
Die DAPI-Färbung von Zellen nach der Antibiotikabehandlung belegt ebenfalls die erfolgreiche Eradikation der Endosymbionten aus den Wirtszellen (s. Abb. 3-3). Während bei den Zellen des Ausgangsstammes deutlich im Cytoplasma liegende Endosymbionten zu erkennen sind, waren im Cytoplasma der Zellen nach Antibiotikabehandlung keinerlei angefärbte Bakterienzellen mehr zu sehen.



**Abb. 3-2:**

Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der PCR-Produkte der spezifischen *Caedibacter*-Nachweisreaktion von Zelllinien nach und vor Antibiotikabehandlung.

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1 | <i>P. tetraurelia</i> 298apo  |
| 2 | <i>P. tetraurelia</i> 298apo  |
| 3 | <i>P. novaurelia</i> BGD19apo |
| 4 | <i>P. novaurelia</i> BGD19apo |
| 5 | ---                           |
| 6 | <i>P. tetraurelia</i> 298K    |
| 7 | <i>P. tetraurelia</i> 298K    |
| 8 | <i>P. novaurelia</i> BGD19K   |
| 9 | <i>P. novaurelia</i> BGD19K   |
| M | pGem-DNA-Marker               |



**Abb. 3-3:**

DAPI-Färbung zum in situ Nachweis von Endosymbionten im Cytoplasma. *P. tetraurelia* 298K und *P. tetraurelia* 298apo (400x). Die Färbungen belegen die Entfernung der Symbionten aus dem Cytoplasma der Wirtszellen.

- A: *P. tetraurelia* 298K (Fluoreszenzaufnahme); B: Zelle aus A im DIC  
 C: *P. tetraurelia* 298apo (Fluoreszenzaufnahme); D: Zelle aus C im DIC  
 M: Makronukleus; m: Mikronukleus; Pfeile: Endosymbionten  
 (WEGMANN, 2001)

### 3.3 Transformation mit Antibiotikaresistenz-Marker

Da ein aus *Caedibacter*-Arten stammendes Plasmid zunächst nicht zur Verfügung stand, wurde untersucht, ob das Plasmid RSF1010 für eine Transformation von *Caedibacter* mit einem Antibiotikaresistenz-Marker geeignet ist.

RSF1010 verfügt über ein extrem weites Wirtsspektrum (s. 2.4). Auf dem Plasmid befinden sich Gene sowohl für eine Streptomycin- als auch für eine Sulfonamid-Resistenz. Streptomycin hat sich in den bereits beschriebenen Versuchen als sehr wirksames Antibiotikum zur Abtötung von *Caedibacter* erwiesen (s. 3.2). Alle Transformationsexperimente in diesem Abschnitt wurden daher mit RSF1010 durchgeführt.

Das Plasmid liegt in *E. coli* allerdings im Vergleich zu herkömmlichen Vektoren in relativ geringer Kopienzahl vor. Die Isolierung und anschließende Aufkonzentrierung der Plasmid-DNA war daher relativ problematisch. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgten Versuche unter Variation der Kulturbedingungen, der Wirtsstämme (*E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* JM109) und Isolierungsverfahren. Der Plasmid Maxi-Prep-Kit der Firma Sigma lieferte dabei die besten Ausbeuten (s. 2.10.1.2). Für die durchgeführten Versuche, insbesondere zur Elektroporation, wurden sehr hochkonzentrierte Plasmid-DNA-Lösungen (> 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) benötigt, die einen möglichst hohen Anteil an supercoiled-DNA aufweisen sollten und möglichst arm an Ionen sein mussten. Fällungen führten daher nicht zum gewünschten Ergebnis. Mit einem angepassten Ultrazentrifugationsverfahren konnten Lösungen mit der gewünschten Konzentration hergestellt werden, die den Anforderungen entsprachen.

#### 3.3.1 Detektion und Selektion der Transformanten

Das Plasmid RSF1010 wurde für alle getesteten Transformationsmethoden verwendet. Es wurde zur Elektroporation isolierter *Caedibacter* (s. 2.11.1),

zur Elektroporation von *Caedibacter* in *Paramecium* (s. 2.11.3) und für die Biolistik-Versuche (s. 2.11.4) eingesetzt.

Bei den durchgeführten Transformationsversuchen war prinzipiell nur von einem geringen Anteil stabiler Transformanten auszugehen. Nach einer Behandlung der Paramecien mit Streptomycin sollten deshalb nur in den wenigen Wirtszellen, in denen eine stabile Transformation von *Caedibacter* mit dem Plasmid RSF1010 stattgefunden hat, noch Endosymbionten vorhanden sein. Der überwiegende Teil der eingesetzten Paramecien sollte durch das Streptomycin von seinen Symbionten befreit worden sein. Der Nachweis symbiontenhaltiger Paramecien erfolgte nach dem von Albrecht (1999) beschriebenen PCR-Nachweis (s. 2.10.3.1). Die PCR-Methode eignete sich zu diesem Zweck besser als die DAPI-Färbung der Endosymbionten, da mit sehr geringen Zellzahlen oder sogar Einzelzellen gearbeitet werden konnte. Für das Färbeverfahren musste eine größere Zahl von Zellen eingesetzt werden. Zur Detektion der Paramecien, bei denen sich nach einer Transformation eine Population von transformierten (und damit Streptomycin-resistenten) *Caedibacter* etabliert haben sollte, wurden drei verschiedene Verfahren getestet.

### **3.3.1.1 Selektion durch Toxizität der „Killerparamecien“**

In diesen Versuchen wurde getestet, ob sich Symbionten-tragende Paramecien aufgrund ihrer natürlichen Killereigenschaft gegenüber aposymbiontischen Zellen des selben Stammes durchsetzen (s. 2.11.5). Würden sich einzelne Killer-Paramecien immer zuverlässig gegenüber aposymbiontischen Zellen durchsetzen, würden in einem Versuchsansatz nach der Antibiotikaselektion nur diejenigen Paramecien überleben, die transformierte und damit Streptomycin-resistente *Caedibacter* beherbergen. Sollte die Killeraktivität dazu nicht ausreichen, müssten nach einem Transformationsversuch von allen eingesetzten Paramecien Zelllinien angelegt werden, die dann jeweils mittels PCR auf das Vorhandensein von resistenten Endosymbionten getestet werden müssten.

In Vorversuchen wurde ermittelt, bei welchen Kultivierungsbedingungen Kleinkulturen des Stammes *Paramecium novaurelia* BGD19 in 24-Loch-Mikrotiterplatten über längere Zeiträume (mehrere Wochen) stabil gehalten werden konnten (s. 2.11.5). Anschließend wurden Mischkulturen aus *P. novaurelia* BGD19 und *P. novaurelia* BGD19apo mit verschiedenen Mischungsverhältnissen angelegt (1:1; 1:9; 9:1). Nach 6 Wochen wurden die Zellen der Kulturen mittels PCR auf das Vorhandensein von Endosymbionten untersucht (s. 2.11.5). Es wurden jeweils PCR-Tests mit Einzelzellen aus jedem Ansatz durchgeführt (s. 2.10.3.1). In den parallel geführten Kontrollen ungemischter Kulturen zeigte sich, dass die aposymbiontischen Zellen erwartungsgemäß höhere Teilungsraten hatten. In den Mischansätzen setzten sich bei Überschuß sowie bei äquivalentem Mischungsverhältnis immer die Killer durch (s. Tab. 3-1). Bei einem anfänglichen Verhältnis von 9 Sensitiven zu 1 Killer setzten sich entweder Killer oder Sensitive durch. Als Maß für die Teilungsraten in den einzelnen Ansätzen wurden die Zelldichten bestimmt. Absolute Zellzahlen konnten bei diesen Versuchsreihen nicht bestimmt werden, da beim Füttern der Ansätze immer ein Teil der Kultur verworfen wurde, um das Gesamtvolumen konstant zu halten.

**Tab. 3-1:** Killeraktivität in Mischkulturen

Versuchs- Nummer	Zahl der Parallelen	Mischungsverhältnis K/S	Ausgangszahl K/S	Zelldichte Ø [Zellen/ml] nach 6 Wochen	Verhältnis K/S nach 6 Wochen
1	5	9/1	18 K/2 S	60	100 % K
2	5	1/9	2 K/18 S	400 50	3 x 100 % S 2 x 100 % K
3	5	1/1	10 K/10 S	100	100 % K
4	3	1/0	20 K	60	100 % K
5	3	0/1	20 S	350	100 % S

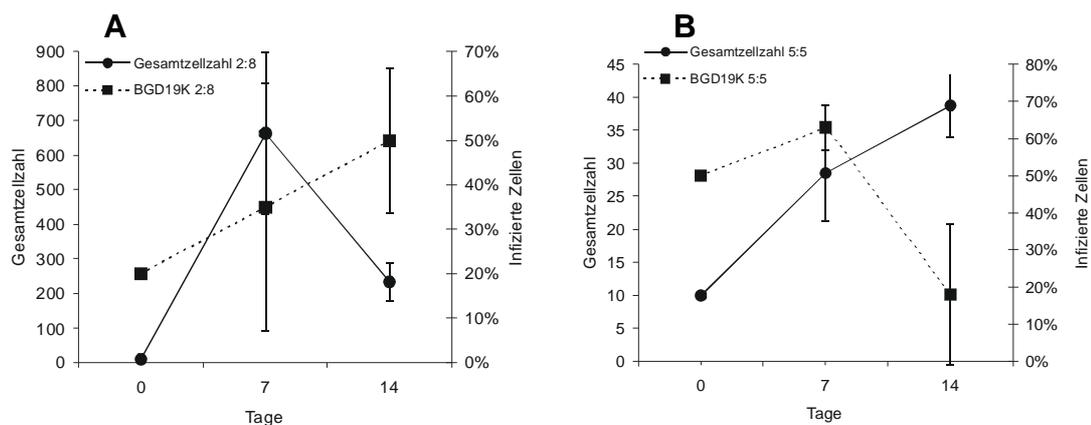
K: Killer

S: Sensitive

Für die Transformationsversuche bedeutete dies, dass nach Möglichkeit das Screening nach Transformanten anhand von Zelllinien der Wirtszellen

erfolgen sollte, zumal nicht zu bestimmen war, wie lange die Zeitdauer vom Verlust der Endosymbionten durch das Streptomycin bis zum Verlust der an die Symbionten gekoppelten Resistenz vergehen würde. Bei allen Versuchen wurden daher so viele Zelllinien wie möglich angelegt.

In einer weiteren Versuchsreihe (s. 2.11.5) wurden Konkurrenzversuche mit den Stämmen *P. novaurelia* BGD19 als auch *P. tetraurelia* 298 durchgeführt, bei denen die Kulturen allerdings nicht gefüttert wurden. Die Untersuchungszeit war daher auf höchstens drei Wochen begrenzt. Die Mischansätze wurden mit einem Volumen von 2 ml angelegt. Begonnen wurde jeweils mit 2 symbiontenträgenden (infizierten) und 8 aposymbiontischen Zellen bzw. 5 symbiontenträgenden und 5 aposymbiontischen Zellen. Die in diesen Versuchen erhobenen Daten lassen Rückschlüsse auf die ökologische Bedeutung der Killersymbionten zu und wurden bereits veröffentlicht (KUSCH ET AL., 2002). Abbildung 3-4 und 3-5 zeigen die Entwicklung der Gesamtzellzahlen und den Anteil der infizierten Zellen während des Untersuchungszeitraums bei den verschiedenen Mischungen.

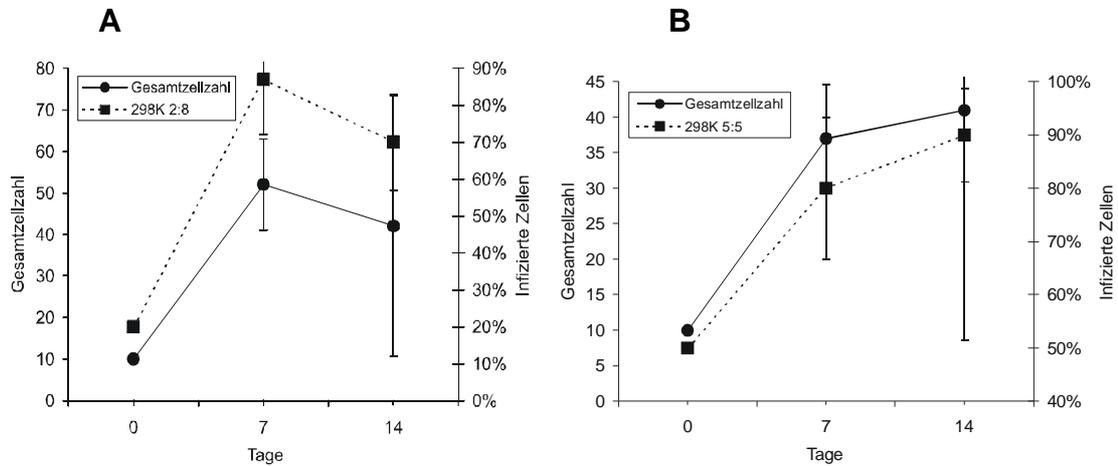


**Abb. 3-4:**

Abundanzen von Zellen während der Kultivierung von *P. novaurelia* BGD19K und *P. novaurelia* BGD19apo in Mischkulturen. Die Werte beziehen sich jeweils auf ein Kulturvolumen von 2 ml.

**A:** *P. novaurelia* BGD19K und *P. novaurelia* BGD19apo im Mischungsverhältnis 2:8.

**B:** *P. novaurelia* BGD19K und *P. novaurelia* BGD19apo im Mischungsverhältnis 5:5.



**Abb. 3-5**

Abundanzen von Zellen während der Kultivierung von *P. tetraurelia* 298K und *P. tetraurelia* 298apo in Mischkulturen. Die Werte beziehen sich jeweils auf ein Kulturvolumen von 2 ml.

**A:** *P. tetraurelia* 298K und *P. tetraurelia* 298apo im Mischungsverhältnis 2:8.

**B:** *P. tetraurelia* 298K und *P. tetraurelia* 298apo im Mischungsverhältnis 5:5.

### 3.3.1.2 Selektion mit R-Körpern und Killerextrakten

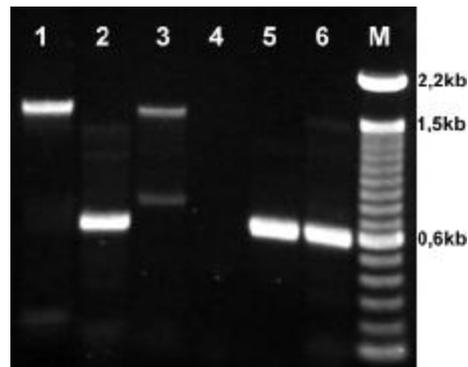
Es wurde geprüft, inwieweit sich aposymbiotische Paramecien von Symbionten-beherbergenden Zellen durch die Zugabe von R-Körpern bzw. Zellhomogenaten aus Killerzellen trennen lassen (s. 2.11.5). Testansätze mit *P. novaurelia* BGD19 und *P. novaurelia* BGD19apo sowie *P. tetraurelia* 298K und *P. tetraurelia* 298apo wurden jeweils parallel mit den toxischen Lösungen behandelt. Es wurden Zellhomogenate und isolierte R-Körper aus *P. novaurelia* BGD19 sowie *P. tetraurelia* 298K verwendet. Zusätzlich wurden Tests mit isolierten R-Körpern des Stammes *P. caudatum* C221, die von Hr. Prof. Schmidt in Münster isoliert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren, durchgeführt. Als toxisch erwiesen sich nur Homogenate aus lange gehungerten Kulturen. Ebenso zeigte sich, dass frisch isolierte R-Körper weniger wirksam waren als das komplette Zellhomogenat. Die eingefrorenen R-Körper aus Stamm C221 erwiesen sich als unwirksam.

Insgesamt mussten zu einer zuverlässigen Abtötung der aposymbiontischen Zellen so hohe Konzentrationen an toxischer Lösung eingesetzt werden, dass auch die Symbionten-tragenden Zellen abgetötet wurden. Für eine Selektion im Sinne der geplanten genetischen Manipulationen war dieses Verfahren damit zu unspezifisch.

### 3.3.1.3 Detektion von Transformanten mittels PCR-Nachweis

Die Streptomycin-Selektion im Anschluß an die Transformationsexperimente (s. 2.11) konnte nur mit geringen Streptomycin-Konzentrationen durchgeführt werden, um eine möglichst hohe Überlebensrate der Paramecien zu gewährleisten. Außerdem war unklar, wie gut *Caedibacter* die Streptomycin-Resistenz nach der Transformation ausprägen würde. Der Selektionsprozeß wurde daher auf bis zu 10 Wochen ausgedehnt. Die während dieser Zeit erhaltenen Signale in den PCR-Tests konnten nicht zugeordnet werden. Es war unklar, ob sie von Transformanten oder von noch nicht abgetöteten untransformierten Symbionten stammten. Es wurden deshalb Primer homolog zur Sequenz des Streptomycin-Resistenz-Gens von RSF1010 für PCR-Tests eingesetzt (s. 2.3 und Abb. 3-6). Durch die Amplifikation eines DNA-Fragments spezifischer Länge konnte der Transformationsvektor direkt nachgewiesen werden. Der Nachweis konnte durch Variation der PCR-Bedingungen (MgCl<sub>2</sub>-Konzentration; Annealing-Temperatur) weiter optimiert werden. Die Versuche wurden mit RSF1010 in *E. coli* durchgeführt. Aus den Versuchen konnte allerdings nicht abgeleitet werden, ob dieser Nachweis letztlich sensitiver sein würde als ein Nachweis des Symbionten mit dem etablierten PCR-Verfahren. Weiterhin wurde getestet, ob in einer Multiplex-PCR *Caedibacter* und RSF1010 gleichzeitig nachweisbar sind. Dies war nicht möglich (s. Abb. 3-6). Mittels der verwendeten Primer konnten jeweils DNA-Fragmente spezifischer Größe zum Nachweis von *Caedibacter* als auch des Transformationsvektors RSF1010 amplifiziert werden. Wurden die Primerpaare aber in einem Reaktionsansatz kombiniert, konnten nicht die

beiden erwarteten DNA-Fragmente amplifiziert werden. Es trat nur noch die für RSF1010 spezifische 0,6 kb-Bande auf.



**Abb. 3-6:**

Agarosegelelektrophorese (1,5 %) von PCR-Produkten zur Entwicklung einer Multiplex-PCR zum parallelen Nachweis von *Caedibacter* und dem Vektor RSF1010.

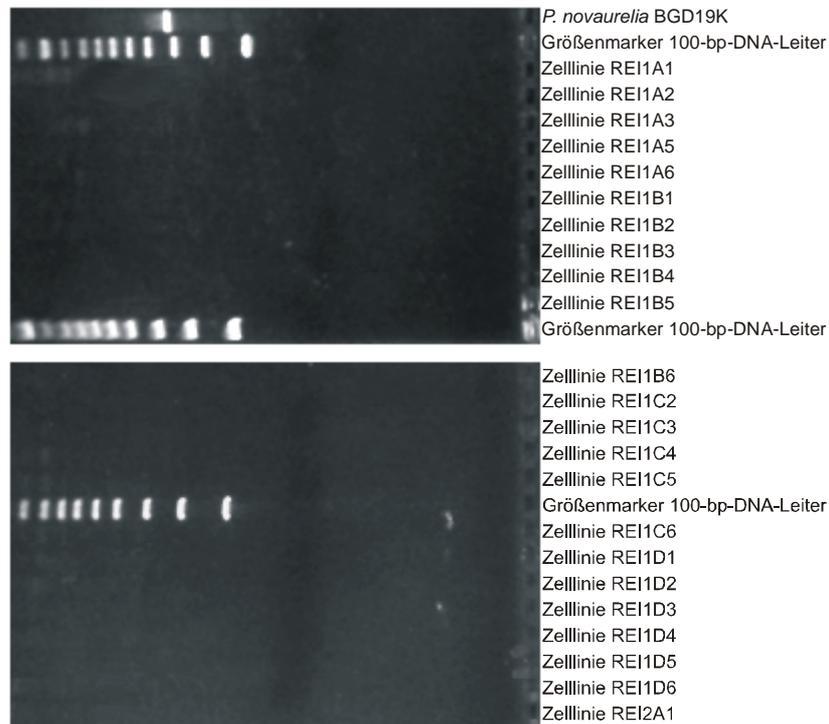
Lane	Organismen	Primerpaare
1	<i>P. novaurelia</i> BGD19	TP1F/R
2	<i>E. coli</i> DH5α/RSF1010	TP1F/R; RSF1010F/R
3	<i>P. novaurelia</i> BGD19	TP1F/R; RSF1010F/R
4	<i>P. novaurelia</i> BGD19	RSF1010F/R
5	<i>E. coli</i> DH5α/RSF1010	RSF1010F/R
6	<i>E. coli</i> DH5α/RSF1010 u. <i>P. novaurelia</i> BGD19	TP1F/R; RSF1010F/R
M	DNA-Marker 100 bp-Ladder	

Das Primerpaar TP1F/R ist komplementär zum RebC-Locus von *Caedibacter*. Es wird ein 1,5 kb Fragment amplifiziert. Mit RSF1010F/R wird in Gegenwart der Template-DNA von RSF1010 ein 0,6 kb Fragment amplifiziert. Werden *E. coli* DH5α/RSF1010 und *P. novaurelia* BGD19 zusammen mit beiden Primerpaaren eingesetzt, wird nur die für RSF1010 spezifische Bande detektiert.

### 3.3.2 Transformation isolierter *Caedibacter*

#### 3.3.2.1 Elektroporation isolierter *Caedibacter* und direkte Reinfektion

Aus 5-12 I Massenkultur von *P. novaurelia* BGD19 wurden die Symbionten mittels ECTEOLA-Säule isoliert (s. 2.8.2). Die isolierten Bakterien wurden entsprechend den Vorgaben für eine Elektroporation von Bakteriensuspensionen aufgearbeitet und mit der Plasmid-DNA gepulst (s. 2.11.1). Die elektroporierten Zellen wurden unmittelbar nach dem Puls an *P. novaurelia* BGD19apo „verfüttert“ (s. 2.11.2), um eine Reinfektion zu erreichen. Die Elektroporations-Parameter wurden in Anlehnung an für die Elektroporation von Bakterien bekannte Bedingungen variiert (s. z.B. DOWER ET AL., 1988; DOWER, 1990). Die Paramecien aus diesen Infektionsansätzen wurden als Einzelzelllinien in Kultur genommen (s. 2.7.1.3). Nach einer Regenerationsphase von 1-3 Tagen wurde mit der Antibiotika-Selektion begonnen. Die ersten PCR-Tests zur Detektion von *Caedibacter* erfolgten nach 10-14 Tagen (s. 2.10.3.1). Auch nach mehreren Monaten konnten noch keine Paramecien mit transgenen Symbionten detektiert werden. Es wurden dabei insgesamt 443 Zelllinien kultiviert. 37 Linien starben während der Kultivierung ab. 406 Zelllinien wurden mittels PCR auf Streptomycin-resistente *Caedibacter* getestet. Abbildung 3-7 zeigt exemplarisch das Ergebnis der PCR-Tests einiger angezogener Zelllinien (REI1A1-REI2A1).



**Abb. 3-7:**

PCR-Screening von Zelllinien nach Streptomycin-resistenten Endosymbionten. Die Zelllinien entstanden aus Einzelzellen von *P. novaurelia* BGD19, denen mit dem Plasmid RSF1010 elektroporierte *Caedibacter* zur Infektion verfüttert wurden.

Da die Ursache für das Scheitern der Transformation darin zu vermuten ist, dass nach der Elektroporation keine Infektion der Wirtszellen mehr erfolgte, sollte deshalb getestet werden, ob die Mikroinjektionstechnik eine effektive Reinfektion nach einer Elektroporation isolierter Symbionten ermöglicht (s. 2.11.2). In Vorversuchen zeigte sich allerdings schon, dass diese Technik nur die Bearbeitung relativ weniger Zellen erlaubt. Im Gegensatz zu in vitro kultivierten adherenten Zellen aus Gewebekulturen sind Paramecien motil und müssen deshalb zur Injektion erst entsprechend fixiert werden (Ansaugen an Glaskapillare bzw. Eingießen in Agarose). Das Verfahren ist deshalb insgesamt zu aufwendig und birgt eine zu hohe Mortalitätsrate bei den behandelten Zellen. Da bei der Injektion weiterhin auch nur eine geringe Zahl von Bakterien pro *Paramecium* eingespritzt werden kann, wurden keine weiteren Versuche mit dieser Technik unternommen.

### 3.3.2.2 In vitro Kultivierung von *Caedibacter*

Die Kultivierung der Endosymbionten außerhalb von *Paramecium* könnte eine Transformation entscheidend vereinfachen. Die genetischen Manipulationen könnten analog zu anderen kultivierbaren Arten durchgeführt werden. Mit einem auf diesem Wege erhaltenen *Caedibacter*-Klon könnte dann mittels Mikroinjektion ein *Paramecium* wieder problemlos infiziert werden (jedes eingespritzte Bakterium wäre dann ein Transformant). Versuche der Arbeitsgruppe von Hr. Prof. Neuhaus deuteten an, dass *Caedibacter* nicht zu einer eigenen ATP-Produktion fähig ist und dieser Metabolit deshalb von außen zugeführt werden muß (TJADEN ET AL., 1999). Das Gleiche gilt auch für die anderen Nukleoside. Es wurden verschiedene Medien hergestellt, die einem intrazellulären Milieu entsprechen und verschiedene Metabolite sowie Zellhomogenat von *Paramecium* enthielten (s. 2.7.2.4). Bei den Metaboliten handelte es sich um ATP, CTP, GTP und UTP sowie die zentralen Stoffwechselzwischenprodukte Malat und Glucose-6-phosphat. Neben dem Zusatz von Zellhomogenat wurde auch die Zugabe von Trypton und Hefeextrakt ins Medium getestet. Das Animpfen des Mediums mit *Caedibacter* erfolgte durch die Zugabe von aufgebrochenen *Paramecium*-Zellen. Die Vermehrung der *Caedibacter* wurde durch tägliches Auszählen der Zelldichte unter dem Mikroskop verfolgt. Dabei konnten die Endosymbionten nur anhand von Größe und Form identifiziert werden. Die sich teilenden *Caedibacter* waren als typische lange Ketten aus 2-6 Zellen zu erkennen. Eine sichere Identifikation der Bakterien war so allerdings nicht möglich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Bakterien möglicherweise zum Teil um Kontaminationen von Fremdbakterien handelte. Es zeigte sich, dass die auf diese Weise identifizierten Symbionten unter diesen Bedingungen noch maximal 1-3 Tage vital waren und in dieser Zeit 2-3 Teilungen stattfanden. Eine weitere Kultivierung war nicht mehr möglich. Die Transformation und Selektion von *Caedibacter* außerhalb seines Wirtes ist damit noch nicht durchführbar.

### 3.3.3 In situ Transformation von *Caedibacter* in *Paramecium*

Die obigen Ergebnisse (s. 3.3.2) legten nahe, dass zur genetischen Manipulation der *Paramecium*-Symbionten Methoden gewählt werden müssen, die eine Transformation der Bakterien innerhalb ihrer Wirtszellen erlauben.

#### 3.3.3.1 In situ Elektroporation

Es wurde ein Verfahren zur Elektroporation entwickelt, mit dem die Plasmid-DNA direkt in die in den Paramecien befindlichen *Caedibacter* gebracht werden sollte (s. 2.11.3). Dabei wurden die für die erfolgreiche Elektroporation von *Paramecium* bekannten Bedingungen (FRAGA ET AL., 1998; BOILEAU ET AL., 1999) mit den für die Transformation von Bakterien notwendigen elektrischen Parametern kombiniert. Daraus resultierte ein „Doppelpuls“ bei dem der erste Puls entsprechend den Bedingungen für die DNA-Aufnahme von *Paramecium* gewählt wurde. Hier sollte möglichst viel Plasmid-DNA ins Cytoplasma der Paramecien gelangen und die Mortalitätsrate dennoch relativ gering sein. Ein zweiter Puls mit entsprechend hoher Feldstärke sollte die Aufnahme der DNA durch die Endosymbionten bewirken. Bedingt durch die hohen Feldstärken war die Mortalitätsrate der Paramecien beim zweiten Puls sehr hoch. Der Anteil der überlebenden Zellen war hier < 1 %. Die maximal einsetzbare Feldstärke war 18 kV/cm. Größere Feldstärken, wie sie z. T. bei der Elektroporation von Bakterien für maximale Anzahlen an Transformanten eingesetzt werden, konnten nicht mehr verwendet werden, da sonst die Überlebensrate der Paramecien gegen Null ging. Bei 18 kV/cm ist der Elektrodenabstand auf 1 mm limitiert. Der Querschnitt der Kammer ist ebenfalls klein, um den Widerstand möglichst groß zu halten. Damit war das Volumen an Zellsuspension pro Elektroporation auf maximal 60 µl begrenzt. Die Dichte der eingesetzten Zellsuspension war ebenfalls begrenzt, da die permanent von den Zellen

ausgeschiedenen Ionen die Leitfähigkeit der Zellsuspension stark erhöhen. Eine Elektroporation mit diesen Bedingungen überlebten jeweils nur 10-20 Zellen. Die Zahl der Überlebenden konnte auch durch die Variation aller anderen Parameter nicht gesteigert werden. Höhere Zahlen von Überlebenden konnten nur durch den Einsatz größerer Mengen an Zellsuspension erzielt werden. Der dadurch bedingte größere Elektrodenabstand ließ aber nur eine Feldstärke von 12,5 kV/cm zu. Bei dieser Feldstärke ist aber (aus Erkenntnissen über *E. coli* abgeleitet) nicht von einer maximalen Anzahl von Transformanten auszugehen, zumal der Zelldurchmesser von *Caedibacter* kleiner als von *E. coli* ist und damit prinzipiell höhere Feldstärken zur Transformation eingesetzt werden müssten (s. z.B. DOWER, 1990). Unter diesen Bedingungen wurden ca. 100-200 überlebende Paramecien pro Zelle erhalten. Folgendes Verfahren zur Elektroporation wurde etabliert und ebenso bei den Versuchen mit GFP-Markergenen eingesetzt (s. 2.11.3):

1. Filtrieren und Abernten der Massenkulturen (5-15 l) in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde).
2. Aufkonzentrieren der Zellen auf 100 ml in der Ölttestbecherzentrifuge (Damon/IEC Division).
3. 3 x Waschen der Zellen mit 150 mM Saccharose in der Ölttestbecherzentrifuge.
4. Konzentrieren der Zellen auf ca. 3 ml; Zelldichte ca.  $10^5$  Zellen/ml.
5. Elektroporationsküvette auf Eis vorkühlen.
6. DNA-Lösung (> 1 mg/ml) in gekühlte Küvette pipettieren.
7. Sofort Zellsuspension zugeben und durch Auf- und Abpipettieren mischen.
8. Puls auslösen.
9. Unmittelbar nach Puls Zellen in halbkonzentriertem WGP-Medium aufnehmen.
10. Vereinzelung in Zelllinien.

Die folgende Tabelle zeigt die Pulsparameter bei unterschiedlichem Elektrodenabstand in 0,1 cm- bzw. 0,2 cm-Küvetten, die bei den Versuchen eingestellt wurden. Die dabei gemessenen Zeitkonstanten sind ebenfalls aufgelistet:

**Tab. 3-2:** In situ Elektroporation von *Caedibacter*

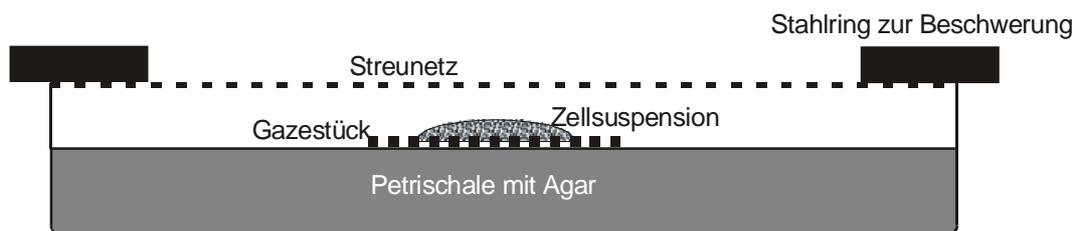
Küvette DNA-Vol. Zellsus.-Vol.	1. Puls				2. Puls			
	Spannung [V]	Kapazität [ $\mu$ F]	Widerstand [ $\Omega$ ]	Zeitkonstante [ms]	Spannung [V]	Kapazität [ $\mu$ F]	Widerstand [ $\Omega$ ]	Zeitkonstante [ms]
0,1 cm 5 $\mu$ l 50 $\mu$ l	150	75	---	12,5-16,9	1800	25	200	4,1-5,5
0,2 cm 10 $\mu$ l 250 $\mu$ l	300	75	---	13,3-18,6	2500	25	200	4,4-5,2

Mit den beschriebenen Verfahren wurde *P. novaurelia* BGD19 mit RSF1010 elektroporiert. Die Überlebenden wurden nach 3 Tagen der Selektion mit Streptomycin unterzogen und vereinzelt. Nach 10-14 Tagen wurden erste PCR-Tests auf *Caedibacter* durchgeführt. Es zeigte sich, dass noch bis ca. 10 Wochen nach Beginn der Antibiotika-Selektion *Caedibacter* in einzelnen Paramecien nachweisbar waren, die aber im weiteren Verlauf der Selektion auch verschwanden. In keinem Fall konnten Streptomycin-resistente Symbionten und damit erfolgreiche Transformanten nachgewiesen werden. Insgesamt wurden so 478 Zelllinien nach der Elektroporation in Kultur genommen. 93 starben während der Antibiotikabehandlung ab. 385 wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von transformierten Endosymbionten getestet.

In keinem Fall wurden transformierte *Caedibacter* gefunden.

### 3.3.3.2 Biolistik

Durch den Beschuss von Hefezellen mit DNA-beschichteten Wolframpartikeln ist die Transformation der Mitochondrien der Hefen schon mehrfach dokumentiert worden (s. z.B. BUTOW & FOX, 1990). Es sollte deshalb auch möglich sein, durch den Beschuss von *Paramecium*-Zellen DNA-Moleküle in deren bakterielle Endosymbionten einzuführen, zumal hier die Größenverhältnisse noch günstiger liegen als im Falle der Hefemitochondrien und das Partikel-Bombardement als Routinemethode zur Transformation von *Paramecium* ebenfalls schon seit einiger Zeit erfolgreich eingesetzt wird (z.B. BOILEAU ET AL., 1999). Bei den durchgeführten Versuchen wurde *P. novaurelia* BGD19 mit RSF1010-beschichteten Wolframpartikeln (M5 Tungsten, Biorad) beschossen. Dazu musste zunächst das in der Literatur beschriebene Verfahren an die zur Verfügung stehende Apparatur angepasst werden (s. 2.11.4). Um einem Zerstreuen der Zellsuspension durch die Heliumdruckwelle der Particle Inflow Gun vorzubeugen, wurde der in Abbildung 3-8 gezeigte Aufbau entwickelt. Die Zellsuspension wurde auf Nylongaze (ca. 1 cm<sup>2</sup>, Maschenweite 250 µm) aufgebracht. Die Gazestücke waren auf einer Agarplatte aufgelegt. Nach



**Abb. 3-8:**

Aufbau zum Beschuss von *Paramecium*-Suspensionen mit der Particle Inflow Gun. Die Zellsuspension (50 µl) wird auf eine Gaze (1 cm<sup>2</sup>, Maschenweite 250 µm) auf einer Agarplatte (Ø 50 mm) gegeben. Die Platte wird mit einer weiteren Gaze (Maschenweite 1000 µm), die eine Streuung der Partikel bewirkt, abgedeckt und mit einem Stahlring beschwert. Die Platte wird dann gemäß Anleitung in der Particle Inflow Gun plaziert und beschossen.

dem Beschuss wurden die Paramecien mit Nährmedium von der Platte und der Gaze abgeschwemmt.

Es wurden jeweils 25-100 µl maximal dichte *Paramecium*-Suspension (ca.  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml) mit verschiedenen Drücken und verschiedenen Abständen zur Suspension (unterschiedlicher Streuwinkel) beschossen. Folgendes Verfahren wurde dazu etabliert:

1. Filtrieren und Abernten der Massenkulturen (10-20 l) in der Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator, Oelde).
2. Aufkonzentrieren der Zellen auf 100 ml in der Ölttestbecherzentrifuge (Damon/IEC Division).
3. Waschen der Zellen mit Volvic in der Ölttestbecherzentrifuge.
4. Konzentrieren der Zellen auf max. 3 ml; Zelldichte ca.  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml.
5. 50 µl Suspension auf Platte gemäß Abb. 3-8 auftragen.
6. Zellen nach Anleitung in der Particle Inflow Gun beschießen.
7. Zellen 4 x mit 500 µl Nährmedium abschwemmen.

Das Verfahren wurde ebenso zum Beschuss mit dem GFP-Vektor pLC5 verwendet.

Die Überlebensrate konnte bei diesem Verfahren als annähernd 100 % angenommen werden. Die hohen Überlebensraten bei dieser Transformationsmethode sind grundsätzlich wünschenswert, erschweren aber die Selektion der Zellen. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Zellen nach dem Beschuss zeigte zunächst viele durch die starke mechanische Einwirkung deformierte Zellen. Diese Schäden waren aber reversibel. In den vereinzelt Zelllinien zeigte sich, dass die Paramecien in der Regel innerhalb 24 Stunden gut regenerierten.

Die so behandelten Paramecien wurden nach 2 Tagen der Streptomycin-Selektion unterzogen. Aufgrund der hohen Überlebensraten konnte nur ein vergleichsweise geringer Teil der beschossenen Zellen vereinzelt werden. Nach entsprechender Selektionsdauer wurden wiederum PCR-Tests auf *Caedibacter* durchgeführt.

Es wurden insgesamt 456 Zellen nach dem Beschuss mit RSF1010 vereinzelt. 403 Zelllinien wurden nach der Antibiotikabehandlung auf das Vorhandensein von transformierten *Caedibactern* mittels PCR getestet.

Es wurden keine Paramecien mit transformierten *Caedibactern* detektiert.

### 3.4 Transformation mit GFP-Markergenen

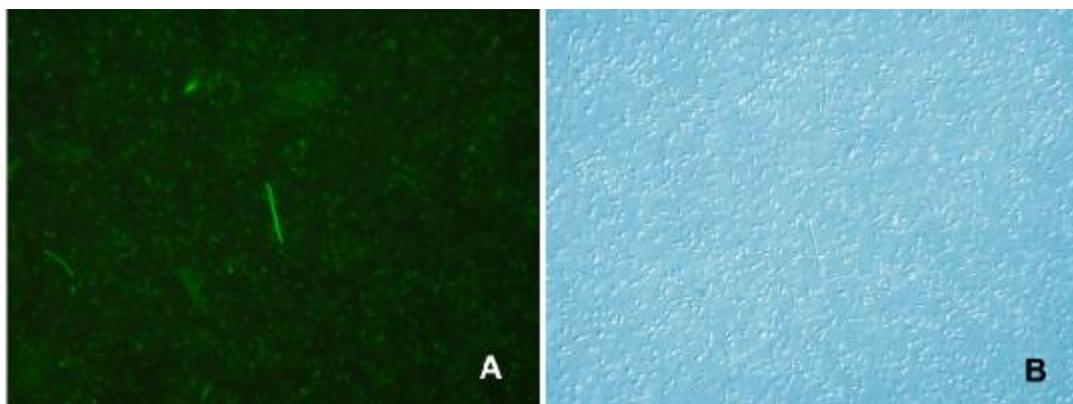
Der Einsatz von GFP als Markergen zur Transformation von *Paramecium*-Endosymbionten sollte mehrere Vorteile haben. Endosymbionten, die das entsprechende Plasmid aufgenommen haben und GFP exprimieren, sollten kurze Zeit nach der Aufnahme des Konstrukts schon unter dem Fluoreszenzmikroskop in ihren Wirtszellen zu erkennen sein. Die Paramecien müssten deshalb nicht mehr in Zelllinien vereinzelt werden, sondern könnten aufkonzentriert in großen Mengen unter dem Mikroskop „durchsucht“ werden. Die langwierige Behandlung mit Antibiotika würde ausfallen (s. 2.7.1.4). Auch wenn das Plasmid nicht dauerhaft von den Endosymbionten erhalten wird, könnten Zellen, die Plasmide auch nur für kurze Zeit aufgenommen haben, detektiert werden. Auf diese Weise konnten wesentlich größere Zahlen von Paramecien auf transformierte Endosymbionten hin gescreent werden. Die Chance, eine Zelle mit transformierten *Caedibactern* isolieren zu können, konnte so gesteigert werden.

Die Transformationsexperimente wurden mit zwei verschiedenen Konstrukten durchgeführt. Zum einen wurde das Plasmid pASV2 verwendet, das in *E. coli* zu einer relativ starken konstitutiven Expression des Wild-Typ GFP-Gens führt. Zum anderen wurde auf Basis eines Promotor-Sondenvektors ein Plasmid hergestellt, das eine kurze Sequenz des RebC-Promotors vor dem GFPmut2-Gen enthält. Mit diesem Plasmid (pLC5) konnten ebenfalls entsprechende Transformationsexperimente durchgeführt werden.

### 3.4.1 Transformation mit pASV2

#### 3.4.1.1 Signalintensität von *E. coli*/pASV2

Das Plasmid pASV2, das freundlicherweise von Hr. Prof. Guzman überlassen wurde, wurde in *E. coli* JM109 mittels Hitzeschock transformiert und vermehrt (s. 2.10). Die Abbildung 3-9 zeigt *E. coli* JM109/pASV2 nach Anzucht in Flüssigkultur unter dem Fluoreszenzmikroskop (Filter Zeiss 09).



**Abb. 3-9:**

*E. coli*/pASV2 (630x). A: Fluoreszenzaufnahme; B: im DIC

Die Zellen von *E. coli*/pASV2 zeigen unter Fluoreszenzanregung ein eher schwaches Fluoreszenzsignal. Einzelne Zellen sind nur schwach zu erkennen. Ein deutliches Fluoreszenzsignal ist nur bei sich teilenden, zusammenhängenden Zellfäden zu erkennen. Das Wild-Typ GFP liefert auch bei starker Expression in Prokaryoten nur geringe Fluoreszenzintensitäten. Die Darstellung von einzelnen Bakterienzellen ist mit diesem Konstrukt nur bedingt möglich.

#### 3.4.1.2 Elektroporation mit pASV2

Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen *P. novaurelia* BGD19 mit dem bereits beschriebenen Verfahren mit pASV2 elektroporiert wurde (s. 2.11.3). Die überlebenden Zellen aus den Elektroporationsansätzen wurden jeweils

ohne eine Vereinzelung in Zelllinien vorzunehmen kultiviert. Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen der einzelnen Kulturen aufkonzentriert und als mikroskopische Dauerpräparate fixiert. Auf diese Weise konnten ca.  $10^5$  Paramecien auf das Vorhandensein von GFP-exprimierende Endosymbionten gescreent werden. Dabei wurden keine entsprechende *Caedibacter* gefunden.

Die Versuche mit diesem Plasmid wurden eingestellt, nachdem von Hr. Prof. Lindow die Überlassung von Plasmiden mit GFPmut2-Genen zugesagt wurde.

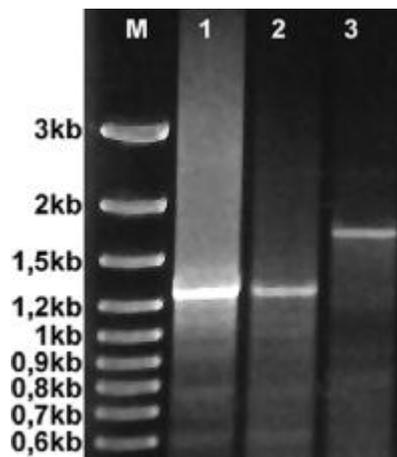
### **3.4.2 Transformation mit GFPmut2-Markergenen**

#### **3.4.2.1 Konstruktion der pLC-Plasmide**

Als Basis für die Konstruktion eines GFP-Expressionsvektors für *Caedibacter* wurde der Promotor-Sondenvektor pPROBE-NT' wegen seines Broad Host Range Replicons aus pBBR1 und dem GFPmut2-Gen ausgewählt. Die Promotorsequenzen (Sequenz-Zugangsnummer des Reb-Locus: U04524) aus *Caedibacter caryophilus* wurden mittels PCR-Primern, die Restriktionsschnittstellen für HindIII und EcoRI als Überhänge besaßen, amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden mit HindIII und EcoRI verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert. Die Multi Cloning Site des Vektors entspricht der von pUC18 und liegt von EcoRI→HindIII orientiert in Leserichtung vor dem GFPmut2-Gen. Durch den Doppelverdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen war die richtige Orientierung des Inserts vor dem Markergen gewährleistet. Das Screening der Transformanten erfolgte ebenfalls mittels PCR. Durch die dabei verwendeten Oligonukleotide AF 3017F und AF 4164R wurde die Template-DNA des Vektors von beiden Seiten über die Klonierungsstelle hinweg amplifiziert. Bei dem ursprünglich eingesetzten Plasmid resultierte daraus ein DNA-Fragment von ca. 1,1 kb. Erfolgte bei dem zu untersuchenden Klon die Ligation in die

Schnittstelle, wurden die in der PCR erhaltenen Fragmente um einen entsprechenden Betrag verlängert.

Auf Basis des Vektors pPROBE-NT' wurden so zwei Plasmide hergestellt, die unterschiedlich große Bereiche des RebC-Promotors vor dem GFPmut2-Gen beinhalten. Die Konstrukte wurden pLC5 und pLC3 genannt. Beim PCR-Screening der Klone resultierte bei pLC3 eine Bande von ca. 1,6 kb, bei pLC5 eine Bande von  $\geq 1,1$  kb. Bei pLC3 sollte der gesamte Bereich vor dem RebC-Gen (ca. 0,3 kb, 1141-1424) einkloniert sein, bei pLC5 nur 10 bp (1415-1424) des Promotors mit der Ribosom Binding Site vor dem kodierenden Bereich des Gens. Das Resultat des PCR-Screenings von pLC3 und pLC5 zeigt Abbildung 3-10.



**Abb. 3-10:**

Agarosegelelektrophorese (1,5 %) des PCR-Screening der Klone mit pLC3 und pLC5. Mit 2 Primern wurde von beiden Seiten über die Klonierungsstelle amplifiziert. Das Plasmid pPROBE-NT', das Basis für die hergestellten Plasmide war, diente als Kontrolle.

M: 100 bp-Ladder-DNA-Marker

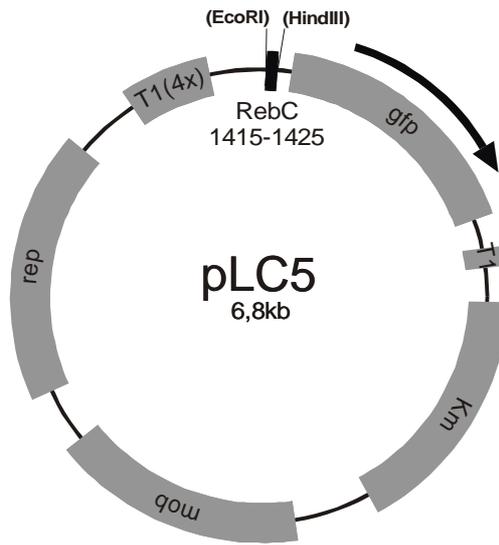
1: pPROBE-NT'

2: pLC5

3: pLC3

Bei pLC3 wurde ein 0,5 bp großer Teil des RebC-Promotors einkloniert, bei pLC5 nur 40 bp desselben.

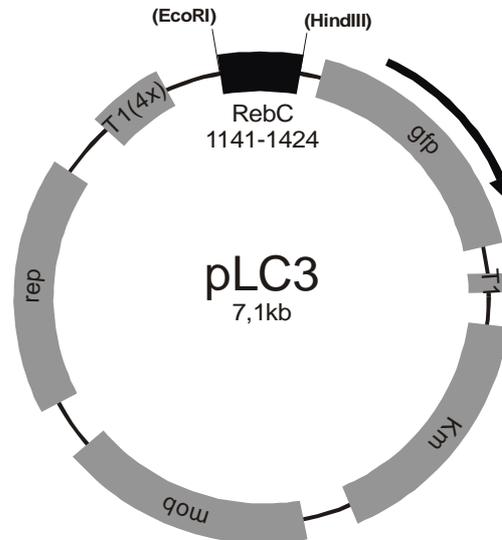
Der Erfolg der Klonierung wurde durch das Ansequenzieren der Plasmide überprüft (s. 2.10.6). Es wurde dabei aus dem GFPmut2-Gen zurück über die Klonierungsstelle ca. 500 bp weit ansequenziert. Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12 zeigen die beiden Plasmide pLC3 und pLC5.



**Abb. 3-11:**

Karte des Plasmids pLC5. Vor das GFPmut2-Gen wurde eine kurze Sequenz (1415-1425) aus dem Promotor des RebC-Locus (Sequenz-Zugangsnummer: U04524) kloniert, die die Ribosom Binding Site enthält. Die Expressionskassette ist durch Transkriptionsstop-Sequenzen begrenzt. Das Konstrukt enthält das Broad Host Range Replicon aus pBBR1 und ein Kanamycin-Resistenzgen.

gfp: GFPmut2-Gen; rep: pBBR1-Replicon; T1: Transkriptionsstop; Km: Kanamycin-Resistenzgen; mob: *mob*-Region.



**Abb. 3-12:**

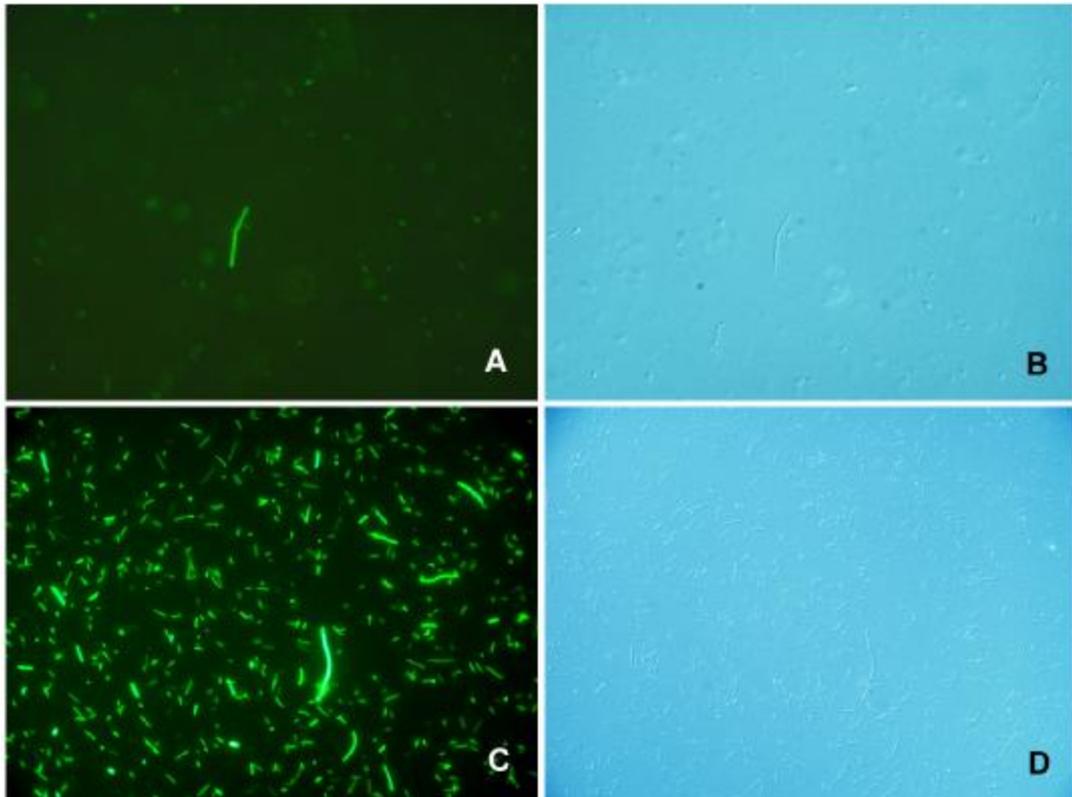
Karte des Plamids pLC3. Vor das GFPmut2-Gen wurde die Promotorregion (1141-1424) des RebC-Locus (Sequenz-Zugangsnummer: U04524) kloniert. Die Expressionskassette ist durch Transkriptionsstop-Sequenzen begrenzt. Das Konstrukt enthält das Broad Host Range Replicon aus pBBR1 und ein Kanamycin-Resistenzgen.

gfp: GFPmut2-Gen; rep: pBBR1-Replicon; T1: Transkriptionsstop; Km: Kanamycin-Resistenzgen; mob: *mob*-Region.

### 3.4.2.2 Signalintensität der pLC-Konstrukte

Die Plasmide pLC3 und pLC5 wurden in *E. coli* JM109 vermehrt. Die Zellen aus diesen Flüssigkulturen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop deutliche Unterschiede in ihrer konstitutiven GFP-Expression (s. 2.9.1). Die Signalintensität der Wirtsbakterien mit pLC5 zeigte eine wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität. Einzelzellen waren deutlich aufgrund ihres Fluoreszenzlichtes zu erkennen. Die Intensität der Signale war bei allen beobachteten Zellen vergleichbar stark. Bei Bakterien mit pLC3 waren Einzelzellen nur sehr schwach zu erkennen. Lediglich zusammenhängende, in der Teilung befindliche Fäden aus mehreren Bakterienzellen hatten Signalintensitäten, die ausreichend stark waren, um die Zellen unter Fluoreszenzbeleuchtung erkennen zu lassen. Auf Festmedium gezüchtete

Bakterienkolonien mit dem Plasmid pLC5 fluoreszierten bei UV-Bestrahlung deutlich grün. Kolonien mit pLC3-tragenden Bakterien zeigten bei gleicher Beleuchtung kein mit dem bloßen Auge wahrnehmbares Fluoreszenzsignal. Abbildung 3-13 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* aus Flüssigkulturen mit den beiden Plasmiden.



**Abb. 3-13:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* JM109/pLC3 und *E. coli* JM109/pLC5 aus Flüssigkulturen (630x; Zeiss Filter 09).

Die Zellen, die das Plasmid pLC5 tragen, zeigen eine deutlich stärkere konstitutive Fluoreszenz als die Zellen mit pLC3.

A: *E. coli* JM109/pLC3 (Fluoreszenzaufnahme); B: Ausschnitt aus A im DIC

C: *E. coli* JM109/pLC5 (Fluoreszenzaufnahme); D: Ausschnitt aus C im DIC

### 3.4.2.3 Elektroporation mit pLC5

Aufgrund der starken GFP-Expression die bei *E. coli* mit pLC5 zu sehen war, wurde dieses Plasmid für weitere Transformationsversuche mit GFP als Markergen benutzt. Bei vergleichbarer GFP-Expression in *Caedibacter* sollten GFP-exprimierende Endosymbionten gut in den jeweiligen *Paramecium*-Zellen zu erkennen sein.

Die Elektroporationsversuche mit pLC5 wurden analog zu dem bereits für die Versuche mit RSF1010 entwickelten Verfahren durchgeführt (s. 2.11.3). Das Plasmid sollte hier ebenfalls durch zwei elektrische Pulse zunächst ins Cytoplasma der Wirtszellen eingebracht und dann von den Endosymbionten aufgenommen werden. Die Versuche wurden mit *C. caryophilus* in *P. novaurelia* durchgeführt.

Wie bei den Versuchen mit pASV2 wurde auf eine Vereinzelung der Zellen nach der Elektroporation verzichtet. Die einzelnen Versuchsansätze wurden für 1-3 Tage kultiviert und anschließend aufkonzentriert und fixiert. Aus den fixierten Zellen wurden Dauerpräparate angefertigt, die dann auf das Vorhandensein von GFP-exprimierende Endosymbionten hin unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden.

Auf diese Weise konnten ca.  $3 \cdot 10^5$  Paramecien nach Transformanten gescreent werden.

Es wurden dabei keine GFP-exprimierenden Endosymbionten gefunden.

### 3.4.2.4 Biolistik mit pLC5

Bei der Transformation durch das Partikel-Bombardement (s. 2.11.4) wird nur ein Teil der eingesetzten Paramecien von Partikeln getroffen. Viele der verwendeten Wirtszellen scheiden damit als potentielle Träger von transgenen Endosymbionten aus. Die Expression als genetischer Marker für transgene *Caedibacter* sollte die Chance erhöhen, aus der großen Überzahl

von *Paramecium*-Zellen die Träger transformierter Endosymbionten zu detektieren.

Bei den Versuchen wurde *P. novaurelia* BGD19 mit dem etablierten Verfahren mit pLC5 beschossen (s. 2.11.4). Die Zellen wurden dann 1-3 Tage weiterkultiviert, aufkonzentriert und als mikroskopische Dauerpräparate fixiert. Die Präparate wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop nach GFP-exprimierenden Endosymbionten gescreent.

Es wurden ca.  $10^6$  *Paramecium*-Zellen untersucht. In keinem Falle wurden transformierte *Caedibacter* gefunden.

### 3.5 Untersuchung des Reb-Promotors

#### 3.5.1 Die unterschiedlichen pLC-Konstrukte

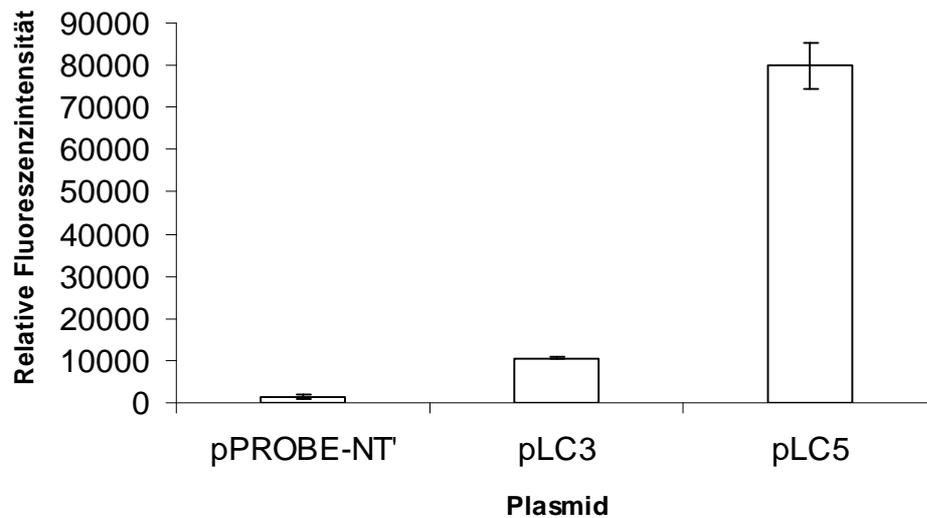
Die stark unterschiedliche GFP-Expression, die in *E. coli* von den Plasmiden pLC5 und pLC3 ausgeht und unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen entsprechenden Signalunterschied auffällt, wurde durch fluoreszenzspektrometrische Messungen quantifiziert (s. 2.12.1).

Die Bakterien stammten dabei gleichfalls aus Flüssigkulturen. Die Zellen wurden auf gleiche Zelldichten hin verdünnt und die Fluoreszenz im Vergleich zu Kulturen mit Bakterien, die das Ausgangsplasmid pPROBE-NT<sup>+</sup> mit dem promotorlosen GFP-Gen beherbergen, bestimmt. Die Fluoreszenz wurde als relative Fluoreszenz gemessen, d. h. die Zelldichte der Suspension wurde ebenfalls als OD<sub>600</sub> gemessen und die Fluoreszenzintensität dann relativ zur Zelldichte gesetzt.

Abbildung 3-14 zeigt die unterschiedlichen relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellsuspensionen.

Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten sind ein Maß für die konstitutive GFP-Expression in den unterschiedlichen Klonen. Das Einklonieren von Promotorsequenzen aus dem Reb-Locus führt bei *E. coli* JM109 jeweils zu einer konstitutiven GFP-Expression durch die Wirtszellen.

Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* JM109-Zellsuspensionen mit unterschiedlichen GFP-Plasmiden



**Abb. 3-14:**

Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pLC3 und pLC5 im Vergleich zum Ausgangsplasmid pPROBE-NT' mit promotorlosem GFP-Gen. Die pLC-Plasmide enthalten unterschiedliche Teile des RebC-Promotors vor dem GFP-Gen.

Die konstitutive GFP-Expression in *E. coli* ist stark abhängig davon, welcher Bereich des RebC-Promotors vor das GFP-Gen kloniert wurde.

Abhängig von dem jeweils einklonierten Bereich des RebC-Promotors unterscheidet sich die konstitutive GFP-Expression. Der kurze Bereich des Reb-Promotors in pLC5, der lediglich die Ribosome Binding Site enthält, führt zu einer wesentlich höheren GFP-Expression als bei pLC3. Hier wurde ein Bereich von ca. 300 bp vor dem kodierenden Bereich des RebC-Gens einkloniert.

In den folgenden Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob der Promotor des RebC-Locus, wie er in pLC3 einkloniert wurde, durch Stresssignale aktiviert werden kann.

### 3.5.2 Stressinduktion des RebC-Promotors

Im Rahmen dieser Versuche wurde gemessen, wie sich die Expression von GFP in *E. coli* JM109/pLC3 bei der Einwirkung von Stresssignalen auf entsprechende Kulturen auswirkt (s. 2.12). Die Messung der GFP-Expression erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensitäten von Zellsuspensionen der Bakterien. Die Akkumulation von GFP in den Bakterienzellen und damit die gemessene Fluoreszenzintensität ist stark abhängig von der Teilungsrate der Bakterien. Für die Messung von Änderungen in der GFP-Expression in Bakterien werden in der Literatur daher zwei unterschiedliche Verfahren beschrieben. Einerseits kann die Messung bei Zellen im Hungerzustand, die keine Teilungen mehr vollziehen, durchgeführt werden (CHA ET AL., 1999). Andererseits kann die Akkumulation von GFP aus mehrfachen Messungen im Laufe der Induktion eines entsprechenden Promotors mathematisch modelliert werden (LEVEAU & LINDOW, 2001).

Die beiden beschriebenen Verfahren wurden in den folgenden Versuchen zur Messung der Induzierbarkeit des RebC-Promotors durch Stressfaktoren angewendet.

#### 3.5.2.1 Messung der Promotoraktivitäten in hungrigen *E. coli*

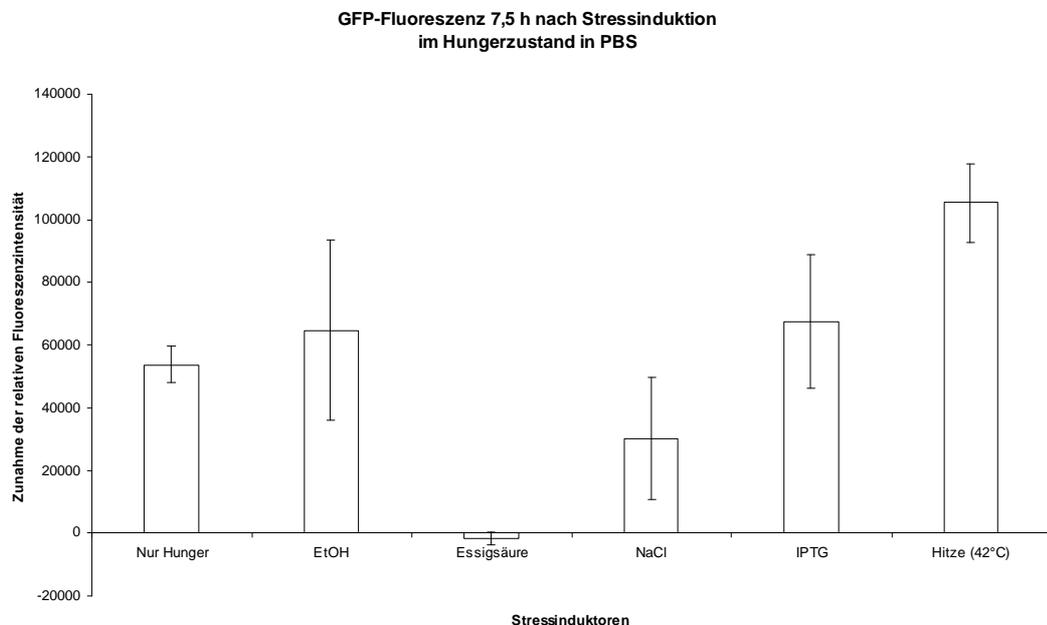
Die zu untersuchenden Bakterienkulturen wurden abgeerntet und in PBS überführt, um eine weitere Teilung der Zellen zu verhindern (s. 2.12.2). Der dadurch ausgelöste Hungerzustand war dabei selbst schon einer der zu untersuchenden Stressfaktoren. Die weiterhin getesteten Stressfaktoren waren (s. 2.12.2):

1. Osmotischer Stress durch die Zugabe von NaCl (40 g/l)
2. Säurestress durch die Zugabe von Essigsäure (10 g/l)
3. Hitzeschock durch plötzliche Temperaturerhöhung auf 42 °C
4. Einwirkung von Ethanol (4 %)

5. Zugabe von IPTG (5 mM)

Vor und 7,5 Stunden nach der Stressinduktion wurde die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität der Bakteriensuspensionen gemessen. Die durch die Stressfaktoren induzierte Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde durch den Vergleich mit einer nichtinduzierten Bakteriensuspension ermittelt.

Abbildung 3-15 zeigt die Auswirkungen der einzelnen Stressfaktoren auf die GFP-Expression unter Kontrolle des RebC-Promotors in *E. coli* JM109.



**Abb. 3-15:**

Zunahme der GFP-Expression in *E. coli* JM109/pLC3 durch unterschiedliche Stressfaktoren. Die Untersuchung erfolgte jeweils an nichtreproduktiven, hungernden Zellen. Als Vergleich diente eine nichtinduzierte Bakteriensuspension des gleichen Klones.

Die Messung zeigt, dass durch den Hungerzustand der Zellen in PBS schon eine Verstärkung der relativen Fluoreszenz ausgelöst wird. Die Zugabe von IPTG bzw. Ethanol bewirkt noch einen weiteren Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Hitzebehandlung führt zur stärksten Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zum reinen Hungerzustand. Der osmotische Stress, ausgelöst durch die NaCl-Zugabe, führt zu einer Erhöhung der Signalintensität im Vergleich zum nichtinduzierten Zustand, erreicht aber nicht das Niveau der ausschließlich hungernden Suspension. Die Zugabe von Essigsäure dagegen bewirkt eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur nichtinduzierten Kontrolle.

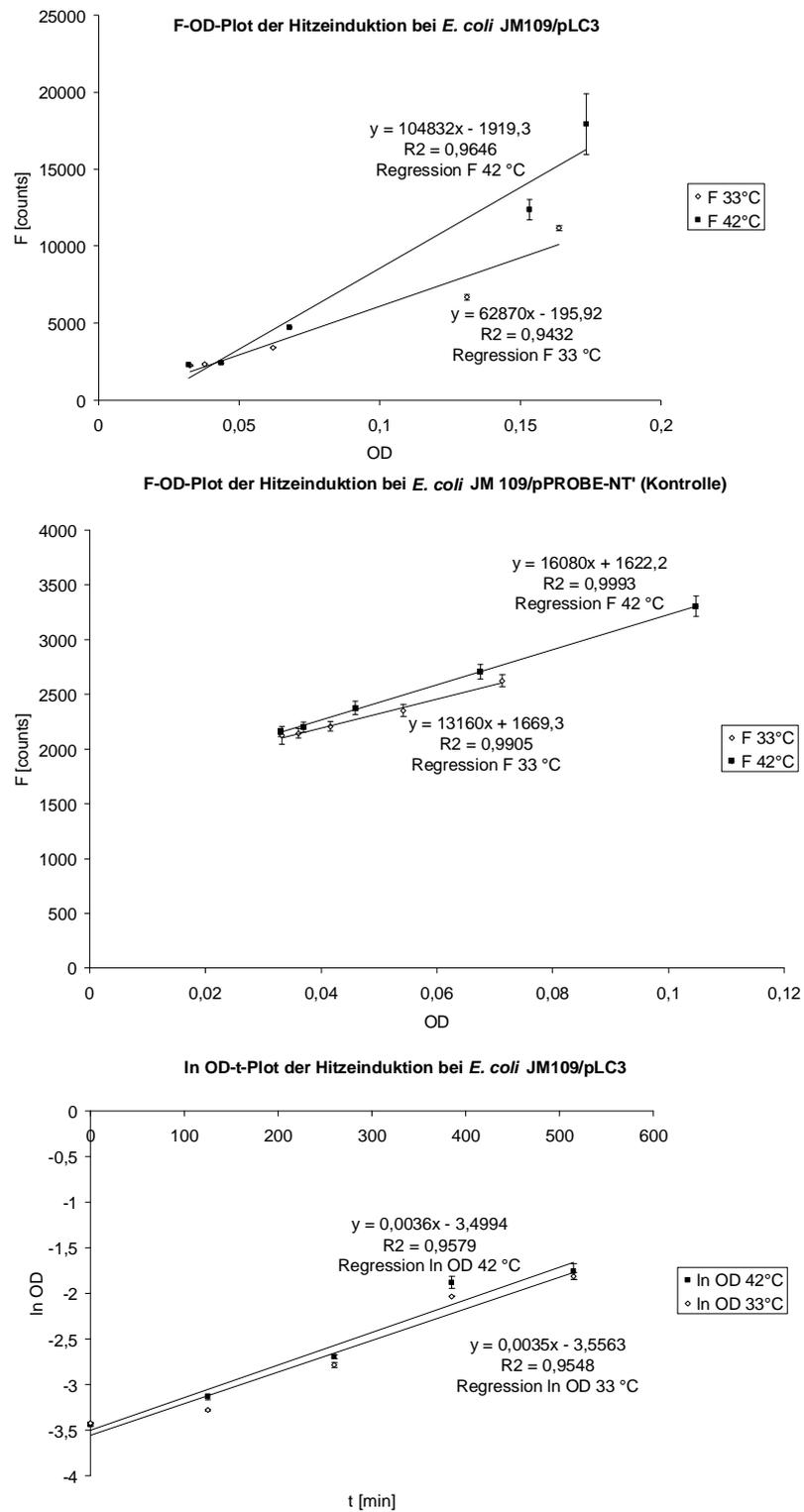
### 3.5.2.2 Messung der Promotoraktivitäten in wachsenden *E. coli*

Hitzebehandlung und Hungerzustand führten bei den vorangegangenen Versuchen zu einer Erhöhung der GFP-Expression bei *E. coli* JM109/pLC3. Die Auswirkung dieser Stressfaktoren wurde deshalb eingehender untersucht. Die Änderung der Promotoraktivität des RebC-Promotors wurde bei Hitzeschock, Glucosemangel und Aminosäuremangel gemessen. Zum Vergleich der Promotoraktivitäten bei stressinduzierten bzw. nichtinduzierten Zellen wurde die Akkumulation von GFP in den untersuchten Bakterien mathematisch modelliert (s. 2.12.3). Dazu wurde die gemessene Fluoreszenzintensität (F) über der als OD<sub>600</sub> gemessenen Zelldichte (OD) aufgetragen (F-OD-Plot). Die Steigung der Geraden (f<sub>ss</sub>) entspricht der Akkumulation von GFP in den Zellen. Die Werte wurden durch Vergleich mit einer unter gleichen Bedingungen kultivierten Bakterienkultur mit dem promotorlosen Plasmid pPROBE-NT' korrigiert. Die Teilungsrates μ der Zellen wurde durch Auftragung von ln OD über der Zeit (t) bestimmt. Für die Reifungszeit von GFP wurden 45 min angenommen. Die Promotoraktivität P folgt dann aus der Gleichung (LEVEAU & LINDOW, 2001):

$$P = f_{ss} \cdot \mu \cdot \left(1 + \frac{\mu}{m}\right)$$

Im Folgenden sind die Diagramme und die daraus errechneten Änderungen der Promotoraktivitäten bei Einwirkung der unterschiedlichen Stressreize aufgeführt.

## ERGEBNISSE

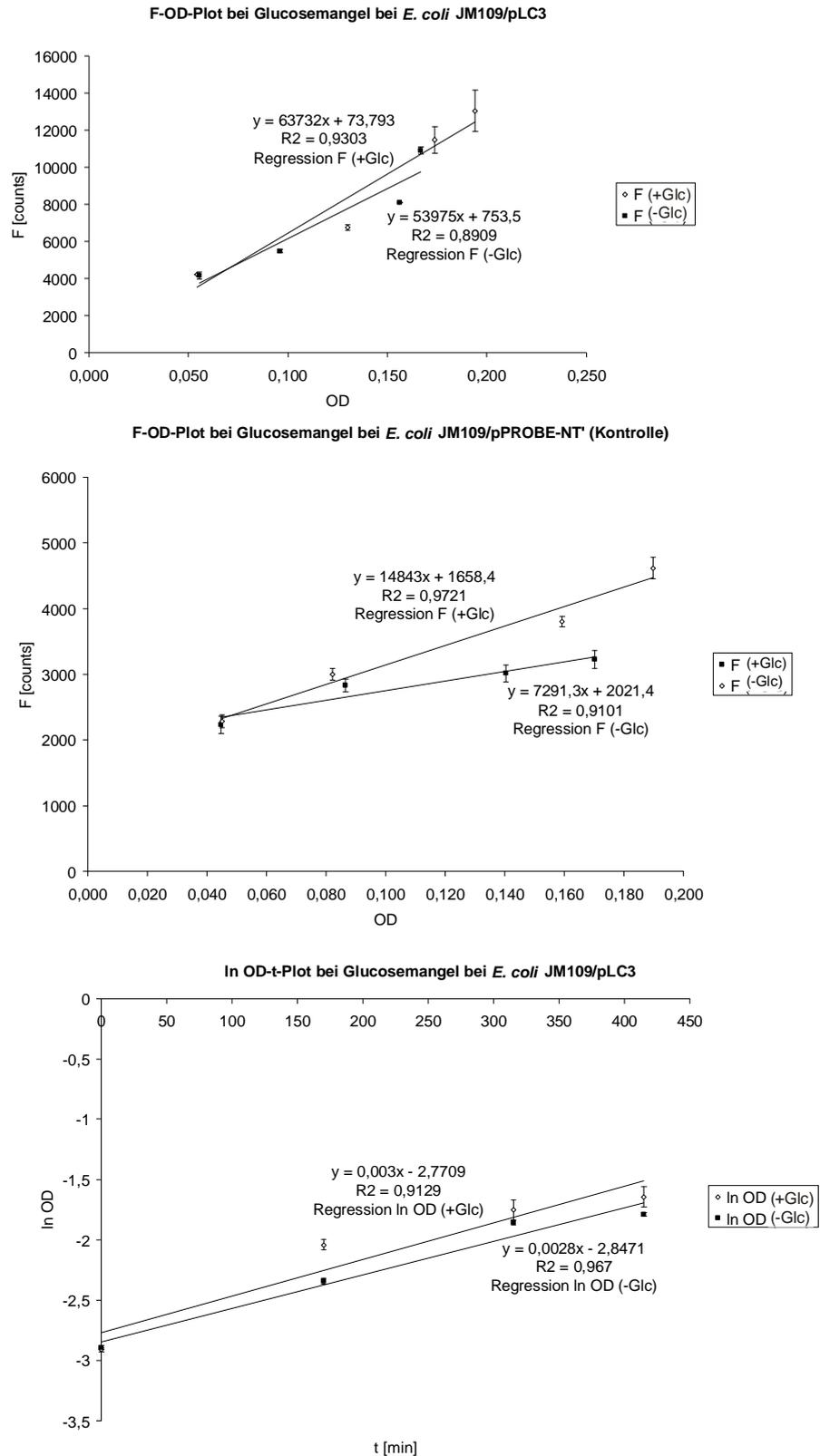


**Abb. 3-16:**

Messung der Induzierbarkeit des RebC-Promotors durch Hitzeschock in *E. coli* JM109/pLC3. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit dem promotorlosen Plasmid pPROBE-NT'.

F: Fluoreszenzintensität; OD: optische Dichte bei 600 nm; t: Zeit

## ERGEBNISSE

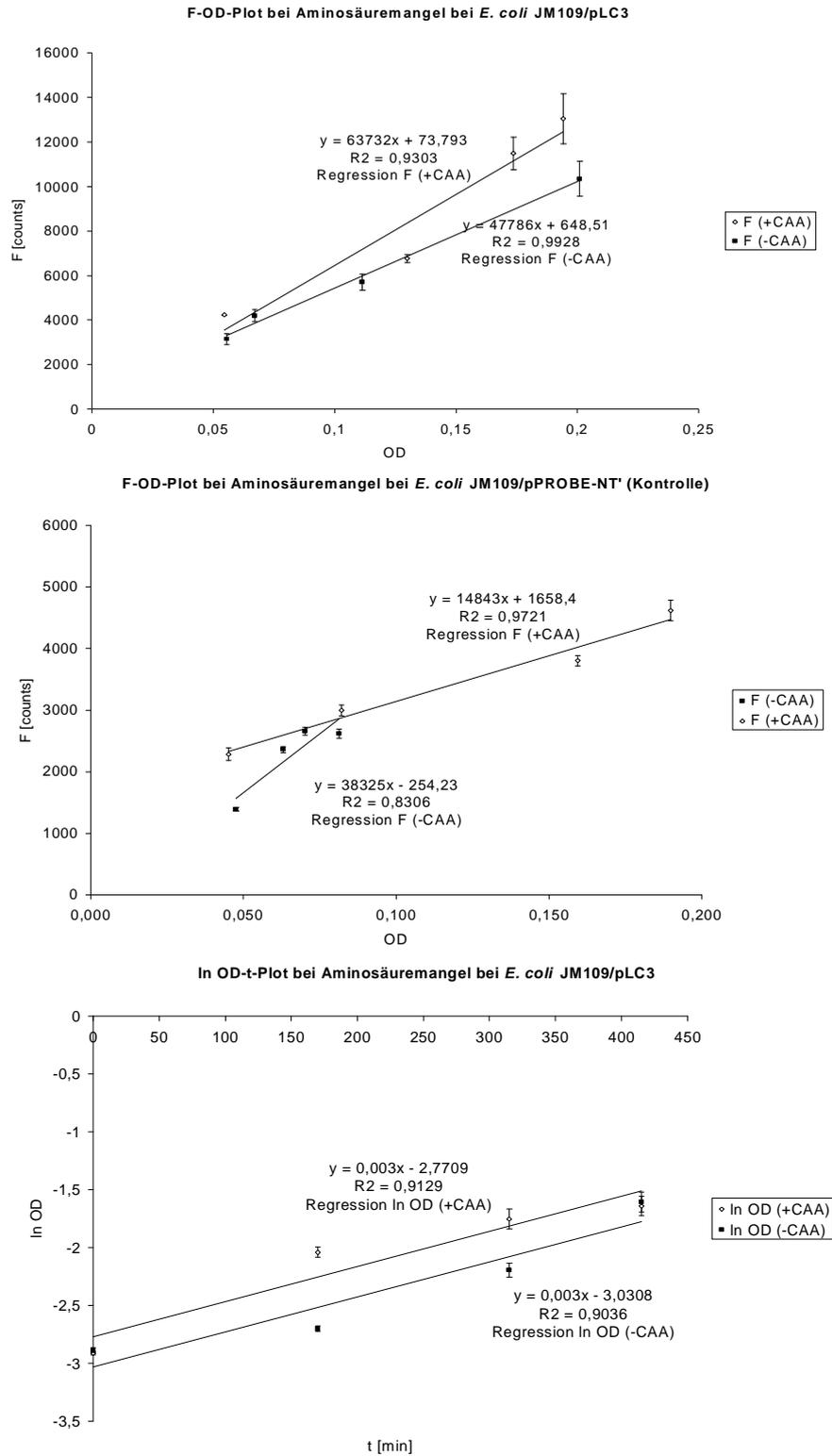


**Abb. 3-17:**

Messung der Induzierbarkeit des RebC-Promotors durch Glucosemangel in *E. coli* JM109/pLC3. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit dem promotorlosen Plasmid pPROBE-NT'.

F: Fluoreszenzintensität; OD: optische Dichte bei 600 nm; t: Zeit

# ERGEBNISSE



**Abb. 3-18:**

Messung der Induzierbarkeit des RebC-Promotors durch Aminosäuremangel in *E. coli* JM109/pLC3. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit dem promotorlosen Plasmid pPROBE-NT'. F: Fluoreszenzintensität; OD: optische Dichte bei 600 nm; t: Zeit

## ERGEBNISSE

---

Nach diesem Verfahren ergeben sich rechnerisch die folgenden Promotoraktivitäten bei der jeweiligen Stressinduktion:

Hitzeschock (42 °C)	1,8fache Promotoraktivität
Glucosemangel	0,9fache Promotoraktivität
Aminosäuremangel	0,2fache Promotoraktivität

Der Hitzeschock bewirkt demnach eine sehr leichte Erhöhung der Promotoraktivität des RebC-Promotors. Durch die beiden Mangelzustände wurde keine Erhöhung der Promotoraktivität gemessen. Die errechneten Werte sprechen für einen Rückgang der Promotoraktivität bei Glucose- und Aminosäuremangel.

## 4 Diskussion

Die Erforschung von bakteriellen Endosymbionten von *Paramecium* erfolgte bislang nur in Hinblick auf ökologische, zellbiologische und evolutive Fragestellungen. In diesem Zusammenhang wurden Adaptionen der Organismen an die jeweilige Lebensgemeinschaft, Kommunikation zwischen den Partnern sowie der biologische Nutzen, den die Organismen aus der Lebensgemeinschaft ziehen, untersucht (GÖRTZ & BRIGGE, 1998; GÖRTZ, 1996). Molekularbiologische Methoden, insbesondere der Einsatz der PCR zur Amplifikation der 16S-rDNA und der FISH mit artspezifischen DNA-Sonden, ermöglichten auch die Identifikation und die phylogenetische Charakterisierung der nichtkultivierbaren Endosymbionten der Gattung *Caedibacter* (SPRINGER ET AL., 1993; SPRINGER, 1992).

Die bisherigen Untersuchungen fallen damit in den Bereich der Grundlagenforschung. Eine mikrobiologische oder gar gentechnische Nutzung erfolgte weder bei den Endosymbionten von *Paramecium* noch bei anderen obligat intrazellulär lebenden Bakterien.

Die heterologe Expression von Bti-Toxinen in *Paramecium*-Endosymbionten im Rahmen des DFG-Projektes KU1237/2 stellt einen angewandten Aspekt der Erforschung der bakteriellen Endosymbionten von *Paramecium* dar. Im Rahmen dieses Projektes sollten Bti-Toxingene zur Bekämpfung von Malaria-Vektoren heterolog in *Caedibacter* exprimiert werden. Die gentechnischen Methoden zur Expression von Fremdproteinen in unterschiedlichen Bakterien stehen schon seit längerem zur Verfügung. Die Gene, die für die unterschiedlichen Bti-Toxinbestandteile kodieren, sind ebenfalls schon sehr gut genetisch charakterisiert. Entsprechende Proteine wurden bereits mehr oder weniger erfolgreich heterolog exprimiert (PORTER ET AL., 1993). In Zusammenführung der bisherigen Erkenntnisse über die bakteriellen *Paramecium*-Endosymbionten sollte eine heterologe Expression der Bti-Toxine in den symbiontischen Bakterien durchgeführt werden. Auf diese Weise könnte die Persistenz der Toxine im Habitat der zu

bekämpfenden Mückenlarven stark verlängert werden. Ziel der Bestrebungen ist es, eine biologische Kontrolle der Krankheitsüberträger zu erreichen, die eine effektive und gleichzeitig für Mensch und Umwelt möglichst schonende Bekämpfung der Malaria und der weiteren von Stechmücken übertragenen Krankheiten erlaubt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei für die Durchführung dieses Projektes notwendige Aspekte untersucht. Zum einen wurden Versuche zur Transformation von *Caedibacter* mit verschiedenen Markergenen und Transformationsvektoren durchgeführt. Ziel war es, ein Verfahren zu etablieren, mit dem eine routinemäßige genetische Transformation der Endosymbionten möglich ist. Zum anderen sollte ein Promotor gefunden werden, unter dessen Kontrolle eine gezielte Expression von Bti-Toxin durch die Endosymbionten im Freiland möglich ist. Dazu wurde der RebC-Promotor, der die Expression eines der an der R-Körperbildung beteiligten Proteine steuert, auf seine Induzierbarkeit durch Stresssignale hin untersucht.

Die Transformationsexperimente als auch die Isolierung der regulatorischen Sequenz aus dem Reb-Locus erfolgte jeweils mit *Caedibacter caryophilus* aus *Paramecium novaurelia* BGD19. Der Stamm wurde 1995 in Münster isoliert (STREMMEL, 1995). Dieser Bakterienstamm war für die Versuche aus mehreren Gründen verwendet worden. Im Gegensatz zu den in *P. caudatum* vorkommenden *C. caryophilus*-Stämmen besetzen die Endosymbionten in *P. novaurelia* nicht den Makronukleus sondern das Cytoplasma der Wirtszellen (KUSCH ET AL., 2000). Im Cytoplasma befindliche Bakterien sollten für Transformationsexperimente leichter zugänglich sein als Endosymbionten die spezifisch den Kern der Paramecien besiedeln und in diesem Kompartiment noch von einer weiteren Membran, der Kernmembran, umschlossen sind. Weiterhin musste die für eine effektive gentechnische Manipulation notwendige Entwicklung von Shuttle-Vektoren für *Caedibacter* bedacht werden. Diese Shuttle-Vektoren sollten Plasmide sein, die in *E. coli* als auch in *Caedibacter* vermehrt und selektiert werden können. Die Plasmide müssen daher über Replika verfügen, die den Erhalt in beiden

Wirtszellen ermöglichen. Zum anderen müssen sie über Markergene verfügen, die in *E. coli* und in *Caedibacter* selektiert werden können. Aus *C. taeniospiralis* sind bereits mehrere Plasmide isoliert worden, auf denen auch die Gene für die R-Körpersynthese liegen. Die Plasmide pKAP47 und pKAP116 aus den Stämmen 47 und 116 von *P. tetraurelia* erwiesen sich als identisch (HERUTH ET AL., 1994). Ein weiteres R-Körper-kodierendes Plasmid aus *C. taeniospiralis* pKAP169 zeigte eine ebenfalls gleiche Restriktionskarte wie pKAP116 (QUACKENBUSH ET AL., 1986; HERUTH ET AL., 1994). Könnte das Replikon der Plasmide identifiziert werden, so könnte dieses als Basis für die Konstruktion eines Shuttle-Vektors dienen. Mit einem solchen Vektor könnten allerdings nur *Caedibacter* transformiert werden, die selbst nicht das gleiche Plasmid tragen, da bei Plasmiden mit gleicher Replika in der selben Wirtszelle mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Inkompatibilität zu rechnen ist. Nur eines der beiden Plasmide würde stabil in den Zellen erhalten bleiben. Bei *C. caryophilus* liegen die R-Körpergene auf dem Genom eines Phagen (PREER & PREER, 1967; PREER & JURAND, 1968; GRIMES & PREER, 1971; PREER ET AL., 1974 A). Bei der Transformation mit einem Vektor mit dem Replikon aus einem der Plasmide aus *C. taeniospiralis* sollte damit das Problem der Inkompatibilität ausgeschlossen sein. Ein weiterer Vorteil des Stammes *P. novaurelia* BGD19 besteht darin, dass dieser außerordentlich gut unter Laborbedingungen vermehrt werden kann. Die Zellen können sehr schnell in Kulturen mit großen Zelldichten (> 1000 Zellen/ml) kultiviert werden. Die Endosymbionten bleiben dabei stabil in den Wirtszellen erhalten. Seit seiner Isolierung 1995 ist der Stamm *P. novaurelia* BGD19 sehr häufig vereinzelt und zum Teil in Massenkulturen weiterkultiviert worden. Dabei ist bisher in keiner Linie der zufällige Verlust der Endosymbionten beobachtet worden. Für die geplanten gentechnischen Versuche war in jedem Fall ein Symbiontenstamm zu verwenden, bei dem die Lebensgemeinschaft auch stabil über lange Zeiträume erhalten bleibt.

## 4.1 Isolierung von Endosymbionten

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll-Dichtegradienten ist ein Standardverfahren zur Auftrennung kleinster Partikel aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften. So können beispielsweise Blutzellen durch entsprechend zusammengesetzte Percoll-Gradienten voneinander getrennt und gereinigt werden. Die durchgeführten Versuche haben aber gezeigt, dass zur Gewinnung von *Caedibacter* aus *Paramecium* die bereits wesentlich älteren Aufreinigungsverfahren mittels ECTEOLA-Säulen vergleichbar reine Bakterienisolate liefern (s. 3.1). Für die hier durchgeführten Versuche war vor allem die Vermeidung der Kontamination mit Futterbakterien von vorrangiger Bedeutung. Verunreinigungen mit Zelltrümmern wie Trichocysten und Cilien spielten eine etwas untergeordnete Rolle, da sie bei Transformationsversuchen oder PCR-Analysen weit weniger stören als Fremdbakterien, mit denen zwangsläufig ein Eintrag von fremder DNA und eine Verdünnung der gewünschten Endosymbionten einhergeht. Da sich gerade in diesem Punkt das säulenchromatografische Verfahren nicht von der Dichtegradientenzentrifugation unterschieden hat, wurden zur Isolierung von Endosymbionten im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch ECTEOLA-Säulen verwendet. Das Herstellen der Zellhomogenate beansprucht bei beiden Verfahren die gleiche Zeit. Der Aufreinigungsschritt durch die ECTEOLA-Säule ist aber wesentlich schneller als das Herstellen und Zentrifugieren der Dichtegradienten. Einen größeren Zeitaufwand beansprucht vor allem die Gewinnung der einzelnen Fraktionen aus dem Gradienten sowie das Auswaschen des Percoll aus diesen. Der Vorteil der Dichtegradientenzentrifugation besteht allerdings darin, dass reine R-Körper aus den Zellhomogenaten gewonnen werden können (s. 3.1.1). Dies ist mit der ECTEOLA-Säule nicht möglich. Zur Isolierung der R-Körper für die Selektionsversuche musste daher der Percollgradient verwendet werden. Bei den Versuchen mit den Dichtegradienten war auffällig, dass mit *P. novaurelia* BGD19 nie reine Bright-Fractionen isoliert werden konnten (s.

3.1.1), wie sie bei der Isolierung von *C. caryophilus* aus *P. caudatum* in der Literatur jeweils beschrieben wurden (SCHMIDT ET AL., 1988). Da aber immer am Boden der Gradienten Pellets aus freien R-Körpern entstanden sind, konnte sichergestellt werden, dass *C. caryophilus* aus *P. novaurelia* BGD19 dennoch zur R-Körpersynthese und damit zur Ausbildung von „bright“-Formen fähig ist. Bei einem in Münster kultivierten Stamm von *P. caudatum* (C220) ist im Laufe der Kultivierung im Labor vermutlich aufgrund einer Mutation die Fähigkeit R-Körper zu bilden und damit die Killereigenschaft verloren gegangen (SCHMIDT ET AL., 1988). Vermutlich ist bei *P. novaurelia* BGD19 die Zahl der Brights in der *Caedibacter*-Population niedriger als bei den aus *P. caudatum* isolierten *C. caryophilus*-Stämmen. Die im Verhältnis wenigen „bright“-Formen reichten dadurch nicht aus im Percoll-Gradienten sichtbare Banden zu bilden.

## 4.2 Herstellung aposymbiontischer Zellen

Nach den in der Literatur gemachten Angaben sollten mit Hilfe der meisten gängigen Antibiotika *Caedibacter* aus ihren Wirtszellen zu entfernen sein (SONNEBORN, 1970). In den von Albrecht (1999) durchgeführten Versuchen hat sich allerdings gezeigt, dass die Eradikation der Endosymbionten am zuverlässigsten mit Streptomycin durchgeführt wird. Bei Verwendung von Tetracyclin und Ampicillin ist die auf Dauer toxische Wirkung dieser Substanzen auf die Paramecien besonders nachteilig. Die Streptomycinbehandlung musste wie beschrieben (s. 3.2) über einen relativ langen Zeitraum hinweg durchgeführt werden, da das Antibiotikum nur niedrig konzentriert angewendet werden konnte. Einige der älteren Arbeiten zur Entfernung von Endosymbionten mit Antibiotika geben wesentlich kürzere Behandlungszeiten an. Diese Arbeiten wurden aber nicht in Hinblick auf eine wirklich vollständige Entfernung der Endosymbionten durchgeführt (SONNEBORN, 1970). Die völlige Entfernung der Symbionten kann nur durch Anlegen von Zelllinien und wiederholten Tests auf noch vorhandene

Endosymbionten über längere Zeiträume erreicht werden (SONNEBORN, 1970). Möglicherweise wurden in den älteren Arbeiten Paramecien, die noch nicht völlig von ihren Symbionten befreit waren, schon als symbiontenfrei angesehen, weil mit den zur Verfügung stehenden Methoden, in der Regel Phasenkontrastmikroskopie und Killertest, keine Endosymbionten mehr nachgewiesen werden konnten. Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten aposymbiontischen Stämme haben sich selbst lange nach dem Beenden der Streptomycinbehandlung in PCR-Tests immer wieder als symbiontenfrei erwiesen (s. 3.2).

### **4.3 Transformation mit Antibiotikaresistenzmarker**

Soll ein Bakterium genetisch transformiert werden, so müssen zunächst genetische Informationen übertragen werden, die phänotypische Änderungen bei den transformierten Zellen bewirken, anhand derer diese von den nicht transformierten Zellen unterschieden und „abgetrennt“ werden können. Im Falle von Bakterien können z. B. Antibiotikaresistenzgene als genetische Marker verwendet werden. Wird ein solches Gen von einem Bakterium aufgenommen und erfolgreich exprimiert, so prägen diese Zellen nun Schutzmechanismen gegen bestimmte Antibiotika aus. Diese Schutzmechanismen können auf verschiedenen Ebenen wirksam sein, z. B. können die Antibiotikamoleküle in unwirksame Substanzen gespalten werden oder die Wirkstoffe werden wieder aktiv aus den Zellen ausgeschleust (MADIGAN ET AL., 1997). Vorausgesetzt der ursprüngliche Phänotyp des zu transformierenden Bakteriums war sensitiv gegen ein bestimmtes Antibiotikum, können transformierte Zellen, die nun über ein entsprechendes Resistenzgen verfügen, einfach von den in der Regel in großem Überschuss vorhandenen nichttransformierten Zellen getrennt werden. Trägt man die Bakteriensuspension nach der Transformation auf ein Festmedium auf, das das betreffende Antibiotikum enthält, so werden nur die Bakterienzellen wachsen können, die das Resistenzgen aufgenommen haben. Diese

Bakterienzellen bilden dann entsprechende makroskopische Kolonien, die leicht isoliert werden können und die Nachkommenschaft einer ursprünglich transformierten Zelle darstellen. Damit eine solche Selektion möglich wird, muss allerdings gewährleistet sein, dass die aufgenommenen Resistenzgene bei der Zellteilung jeweils zuverlässig an die Tochterzellen weitergegeben werden. Nur wenn die Antibiotikaresistenz über viele Zellgenerationen erhalten bleibt, lässt sich eine Selektion nach Transformanten in der beschriebenen Weise durchführen. Der Erhalt des Markergens in den Bakterienzellen kann durch die Integration des Gens in ein Plasmid erreicht werden. Dabei muss wiederum gewährleistet sein, dass das Plasmid über ein Replikon verfügt, durch das das Plasmid in den betreffenden Bakterien erhalten bleibt. Insbesondere Replikation und Verteilung auf die Tochterzellen bei der Zellteilung müssen entsprechend gesteuert werden, damit das Plasmid nicht wieder „verloren“ geht (SNYDER & CHAMPNESS, 1997). Man unterscheidet Plasmide danach, in wie vielen verschiedenen Arten von Wirtsbakterien sie erhalten werden können. Die Zahl der als Wirtszellen in Frage kommenden Bakterienarten nennt man Wirtsspektrum oder „Host-Range“ eines Plasmids. Dementsprechend werden Plasmide, die in nur wenigen Bakterienarten erhalten werden, als „Narrow-Host-Range-Plasmide“ bezeichnet. Kann ein Plasmid in vielen unterschiedlichen Bakterienarten erhalten werden, so verfügt es über ein weites Wirtsspektrum und man spricht von einem „Broad-Host-Range-Plasmid“ (SNYDER & CHAMPNESS, 1997).

Für die erstmalige Transformation von *Caedibacter* musste ein Plasmid eingesetzt werden, das über ein möglichst weites Wirtsspektrum verfügt und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Endosymbionten erhalten wird. Weiterhin musste dieses Plasmid eine Streptomycinresistenz vermitteln, da sich dieses Antibiotikum als wirksam gegen *Caedibacter* erwiesen hat. Das Plasmid RSF1010 erfüllte die geforderten Eigenschaften (SNYDER & CHAMPNESS, 1997). Das schon seit langem bekannte Plasmid verfügt über ein sehr weites Wirtsspektrum und ist bereits in vielen Untersuchungen zur erfolgreichen Transformation von zahlreichen gram-negativen und gram-

positiven Bakterienarten eingesetzt worden (BAGDASARIAN ET AL., 1981; SCHERZINGER ET AL., 1984; SNYDER & CHAMPNESS, 1997). Wegen seines außerordentlich weiten Wirtsspektrums diente RSF1010 schon als Basis zur Entwicklung zahlreicher Broad-Host-Range Klonierungsvektoren (BAGDASARIAN ET AL., 1979; 1981; 1982; BAGDASARIAN & TIMMIS, 1981; BARTH, 1979; BARTH ET AL., 1981). Das RSF1010-Derivat pKT231 wurde wegen des weiten Wirtsspektrums zu Untersuchungen eingesetzt, bei denen systematisch die Transformierbarkeit von zahlreichen Arten gram-negativer Bakterien getestet wurde. Von den insgesamt 21 Arten aus 16 Gattungen, darunter zahlreiche frisch isolierte Wildstämme, konnten lediglich 7 Arten nicht mit dem Plasmid transformiert werden (WIRTH ET AL., 1989). So wurde RSF1010 zum Beispiel auch erfolgreich zur Entwicklung von Transformationsverfahren für verschiedene *Caulobacter*-Arten aus Süß- und Seewasser verwendet (GILCHRIST & SMITH, 1991). Mit einiger Wahrscheinlichkeit sollte das Plasmid deshalb auch geeignet sein, um erste Transformationsversuche an *Caedibacter* durchzuführen. Das Plasmid hat eine Größe von 8684 bp und gehört zur Inkompatibilitätsgruppe Inc Q. Neben der Streptomycinresistenz kodiert das Plasmid auch noch für eine Sulfonamidresistenz.

Das Plasmid RSF1010 wurde lediglich als Vektor zur Etablierung eines Transformationsverfahrens für *Caedibacter* eingesetzt. Es sollte nicht als Basis zur Konstruktion eines Expressionsvektors zur Toxinexpression in den Endosymbionten dienen. Sollte ein geeignetes Verfahren zur Transformation der Endosymbionten zur Verfügung stehen, könnten Shuttle- bzw. Expressionsvektoren beispielsweise auf Grundlage der aus *Caedibacter* bereits isolierten Plasmide konstruiert werden.

#### 4.3.1 Detektion und Selektion von Transformanten

Unabhängig davon, mit welchem Verfahren *Paramecium*-Endosymbionten transformiert werden sollen, muss die anschließende Selektion der Transformanten bedingt durch das Wesen der Endosymbiose immer auf zwei Ebenen stattfinden. Einerseits müssen, wie bei der Transformation kultivierbarer Bakterien, durch eine Antibiotikaselektion die nichttransformierten Bakterienzellen unterdrückt werden. Andererseits muss auch noch eine Selektion derjenigen *Paramecium*-Zellen erfolgen, die transformierte Endosymbionten enthalten. In einer *Paramecium*-Zelle liegt die Größe der Endosymbiontenpopulation bei ca.  $10^2$ - $10^3$  Bakterien (PREER ET AL., 1974 A). Bei der Transformation der Bakterien ist prinzipiell nur von einem geringen Anteil an erfolgreich transformierten Zellen auszugehen. Nur ein kleiner Teil der bei Transformationsversuchen mit RSF1010 eingesetzten Wirtszellen wird daher streptomycinresistente Endosymbionten enthalten. Die Selektion mit Streptomycin führt deshalb vermutlich zu einer großen Anzahl von aposymbiontischen Zellen, die sich in der Kultur weitervermehren. Die Suche nach den Paramecien die letztlich transformierte Endosymbionten tragen, gleicht damit der berühmten „Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen“. Die geschickte Ausnutzung der Killereigenschaft der *Caedibacter*-tragenden Paramecien schien hier zunächst eine Möglichkeit zur Selektion zu bieten. Aus bisherigen ökologischen Untersuchungen geht hervor, dass die Killereigenschaft den Symbionten-tragenden Paramecien einen Selektionsvorteil gegenüber aposymbiontischen Zellen verschafft (GÖRTZ, 1996; LANDIS, 1981; 1987). Sollten sich bei einer Kultivierung im Labor nach einer Transformation zuverlässig diejenigen Paramecien durchsetzen, die *Caedibacter* tragen, sollten nach einer Antibiotikaselektion nur noch Paramecien mit transgenen Symbionten übrig bleiben. Das „*Caedibacter-Paramecium*-System“ schien damit eine besonders gute Chance zur Transformation obligat intrazellulärer Bakterien zu bieten.

Die Versuche zeigten, dass die natürliche Killereigenschaft nicht zu einer zuverlässigen Trennung zwischen aposymbiontischen und *Caedibacter*-tragenden Paramecien ausreicht. Die Ergebnisse belegten aber, dass die Killer einen gewissen Vorteil gegenüber den aposymbiontischen Paramecien haben, diese aber nicht zuverlässig verdrängen konnten. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 setzten sich zwar noch die symbiontenhaltigen Paramecien durch. Aber schon bei einem Verhältnis von 9 Sensitiven zu einem Killer konnte keine sichere Selektion zu Gunsten der symbiontenhaltigen Zellen mehr beobachtet werden. Die weiterhin durchgeführten Konkurrenzversuche in nicht gefütterten Kulturen (s. 3.3.1.1) decken sich weitgehend mit diesem Befund. Aus den Daten konnten Modelle für das Wachstum konkurrierender Populationen von *Caedibacter*-infizierten und sensitiven *P. aurelia*-Zellen des jeweils gleichen Stammes entwickelt werden. Der Konkurrenzvorteil der Killer liegt danach in der toxischen Wirkung der Killerpartikel. Der toxische Effekt ist von der Dichte der ausgeschiedenen Partikel und damit von der Dichte der Killerparamecien abhängig. Der Killereffekt kompensiert damit erst ab einer bestimmten Dichte die durch die Symbionten bedingte langsamere Wachstumsrate der infizierten Paramecien (KUSCH ET AL., 2002). Für die durchzuführenden gentechnischen Manipulationen wäre es aber notwendig, dass sich Killer immer gegenüber einem sehr großen Überschuss an sensitiven Paramecien in Mischkulturen zuverlässig durchsetzen, die dauerhaft weiterkultiviert werden.

Da die toxische Wirkung der Killerparamecien, wie bereits beschrieben, abhängig von der Dichte der ausgeschiedenen Killerpartikel ist, lag es nahe eine Selektion mit Konzentraten derselben durchzuführen. Das für die toxische Wirkung verantwortliche Toxin ist bisher noch nicht identifiziert, deshalb wurden die zu selektierenden Mischkulturen sowohl mit Zellhomogenaten als auch mit isolierten R-Körpern behandelt. So sollten künstlich hohe Konzentrationen des toxischen Agens erzeugt werden. Die toxische Wirkung war allerdings viel zu unspezifisch, als dass sie sich zu einer sinnvollen Selektion eignen würde. Da selbst schon bei Homogenat-

Konzentrationen, die noch nicht zu einer sicheren Abtötung sensitiver Zellen ausreichten, schon eine deutliche letale Wirkung bei Symbionten-tragenden Paramecien zu sehen war, wurden keine weiteren Versuche in dieser Richtung unternommen. Bei den in den Arbeiten von Szallis (1995) und Dankbar (1991) durchgeführten Toxizitätstests wurde als sensitiver Stamm immer *P. tetraurelia* 152 verwendet, der eine besondere Empfindlichkeit gegenüber den *Caedibacter*-Toxinen zeigt. Selbst dabei waren zu einer effektiven Abtötung der Sensitiven relativ hohe Konzentrationen an R-Körpern bzw. Zellhomogenaten erforderlich. Eine vollständige Abtötung von *P. tetraurelia* 152 durch R-Körper von *C. caryophilus* aus *P. caudatum* C221 war beispielsweise erst ab einer R-Körperkonzentration von mindestens  $8 \cdot 10^7$ /ml möglich und dauerte dabei immer noch über 4 Tage (DANKBAR, 1991).

Die Versuche zeigten, dass die Killereigenschaft der *Caedibacter* nicht zu einer gezielten Selektion von Symbionten-tragenden Paramecien ausgenutzt werden kann. Nach einer Transformation mit RSF1010 mussten deshalb die Wirtsparamecien jeweils in Zelllinien vereinzelt werden, die dann der Selektion mit Streptomycin unterzogen werden mussten. Nach einer ausreichenden Dauer der Antibiotikabehandlung mussten dann Zellen der einzelnen Linien mittels PCR auf das Vorhandensein von Endosymbionten getestet werden. Während der Behandlung mit Streptomycin verlieren die Paramecien nur relativ langsam ihre Symbionten. Auch bei schon sehr stark ausgedünnten Symbiontenpopulationen erhält man im PCR-Test mit einzelnen Zellen noch eine diagnostische Bande. Der gleichzeitige Nachweis von *Caedibacter* und RSF1010 in einer PCR-Reaktion erwies sich als schwierig (s. 3.3.1.3).

Die relativ zeitaufwendige Selektion der angelegten Zelllinien mit Streptomycin konnte nicht weiter verkürzt werden. Einerseits musste die Behandlung solange stattfinden, wie nötig war, um eine *Paramecium*-Zelle die lediglich untransformierte und damit Streptomycin-sensitive Symbionten enthält, völlig von den Bakterien zu befreien. Andererseits musste auch genügend Zeit zur Verfügung stehen, um in einer *Paramecium*-Zelle, in der

ein Endosymbiont mit dem Plasmid transformiert wurde, eine Population aus ausschließlich transgenen Symbionten heranwachsen zu lassen.

Bei der Transformation der *Caedibacter* mit einem Antibiotikaresistenz-Plasmid war insgesamt eine relativ aufwendige und langwierige Selektion von Transformanten nicht zu umgehen. Die Zahl der Paramecien, die jeweils gescreent werden konnte, war daher stark eingeschränkt. Damit war die Chance Transformanten zu finden ebenso stark verkleinert.

Das Fehlen effektiverer Selektionsmethoden muss schließlich als eine der möglichen Ursachen für das bisherige Scheitern der Transformation von *Caedibacter* mit Antibiotikaresistenz-Markern in Betracht gezogen werden.

#### **4.3.2 Transformation isolierter *Caedibacter***

Für die routinemäßige Transformation von Bakterien stehen bereits eine Reihe von Verfahren zur Verfügung. Insbesondere für die gentechnisch bedeutsamen Arten, allen voran *E. coli*, wurden Verfahren etabliert, die eine zuverlässige und hoch effiziente Transformation der Bakterien erlauben. Die Elektroporation hat sich dabei als sehr effektive Methode erwiesen. Sie wird zur Permeabilisierung sowohl von prokaryontischen als auch von eukaryontischen Zellen eingesetzt.

Die methodischen Prinzipien zur Elektroporation von Prokaryonten wurden zunächst an *E. coli* und *Campylobacter jejuni* entwickelt und konnten dann auf zahlreiche gram-negative und gram-positive Bakterien übertragen werden (DOWER, 1990). Dabei konnten die Verfahren für *E. coli* soweit optimiert werden, dass herausragend hohe Transformationsraten erreicht werden konnten (DOWER, 1988; 1990). Mit diesen Verfahren werden Transformationsraten von  $10^{10}$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid-DNA und Transformationshäufigkeiten von 80 % der überlebenden Zellen erreicht. Im Folgenden sollen die theoretischen Grundlagen der Elektroporation nach Dower (1990) kurz erklärt werden: Wird eine Suspension von Zellen in einem Elektrolyten einem elektrischen Feld ausgesetzt, resultiert daraus eine Potentialdifferenz über die Membran der

Bakterienzellen. Die Orientierung des Feldes ist dabei durch die beiden entgegengesetzt geladenen Elektroden gegeben, zwischen denen das Feld entsteht. Die Höhe der Potentialdifferenz hängt vom Spannungsabfall durch den Querschnitt der Zelle ab, und ist somit abhängig vom Durchmesser der Zelle und der Stärke des angelegten Feldes. Bei Erreichen einer spezifischen kritischen Potentialdifferenz wird die Membran schließlich permeabel für geladene Teilchen und Makromoleküle, die normalerweise die Membran nicht passieren können. Über die genauen Mechanismen die insbesondere bei Prokaryonten zur Öffnung der Membranporen führen, ist allerdings noch relativ wenig bekannt. Wird das elektrische Feld und damit das Transmembranpotential immer weiter erhöht, werden zunehmend mehr Zellen irreversibel geschädigt und sterben ab. Sie gehen damit auch als potentielle Transformanten verloren.

Der zeitliche Spannungsverlauf der bei der Bakterien-Elektroporation verabreichten Pulse beschreibt üblicherweise einen exponentiellen Abfall. Als Spannung des Pulses wird dabei die bei der Entladung der Kapazität erreichte maximale Spannung angegeben. Die Dauer des Pulses, der an eine leitende Probe angelegt wird, ist abhängig von der Kapazität des verwendeten Kondensators und dem Widerstand der Probe bzw. dem parallel zur Probe geschalteten Widerstand. Die Länge des Pulses wird durch die Zeitkonstante  $\tau$  beschrieben. Die Zeitkonstante gibt bei einem exponentiellen Spannungsabfall die Zeit bis zum Erreichen von  $V_0/e$  an. Dabei ist  $V_0$  die maximale Spannung zu Beginn der Entladung. Die Zeitkonstante lässt sich nach der Gleichung  $\tau = RC$  berechnen (R: Widerstand in Ohm [ $\Omega$ ], C: Kapazität in Farad [F]). Sie wird daher auch als RC-Zeitkonstante bezeichnet.

Die für die Elektroporation von Bakterien entscheidende Variable ist die Feldstärke  $E$  des angelegten elektrischen Feldes. Sie ist gegeben durch  $E = U/d$ , wobei  $U$  die angelegte Spannung und  $d$  den Elektrodenabstand bezeichnet. Die Feldstärke kann daher durch Variation des Elektrodenabstandes oder der angelegten Spannung verändert werden. Wegen des sehr kleinen Zelldurchmessers müssen bei der Elektroporation

von Bakterien relativ hohe Feldstärken eingesetzt werden, um eine Permeabilisierung der Zellmembran zu erreichen. In der Praxis müssen Feldstärken von 5 bis 20 kV/cm eingesetzt werden, um Bakterien zu elektroporieren. Die hohen Spannungen, die dabei angelegt werden, erfordern ein Medium mit möglichst niedriger Leitfähigkeit für die Suspension der Zellen. Werden stärker leitende Medien verwendet, entstehen Lichtbögen zwischen den Elektroden, die die Probe zerstören. In der Regel wird daher destilliertes Wasser als Elektroporationsmedium verwendet. Der Entstehung von Lichtbögen kann weiterhin durch eine entsprechende Kühlung der Probe vorgebeugt werden. Auf diese Weise wird die Ionenleitfähigkeit vermindert und der Widerstand der Lösung erhöht. Es hat sich gezeigt, dass die Elektroporation bei 0 °C generell erfolgreicher verläuft als bei höheren Temperaturen. Allgemein kann auch die Zahl der Transformanten durch Erhöhung der DNA-Konzentration gesteigert werden. Prinzipiell ist die höchste Transformationswahrscheinlichkeit bei Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase zu erwarten. Da die Elektroporation zu einer erheblichen Irritation der Zellen führt, muss zu Gunsten einer möglichst hohen Zahl von Überlebenden für ein rasches Anwachsen gesorgt werden. Man überführt die Zellen deshalb unmittelbar nach dem Puls in ein entsprechendes Nährmedium.

Auf Grundlage dieser generellen Erkenntnisse für die Bakterien-Elektroporation wurden von Dower (1990) Strategien für die Elektroporation bisher noch nicht getesteter Bakterienarten entwickelt, die hier zunächst auf die Transformation von isolierten *Caedibacter*-Zellen übertragen wurden. Da es sich bei *Caedibacter* um ein gram-negatives Bakterium handelt, wurden die elektrischen Variablen bei der Elektroporation der isolierten Symbionten entsprechend der für *E. coli* erforderlichen Bedingungen gewählt (s. 2.11.1). Die eingesetzten *Caedibacter* wurden aus gut gefütterten schnell wachsenden *Paramecium*-Kulturen isoliert. Die Symbionten sollten deshalb wie gefordert in einer Phase möglichst schnellen, bestenfalls exponentiellen Wachstums gewesen sein, da der Symbiont mit der Teilung seiner Wirtszellen Schritt halten muss um nicht ausgedünnt zu werden (z. B. GÖRTZ,

1988). Die Zellpräparationen wurden während der Isolierung und bis zur Elektroporation immer gekühlt. Dies sollte die Überlebensrate der isolierten Endosymbionten erhöhen und entspricht ebenfalls den Anforderungen für eine möglichst erfolgreiche Elektroporation. Es liegen bisher auch keinerlei Hinweise darauf hin vor, dass *Caedibacter* niedrige Temperatur nicht tolerieren kann. Da die Paramecien als freilebende Organismen durchaus tiefen Temperaturen ausgesetzt sind, sollte dies auch von den Symbionten toleriert werden. Die hohen eingesetzten DNA-Konzentrationen von bis zu 1 µg/µl pro Probe sollten die Chance einer Transformation auch bei vorliegenden Restriktionsbarrieren erhöhen. Wird unmodifizierte DNA in einen Restriktions-Background eingeführt, vermindert sich die Effizienz der Elektroporation um das  $10^2$ - $10^4$ fache (DOWER, 1990). Im Vergleich dazu lassen sich im Falle von *E. coli* schon mit 10 pg/ml DNA in einem Volumen von 40 µl Zellsuspension ( $2 \cdot 10^{10}$ - $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml) erfolgreich Transformanten isolieren (DOWER, 1988). Die Dichten der verwendeten *Caedibacter*-Suspensionen waren ebenfalls immer größer  $10^{10}$  Zellen/ml. Auch die verwendeten Feldstärken sollten eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit der Transformation bieten. Bei bis zu 25 kV/cm sollte auch bei *Caedibacter*, der in der Regel einen etwas kleineren Zelldurchmesser als *E. coli*-Zellen aufweist, eine Permeabilisierung zu erreichen sein. Diese Feldstärke stellt gleichzeitig die maximale Feldstärke dar, die von gängigen Geräten geliefert wird. Die bei den Versuchen gemessenen Zeitkonstanten von ca. 5 msec lagen auch jeweils im geforderten Bereich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Elektroporation der isolierten *Caedibacter* die Bedingungen zunächst so gewählt werden konnten, dass generell von einer möglichst hohen Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Transformation einer Bakteriensuspension ausgegangen wurde. Da eine in vitro-Kultivierung der *Caedibacter* nicht möglich war, musste nach der Transformation eine möglichst schnelle Übertragung der gepulsten Bakterien auf eine geeignete Wirtszelle erfolgen. Dies könnte durch Injektion der Bakteriensuspension in eine aposymbiontische Zelle bzw. über den natürlichen Infektionsmechanismus erfolgen. Abgesehen von den bereits

beschriebenen technischen Problemen der Mikroinjektion, die sowieso nur die Bearbeitung einer kleinen Anzahl von Zellen erlaubt (Skovorodkin, persönliche Mitteilung), ist die Zahl der dabei pro *Paramecium*-Zelle eingebrachten Symbionten nicht groß genug. Schätzt man das Volumen einer *Paramecium*-Zelle ab, indem man die Form der Zelle als Quader mit den Abmessungen  $35\ \mu\text{m} \cdot 35\ \mu\text{m} \cdot 150\ \mu\text{m}$  annimmt, erhält man ein Volumen von rund 180 pl (pl =  $10^{-12}$  l). Bei einer Mikroinjektion können maximal 10 % des Volumens der Zelle eingespritzt werden (Skovorodkin, persönliche Mitteilung), also ca. 18 pl. Bei einer Zellsuspension mit einer Dichte von  $10^{10}$  Zellen/ml entspricht dies nur etwa 180 Bakterien. Die Arbeiten von Wirth et al. (1989), bei denen bisher noch nicht getestete Bakterienarten, zum Teil Wildstämme, unter analogen Bedingungen auf ihre Transformierbarkeit mittels Elektroporation mit einem RSF1010-Derivat getestet wurden, zeigen, dass eine Bakterienzelle bestenfalls mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-5}$  erfolgreich transformiert wird. Wollte man etwaige Transformanten per Mikroinjektion wieder in *Paramecium* reinfizieren, wäre dazu die Injektion von mehreren Tausend Zellen nötig. Dies würde eine für die außerhalb ihrer Wirtszellen nicht lebensfähigen *Caedibacter* viel zu lange Zeit beanspruchen. Für eine Reinfektion der elektroporierten *Caedibacter* bleibt damit nur noch der Weg der natürlichen Infektion. Die unmittelbar nach dem Puls an aposymbiontische *P. novaurelia* BGD19 verfütterten *Caedibacter* sollten von den Wirtszellen zunächst in die Nahrungsvakuole aufgenommen werden, und dann die betreffende Zelle infizieren. Über die zu erwartenden Infektionshäufigkeiten durch *Caedibacter* finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Ausgehend von den Arbeiten von Mueller (1963; 1964) mit *C. taeniospiralis* aus *P. tetraurelia* 51 sollte eine relativ zuverlässige Reinfektion aposymbiontischer Wirtszellen möglich sein. Andere Arbeiten mit verschiedenen Arten aus dem *P. aurelia*-Komplex zeigten aber, dass eine Infektion neuer Wirtszellen nur in seltenen Fällen möglich ist (PREER ET AL., 1974 A). Später durchgeführte Versuche, in denen gezeigt werden sollte, dass eine Reinfektion aposymbiontischer Wirts-Paramecien weder mit *C. taeniospiralis* noch mit *C. caryophilus* möglich ist, wurden mit

isolierten Symbionten als auch mit Homogenaten von infizierten Paramecien durchgeführt (ALBRECHT, 1999; KUSCH ET AL., 2002).

Die Transformation isolierter *Caedibacter* ist daher wegen des Scheiterns der Reinfektion nicht möglich gewesen. Es kann deshalb auch keine Aussage über den Erfolg der Elektroporation selbst gemacht werden.

#### **4.3.3 In situ Transformation von *Caedibacter***

Einmal aus den Wirtszellen isoliert, lassen sich *Caedibacter* nicht mehr in größeren Mengen in Paramecien reinfizieren. Die Transformation der Endosymbionten muss daher direkt in den Wirtszellen erfolgen.

Das direkte Einbringen von Plasmid-DNA in noch im Wirt befindliche Endosymbionten sollte mit Hilfe der Elektroporation oder durch den Beschuss mit DNA-beschichteten Mikroprojekten, der sogenannten Partikel-Gun, möglich sein.

Zur Permeabilisierung eukaryontischer Zellen sind bei der Elektroporation wesentlich geringere Feldstärken notwendig als bei Bakterienzellen. Die Elektroporation von tierischen Zellen aus Zellkulturen gehört zu den Routineverfahren. Die eingesetzte DNA muss zu einer erfolgreichen Transformation eukaryontischer Zellen nicht nur die Zellhülle durchdringen sondern auch in den durch eine weitere Membranbarriere umgebenen Zellkern gelangen.

Es wurden bereits Verfahren zur Elektroporation von Ciliaten entwickelt und erfolgreich an *P. aurelia* und *Tetrahymena thermophila* durchgeführt (BOILEAU ET AL., 1999; GAERTIG & GOROVSKY, 1992; GAERTIG ET AL., 1994; BRUNK & NAVAS, 1988; ORIAS ET AL., 1988). Die Elektroporation ermöglichte hier die Einführung von DNA in den Makronukleus der Zellen. Dementsprechend wurden Zell- und Kernmembran der Ciliaten bei der Elektroporation für die jeweiligen Konstrukte permeabilisiert. Weitere Arbeiten zeigten, dass schon bei Verwendung relativ „milder“ elektrischer Impulse die Zellmembran der Paramecien zuverlässig für DNA-Moleküle gängig gemacht wird. Bei einer Feldstärke von 375-625 V/cm und

Zeitkonstanten von nur 3,9-4,2 ms konnte bei bis zu 95 % der Paramecien die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Antisense Oligodeoxynukleotiden ins Cytoplasma beobachtet werden (FRAGA ET AL., 1998). Die Überlebensraten waren bei diesen Versuchen bei maximaler Aufnahmehäufigkeit immer noch ca. 70 %. Es sollte daher möglich sein durch einen elektrischen Puls eine bestimmte cytoplasmatische DNA-Konzentration zu erreichen unter Bedingungen, bei denen der überwiegende Teil der Paramecien überlebt. Der zweite unmittelbar darauf applizierte Puls wurde entsprechend der bereits beschriebenen, für die Elektroporation von Bakterien notwendigen Bedingungen gewählt. Die dabei erzielten Zeitkonstanten sollten bei in Suspension befindlichen Bakterien in jedem Falle für eine Permeabilisierung der Prokaryonten ausreichen. Der erste Puls, der zunächst nur zur Aufnahme der Plasmid-DNA in das Cytoplasma der Paramecien führen sollte, erreichte sogar Zeitkonstanten, die größer waren als erforderlich (s. 3.3.3.1). Dies war auf die relativ geringe Leitfähigkeit des verwendeten Mediums zurückzuführen, das wegen der hohen Feldstärken des zweiten Pulses eingesetzt werden musste, um die Entstehung von Lichtbögen zu verhindern. Die bei anderen Arbeiten verwendeten Medien hatten höhere Ionenstärken und damit auch geringere Widerstände (BOILEAU ET AL., 1999; FRAGA ET AL., 1998). Die so erzielten etwas längeren Zeitkonstanten als in anderen Arbeiten waren damit im Sinne der schließlich gewünschten Transformation der Endosymbionten. Beim ersten Puls wurden daher bewusst höhere Absterberaten bei den Paramecien in Kauf genommen, da die Sterblichkeit beim zweiten Puls aufgrund der hohen Feldstärken sowieso ungleich höher war. Dieses Vorgehen sollte sicherstellen, dass die cytoplasmatische DNA-Konzentration für den zweiten Puls, der zur DNA-Aufnahme durch die Caedibacter führen sollte, möglichst hoch ist.

Die Tatsache, dass auf diese Weise keine Transformation der Caedibacter möglich war, kann unterschiedliche Ursachen haben. Möglicherweise war die durch den ersten Puls erreichte cytoplasmatische DNA-Konzentration zu niedrig. Es muss auch bedacht werden, dass die physikalischen

Bedingungen, denen die *Caedibacter* im Cytoplasma der Paramecien ausgesetzt sind, nicht geeignet sind, um eine erfolgreiche Elektroporation zuzulassen. Die Ionenstärke des die Symbionten umgebenden Cytoplasmas ist höher als die des annähernd Ionen-freien Puffers. Die im umgebenden Cytoplasma beim Puls stattfindenden Ionenwanderungen führen möglicherweise zu einer Verminderung des direkt auf die Symbionten wirkenden Feldes. Die Wahrscheinlichkeit, dass einzelne *Caedibacter* auf diese Weise schließlich erfolgreich transformiert werden, war durch die angeführten Ursachen möglicherweise so gering, dass in der begrenzten Zahl der untersuchten Zellen keine Transformanten gefunden werden konnten. Das Scheitern der Transformation mit diesem Verfahren kann allerdings auch generelle Ursachen haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass RSF1010 trotz seines Broad-Host-Range-Replikons dennoch nicht in *Caedibacter* erhalten wird. Eine Plasmid-Inkompatibilität kann allerdings weitestgehend ausgeschlossen werden, da bei *C. caryophilus* weitere Plasmide fehlen. Ebenso stellen Restriktionsbarrieren der zu transformierenden Zellen prinzipiell erhebliche Hindernisse für eine Transformation dar (DOWER, 1990). Ein Restriktions-/Modifikationssystem zerstört effektiv nicht entsprechend modifizierte Fremd-DNA. Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass die als Marker verwendete Streptomycinresistenz von *Caedibacter* nicht erfolgreich ausgeprägt wurde (WIRTH ET AL., 1989). Letztlich muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass eine Elektroporation der *Caedibacter* möglicherweise stattgefunden hat, die Zahl der gescreenten Zellen aber zu klein war, um Transformanten zu detektieren. Die ca. 400 untersuchten Zelllinien entsprechen 400 Einzelzellen in denen bei der Elektroporation möglicherweise *Caedibacter* mit RSF1010 transformiert wurden. Geht man optimalerweise von ca.  $10^3$  Endosymbionten pro *Paramecium* aus, so standen letztlich nur maximal  $4 \cdot 10^5$  *Caedibacter* als potentielle Transformanten zur Verfügung. Da bei diesen Versuchen von wesentlich geringeren Transformationsraten ausgegangen werden muss als bei den für *E. coli* optimierten Verfahren, war diese Zahl höchstwahrscheinlich zu gering um Transformanten zu erhalten.

Die Transformation der bakteriellen Endosymbionten in ihren Wirtszellen gleicht von der Problemstellung her der direkten Transformation von Mitochondrien. Während die Elektroporation isolierter Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* durchaus gelingt, ist eine direkte Transformation der Mitochondrien in den Hefezellen nur mit Hilfe der Biolistik möglich (BUTOW ET AL., 1996; SULO ET AL., 1995; BUTOW & FOX, 1990; JOHNSTON ET AL., 1988). Bei diesem Verfahren werden mikroskopische Partikel, die mit DNA beschichtet sind, auf die zu transformierenden Zellen geschossen. Bei der Penetration der Zellen durch die Partikel wird die DNA dann in den Zellen abgestreift. Die Biolistik stellt eine relativ einfache und zugleich effektive Methode zur Einschleusung von DNA in unterschiedliche Zellen dar. Sie erlaubt den Gentransfer in kultivierte tierische und pflanzliche Zellen, in Gewebe von Pflanzen und Tieren sowie in Protozoen, Bakterien und Pilzen (KLEIN ET AL., 1992).

Die Transformation von Bakterien erfordert die Verwendung entsprechend kleiner Partikel. Bei der Transformation von *E. coli* auf Agarplatten wurden die größten Ausbeuten an Transformanten mit M5-Wolframpartikeln erzielt (SMITH ET AL., 1992). Dieses Partikel-Präparat stellt eine Mischung von Partikeln unterschiedlicher Größe dar. Der mittlere Durchmesser beträgt 0,771 µm. Der Hauptanteil der Partikel hat aber nur einen Durchmesser von 0,1-0,2 µm. Diese besonders kleinen Partikel erlauben die Transformation von Bakterien, da sie die für die Übertragung der DNA notwendigen kleinen Verletzungen der Bakterien erlauben. Größere Partikel erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer letalen Verletzung der Zellen und senken daher die Zahl der erfolgreichen Transformationen (SMITH ET AL., 1992). Da die Größenverhältnisse bei *Caedibacter* mit denen von *E. coli* vergleichbar sind, sollte diese Partikelgröße auch für die Transformation von *Caedibacter* geeignet sein und wurde deshalb zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen verwendet (s. 3.3.3.2). Weiterhin wurden bei der direkten Transformation von Hefemitochondrien ebenfalls Partikel dieser Größe verwendet (BUTOW ET AL., 1996). Neuere Untersuchungen haben auch den Erfolg des Partikel-Bombardements zur Transformation von

*Tetrahymena thermophila* und *P. tetraurelia* gezeigt (BRUNS & CASSIDY-HANLEY, 2000; BOILEAU ET AL., 1999; CASSIDY-HANLEY ET AL., 1997; HAI & GOROVSKY, 1997). Bei den Arbeiten von Boileau et al. (1999) wurden Elektroporation und Biolistik als zur Verfügung stehende Methoden zur Transformation von *Paramecium* verglichen. Es zeigte sich dabei, dass mit Hilfe der Biolistik eine größere Zahl von Kopien der eingesetzten DNA in den Makronukleus eingeschleust wird als bei der Elektroporation. Die Biolistik stellt somit eine Methode dar, mit deren Hilfe *Paramecium* und prinzipiell auch *Caedibacter* transformiert werden kann. Da die Transformation von Mitochondrien in Hefezellen, wie bereits erwähnt, mit Hilfe des Partikel-Bombardements möglich ist, sollte die Biolistik auch ein geeignetes Mittel sein, Plasmid-DNA in *Caedibacter* zu bringen, ohne diese vorher aus den Paramecien zu isolieren. Die Größenverhältnisse sollten bei *Caedibacter* sogar noch günstiger sein, da Hefemitochondrien mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,3-0,4 µm (BUTOW & FOX, 1990) noch etwas kleiner sind als *Caedibacter*, und damit beim Partikel-Beschuss ein schlechteres „Ziel“ darstellen.

Das Verfahren musste allerdings an die gegebene Partikel-Gun angepasst werden. Die bereits zitierten Transformationsexperimente mit Ciliaten wurden jeweils mittels einer Apparatur durchgeführt, bei der die Mikroprojektele zunächst auf ein Makroprojektil aufgebracht wurden, durch das sie beschleunigt wurden. Dieses Makroprojektil ist ein Bolzen, der bei frühen Apparaturen durch eine Sprengstoffladung und bei neueren Apparaturen durch Gasdruck aus einem Hochdrucktank beschleunigt wird. Schematische Zeichnungen der Apparaturen finden sich beispielsweise bei Butow & Fox (1990) und bei Klein et al. (1992). Der Gasdruck wird in der Regel durch eine Heliumdruckflasche geliefert. Der eigentliche Beschuss findet immer in einer evakuierten Kammer statt, da die Mikroprojektele in einer Luftatmosphäre zu stark abgebremst bzw. die DNA-Beschichtung verlieren würden. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde die sogenannte Partikel-Inflow-Gun benutzt. Bei dieser Apparatur werden die Mikroprojektele nicht durch ein Makroprojektil, sondern direkt durch Gasdruck beschleunigt.

Die beschichteten Partikel werden in Suspension durch das abrupte Öffnen eines Druckventils von dem austretenden Helium mitgerissen. Die zu beschießenden Zellen werden daher noch von der Heliumdruckwelle getroffen. Mit dem hier entwickelten Aufbau (siehe 3.3.3.2) konnte ein Verdriften der Zellsuspension durch die Druckwelle aber wirkungsvoll verhindert werden. Die Suspension wurde in der Regel vollständig von der Gaze aufgenommen. Durch das Aufbringen der Suspension auf die Gaze konnte auch eine möglichst geringe Schichtdicke der Flüssigkeit erreicht werden. Dies ist notwendig, da die Partikel in der Flüssigkeit stark abgebremst werden. Die Tatsache, dass bei diesen Versuchen keine Transformanten gefunden wurde, sollte deshalb nicht auf die technische Durchführung der Biolistik zurückzuführen sein, sondern vielmehr auf das Screening zu geringer Zellzahlen. Es muss dabei bedacht werden, dass ein relativ großer Teil der eingesetzten Paramecien gar nicht von den Wolfram-Partikeln getroffen wurde. Diese Zellen scheiden damit als Träger von potentiell transformierten Endosymbionten von vornherein aus. Auch wenn die Zellsuspension bei dem entwickelten Verfahren durch das Aufbringen auf die Gaze in jedem Falle auf einen Bereich konzentriert war, der innerhalb des Streuegels der Partikel lag, kann nicht gewährleistet werden, dass die Verteilung der auftreffenden Partikel so gleichmäßig ist, dass der größte Teil der Zellen getroffen wird. Trotz der durch die Gaze erreichten dünnen Schichtdicke der aufgetragenen Suspension werden für eine erfolgreiche Transformation in der Regel nur diejenigen Zellen in Frage kommen, die unmittelbar unter der Oberfläche der Flüssigkeit waren. Tiefer befindliche Zellen werden nicht mehr effektiv von den Partikeln erreicht. Ein gewisser Nachteil der Gaze besteht allerdings auch darin, dass ein Teil der Zellen durch die Nylonfäden des Gewebes von den Partikel abgeschirmt wird. Da das Screening wie bei der Elektroporation isolierter Zellen wiederum an Zelllinien durchgeführt werden musste, war die Zahl der untersuchbaren Klone möglicherweise zu klein um transformierte Caedibacter zu finden. Vergleicht man hier wieder mit der biolistischen Transformation von Hefe-Mitochondrien, so wird deutlich, dass nur mit einer sehr kleinen Zahl von

Transformanten zu rechnen ist. Die Transformationsrate bei der Transformation von Mitochondrien beträgt hier nur ca. 0,05 % (oder weniger) der Kern-Transformanten (BUTOW ET AL., 1996). Die Häufigkeit der Kern-Transformanten bei den von Boileau et al. (1999) für *Paramecium* optimierten biolistischen Verfahren beträgt ebenfalls nur ca. 1,5 %. Diese Zahlen können sicherlich nur sehr eingeschränkt für die Abschätzung einer Transformationshäufigkeit bei *Caedibacter* herangezogen werden. Sie lassen aber erahnen, dass die direkte Transformation von *Paramecium*-Endosymbionten ein sehr seltenes Ereignis darstellt.

Neben allen für das gewählte Transformationsverfahren spezifischen Störfaktoren müssen auch hier die generellen Hindernisse bei der Transformation eines noch nicht getesteten Bakteriums in Betracht gezogen werden (DOWER, 1990).

In diesem Zusammenhang muss auch noch erwähnt werden, dass bisher die Transformation von Mitochondrien in tierischen Zellen noch nicht gelungen ist. Die Ursachen dafür wurden aber schon nach dem Scheitern erster Versuche weniger in technischen Variablen als vielmehr in der Tatsache gesehen, dass im Falle tierischer Zellen eine wesentlich größere Kopienzahl der genetischen Marker in die Mitochondrien transportiert werden muss (BUTOW & FOX, 1990).

#### **4.4 Transformation mit GFP-Markergenen**

Das sogenannte Green Fluorescent Protein (GFP), das in seiner ursprünglichen Form aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt, ist ein sehr vielfältig einsetzbarer genetischer Marker zu Untersuchungen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten. GFP wurde schon in bakteriellen, pflanzlichen, viralen und unterschiedlichen tierischen Systemen (Insekten und Säugetiere) exprimiert (MILLER & LINDOW, 1997). Die Fähigkeit von GFP ohne andere Kofaktoren zu fluoreszieren macht es besonders nützlich für diverse in situ Untersuchungen. Es eröffnet die Möglichkeit gerade Bakterien

lebend zu markieren und diese innerhalb ihres Habitats zu beobachten. Insbesondere für ökologische Untersuchungen von Bakterien in Biofilmen und Detritusflocken wurde GFP bereits schon vielfältig als Marker eingesetzt (ERRAMPALLI ET AL., 1997). Das Fluoreszenzsignal von GFP ist dabei ohne vorherige Behandlung oder Fixierung bei entsprechender Fluoreszenzbeleuchtung zu beobachten. Das Protein dient dabei nicht nur zur Markierung der Zellen, sondern erlaubt auch eine quantitative Untersuchung der Genexpression (STRETTON ET AL., 1998). Die zusätzliche Entwicklung von mehreren Farbvarianten des Proteins sowie seine Optimierung für die Expression in Prokaryonten lassen mittlerweile auch Mehrfachmarkierungen zu. In neueren Arbeiten konnten so auch intrazelluläre Bakterien markiert und untersucht werden. Stuurman et al. (2000) konnten mit Hilfe unterschiedlicher GFP-Varianten die Interaktion zwischen *Rhizobium* und Leguminosen visualisieren. Dabei konnte beispielsweise die Bewegung der Bakterien innerhalb der Wurzelzellen dargestellt werden. Ebenso konnte die Wurzel-Kolonisation von *Pseudomonas* durch eine GFP-Markierung verfolgt werden (BLOEMBERG ET AL., 2000).

Als weitere Anwendung für intrazelluläre in vivo Untersuchungen konnte von Logan & Leaver (2000) unter anderem die Bewegung von GFP-markierten Mitochondrien in Pflanzenzellen beobachtet werden.

Auch zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Bakterien und Protozoen wurden GFP-markierte Bakterien schon eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Ingestion von Bakterien durch verschiedene Protozoen (*Tetrahymena*, *Vorticella*, *Aspidisca*, *Bodo*) verfolgt werden (EBERL ET AL., 1997; ERRAMPALLI ET AL., 1997; OLOFSEN ET AL., 1998). Die zitierten Arbeiten ließen erwarten, dass entsprechend GFP-exprimierende Caedibacter unter dem Fluoreszenzmikroskop in ihren Wirtszellen detektierbar sein sollten. Durch die Verwendung von Plasmiden mit GFP-Genen konnten die zu den Transformationsexperimenten verwendeten Paramecien sehr effektiv auf mögliche transformierte Caedibacter untersucht werden. Das aufwendige Anlegen von Zelllinien, die nach langer Antibiotika-Selektion erst mittels PCR

auf Antibiotika-resistente Symbionten untersucht werden konnten, entfiel. Die Paramecien konnten schon kurze Zeit nach der Transformation auf das Vorkommen einzelner GFP-exprimierender *Caedibacter* hin untersucht werden. Da die Zellen dazu fixiert wurden, hätten auf diese Weise zwar keine lebenden Zellen mit transformierten Endosymbionten isoliert werden können, die Transformationshäufigkeit wäre so aber gut erfasst worden und die Methode hätte auf diese Weise entsprechend optimiert werden können. GFP wurde weiterhin auch schon als genetischer Marker anstelle von Antibiotika-Resistenzen zum Kolonie-Screening von kultivierbaren Bakterien eingesetzt (HERRERO ET AL., 1990). GFP ist sehr stabil (WARD & BOKMAN, 1982). Das Fluoreszenzsignal von GFP wird durch die Fixierung mit Paraformaldehyd nicht gemindert und bleibt in den fixierten Präparaten gekühlt über mehrere Monate erhalten. Bei der routinemäßigen Transformation von Pflanzengewebe mit Hilfe der Biolistik werden neben der in den Kern einzuführenden DNA auch Plasmide mit GFP-Genen an die Partikel geheftet. Diejenigen Zellen des Gewebes, deren Kern von einem Partikel penetriert wurde, können so unter dem Mikroskop identifiziert werden und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch durch die gewünschte DNA transformiert worden.

Mit Sicherheit stellt GFP den besten zur Zeit verfügbaren genetischen Marker für die geplante Transformation von *Paramecium*-Endosymbionten dar (s. 3.4). Im Rahmen der Arbeit wurden deshalb zwei unterschiedliche GFP-Varianten in zwei verschiedenen Plasmiden verwendet (s. 2.4). Weder mit Hilfe der Elektroporation noch mit der Biolistik konnten *Caedibacter* transformiert werden. Da nach der Transformation relativ hohe Zellzahlen gescreent werden konnten, kann hier letztlich nicht geklärt werden, was die Ursache für das bisherige Scheitern der Transformationsversuche mit *Caedibacter* ist. Möglicherweise lassen sich die Endosymbionten nur mit noch weit geringerer Wahrscheinlichkeit transformieren, so dass noch größere Zellzahlen gescreent werden müssen. Dies kann aber nicht mehr durch eine Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Vielleicht könnte mit Hilfe hochsensibler Zellsortierer ein Screening nach GFP-

exprimierenden Caedibactern in *Paramecium*-Zellen erfolgen. Auf diese Weise könnten möglicherweise auch lebende Paramecien mit transformierten Caedibactern isoliert werden.

Im Folgenden werden die Versuche mit den verschiedenen GFP-Plasmiden im Einzelnen diskutiert.

#### 4.4.1 Transformation mit pASV2

Das Plasmid pASV2 wurde gezielt zur Markierung von Bakterien entwickelt, um diese nach dem Entlassen in komplexen biologischen Systemen untersuchen zu können (SUAREZ ET AL., 1997). Dieses Plasmid enthält allerdings noch das Wild-Typ-Gen aus *Aequorea victoria*, das bei der Expression in Prokaryonten nur eine relativ schwache Fluoreszenz liefert (MILLER & LINDOW, 1997). Durch Einbau des Gens in eine Expressionskassette, die eine starke konstitutive Expression in *E. coli* bewirkt, konnte aber eine Signalintensität erreicht werden, die unter dem Fluoreszenzmikroskop die Darstellung von Einzelzellen erlauben sollte. In der Expressionskassette wurden die Promotoren  $p_R$  und  $p_L$  des Lambda-Phagen sowie die TIR des *atpE*-Gens aus *E. coli* vor das GFP-Gen kloniert (SUAREZ ET AL., 1997). Die Fluoreszenzintensität von *E. coli* mit pASV2 stellte sich allerdings als relativ schwach dar (siehe Abb. 3-9). Auch bei starkem Anregungslicht waren einzelne *E. coli*-Zellen nur schwach zu erkennen. Lediglich Fäden aus mehreren nach der Zellteilung noch nicht getrennten Zellen waren deutlich zu erkennen. Dieses Phänomen war bei allen GFP-markierten Bakterien zu beobachten. Längere Zellfäden lassen sich besser erkennen, weil es sich dabei insgesamt um ein wesentlich größeres Objekt handelt, von dem das Fluoreszenzsignal ausgeht.

Die Markierung der Bakterien mit pASV2 erreichte nur eine mäßige Intensität, die nicht mit den von Suarez et al. (1997) gemachten Aufnahmen übereinstimmte. Die Autoren räumen in derselben Arbeit allerdings auch ein, dass die Signalintensität des Wild-Typ-GFP-Gens für bestimmte

Anwendungen zu gering sein könnte. Desweiteren basiert pASV2 auf dem Expressionsvektor pJLf201 für *E. coli* (SCHAUDER ET AL., 1987). Es ist daher auch relativ ungewiss, ob das Plasmid in *Caedibacter* stabil erhalten bleibt.

Nachdem die Elektroporations-Versuche mit pASV2 nicht zu einer Transformation bei *Caedibacter* führten (s. 3.4.1.2) wurden keine weiteren Versuche mehr mit diesem Plasmid unternommen, da von Prof. Lindow geeignetere Plasmide in Aussicht gestellt wurden.

Im Falle der Elektroporation mit pASV2 ist das Misslingen der Transformation in erster Linie auf das für eine Expression in Prokaryonten suboptimale GFP-Gen und das ungeeignete Replikon des Plasmids zurückzuführen.

#### **4.4.2 Transformation mit GFPmut2-Markergenen**

Das Wild-Typ GFP-Gen, wie es beispielsweise in pASV2 eingesetzt wurde, führt selbst unter Kontrolle eines starken Promotors in *E. coli* nur zu einem moderaten Fluoreszenzsignal. Bei vielen Anwendungen, bei denen mit einer weniger starken Expression zu rechnen ist, kann das Gen in dieser Form nicht als genetischer Marker verwendet werden. Insbesondere bei der quantitativen Untersuchung von schwächeren Promotoren bedurfte es deshalb der Entwicklung von GFP-Varianten, die zu einem stärkeren GFP-Signal führen. Mutagenese des ursprünglichen Gens führte zu einer Variante mit einer von 395 nm nach ungefähr 490 nm verschobenen Anregungswellenlänge (HEIM ET AL., 1995). Weitere Mutationen, die die Löslichkeit und die Faltung des Proteins beeinflussten, führten zu einer Steigerung der Fluoreszenz zum 45-100fachen des Wild-Typs (CRAMERI ET AL., 1996; CORMACK ET AL., 1996). Dieses Gen wird als GFPmut2 bezeichnet. Bei der Markierung von *Caedibacter* ist von einer weniger starken Expression auszugehen. Das GFPmut2 sollte deshalb auch hier wesentlich besser geeignet sein als der Wild-Typ. Für die Transformationsexperimente musste weiterhin auch ein Plasmid mit einem Broad-Host-Range-Replikon verwendet werden. Von Leveau et al. (2000) wurden Promotor-Sondenvektoren entwickelt, die das GFPmut2-Gen beinhalten und über das Replikon des

Broad-Host-Range-Plasmids pBBR1 verfügen. Mehrere Arbeiten dokumentieren das weite Wirtsspektrum von pBBR1 und deuten auch auf zum Teil moderate Kopienzahlen hin (ANTOINE & LOCHT, 1992; ELZER ET AL., 1994; 1995; KOVACH ET AL., 1994). In dem von Prof. Lindow überlassenen Plasmid pPROBE-NT<sup>1</sup> befand sich allerdings nur das promotorlose GFPmut2-Gen, da dieses Plasmid als Promotor-Sondenvektor entwickelt worden war (LEVEAU ET AL., 2000). Es war daher naheliegend einen Promotor aus dem Zielorganismus *Caedibacter* vor das GFP-Gen zu setzen. Das Einklonieren einer kurzen Sequenz vor dem Transkriptionsstart des RebC-Locus führte zum Plasmid pLC5. Dieses Plasmid führt in *E. coli* wie in Abbildung 3-13 (C+D) gut zu sehen ist, zu einer sehr starken Markierung der Bakterien. Durch die konstitutive Expression sind alle einzelnen Zellen sehr deutlich und in gleichem Maße markiert. Das Fluoreszenzsignal übertrifft bei weitem das der mit pASV2 transformierten *E. coli* (s. Abb. 3-9). So fluoreszierende Bakterien sollten in jedem Falle auch in *Paramecium*-Zellen sehr gut zu erkennen sein. Mit pLC5 wurde damit ein Plasmid eingesetzt, das bei der Transformation von *Caedibacter* zu einer deutlichen Markierung der transgenen Zellen führen sollte.

Die Tatsache, dass auch mit diesem Vektor weder mit Hilfe der Elektroporation noch mit der Biolistik die direkte Transformation der *Paramecium*-Endosymbionten gelungen ist, kann ebenfalls nicht erklärt werden. Es müssen hier fundamentale Gründe angenommen werden, die eine Transformation der Endosymbionten verhindern. Neben den bereits angeführten allgemeinen Hinderungen (s.4.3.3), die bei der Transformation eines noch nicht getesteten Bakteriums in Betracht gezogen werden müssen, liegt das größte Hindernis mit Sicherheit in der Besonderheit der endosymbiontischen Lebensweise der *Caedibacter*. Möglicherweise sind diese Bakterien durch eine entsprechende Koevolution so sehr an die intrazelluläre Lebensweise angepasst, dass sie wie andere intrazelluläre Bakterien genetisch stark reduziert sind. Entsprechende Anpassungen von *Chlamydia*, wie Transportproteine, die den Import von ATP aus dem Cytoplasma der Wirtszelle erlauben, sind bereits eingangs beschrieben

worden (TJADEN ET AL., 1999). Bei *Paramecium*-Endosymbionten der Gattung *Holospira* sind bereits ähnliche Proteine nachgewiesen worden (Neuhaus, persönliche Mitteilung). Erste Untersuchungen an *Caedibacter* lassen die Vermutung zu, dass auch *Caedibacter* durch vergleichbare Proteine den Energiehaushalt der Wirtszellen nutzt (Neuhaus, persönliche Mitteilung). Möglicherweise ist der genetische Apparat der Endosymbionten so stark reduziert, dass notwendige Mechanismen zum Erhalt der Plasmide und zur Expression von Fremdgenen nicht mehr ablaufen können. Aufgrund der starken Markierung die pLC5 bei *E. coli* bewirkt, sollte man allerdings vermuten, dass *Caedibacter*, in die auch nur wenige Kopien des Vektors eingeschleust wurden, auch dann deutlich markiert würden, wenn das Plasmid nicht dauerhaft erhalten bleibt. Dies hätte schon ausgereicht, um das Transformationsverfahren entsprechend zu optimieren und Transformationsraten bestimmen zu können.

Möglicherweise lässt die Lage der *Caedibacter* im Inneren der Paramecien auch eine direkte Transformation prinzipiell nicht zu. Bei der Elektroporation ist es denkbar, dass die erreichte intrazelluläre DNA-Konzentration einfach nicht hoch genug ist, um mit ausreichender Wahrscheinlichkeit die Transformation der Endosymbionten zu bewirken.

Letztlich soll auch nochmal der Vergleich zur direkten Transformation von Mitochondrien hergestellt werden. Die direkte Transformation von Hefemitochondrien gelingt, wenn auch nur mit sehr geringer Häufigkeit, seit längerem, entsprechende Arbeiten wurde bereits zitiert. Für die Transformation von Mitochondrien in höheren tierischen oder pflanzlichen Zellen gibt es allerdings bisher noch keinen Beleg.

## 4.5 Untersuchung des RebC-Promotors

Innerhalb einer Population von *Caedibacter*-Symbionten in einem *Paramecium* enthält immer nur ein Teil der Bakterien einen R-Körper und zählt damit zu den „bright“-Formen, von denen die Killeraktivität ausgeht. Die Faktoren, die in einer *Caedibacter*-Zelle die Bildung eines R-Körpers steuern, sind noch nicht genau bekannt. Die Erfahrungen bei der Kultivierung der Symbionten zeigen aber, dass unter Hungerbedingungen der Anteil der Brights deutlich zunimmt. Bei der Gewinnung von R-Körpern macht man sich diese Tatsache zu Nutze und erntet immer nur stark gehungerte Kulturen zur Isolierung ab. Hunger scheint ein Faktor zu sein, der die Synthese der R-Körperproteine auslöst. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Bestrahlung mit UV-Licht ebenso der Anteil an Brights deutlich erhöht werden kann (PREER ET AL., 1974 B). Dieser Stressfaktor scheint also ebenso für die Regulation der R-Körpersynthese verantwortlich zu sein. Die Bildung der nicht vegetativen aber toxischen Brights unter physiologischen Stressbedingungen scheint auch ökologisch plausibel. Die Killereigenschaft infizierter Paramecien vermindert den Gesamtkonsum vorhandener Ressourcen (KUSCH ET AL., 2002). Gerade in Mangelsituationen besteht ein Konkurrenzvorteil für die infizierten Paramecien, da sie nicht nur über die Exploitation der Nahrungsressourcen, sondern auch durch die Interferenz über die Killereigenschaft mit den nicht-infizierten Zellen konkurrieren können. Ein Mangel an Nahrung ist im natürlichen Mikrohabitat der Paramecien vor allem bei bereits vorhandenen relativ hohen Zelldichten denkbar. Da die Killerwirkung an die Ausscheidung von Brights geknüpft ist, nimmt diese mit der Zelldichte ebenfalls zu. In solchen Mangelsituationen werden die Wirtspamecien weiterhin relativ geringe Teilungsraten aufweisen, so dass die Symbiontenpopulation „es sich leisten kann“ einen größeren Teil ihrer Zellen in nicht-vegetative Formen umzuwandeln. Die Bildung des R-Körpers in den Symbionten erfordert die Synthese großer Mengen der jeweiligen Proteine. Diese werden durch den Reb-Locus kodiert

(HERUTH ET AL., 1994). Die Promotoren des Reb-Locus steuern daher bei der Ausbildung der Brights die Synthese großer Mengen an R-Körperprotein. Mit Hilfe der durchgeführten Versuche (s. 3.5) wurde die Induktion dieser Promotoren durch physiologischen Stress untersucht. Dazu wurde die entsprechende regulatorische Sequenz aus dem Reb-Locus in ein Reportersystem kloniert, mit dem die Aktivität des Promotors untersucht werden konnte. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte dann in *E. coli*. Die so durchgeführten Messungen können Aufschluss darüber geben, inwieweit der eingesetzte R-Körperpromotor durch unterschiedlich induzierte physiologische Stresszustände in einer Bakterienzelle aktiviert wird.

Die Aktivität eines Promotors kann untersucht werden, indem das betreffende DNA-Fragment vor ein Reporter gen kloniert wird, dessen Genprodukt gut detektiert und quantifiziert werden kann. Das GFP-Gen ist mittlerweile ein sehr weit verbreitetes Reporter gen für Anwendungen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten. Durch fluoreszenzspektrometrische Messungen kann GFP ohne das Zusammenwirken weiterer Kofaktoren direkt in Bakteriensuspensionen quantifiziert werden. Da GFP mit 27 kDa relativ klein ist, ist der metabolische Aufwand zur Synthese des Reporterproteins für die Wirtsbakterien relativ gering. Es wurde daher schon als Reporter gen bei der Untersuchung von induziertem zellulären Stress in *E. coli* eingesetzt (CHA ET AL., 1999). Lissmore et al. (2000) haben bereits gezeigt, dass die Messung relativer Promotoraktivitäten mit Hilfe von GFP ebenso sensitiv ist wie bei Verwendung von  $\beta$ -Galaktosidase als Reporter gen. Die von Leveau et al. (2000) konstruierten Sondenvektoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, enthalten eine Variante des GFP-Gens, die im Gegensatz zum Wildtyp-Gen aus der Qualle *Aequorea victoria* in Prokaryonten zu einem relativ stark fluoreszierenden Genprodukt führt. Diese Eigenschaften wurden durch mehrere Mutationen im ursprünglichen Gen erzielt, die eine erhöhte Löslichkeit und eine Verschiebung der Anregungswellenlänge bewirkten (HEIM ET AL., 1995; CRAMERI ET AL., 1996; CORMACK ET AL., 1996). Die Expressionskassette der Sondenvektoren enthält vor dem GFP-Gen noch einen Polylinker mit zahlreichen Restriktionsstellen

und ist zu beiden Seiten mit Transkriptionsterminatoren begrenzt. Diese Terminatoren unterbinden ein Hintergrundsignal, wie es durch die externe Transkription von GFP erzeugt werden könnte. Die damit zur Verfügung stehenden Vektoren sind daher besonders gut zur Untersuchung schwacher oder mittelstarker Promotoren geeignet (LEVEAU ET AL., 2000).

#### 4.5.1 Die unterschiedlichen pLC-Konstrukte

In den Promotorsondenvektor wurde zum einen der gesamte Bereich des RebC-Promotors (pLC3) und zum anderen lediglich die Ribosom Binding Site des RebC-Gens (pLC5) einkloniert. Abbildung 3-14 zeigt deutlich, dass die konstitutive Fluoreszenz, die von dem Konstrukt pLC5 ausgeht, weitaus stärker ist als von pLC3. Dies entspricht auch dem direkten visuellen Eindruck der bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der entsprechenden Zellen gewonnen wurde (s. Abb. 3-13). Die Kontrolle mit dem promotorlosen Vektor pPROBE-NT' zeigt weiterhin, dass bei dem verwendeten Reportersystem nur ein kaum messbares Hintergrund-Signal auftritt. Das ausgewählte System erlaubte damit auch die Messung schwacher Promotoraktivitäten. Die bei den Zellsuspensionen von *E. coli* JM109/pLC5 gemessenen Fluoreszenzen werden lediglich durch das Vorhandensein der Ribosom Binding Site hervorgerufen. Befindet sich der gesamte Promotor des RebC-Locus vor dem GFP-Gen, wie im Falle des Plasmids pLC3, führt dies zu einer wesentlich geringeren konstitutiven Expression von GFP und damit zu weitaus schwächeren Fluoreszenzintensitäten in den betreffenden Zellsuspensionen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Promotor des RebC-Locus induzierbar sein könnte. Sollte es sich bei den Faktoren, die zur Induktion der R-Körpersynthese führen, um allgemeine physiologische Stressbedingungen handeln, sollte die Induktion auch in den rekombinanten *E. coli*-Zellen des Testsystems möglich sein. In den daraufhin durchgeführten Versuchen wurde *E. coli* JM109/pLC3 unterschiedlichen physiologischen

Stressbedingungen ausgesetzt und die darauf in den Zellen erfolgende GFP-Expression als Fluoreszenz gemessen.

#### **4.5.2 Stressinduktion des Reb-Promotors**

Die Induktion von physiologischem Stress in *E. coli* ist durch zahlreiche Faktoren und Agenzien möglich. Verschiedene Stressantworten sind von *E. coli* bereits seit längerem bekannt und die genetischen Regulationsmechanismen gut untersucht. Zu diesen Induktoren gehören z. B. Hitzeschock, pH-Schock oder starke Änderungen in den osmotischen Verhältnissen der Umgebung (SNYDER & CHAMPNESS, 1997). Weiterhin können physiologische Stressreaktionen durch bestimmte Chemikalien ausgelöst werden. Ethanol und IPTG sind als entsprechende Stressinduktoren untersucht worden (RUPANI ET AL., 1996; VAN DYK ET AL., 1994; KOSINSKI ET AL., 1992). Die Zugabe von Kochsalz ermöglicht die Induktion von osmotischem Stress (BOTSFORD, 1990). Zur Induktion eines pH-Schocks eignet sich Essigsäure (MAJEWSKI & DOMACH, 1990).

Der Gehalt an GFP in den Testzellen diente jeweils als Maß für die relative Promotoraktivität. Die Bestimmung des GFP-Gehalts erfolgte durch fluoreszenzspektrometrische Messungen der entsprechenden Zellsuspensionen. Der GFP-Gehalt der Zellen ist aber stark abhängig von der Teilungsrate der Zellen. Mit jeder Zellteilung wird das vorhandene GFP quasi „verdünnt“. Bei hohen Teilungsraten kann daher die relative Promotoraktivität möglicherweise zu niedrig eingeschätzt werden. Im Gegensatz dazu kann aber auch ein geringes Zellwachstum und die damit einhergehende Akkumulation von GFP in den Testzellen eine zu hohe relative Promotoraktivität vortäuschen. Dieses Problem sollte durch zwei unterschiedliche experimentelle Vorgehensweisen eliminiert werden. Zum einen wurde die GFP-Expression in hungernden und damit nichtreproduktiven Zellen gemessen (s. 3.5.2.1), wie bereits von Cha et al. (1999) ebenfalls bei Versuchen zur Stressinduktion in *E. coli* durchgeführt. Der herbeigeführte Hungerzustand der Zellen stellt dabei schon einen Stressfaktor dar, der möglicherweise schon für die Induktion der Reb-

Promotoren verantwortlich ist. Zum anderen wurde ein von Leveau & Lindow (2001) vorgeschlagenes Modell zur Berechnung des GFP-Gehalts in Bakterienzellen zur Untersuchung wachsender Bakterien verwendet (s. 3.5.2.2). Fehler durch den starken Einfluss der induzierten Stresszustände auf die Teilungsraten sollten so ausgeschaltet werden.

#### **4.5.2.1 Messung der Promotoraktivitäten in hungernden *E. coli***

Die Versuche zeigen, dass die eingesetzten Testzellen schon alleine auf den herbeigeführten Hungerzustand mit einer Erhöhung der GFP-Synthese reagieren (s. Abb. 3-15). Die Erhöhung des GFP-Gehalts könnte als Folge der Akkumulation und späteren Reifung des Proteins gedeutet werden, die sich vollzieht, wenn exponentiell wachsende Zellen aus einem Vollmedium in ein nährstoffreies Mangelmedium überführt werden und die weitere Teilung der Zellen dadurch plötzlich unterbunden wird. Der Vergleich mit den von Cha et al. (1999) durchgeführten Untersuchungen gibt hier Aufschluss. Bei diesen Versuchen wurde analog die Induzierbarkeit durch Stressfaktoren von Promotoren dreier unterschiedlicher Hitzeschockproteine gemessen. Es handelte sich dabei um die Promotoren des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors  $\sigma^{32}$ , die Proteaseuntereinheit ClpB und das Chaperon DnaK. Bei diesen Messungen wurde alleine durch die Überführung in den Hungerzustand durch die Promotoren der Gene für ClpB und DnaK keine signifikante Erhöhung der GFP-Synthese gemessen. Bei Zellen mit dem Promotor des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors  $\sigma^{32}$  wurde eine schwache Erhöhung des GFP-Gehalts ermittelt. Die Erhöhung des GFP-Gehalts in den Testzellen im Hungerzustand kann also nicht als durch die Versuchsbedingungen verursachtes Artefakt gewertet werden, sondern ist Folge der Induktion des getesteten Promotors. Die Aktivität des RebC-Promotors wird durch den Hungerzustand in den Bakterienzellen erhöht. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei *Caedibacter* in hungernden Paramecien die Synthese der R-Körperproteine ausgelöst wird. Die

Stresssignale, die für diese Regulation verantwortlich sind, scheinen allgemeiner Natur zu sein. Auch in den verwendeten Testzellen des Stammes *E. coli* JM109 führen diese Signale zu einer Aktivierung des aus *Caedibacter* stammenden Promotors. Damit konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass Hunger ein Faktor ist, der für die Bildung der R-Körper in den Endosymbionten verantwortlich ist.

Die Untersuchung zeigt weiterhin, dass das gewählte Testsystem eine sehr hohe Sensitivität hat und deshalb für die zu bearbeitende Fragestellung prädestiniert war. Das System hat es erlaubt, die zelluläre Antwort von Bakterien auch bei extremen Stressbedingungen zu messen, die die Synthese von Markergenen per se schon stark beeinflussen. Bei analogen Versuchen zur Messung der Induktion von Hitzeschock-Promotoren mit Luciferase als Markergen, konnte bei hungernden Bakterienzellen keine Antwort auf unterschiedliche Stressfaktoren mehr gemessen werden (RUPANI ET AL., 1996). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass für die Aktivität von Luciferase die Anwesenheit von ATP notwendig ist. Daran herrscht in hungernden Zellen allerdings ein Mangel. GFP dagegen führt auch ohne weitere Kofaktoren zu einem messbaren Fluoreszenzsignal. Darüberhinaus ist seine Synthese aufgrund seiner geringen Größe auch unter Mangelbedingungen möglich.

Hitzeschock, Ethanol und IPTG führen ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Aktivität des getesteten Promotors. Der Hitzeschock führt dabei zur stärksten Erhöhung der Promotoraktivität. Auch unter Berücksichtigung der entsprechenden Standardabweichungen ist der durch den Hitzeschock ausgelöste Effekt bei weitem am größten. Diese Faktoren lassen sich allerdings nicht direkt auf die physiologischen Bedingungen von *Caedibacter*-Zellen übertragen. Diese werden innerhalb ihrer Wirtszellen kaum den eingesetzten Induktoren ausgesetzt sein. Sie müssen vielmehr als weitere Auslöser allgemeiner Stresszustände in Bakterienzellen aufgefasst werden. Der RebC-Promotor wird daher nicht spezifisch durch einen Hungerzustand aktiviert sondern scheint durch das Vorherrschen allgemeiner zellulärer Stressbedingungen induziert zu werden. Es sei in diesem

Zusammenhang nochmals darauf verwiesen, dass von Preer et al. (1974 B) eine Erhöhung der R-Körpersynthese durch die Bestrahlung mit UV-Licht erreicht werden konnte. Dieses ist ebenfalls ein Auslöser für einen zellulären Stresszustand.

Osmotischer Stress sowie der herbeigeführte pH-Schock konnten allerdings keine Aktivierung des Promotors verursachen. Insbesondere die Zugabe von Essigsäure scheint die Zellen soweit zu schädigen, dass keine entsprechende Reaktion mehr messbar war. Der negative Wert bei der relativen Fluoreszenz bei Säureinduktion zeigt, dass in den hungernden Zellen nach der Induktion die gemessene Fluoreszenz abgenommen hat und nach 7,5 h niedriger war als der Ausgangswert vor der Applikation der Essigsäure.

Aus den Versuchen lässt sich ableiten, dass die R-Körpersynthese durch zellulären Stress induziert werden kann. Der RebC-Promotor wird dabei durch universelle Stresssignale auch in *E. coli* aktiviert. Der Promotor kann daher möglicherweise zu einer stressinduzierten Expression von Proteinen auch in anderen Bakterienarten als *Caedibacter* dienen. Gerade bei der Expression unter natürlichen Bedingungen werden Promotoren, die auf Hunger oder andere physiologische Stresssignale reagieren, sinnvoller sein als z. B. spezifische Substratinduktoren. Unter natürlichen Bedingungen werden Stresszustände für Mikroorganismen mit hoher Wahrscheinlichkeit immer wieder eintreten. Damit wird auch eine gewünschte Transkription eines Gens unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors in der Natur mit großer Wahrscheinlichkeit erfolgen.

#### 4.5.2.2 Messung der Promotoraktivitäten in wachsenden *E. coli*

Bei nicht-wachsenden Zellen haben sich Hitzeschock und Hunger als wirksamste Induktoren des RebC-Promotors erwiesen. Alternativ zu den bereits beschriebenen Versuchen wurde die Aktivierung des Promotors durch Hitzeschock und Hunger auch an sich teilenden Zellen untersucht. Der Gehalt an GFP pro Zelle wurde durch ein mathematisches Modell berechnet (LEVEAU & LINDOW, 2001). Zur Induktion eines Hungerzustandes wurde zum einen ein Medium ohne Glucose und zum anderen auch ein Medium mit Glucose aber ohne Aminosäuren verwendet. Mit diesem Verfahren konnte allerdings in keinem Fall eine deutliche Zunahme der relativen Promotoraktivität gemessen werden (s. 3.5.2.2). Bei Glucose- bzw. Aminosäuremangel nimmt die Promotoraktivität im Laufe der Induktion sogar ab. Durch den Hitzeschock wird eine rechnerische Steigerung der Promotoraktivität um das 1,8fache erreicht. Diese Steigerung kann aber nur als unbedeutend angenommen werden. Zum Vergleich: Der durch IPTG induzierbare Promotor P<sub>A1/04/03</sub> führt bei analog durchgeführten Versuchen in *Erwinia herbicola* bei der Zugabe von IPTG zu einer Steigerung der Promotoraktivität um das mehr als 200fache (LEVEAU & LINDOW, 2001). Die Ergebnisse stehen damit zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen, die bei hungernden Zellen erhalten wurden. Die Ursache dafür ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit im methodischen Vorgehen zu sehen. Wird in Zellen, die sich weiterhin teilen, starker physiologischer Stress induziert, ist es den Zellen nicht mehr möglich, zusätzlich noch gut messbare Mengen an GFP zu produzieren. Der physiologische Aufwand dafür ist dann zu hoch. Besteht die Stressinduktion dann zusätzlich noch aus extremen Mangelzuständen, kann nur noch so wenig Reporterprotein produziert werden, dass der Gehalt an GFP mit den fortwährenden Teilungen in den Zellen abnimmt. Es resultiert daraus die bei Glucose- bzw. Aminosäuremangel vermeintlich geringere Promotoraktivität. Wird die Zellteilung aber wie unter 3.5.2.1 beschrieben durch den Entzug jeglichen verwertbaren Substrates völlig unterbunden, können auch geringere GFP-Mengen in den Zellen akkumulieren und

entsprechend detektiert werden. Das hier gewählte Verfahren war daher nicht geeignet, die Induktion eines Promotors zu messen, die mit starken Stresszuständen bei den Testzellen verknüpft ist. Die Untersuchung hungernder Zellen hat sich als wesentlich günstiger erwiesen und führte zu den mit Sicherheit zuverlässigeren Ergebnissen.

## 5 Zusammenfassung

Die obligat endocytisch in *Paramecium* lebenden bakteriellen Symbionten der Gattung *Caedibacter* können bislang weder außerhalb ihrer Wirtszellen kultiviert noch genetisch transformiert werden. Entsprechend limitiert sind unsere Möglichkeiten der Erforschung oder gar Nutzung dieser Bakterien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Isolierung der Endosymbionten aus Paramecien etabliert und Strategien zur genetischen Transformation von *Paramecium*-Endosymbionten getestet. Es zeigte sich, dass eine Transformation außerhalb der Wirtszellen nicht möglich ist, da die Bakterien nicht in vitro selektiert werden können und eine Reinfektion der Symbionten entsprechender aposymbiontischer Wirtszellen auf dem vermuteten Infektionsweg scheiterte.

Die Transformation der Endosymbionten sollte daher direkt in den Paramecien erfolgen. Es wurden Verfahren entwickelt, mit deren Hilfe die Transformation der Endosymbionten mittels Elektroporation bzw. Partikelbombardement innerhalb der Wirtszellen getestet wurde. Die zu diesen Versuchen eingesetzten Plasmide verfügten über verschiedene Replika mit nachweislich weitem Wirtsspektrum. Als Markergene dienten zum einen ein Streptomycinresistenz-Gen und zum anderen zwei Varianten des Green Fluorescent Protein. Es zeigte sich, dass die Transformation von *Caedibacter* derzeit noch nicht möglich ist.

Weiterhin wurde untersucht, ob der Promotor des RebC-Locus aus *Caedibacter* für eine Kontrolle einer heterologen Genexpression unter natürlichen Bedingungen in Frage kommt. Durch Studien mit Hilfe von Promotorsonden-Vektoren, in die die entsprechende Sequenz vor ein GFP-Gen kloniert wurde, konnte in *E. coli* gemessen werden, inwieweit unterschiedliche physiologische Stressbedingungen zu einer Aktivierung des RebC-Promotors führen. Die Promotorstudien erfolgten nach zwei unterschiedlichen Verfahren. Unter den getesteten Stressfaktoren bewirkten Hunger und Hitzeschock die stärkste Aktivierung des untersuchten Promotors.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass die R-Körpersynthese in *Caedibacter* in der Natur unter Mangel- bzw. Stressbedingungen erfolgt.

## 6 Literatur

ALBRECHT, P. (1999): Funktionen von *Caedibacter*-Symbionten für *Paramecium aurelia*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.

ANGSUTHANASOMBAT, C. & PANYIM, S. (1989): Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied Environmental Microbiology* 55: 2428-2430.

ANTOINE, R. & LOCHT, C. (1992): Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Molecular Microbiology* 6: 1785-1799.

AUSTIN, M. L. (1948): The killing substance, paramecin: activity of single particles. *American Naturalist* 82: 51-59.

BAGDASARIAN, M., BAGDASARIAN, M. M., COLEMAN, S. & TIMMIS, K. N. (1979): New vector plasmids for cloning in *Pseudomonas*. In: Timmis, K. N. & Puhler, A.: *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*. Elsevier, North Holland, Amsterdam.

BAGDASARIAN, M., BAGDASARIAN, M. M., LURZ, R., NORDHEIM, A., FREY, J. & TIMMIS, K. N. (1982): Molecular and functional analysis of the broad host range plasmid RSF 1010 and construction of vectors for gene cloning in gram-negative bacteria. In: Mitsuhashi, S.: *Drug resistance in bacteria*. Japan Scientific Society Press, Tokyo; Thieme Stratton Inc., New York.

BAGDASARIAN, M., LURZ, R., RUCKERT, B., FRANKLIN, F. C. H., BAGDASARIAN, M. M., FREY, J. & TIMMIS, K. N. (1981): Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010 derived vectors,

and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16: 237-247.

BAGDASARIAN, M. & TIMMIS, K. N. (1981): Host-vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96: 47-67.

BALL, G. H. (1969): Organisms living on and in protozoa. *Research in Protozoology*. Pergamon Press, London.

BARTH, P. T. (1979): RP4 and R300B as wide host-range plasmid cloning vehicles. In: Timmis, K. N. & Puhler, A.: *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*. Elsevier, North Holland, Amsterdam.

BARTH, P. T., TOBIN, L. & SHARPE, G. S. (1981): Development of broad host-range plasmid cloning vectors. In: Levy, S. B., Clowes, R. C. & Koenig, E. L.: *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of bacterial Plasmids*. Plenum Press, New York.

BAUER-KRYLOV, E., MADEO, M. & STILLE, W. (2000): Die Infektionstheorie als Androtropie des Herzinfarktes. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 125: 1095-1097.

BLASI, F., DENTI, F. & ERBA, M. (1996): Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2766-2769.

BLOEMBERG, G. V., WIJFJES, A. H. M., LAMERS, G. E. M., STUURMAN, N. & LUTGENBERG, B. J. J. (2000): Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1170-1176.

BOILEAU, A. J., KISSMEHL, R. KANABROCKI, J. A. & SAIMI, Y. (1999): Transformation of *Paramecium tetraurelia* by electroporation or particle bombardement. *Journal of Eucaryotic Microbiology* 46: 56-65.

BOTSFORD, J. L. (1990): Analyses of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 72: 355-360.

BRUNK, C. F. & NAVAS, P. (1988): Transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation and parameters effecting cell survival. *Experimental Cell Research* 174: 525-532.

BRUNS, P. J. & CASSIDY-HANLEY, D. (2000): Biolistic transformation of macro- and micronuclei. *Methods in Cell Biology* 62: 501-512.

BUTOW, R. A. & FOX, T. D. (1990): Organelle transformation: shoot first, ask questions later. *Trends in Biochemical Sciences* 15: 465-468.

BUTOW, R. A., HENKE, R. M., MORAN, J. V., BELCHER, S. M. & PERLMAN, P. S. (1996): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun. *Methods in Enzymology* 264: 265-278.

CASSIDY-HANLEY, D., BOWEN, J., LEE, J. H., COLE, E., VERPLANK, L. A., GAERTIG, J., GOROVSKY, G. A. & BRUNS, P. J. (1997): Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardement. *Genetics* 146: 135-147.

CHA, H. J., SRIVASTAVA, J., VAKHARIA, V. N., RAO, G. & BENTLEY, W. E. (1999): Green fluorescent protein as a noninvasive stress probe in resting *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 409-414.

CHUNGJATUPORCHNAI, W. (1990): Expression of the mosquitocidal-protein genes from of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. *Current Microbiology* 21: 283-288.

COLLOMBET, J.-M., WHEELER, V. C., VOGEL, F. & COUTELLE, C. (1997): Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 5342-5347.

CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H. & FALKOW, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.

CRAMERI, A., WHITEHORN, E. A., TATE, E. & STEMMER, W. P. C. (1996): Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

DANKBAR, B. (1991): Untersuchungen zur Toxizität intrazellulärer Symbionten von *Paramecium caudatum* und *Paramecium aurelia*. Diplomarbeit des Institutes für Allgemeine Zoologie und Genetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

DAVIDSON, E. W. (1982): Bacteria and the control arthropod vectors of human and animal disease. In: Kurstak, E.: *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker Verlag, New York.

DE LORENZO, V. (1994): Designing microbial systems for gene expression in the field. *Trends in Biotechnology* 12: 365-371

DE MARSAC, N. T., DE LA TORRE, F. & SZULMAJSTER, J. (1987): Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Molecular & General Genetics* 209: 396-398.

DILTS, J. A. & QUACKENBUSH, R. L. (1986): A mutation in the R-body-coding sequences destroys expression of the killer trait in *Paramecium tetraurelia*. *Science* 232: 641-643.

DOWER, W. J., MILLER, J. F. & RAGSDALE, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6145.

DOWER, W. J. (1990): Electroporation of bacteria: A general approach to genetic transformation. In: Setlow, J. K.: *Genetic Engineering*, Vol. 12. Plenum Press, New York.

EBERL, L., SCHULZE, R., AMMENDOLA, A., GEISENBERGER, O., ERHART, R., STERNBERG, C. MOLIN, S. & AMANN, R. (1997): Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. *FEMS Microbiology Letters* 149: 77-93.

ELZER, P. H., PHILLIPS, R. W., KOVACH, M. E., PETERSON, K. M. & ROOP, R. M. (1994): Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant. *Infection and Immunity* 62: 4135-4139.

ELZER, P. H., KOVACH, M. E., PHILLIPS, R. W., ROBERTSON, G. T., PETERSON, K. M. & ROOP, R. M. (1995): In vivo and in vitro stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid* 33: 51-57.

ERRAMPALLI, D., LEUNG, K., CASSIDY, M. B., KOSTRZYNSKA, M., BLEARS, M., LEE, H. & TREVORS, J.T. (1997): Applications of green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 35: 187-199.

FONG, I. W., CHIU, B., VIIRA, E., FONG, M., JANG, D. & MAHONY, J. (1997): Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 48-52.

FRAGA, D., YANO, J., REED, M. W., CHUANG, R., BELL, W., VAN HOUTEN, J. L. & HINRICHSSEN, R. (1998): Introducing antisense nucleotides into *Paramecium* via electroporation. *Journal of Eucaryotic Microbiology* 45: 582-588.

GAERTIG, J. & GOROVSKY, M. A. (1992): Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 9196-9200.

GAERTIG, J., GU, L., HAI, B. & GOROVSKY, M. A. (1994): High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Research* 22: 5391-5398.

GILCHRIST, A. & SMIT, J. (1991): Transformation of freshwater and marine Caulobacters by electroporation. *Journal of Bacteriology* 173: 921-925.

GÖRTZ, H.-D. (1988): Endocytobiosis. In: *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

GÖRTZ, H.-D. (1996): Symbiosis in ciliates. In: *Ciliates: Cells as organisms*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

GÖRTZ, H.-D. & BRIGGE, T. (1998): Intracellular bacteria in protozoa. *Naturwissenschaften* 85: 359-368.

GRIMES, G. W. & PREER, J. R.,JR. (1971): Further observations on the correlation between *kappa* and phage-like particles in paramecia. *Genetical Research* 18: 115-116.

HAI, B. & GOROVSKY, M. A. (1997): Germ-line knockout heterokaryons of an essential  $\alpha$ -tubulin gene enable high-frequency gene replacement and a test of gene transfer from somatic to germ-line nuclei in *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 1310-1315.

HEIM, R., CUBITT, A. B. & TSIEN, R. Y. (1995): Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664.

HERRERO, M., DE LORENZO, V. & TIMMIS, K. N. (1990): Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 172: 6557-6567.

HERUTH, D. P., POND, F. R., DILTS, J. A. & QUACKENBUSH, R. L. (1994): Characterization of genetic determinants for r-body-synthesis and assembly in *Caedibacter taeniospiralis* 47 and 116. *Journal of Bacteriology* 176: 3559-3567.

INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNISKY, J. J. & WHITE, T. J. (1990): *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.

JOHNSTON, S. A., ANZIANO, P. Q., SHARK, K., SANFORD, J.C. & BUTOW, R. A. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240: 1538-1541.

JURAND, A., PREER, J. R., JR. & RUDMAN, B. M. (1978): Further investigation on the prelethal effects of killing action of kappa-containing killer stocks of *Paramecium aurelia*. *Journal of Experimental Zoology* 206: 25-48.

JURAND, A., RUDMAN, B. M. & PREER, J. R., JR. (1971): Prelethal effects of killing action by stock 7 of *Paramecium aurelia*. *Journal of Experimental Zoology* 177: 365-388.

KAIN, K. C., SHANKS, G. D. & KEYSTONE, J. S. (2001): Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. I. Currently recommended drug regimens. *Travel Medicine* 33: 226-234.

KLEIN, T. M., ARENTZEN, R., LEWIS, P. A. & FITZPATRICK-MCELLIGOTT, S. (1992): Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology* 10: 286-291.

KNOWLES, B. H. & ELLAR, D. J. (1987): Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificities. *Biochemical and Biophysical Acta* 924: 509-518.

KOSINSKI, M. J., RINAS, U. & BAILEY, J. E. (1992): Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 782-784.

KOVACH, M. E., PHILLIPS, R. W., ELZER, P. H., ROOP II, R. M. & PETERSON, K. M. (1994): pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.

KUSCH, J., STREMMEL, M., SCHWEIKERT, M., ADAMS, V. & SCHMIDT, H. J. (2000): The toxic symbiont *Caedibacter caryophila* in the cytoplasm of *Paramecium novaurelia*. *Microbial Ecology* 40: 330-335.

KUSCH, J., CZUBATINSKI, L., WEGMANN, S., HÜBNER, M., ALTER, M. & ALBRECHT, P. (2002): Competitive advantages of *Caedibacter*-infected paramecia. *Protist* 153: 47-58.

LAIRD, M., LACEY, L. A. & DAVIDSON, E. W. (1990): Safety of microbial insecticides. CRC Press, Boca Raton.

LANDIS, W. G. (1981): The ecology, role of the killer trait, and interactions of five species of *Paramecium aurelia* complex inhabiting the littoral zone. *Canadian Journal of Zoology* 59: 1734-1743.

LANDIS, W. G. (1987): Factors determining the frequency of the killer trait within populations of *Paramecium aurelia* complex. *Genetics* 115: 197-205.

LAPAGE, S. P., SNEATH, P. H. A., LESSEL, E. F., SKERMAN, V. B. D., SEELIGER, H. P. R. & CLARK, W. A. (1975): International code of nomenclature of bacteria-bacteriological code. American Society of Microbiology, Washington DC.

LEVEAU, J. H. J. & LINDOW, S. E. (2001): Predictive and interpretive simulation of greenfluorescent protein expression in reporter bacteria. *Journal of Bacteriology* 183: 6752-6762.

LEVEAU, J. H. J., MILLER, W. G. & LINDOW, S. E. (2000): Improved gfp and inaZ broad-host-range promotor-probe vectors. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 1243-1250.

LISSMORE, J. L., JANKOWSKI, J. T., THOMAS, C. B., MASCOTTI, D. P. & DEHASETH, P. L. (2000): Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promotor activity in *E. coli*. *Biotechniques* 28: 82-89.

LOGAN, D. C. & LEAVER, C. J. (2000): Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *Journal of Experimental Botany* 51: 865-871.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & PARKER, J. (1997): Brock, Biology of microorganisms. Prentice Hall, New Jersey 07458.

MAJEWSKI, R. A. & DOMACH, M. M. (1990): Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 732-738.

MANASHEROB, R., BEN-DOV, E., ZARITSKY, A. & BARAK, Z. (1998): Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1750-1758.

MERRITT, R. W., DADD, R. H. & WALKER, E. D. (1992): Feeding behaviour, natural food, and nutritional relationship of larval mosquitoes. *Annual Reviews of Entomology* 37: 349-367.

MILLER, L. H. (1992): The challenge of malaria. *Science* 257: 36-37.

MILLER, W. G. & LINDOW, S. E. (1997): An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 1991: 149-153.

MUELLER, J. A. (1963): Separation of *kappa*-particles with infective activity and identification of infective particles in *Paramecium aurelia*. *Experimental Cell Research* 30: 492-508.

MUELLER, J. A. (1964): Cofactor for infection by *kappa* in *Paramecium aurelia*. *Experimental Cell Research* 35: 464-476.

OLOFSSON, A.-C., ZITA, A. & HERMANSSON, M. (1998): Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology* 144: 519-528.

ORIAS, E., LARSON, D., HU, Y.-F., YU, G.-L., KARTTUNEN, J., LØVLIE, A., HALLER, B. & BLACKBURN, E. H. (1988): Replacement of the macronuclear ribosomal RNA genes of a mutant *Tetrahymena* using electroporation. *Gene* 70: 295-301.

POND, F. R., GIBSON, I., LALULAC, J. & QUACKENBUSH, R. L. (1989): R-body-producing bacteria. *Microbiological Reviews* 53: 25-67.

PORTER, A. G., DAVIDSON, E. W. & LIU, J.-W. (1993): Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiological Reviews* 57: 838-861.

PREER, J. R.,JR., SIEGEL, R.W. & STARK, P. S. (1953): The relationship between *kappa* and paramercia in *Paramecium aurelia*. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 39: 1228-1233.

PREER, J. R.,JR. & PREER, L. B. (1967): Virus-like bodies in killer paramercia. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 58: 1774-1781.

PREER, J. R.,JR., PREER, L. B. & JURAND, A. (1974 A): *Kappa* and other endosymbionts in *Paramecium aurelia*. *Bacteriological Reviews* 38: 113-163.

PREER, L. B., RUDMAN, B. M., PREER, J. R.,JR., & JURAND, A. (1974 B): Induction of r bodies by ultraviolet light in killer paramercia. *Journal of General Microbiology* 80: 209-215

PREER, J. R.,JR. & JURAND, A. (1968): The relation between virus-like particles and r-bodies of *Paramecium aurelia*. *Genetical Research* 12: 331-340.

PREER, J. R.,JR. (1975): The hereditary symbionts of *Paramecium aurelia*. *Symposium of the Society of Experimental Biology* 29: 125-144.

QUACKENBUSH, R. L. & BURBACH, J. A. (1983): Cloning and expression of DNA sequences associated with the killer trait of *Paramecium tetraurelia* stock 47. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 80: 250-254.

QUACKENBUSH, R. L., DILTS, J. A. & COX, B. J. (1986): Transposon-like elements in *Caedibacter taeniospiralis*. *Journal of Bacteriology* 166: 349-352.

RUPANI, S., GU, M. B., KONSTANTINOV, K. B., DHURJATI, VAN DYK, T. K. & LAROSSA, R. A. (1996): Characterization of the stress response of a bioluminescent biological sensor in batch and continuous cultures. *Biotechnology Progress* 12: 387-392.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS (1989): *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

SCHAUDER, B., BLÖCKER, H., FRANK, R. & MCCARTHY, J. E. G. (1987): Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* *atpE* translational initiation region. *Gene* 52: 279-283.

SCHERZINGER, E., BAGDASARIAN, M. M., SCHOLZ, P., LURZ, R., RÜCKERT, B. & BAGDASARIAN, M. (1984): Replication of the broad host range plasmid RSF 1010: Requirement of three plasmid-encoded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 654-658.

SCHLEGEL, H. G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

SCHMIDT, H. J., GÖRTZ, H.-D., POND, R. F. & QUACKENBUSH, R. L. (1988): Characterization of *Caedibacter* endonucleobionts from the macronucleus of *Paramecium caudatum* and the identification of a mutant with blocked r-body synthesis. *Experimental Cell Research* 174: 49-57.

SCHOLZ, P., HARING, V., WITTMANN-LIEBOLD, B., ASHMAN, K., BAGDASARIAN, M. & SCHERZINGER, E. (1989): Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75: 271-288.

SMITH, F. D., HARPENDING, P. R. & SANFORD, J. C. (1992): Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal of General Microbiology* 138: 239-248.

SMITH-SONNEBORN, J. E. & VAN WAGTENDONK, W. J. (1964): Purification and chemical characterization of *kappa* of stock 51, *Paramecium aurelia*. *Experimental Cell Research* 33: 50-59.

SNYDER, L. & CHAMPNESS, W. (1997): Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington DC.

SONNEBORN, T. M. (1938): Mating types in *Paramecium aurelia*: diverse conditions for mating in different stocks; occurrence, number and interrelations of the types. *Proceedings in the American Philosophic Society* 79: 411-434.

SONNEBORN, T. M. (1943): Gene and cytoplasm. I. The determination and inheritance of the killer character in variety 4 of *Paramecium aurelia*. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 29: 329-338.

SONNEBORN, T. M. (1970): Methods in *Paramecium* research. In: Methods in Cell Physiology. Academic Press, New York.

SPRINGER, N. (1992): Phylogenie und in situ-Nachweis nicht-kultivierbarer bakterieller Endosymbionten. Dissertation an der Technischen Universität München.

SPRINGER, N., LUDWIG, W., AMANN, R., SCHMIDT, H. J., GÖRTZ, H.-D. & SCHLEIFER, K.-H. (1993): Occurrence of fragmented 16S rDNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. Proceedings of The National Academy of Sciences USA 90: 9892-9895.

STILLE, W. & DITTMANN (1998): Atherosklerose als Folge einer chronischen Infektion durch *Chlamydia pneumoniae*. Herz 23: 185-192.

STREMMEL, M. (1995): Experimente zur vergleichenden Untersuchung von „Killer-Paramecien“ der Arten *Paramecium caudatum* und *Paramecium aurelia*. Diplomarbeit des Institutes für Allgemeine Zoologie und Genetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

STRETTON, S., TECHKARNJANARUK, S., MCLENNAN, A. M. & GOODMAN, A. E. (1998): Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. Applied and Environmental Microbiology 64: 2554-2559.

STUURMAN, N., BRAS, C. P., SCHLAMAN, H. R. M., WIJFJES, A. H. M., BLOEMBERG, G. & SPAINK, H. P. (2000): Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 1163-1169.

SUAREZ, A., GÜTTLLER, A., STRÄTZ, M., STAENDER, L. H., TIMMIS, K. N. & GUZMÁN, C. A. (1997): Green fluorescent protein-based reporter systems for

genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* 196: 69-74.

SULO, P., GROOM, K. R., WISE, C., STEFFEN, M. & MARTIN, N. (1995): Successful transformation of yeast mitochondria with RPM1: an approach for in vivo studies of mitochondrial RNase P RNA structure, function and biosynthesis. *Nucleic Acids Research* 23: 856-860.

SZALLIS, A. (1995): Isolierung von *Caedibacter caryophila*, ein Bakterium aus dem Makronukleus von *Paramecium caudatum*, und Isolierung von Phagen-DNA aus *Caedibacter caryophila*. Studienarbeit des Biologischen Institutes der Universität Stuttgart.

TALLAN, I. (1959): Factors involved in infection by the *kappa* particles in *Paramecium aurelia*, syngen 4. *Physiological Zoology* 32: 78-89.

TALLAN, I. (1961): A cofactor required by *kappa* in the infection of *Paramecium aurelia* and its possible action. *Physiological Zoology* 34: 1-13.

THANABALU, T., HINDLEY, J., BRENNER, S., OEI, C. & BERRY, C. (1992): Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* und *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Applied Environmental Microbiology* 58: 905-910.

THEEGARTEN, D., MOGILEVSKI, G., ANHENN, O., STAMATIS, G., JAESCHOCK, R. & MORGENROTH, K. (2000): The role of *Chlamydia* in the pathogenesis of pulmonary emphysema. *Virchows Archiv* 437: 190-193.

TJADEN, J., WINKLER, H. H., SCHWÖPPE, C., VAN DER LAAN, M., MÖHLMANN, T. & NEUHAUS, H. E. (1999): Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia*

*trachomatis*, on for the net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. Journal of Bacteriology 181: 1196-1202.

VAN DYK, T. K., MAJARIAN, W. R., KONSTANTINOV, K. B., YOUNG, R. M., DHURJATI, P. S. & LAROSSA, R. A. (1994): Rapid and sensitiv pollutant detection by induction of the heat-shock gene-bioluminescence gene fusions. Applied and Environmental Microbiology 60: 1414-1420.

WARD, W. W. & BOKMAN, S. H. (1982): Reversible renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of renatured protein. Biochemistry 21: 4535-4540.

WEGMANN, S. (2001): Einflüsse von *Caedibacter*-Symbionten auf Räuber-Beute Beziehungen bei *Paramecium tetraurelia*. Diplomarbeit des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern.

WIRTH, R., FRIESENEGGER, A. & FIEDLER, S. (1989): Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. Molecular & General Genetics 216: 175-177.

WHO, (1999): Malaria, 1982 –1997. Weekly Epidemiological Record 74: 265-270.

## 7 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Ökologie des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern unter der Leitung von PD Dr. J. Kusch angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen sowie für die Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. J. Schmidt möchte ich für seine freundliche Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. J. W. Deitmer und Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl danke ich für ihre Bereitschaft zur Mitarbeit in meiner Promotionskommission.

Frau Prof. Dr. H. Anke (Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung, Kaiserslautern) danke ich für die Unterstützung bei den fluoreszenzspektrometrischen Messungen.

Herrn PD Dr. R. Tenhaken und Herrn PD Dr. U. Conrad danke ich für die Unterstützung bei den Biolistik-Experimenten und die Bereitstellung der Particle-Gun.

Herrn Prof. Dr. S. E. Lindow (University of California, Berkeley, USA) danke ich herzlich für die Überlassung der unterschiedlichen Promotor-Sondenvektoren.

Herrn Prof. Dr. A. Klier (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) danke ich für die Bereitstellung des Plasmids RSF1010.

Herrn Prof. Dr. C. A. Guzman (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) danke ich für die Überlassung des Plasmids pASV2.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Ökologie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und anregende Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. D. O. Wolf für ihre ständige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und die unermühtlichen Korrekturen und Ratschläge.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit in jeglicher Weise unterstützt haben. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht!

## **Curriculum vitae**

### **Lars Czubatinski**

Diplom-Biologe

\* 21.9.1970 in Kaiserslautern

ledig

Hauptstr. 68

67685 Weilerbach

### **Schulbildung**

1977 -1979

Grundschule „Im Schulhof“ Landau / Pfalz

1979 - 1981

Grundschule Weilerbach

1981 - 1990

Integrierte Gesamtschule Kaiserslautern Süd

25.5.1990

Allgemeine Hochschulreife

### **Ersatzdienst**

1.10.1990 – 31.12.1991

Malteser Hilfsdienst Kaiserslautern

### **Hochschulausbildung**

Okt. 1992 – Juni 1998

Studium der Biologie / Universität Kaiserslautern

22.6.1998

Diplom im Fach Biologie

seit Okt. 1998

Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Ökologie des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Herrn PD Dr. J. Kusch

Okt.1998 – Juli 2001

wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Biologie / Universität Kaiserslautern

Okt. 1998 – Sept. 2001

Studium für das Lehramt an Gymnasien; Biologie / Chemie

28.9.2001

Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien für die Fächer Biologie / Chemie

### **Schuldienst**

seit 1.2.2002

Studienreferendar am Staatlichen Studienseminar für das Lehramt an Gymnasien in Kaiserslautern