

**Etablierung eines experimentellen Systems zur
Untersuchung von Endosymbiosen im Ciliaten**

Tetrahymena pyriformis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



seit 1558

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplombiologin Lisa Siegmund

geboren am 17.04.1989 in Gera

Jena, Februar 2017

Gutachter:

Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer (Universität Jena)

Prof. Dr. Martin Fischer (Universität Jena)

PD Dr. Michael Schweikert (Universität Stuttgart)

Datum der öffentlichen Disputation: 13.06.2017

Stillstand ist der Tod. Geh voran! Bleibt alles anders.

Herbert Grönemeyer – Bleibt alles anders

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	- 4 -
2 Einführung	- 8 -
2.1 <i>Tetrahymena pyriformis</i>	- 8 -
2.1.1 Morphologie und Zellzyklus.....	- 8 -
2.1.2 Ingestion und Verdauung.....	- 12 -
2.1.3 <i>Tetrahymena</i> als Modellorganismus.....	- 18 -
2.1.4 <i>Tetrahymena</i> in Interaktionen mit Mikroorganismen.....	- 19 -
2.2 Endosymbiosen	- 23 -
2.2.1 Endosymbiosen in Ciliaten	- 23 -
2.2.2 Endosymbiosemodelle	- 32 -
2.3 Ziele dieser Arbeit	- 34 -
3 Material und experimentelle Techniken.....	- 35 -
3.1 Geräte und Verbrauchsmittel.....	- 35 -
3.2 Chemikalien.....	- 37 -
3.3 Stämme, Stammhaltung und Kultivierung.....	- 40 -
3.3.1 <i>Tetrahymena pyriformis</i>	- 40 -
3.3.2 <i>Escherichia coli</i>	- 41 -
3.3.2.1 Charakterisierung der Transformanten von <i>Escherichia coli</i>	- 42 -
3.3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> pBS-neoTet	- 43 -
3.3.2.1.2 <i>Escherichia coli</i> pNeo4.....	- 44 -
3.3.2.1.3 <i>Escherichia coli</i> pNeo4-DsRed.....	- 45 -
3.3.2.1.4 <i>Escherichia coli</i> pEGFP-neo.....	- 46 -
3.3.2.2 Kurieren des F-Plasmids	- 46 -
3.3.2.3 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration von Paromomycin	- 48 -
3.3.3 Cokultivierung von <i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i>	- 48 -
	- 1 -

3.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	- 49 -
3.5	Isolierung von Plasmid-DNA	- 50 -
3.6	Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven	- 52 -
3.7	Herstellung synthetischer Mikropartikel	- 54 -
3.8	Chemische Oberflächenmodifikation von <i>Escherichia coli</i>	- 55 -
3.9	Fütterungsexperimente mit <i>Tetrahymena pyriformis</i>	- 56 -
3.10	Mikroskopie.....	- 57 -
3.10.1	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	- 57 -
3.10.2	Transmissionselektronenmikroskopie	- 59 -
3.11	Polymerase-Kettenreaktion	- 62 -
4	Ergebnisse und Auswertung.....	- 66 -
4.1	Cokultivierung von <i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i>	- 66 -
4.2	Paromomycinverträglich in Abhängigkeit der Kultivierung.....	- 74 -
4.3	Verfütterung synthetischer Mikropartikel an <i>Tetrahymena pyriformis</i>	- 84 -
4.3.1	Eignung synthetischer Mikropartikel als Nahrungsquelle.....	- 84 -
4.3.2	Einfluss der Oberflächeneigenschaften synthetischer Mikropartikel	- 93 -
4.4	Einfluss bakterieller Oberflächen	- 95 -
4.4.1	Einfluss der Sex-Pili von <i>Escherichia coli</i> auf das Entkommen aus Nahrungsvakuolen	- 96 -
4.4.2	Einfluss chemisch modifizierter, definierter Bakterienoberflächen	- 100 -
5	Diskussion	- 134 -
5.1	Die Internalisierung von <i>Escherichia coli</i> in <i>Tetrahymena pyriformis</i>	- 134 -
5.2	Einfluss verschiedener Cokulturen auf die Paromomycinsensitivität	- 139 -
5.3	Die Eignung synthetischer Mikropartikel als künstliche Futterpartikel.....	- 140 -
5.4	Einfluss definierter Oberflächeneigenschaften auf die Ingestion.....	- 142 -
5.5	Einfluss modifizierter Bakterienoberflächen auf die Verdauung und das Entkommen aus Nahrungsvakuolen.....	- 144 -
5.5.1	Beteiligung der Sex-Pili am Entkommen aus Nahrungsvakuolen.....	- 144 -

5.5.2 Einfluss chemisch modifizierter Bakterienoberflächen.....	- 146 -
6 Literaturverzeichnis.....	- 149 -
7 Abkürzungsverzeichnis.....	- 170 -
8 Abbildungsverzeichnis.....	- 171 -
9 Anhang.....	- 178 -
9.1 Sequenzen für die Erstellung der Primer.....	- 178 -
9.1.1 Phosphoglyceratkinase-Gen.....	- 178 -
9.1.2 Cytochrom-Oxidase Untereinheit I.....	- 180 -
9.1.3 Ampicillin-Resistenzgen.....	- 181 -
9.1.4 Neomycinresistenzgen.....	- 182 -
10 Wissenschaftliche Publikationen und Beiträge.....	- 183 -
10.1 Publikationen mit korrespondierender Autorenschaft.....	- 183 -
10.2 Publikationen mit Beteiligung.....	- 183 -
10.3 Wissenschaftliche Beiträge auf Tagungen.....	- 184 -
10.4 Bücher.....	- 185 -
11 Curriculum vitae.....	- 186 -
12 Danksagung.....	- 188 -
13 Ehrenwörtliche Erklärung.....	- 189 -

1 Zusammenfassung

Endosymbiosen sind ein häufiges Phänomen und innerhalb nahezu aller Organismengruppen zu finden. Besonders in Ciliaten sind diese Assoziationen sehr vielfältig und abundant. In zahlreichen Untersuchungen wurden viele dieser Interaktionen näher charakterisiert. Dennoch ist wenig über die mechanistischen Ursprünge bekannt, die zur Etablierung von Endosymbiosen führen, und es liegt nahe, dass bereits seit langem bestehende Beziehungen nur wenig Rückschlüsse auf deren Entstehung zulassen. Um die initialen Schritte solcher Interaktionen studieren zu können, bedarf es eines Labormodells, das die Untersuchung der Initiation solcher Ereignisse ermöglicht. Ein geeignetes Modell hierfür stellt die Interaktion von *Tetrahymena pyriformis* mit *Escherichia coli* dar.

Ein logischer und notwendiger erster Schritt auf dem Weg zu Endosymbiosen stellt das Entkommen des potentiellen Symbionten aus den Nahrungsvakuolen des Wirts dar. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass *Escherichia coli* ohne zusätzliche Manipulation in der Lage ist, die Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* zu umgehen und sogar aus deren Nahrungsvakuolen zu entkommen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten diese Beobachtung. Somit ist die erste, zwingende Bedingung zum Studium der Etablierung von Endosymbiosen mit diesem Modell erfüllt.

Außerdem ließen sich beide Partner durch selektiv gewählte Bedingungen zu einer längerfristigen, endosymbiontischen Assoziation zwingen. Nach Zugabe des Antibiotikums Paromomycin hatten vor allem solche *Tetrahymena pyriformis* Kulturen Vorteile beim Überleben der toxischen Bedingungen, die mit Transformantenstämmen von *Escherichia coli* vergesellschaftet waren, die Resistenzgene für das Antibiotikum beherbergten. Fluoreszenz- und transmissionselektronenmikroskopisch wurden die Bakterien nach Antibiotikumbehandlung im Cytoplasma von *Tetrahymena pyriformis* nachgewiesen. Des Weiteren konnte über die Polymerase-Kettenreaktion bis zu zwei Wochen nach der Applikation von Paromomycin bakterielle DNA innerhalb der Ciliaten detektiert werden. Die Kultivierbarkeit von *Escherichia coli* war nach der Internalisierung allerdings beeinträchtigt und Ergebnisse hierzu waren nicht durchgängig reproduzierbar. Dennoch sind zusammengekommen die grundlegenden

Ansprüche an ein Labormodell zum Studium der Entstehung von Endosymbiosen erfüllt, da *Escherichia coli* einerseits aus Nahrungsvakuolen entkommen kann, andererseits aber auch über einen längeren Zeitraum in *Tetrahymena pyriformis* persistiert.

Um klären zu können, wie *Escherichia coli* aus den Nahrungsvakuolen entkommen kann, wurden mehrere experimentelle Linien verfolgt. Da sich die gezielte, genetische Manipulation der Bakterienoberfläche als schwierig herausstellte, wurden die Effekte biochemisch und biophysikalisch definierter Oberflächen auf Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* zunächst anhand synthetischer Mikropartikel untersucht. Über verschiedene Färbetechniken und die Erstellung von Wachstumskurven wurde deutlich, dass *Tetrahymena pyriformis* die angebotenen Partikel ingestiert und verdaut, diese also folglich als Nahrungsquelle akzeptiert. Daraus resultiert, dass die synthetischen Mikropartikel als künstlicher Nahrungersatz zum Studium der Effekte definierter Oberflächen eingesetzt werden können. Dabei haben unterschiedliche, kovalent gebundene Substanzen einen erheblichen Effekt auf die Ingestion, aber auch auf die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis*.

Auf der Basis dieser Modellexperimente wurde der Modifikationsprozess so angepasst, dass *Escherichia coli* prinzipiell vergleichbar chemisch modifiziert wird und dennoch diesen Prozess überleben kann. Vor allem solche Substanzen, die zu einer gesteigerten Hydrophobie der Zelloberfläche führten, erhöhten die Frequenz des Entkommens aus Nahrungsvakuolen erheblich. Auch Substanzen, die nach der Kopplung basisch sind, beeinträchtigten die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* und bewirkten das Entkommen der Bakterien aus den Nahrungsvakuolen. Ursächlich hierfür ist das Verhindern des Ansäuerns von Nahrungsvakuolen, wie die Färbung mit einem pH-Indikatorfarbstoff zeigte.

Auch die Fähigkeit zur Bildung von Sex-Pili beeinflusst das Entkommen aus Nahrungsvakuolen. Somit ist zusammenfassend festzuhalten, dass bakterielle Oberflächeneigenschaften eine bedeutende Rolle für die Initiation von Endosymbiosen spielen, da sie die Entkommensraten aus Nahrungsvakuolen stark beeinflussen.

Summary

Endosymbiosis is a common phenomenon among almost all groups of organisms. These associations occur frequently and in considerable variety especially among ciliates. Numerous studies characterised a lot of these interactions in detail. Until now, however, little is known about the mechanistic origins that give rise to establishing endosymbiotic associations. It appears logical that endosymbioses existing for a long time reveal no further clues on their origins and initiation. Therefore, a laboratory model is required for studying very initial steps in endosymbiosis establishment. This model is possibly provided by the interaction between *Tetrahymena pyriformis* and *Escherichia coli*.

A logical and necessary step towards establishing an endosymbiotic association is the escape from food vacuoles of the host by food bacteria. Fluorescence micrographs showed that *Escherichia coli* is able to evade digestion and subsequently to leave food vacuoles of *Tetrahymena pyriformis* without any manipulation. Transmission electron microscopy confirmed this observation. In consequence, the first necessary prerequisite for studying endosymbiotic establishment is fulfilled.

Furthermore, by applying selective conditions, both partners could be forced into a long-term endosymbiotic association. After applying the antibiotic Paromomycin, such cultures of *Tetrahymena pyriformis* showed advantages in handling the toxic conditions, which were associated with transformant strains of *Escherichia coli* conferring resistance genes for the antibiotic. Fluorescence and transmission electron microscopy identified bacteria in the cytoplasm of *Tetrahymena pyriformis* after treatment with Paromomycin. Additionally, polymerase chain reaction detected bacterial DNA inside the ciliates until two weeks after application of the antibiotic. Cultivation of *Escherichia coli* on solid media was impaired after internalisation and results were not reproducible in every case studied. However, taking all evidence together, the basic requirements for a laboratory model for studying the development of endosymbiosis are accomplished, since *Escherichia coli*, on the one hand, is able to escape from food vacuoles of *Tetrahymena pyriformis*. On the other hand, the bacterium is able to persist within the ciliate for a longer duration.

Different approaches were used to clarify how *Escherichia coli* manages to escape from food vacuoles. Since defined genetic surface manipulation turned out not being feasible, the effects of defined biochemical and biophysical surface traits on ingestion and digestion of *Tetrahymena pyriformis* were initially studied by feeding synthetic microparticles. Different staining techniques as well as growth curves revealed that *Tetrahymena pyriformis* ingests and digests the offered particles and, thus, accepts these particles as food source. In consequence, the particles serve as synthetic food for studying the effects of defined surface traits. Different substances, covalently coupled to the surface of the particles, affect ingestion as well as digestion of *Tetrahymena pyriformis*.

Based on these observations, the process of chemical surface modification was adapted to alter the surface of *Escherichia coli* in such a way that the bacteria remain viable in sufficient numbers. Especially substances leading to increased surface hydrophobicity were highly effective in enhancing the frequency of bacterial escapes from food vacuoles. Additionally, substances conferring alkaline properties after coupling, impair the digestion of *Tetrahymena pyriformis*, resulting in increased escape rates. This effect is caused by hindering the proper acidification of food vacuoles, shown by staining with a pH-indicator. Also the ability to form sex-pili of *Escherichia coli* influences the frequency of escape events. In summary, bacterial surface traits play an important role in initiation of endosymbiosis, since they highly affect escape rates from food vacuoles.

2 Einführung

Die nachfolgenden Anführungen sollen dem Leser einen Überblick über die Hintergründe vermitteln, die einerseits den Stand des Wissens und somit den Ausgangspunkt für das Thema dieser Dissertation beschreiben, und andererseits die Beweggründe für die experimentellen Studien verdeutlichen.

2.1 *Tetrahymena pyriformis*

Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg, 1830) Lwoff, 1947 ist ein heterotropher, einzelliger Organismus und gehört zum Taxon Ciliophora, welche wiederum zu den Alveolata gezählt werden (Adl *et al.*, 2005). Das namensgebende Merkmal der Ciliaten sind die zumeist über die gesamte Zelloberfläche verteilten, oft in Reihen angeordneten Cilien, bei *Tetrahymena pyriformis* normalerweise 17 bis 21 Reihen (Corliss, 1973), die der gerichteten Fortbewegung dienen. Sie sind unterhalb der komplexen Cortexstruktur bestehend aus Plasmamembran, Alveoli (flache Vesikel unterhalb der Zellmembran) und Microfilamenten mit dem Cytoskelett verankert. Aufgrund dieses komplexen Aufbaus ist Phagocytose nur in einem definierten und spezialisierten Bereich der Zelloberfläche möglich, dem Cytostom. Es besteht, zumindest bei *Tetrahymena*, aus vier membranartig angeordneten Cilienreihen, die durch koordinierte Schlagrhythmen dem Einstrudeln von Nahrungspartikeln in entstehende Nahrungsvakuolen dienen (siehe folgende Kapitel). Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Ciliophora stellt der Zellkerndimorphismus dar. Der Micronucleus übernimmt generative, der Macronucleus somatische Funktionen. Im Macronucleus können etliche Gene in mehreren Kopien vorliegen. Im Anschluss an die Konjugation wird er aus den macronuclearen Anlagen, Teilungsprodukte des micronuclearen Synkaryons, neu gebildet, während der alte degeneriert (Martindale *et al.*, 1982).

2.1.1 Morphologie und Zellzyklus

Das namensgebende Merkmal der Gattung *Tetrahymena* ist das Membransystem, das das Cytostom umgibt (Abb. 2-1).

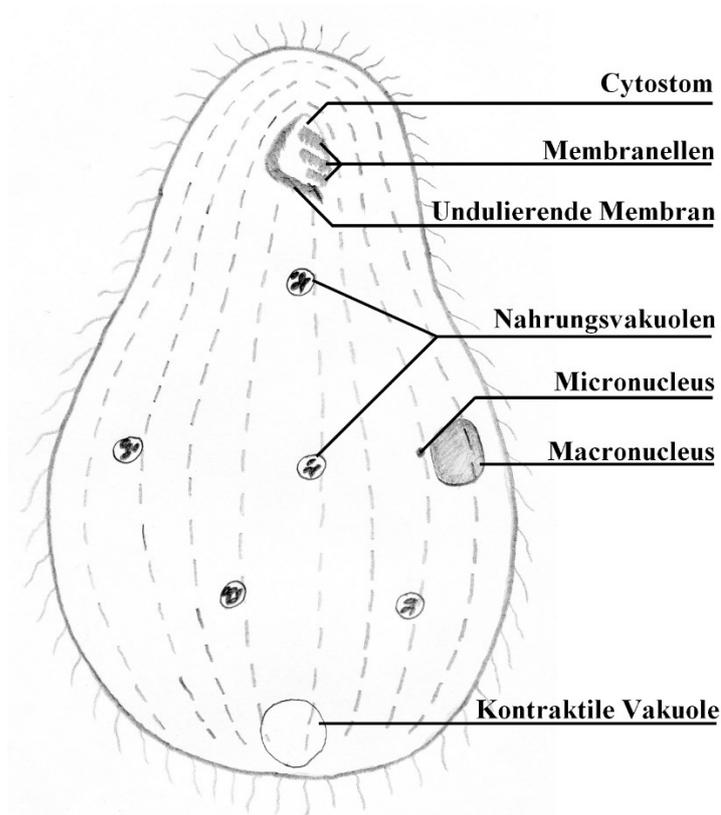


Abb. 2-1: Schematische Darstellung von *Tetrahymena pyriformis*. Das Cytostom ist rechts von der undulierenden Membran umgrenzt, links liegen die drei Membranellen. Die gesamte Zelloberfläche ist mit in Reihen angeordneten Cilien bedeckt (an der Außenseite dargestellt, die gestrichelten Linien entsprechen den Cilienreihen). Mittig liegen sowohl Micro- als auch Macronucleus. Nahrungsvakuolen sind im gesamten Organismus je nach Verdauungsstadium verteilt. Posterior liegen Cytoproct und die kontraktile Vakuole.

Die vier Membranen setzen sich jeweils aus Cilienreihen zusammen. Die größere, das Cytostom rechtsseitig umgebende, ist die undulierende Membran, links liegen die drei kleineren Membranellen. Alle zusammen dienen dem Einstrudeln von Nahrungspartikeln, die phagocytotisch am Cytostom aufgenommen werden. Aufgrund der komplexen Struktur des Cortexes ist Phagocytose ausschließlich in diesem speziellen Bereich möglich. Die Nahrungsvakuolen werden während der Verdauung an das posteriore Ende der Zelle transportiert und deren Inhalt wird über den dort befindlichen Cytoproct ausgeschieden. Ebenfalls posterior und ventrolateral liegt die pulsierende Vakuole, die über zwei Poren überschüssiges Wasser aus dem Ciliaten pumpt.

Der Artnamen *pyriformis* leitet sich vom birnenförmigen Habitus von *Tetrahymena pyriformis* ab. Die Zellen sind durchschnittlich etwa 50 µm lang und 30 µm breit, dabei läuft das anteriore Ende eher spitz zu, während das posteriore abgerundet ist. In Abhängigkeit von Kulturbedingungen ändert sich die Zellform allerdings (Corliss, 1973; Abb. 2-2).

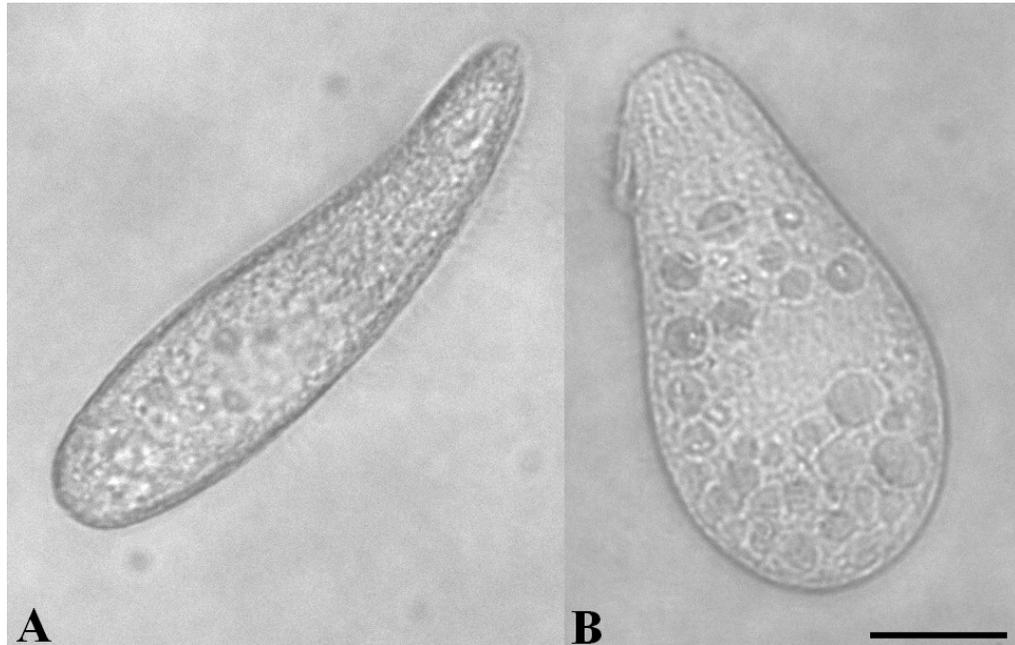


Abb. 2-2: Lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich kultivierter Individuen von *Tetrahymena pyriformis*. A: Individuum aus axenischer Kultur. B: Individuum nach Zugabe von Futterbakterien. Der Vergleich beider Individuen verdeutlicht den Einfluss von Kulturbedingungen auf den Habitus des Ciliaten. Maßstab: 20 µm.

Die eher längliche Form findet sich vor allem bei axenischer Kultivierung oder in Hungerkulturen. In Anwesenheit von Futterbakterien oder anderem partikulärem Material zeigt *Tetrahymena pyriformis* die typische, rundliche Form, weil mehr Nahrungsvakuolen gebildet werden.

Tetrahymena pyriformis weist üblicherweise einen Zellkerndimorphismus auf. Durch lang andauernde axenische Kultivierung kann der Micronucleus allerdings verloren gehen. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm ist amiconucleat (Abb. 2-3).

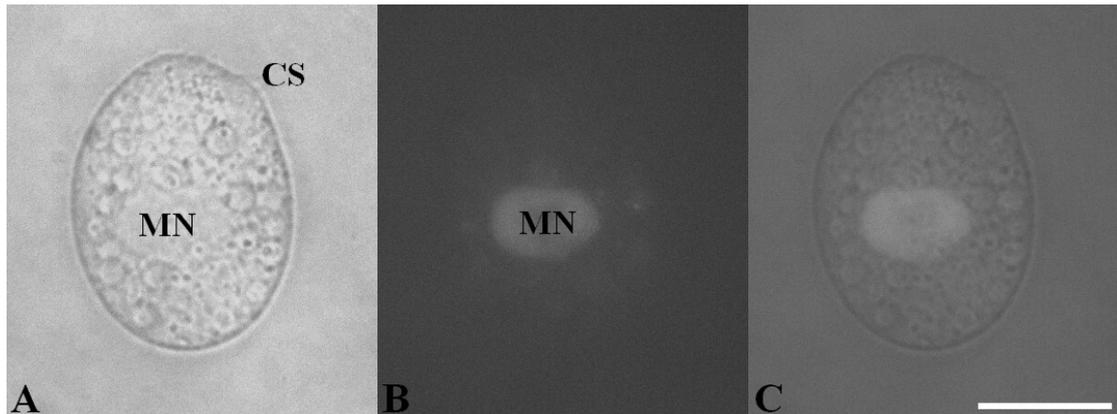


Abb. 2-3: Mikroskopische Aufnahmen eines axenisch kultivierten Individuums von *Tetrahymena pyriformis* nach der Färbung mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. C: Mischbild aus Licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. In der Fluoreszenzaufnahme ist nur der Macronucleus gefärbt und sichtbar. Die leichte Fluoreszenz einiger Nahrungsvakuolen zeigt, dass vermutlich DNA-Reste lysierter Zellen aus dem Kulturmedium aufgenommen wurden. CS: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μm .

Amicronucleate Stämme sind steril, können also nicht mehr mit einem Kreuzungspartner konjugieren. Vor Zellteilungen wird deshalb der Macronucleus, der sich meist leicht posterior der Mittellinie befindet, repliziert. *Tetrahymena pyriformis* teilt sich entlang der Querachse (Abb. 2-4).

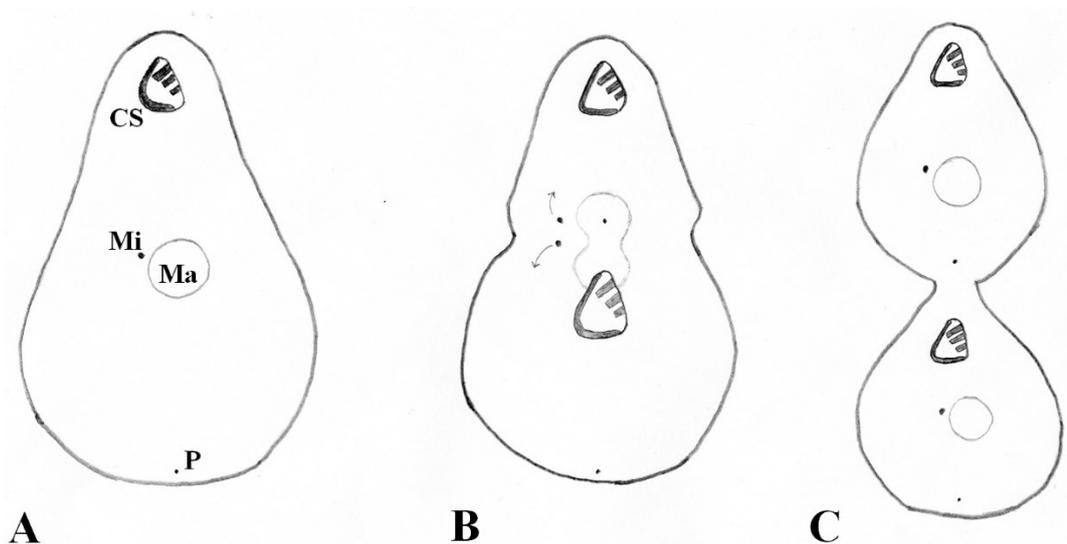


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis*. A: Darstellung vor der Zellteilung. CS: Cytostom. Ma: Macronucleus. Mi: Micronucleus. P: Pore der kontraktiven Vakuole. B: Darstellung eines späteren Stadiums der Zellteilung. Das Cytostom der posterioren Tochterzelle sowie die

kontraktile Vakuole und deren Pore der anterioren Tochterzelle sind bereits fertig ausgebildet. Die mitotisch geteilten Micronuclei migrieren in die Tochterzellen und der Macronucleus befindet sich in der Teilungsphase. Die Teilungslinie ist bereits sichtbar. C: Stadium kurz vorm Beenden der Zellteilung. Beide Nuclei sind jeweils auf die Tochterzellen verteilt und nur noch eine schmale Brücke verbindet beide miteinander.

Der Zellzyklus von *Tetrahymena pyriformis* wurde umfangreich untersucht (Scherbaum und Zeuthen, 1954; Holz, 1960; Frankel, 1967; Sleight, 1973). Sobald der Macronucleus in die S-Phase des Zellzyklus eintritt, beginnen die Vorbereitungen für die Zellteilung. Die erste sichtbare Veränderung ist die Bildung neuer Basalkörper der Cilienreihen des Cytostoms posterior der Zellteilungslinie. Die anterior gelegene Tochterzelle behält in der Regel die bereits vorhandene Buccalregion. Die Fertigstellung des neu gebildeten Cytostoms geht zeitlich mit der micronuclearen Mitose einher, falls ein Micronucleus vorhanden ist. In etwa zeitgleich bildet sich eine neue kontraktile Vakuole in der später anterioren Tochterzelle aus, die mit der Migration der Micronuclei ihre Funktion aufnimmt. Die posteriore Tochterzelle behält die bereits vorhandene kontraktile Vakuole. Auch die Initiation der Teilung des Macronucleus sowie die Erscheinung der äquatorialen Teilungslinie der Zelle fallen in diesen Zeitraum. Entlang der Teilungslinie liegen Microfibrillen, die die Verbindung zwischen beiden Tochterzellen durch Kontraktion kontinuierlich verengen, bis nur noch eine schmale Brücke übrig bleibt. Sobald diese reißt, ist die Zellteilung abgeschlossen (Sleight, 1973).

2.1.2 Ingestion und Verdauung

Sowohl Ingestion als auch Verdauung wurden an *Tetrahymena pyriformis* recht umfangreich untersucht. Das Verständnis beider Prozesse ist essentiell bei der Identifikation von Prozessen, an denen aufgenommene Bakterien intervenieren, um der Verdauung zu entgehen oder sogar aus Nahrungsvakuolen zu entkommen.

Tetrahymena pyriformis kann auf Basis von Pinocytose nur schwer überleben (Holz, 1973) und nimmt Nährstoffe hauptsächlich phagocytotisch am Cytostom auf. Dabei ist der Ciliat auf Partikel im umgebenden Medium als Anreiz für die Ingestion angewiesen (Rasmussen und Kludt, 1970). Die Autoren verglichen das Wachstum von *Tetrahymena pyriformis* in autoklaviertem und sterilfiltriertem Proteose-Pepton-Medium. Die Filtration entfernt selbst kleinste Partikel aus dem Medium. Die Generationszeit erhöhte

sich in diesem Fall auf 40 Stunden im Gegensatz zu etwa fünf Stunden im autoklavierten Medium. Die Zugabe biotischer oder abiotischer Partikel zum Medium bewirkt ebenfalls die Verkürzung der Generationszeit (Rasmussen und Kludt, 1970; Rasmussen und Modeweg-Hansen, 1973). Partikuläres Material stimuliert die Bildung von Nahrungsvakuolen. Je mehr Nahrungsvakuolen gebildet werden, desto mehr Partikel und sie umgebendes Medium werden aufgenommen, sodass sich *Tetrahymena pyriformis* schneller vermehren kann.

Tetrahymena pyriformis kann vor der Ingestion zwischen biotischen und abiotischen Partikeln unterscheiden. Wenn einer Hungerkultur Bakterien und kolloidales Gold gleichzeitig dargeboten werden, werden ausschließlich die Bakterien aufgenommen, das Gold wird nur in Abwesenheit von Bakterien eingestrudelt (Elliott und Clemmons, 1966). Vergleichbare Ergebnisse erhielt Ricketts (1971a) beim Verfüttern von Latexpartikeln an Hungerkulturen von *Tetrahymena pyriformis*, die im Gegensatz zu einer Hefe-Suspension oder Pepton kaum aufgenommen wurden. In Vollmedien zeigte *Tetrahymena pyriformis* dieses Selektivverhalten nicht.

Tetrahymena pyriformis kann nicht nur zwischen biotischen und abiotischen Partikeln unterscheiden, sondern erkennt auch unterschiedliche Substanzen vor der Ingestion. Während Peptide, wie z. B. Proteose-Pepton oder Rinderserumalbumin, Polypeptide oder RNA die Ingestionsrate effektiv erhöhen, beeinflussen Aminosäure-Mixturen, Glutamat, Polysaccharide oder Glucose die Aufnahmerate kaum, Natriumacetat gar nicht (Ricketts, 1972). Die Ladung der angebotenen Stoffe spielt nur eine untergeordnete Rolle beim Stimulieren der Nahrungsvakuolenbildung (Rasmussen und Modeweg-Hansen, 1973). Partikel mit positiver, negativer oder neutraler Nettoladung bei gleicher Größe hatten alle einen ähnlich positiven Effekt auf Aufnahme und Wachstumsrate von *Tetrahymena pyriformis*, wenn sie dem sterilfiltrierten Proteose-Pepton-Medium hinzugegeben wurden.

Wie *Tetrahymena pyriformis* unterschiedliche Nahrungsquellen erkennen kann, ist bislang unklar. Studien an anderen Protozoen zeigen mehrere Möglichkeiten. Verschiedene Lectine sind an der Erkennung und Bindung von Nahrung beim Dinoflagellaten *Oxyrrhis marina* (Wootton *et al.*, 2007) und bei der Amöbe *Vermamoeba* (früher *Hartmannella*) *vermiformis* (Venkataraman *et al.*, 1997) beteiligt.

Bei *Acanthamoeba castellanii* ist ein mannosebindendes Protein beim Erkennen und Internalisieren von Hefezellen involviert (Allen und Dawidowicz, 1990). Eine Bindungsstudie mit *Euplotes mutabilis* zeigte mehrere verschiedene Lectinbindungsstellen am Cytostom. Insgesamt acht von neun getesteten Lectinen binden an das Cytostom und/oder die Nahrungsvakuolen. Zudem bindet das Lectin Weizenkeimagglutinin an den basalen Teil frontaler Membranellen, die an der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Die verschiedenen Lectinbindungsstellen sind vermutlich an der selektiven Aufnahme von Nahrungspartikeln beteiligt (Wilks und Sleight, 2004).

Tetrahymena pyriformis nimmt Nahrung hauptsächlich phagocytotisch am Cytostom auf. Die Nahrungsvakuolenbildung ist in vier Phasen eingeteilt (Nilsson, 1977; Abb. 2-5).

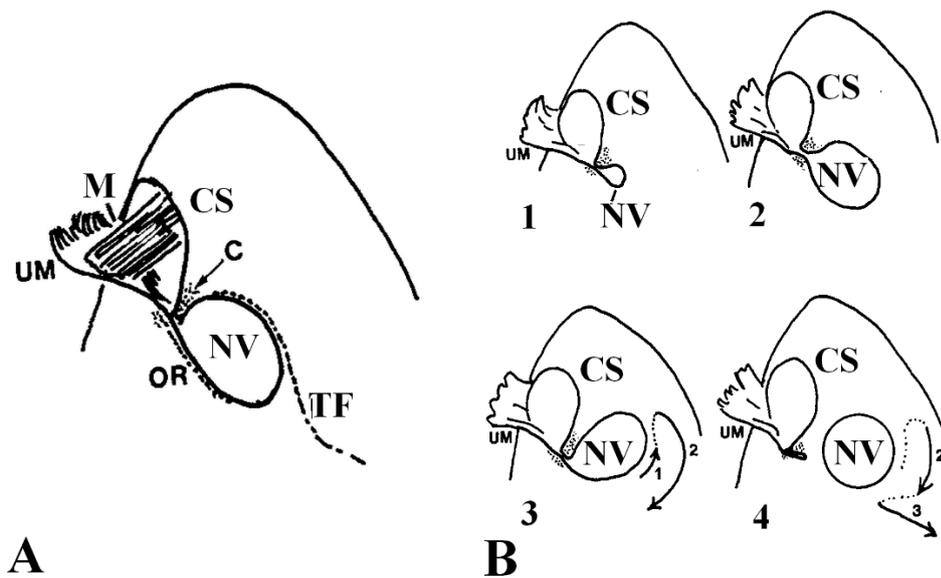


Abb. 2-5: Schematische Darstellung der Nahrungsvakuolenbildung bei *Tetrahymena pyriformis*. A: Übersicht der Buccalregion von *Tetrahymena pyriformis*. C: mikrofilamentreiches Cytoplasma im Bereich der cytostomalen Lippe. CS: Cytostom. M: Membranelle. NV: Nahrungsvakuole. OR: oral ridge. TF: Tiefe Faser. B: Darstellung des Ablaufs der Vakuolenbildung. Die entstehende, zum Cytostom hin geöffnete Nahrungsvakuole wird sukzessiv erweitert (1) und anschließend befüllt, wenn sie ausgewachsen ist (2). Sobald sie voll ist, wird sie verschlossen und leicht nach anterior verschoben (3). Abschließend wird die fertige Nahrungsvakuole entlang der Pfeilrichtung nach posterior transportiert (4) und die Verdauung initiiert. Der am Cytostom verbleibende schlauchförmige Rest dient als Grundlage für die nächste Nahrungsvakuole (modifiziert nach Nilsson, 1977).

Die naszierende Nahrungsvakuole liegt links und posterior vom Cytostom. Zunächst wird der schlauchförmige Fortsatz am Cytostom erweitert. Dieser Prozess dauert fünf bis zehn Sekunden. Die expandierte Nahrungsvakuole wird anschließend durch gleichmäßiges Schlagen von undulierender Membran und der Membranellen mit Nahrungspartikeln gefüllt (ca. 20 sec) und verschlossen. Dabei wird sie leicht nach anterior verschoben. Sobald sie vollständig vom Cytostom gelöst ist, wird sie nach posterior, vermutlich entlang der tiefen Faser, transportiert. Der gesamte Prozess dauert etwa 20 bis 60 Sekunden (Nilsson, 1977).

Nachdem sich die Nahrungsvakuole vollständig vom Cytostom gelöst hat, kann der Verdauungsprozess initiiert werden. Ingestion allein reicht aber nicht als Stimulus aus. Die Verdauung wird nur eingeleitet, wenn sich verdaubares Material in den Nahrungsvakuolen befindet, wie Ricketts (1971a) durch Messung des Anstiegs der sauren Phosphatase-Aktivität zeigte. Die Verdauung ist in acht Phasen unterteilt (Nilsson, 1977; 1987; Abb. 2-6).

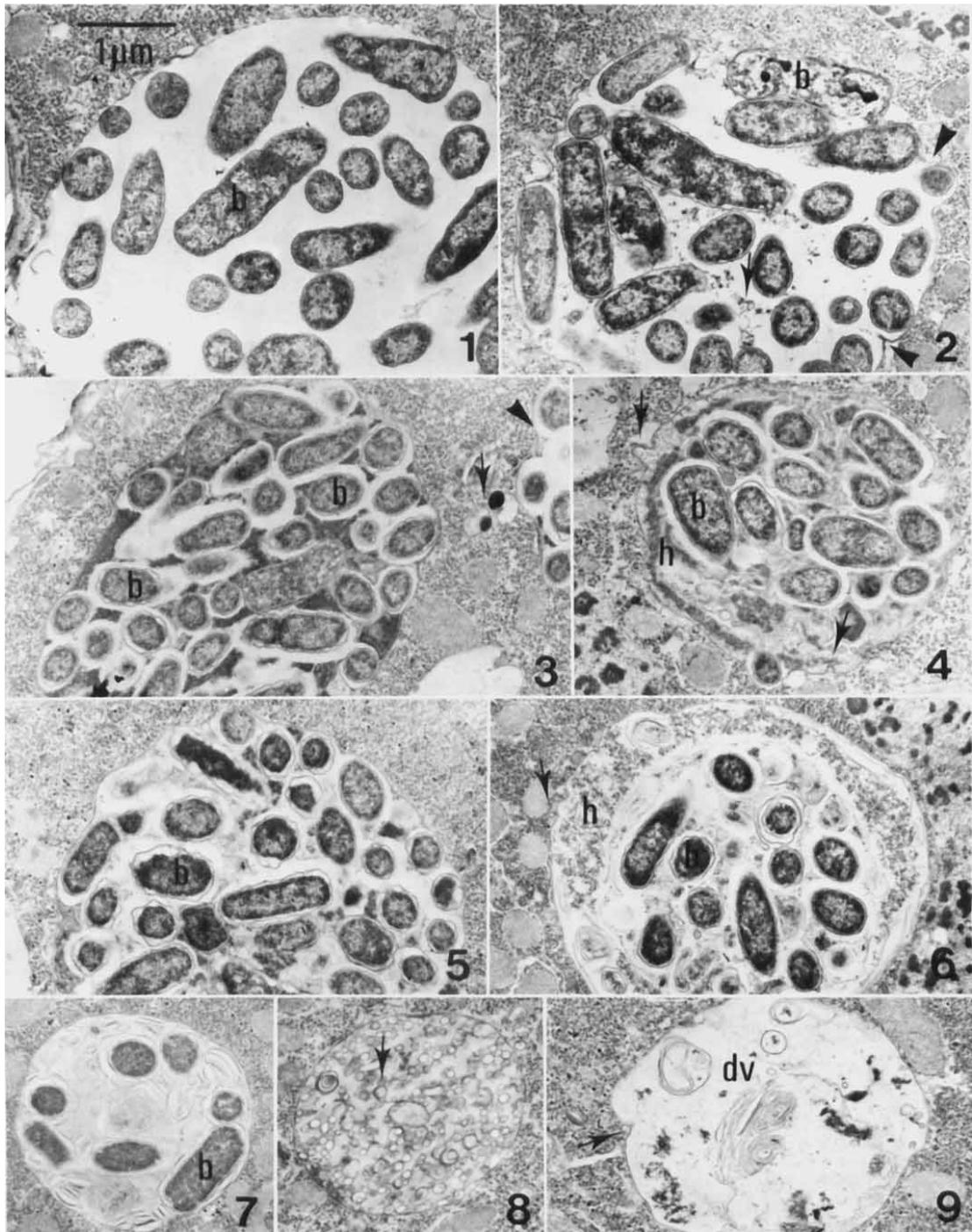


Abb. 2-6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* in verschiedenen Verdauungsstadien nach der Fütterung mit *Escherichia coli*. b: Bakterien. dv: defecation vacuole. h: halo. Phase 1 der Verdauung bezeichnet Nahrungsvakuolen, die entweder noch mit dem Cytostom verbunden sind (1) oder sich gerade eben gelöst haben. Im nächsten Stadium werden die Nahrungsvakuolen dehydriert und der Inhalt folglich verdichtet (2), die Vakuolenmembran liegt dicht an den Bakterien an (Pfeilkopf) und einige Bakterien lysieren bereits (Pfeil). In Phase 3 liegen die Bakterien in einer elektronendichten Matrix in den Vakuolen vor (3). Ein Lysosom (Pfeil) befindet sich in der Nähe

einer Vakuole in Phase 2 (Pfeilkopf). Im Folgestadium (4) sind einige noch intakte Bakterien von einem *halo* aus lysiertem Material umgeben und Verdauungsprodukte werden pinocytotisch aus den Vakuolen geschleust (Pfeile). In Phase 5 kommt es zur Massenlyse von *Escherichia coli* (5). Darauf folgt ein weiteres *halo*-Stadium (6) mit Pinocytoseaktivität (Pfeile). In Phase 6 sind verbliebene, lysierende Bakterien von einer weichen, schmierigen Matrix umgeben (7). Im vorletzten Stadium sind die Bakterien vollständig lysiert und vesikelartige Strukturen, vermutlich Membranreste, liegen in der Nahrungsvakuole vor (Pfeil, 8). Die letzte Phase beschreibt Vakuolen kurz vor der Egestion (9), die unverdauliche Reste enthalten. Vorm Ausscheiden können mehrere Vakuolen fusionieren, wie die Vertiefung in der Vakuolenmembran (Pfeil) indiziert (aus Nilsson, 1987).

Die erste Phase wird durch die neu gebildete Nahrungsvakuole definiert, in denen die Nahrungspartikel, in diesem Fall *Escherichia coli*, recht lose in der Vakuole verteilt liegen. In etwa dieser Phase beginnt auch das Ansäuern des Nahrungsvakuoleninhalts. Es ist bis dato unklar, wie genau dieser Prozess abläuft. Vermutlich sind Vesikel, die in der Nähe parasomaler Säcke gebildet werden und mit der frühen Nahrungsvakuole fusionieren, daran beteiligt (Nilsson, 1977; Nilsson und van Deurs, 1983). Für *Paramecium* wurde gezeigt, dass Acidosomen über Fusion mit Nahrungsvakuolen V-ATPasen in deren Membran integrieren (Ishidia *et al.*, 1997). Eine Phagosom-Proteom-Analyse von *Tetrahymena thermophila* identifizierte drei Untereinheiten von membrangebundenen V-ATPasen, die möglicherweise am Ansäuern der Nahrungsvakuolen beteiligt sind (Jacobs *et al.*, 2006). Der maximal saure pH von 3,5 bis 4,0 wird nach etwa einer Stunde erreicht (Nilsson, 1977).

In Phase zwei werden die Nahrungsvakuolen dehydriert, sodass die Bakterien, die zum Teil bereits in Lyse übergehen, dichter beieinander liegen und eng von der Vakuolenmembran umschlossen sind. Deshalb sind Nahrungsvakuolen in diesem Stadium eher unregelmäßig geformt. Oft sind sie mit Lysosomen assoziiert. Im Folgestadium ist der Großteil der Bakterien noch intakt und hebt sich deutlich von der umgebenden, elektronendichten Matrix aus lysiertem Material ab. In Phase vier wird erstes verdautes Material pinocytotisch aus den Nahrungsvakuolen geschleust. Noch intakte Bakterien liegen eher mittig und sind von einem *halo* aus verdaulichem Material umgeben. Im fünften Stadium lysieren üblicherweise fast alle Bakterien, die wenigsten zeigen eine intakte Zellumgrenzung. Meist folgt ein weiteres *halo*-Stadium, bevor die sechste Phase der Verdauung erreicht wird, in der noch einige Bakterien gefunden werden, die aber bereits in Lyse übergegangen sind. Sie sind von einer homogenen

Matrix umgeben. In der vorletzten Phase zeigen sich viele vesikelartige Strukturen innerhalb der Nahrungsvakuolen. Es handelt sich dabei vermutlich um Membranüberreste. Bakterien sind nicht mehr auffindbar. Das letzte Stadium definiert Vakuolen unmittelbar vor der Egestion, die nur noch unverdauliche Reste und Zelltrümmer enthalten. Vor der Ausscheidung wird der pH-Wert des Nahrungsvakuoleninhalts wieder neutralisiert. Dieser wird ohne umgebende Membran am Cytoproct entlassen. Die Dauer der einzelnen Phasen kann variieren, aber der gesamte Verdauungsprozess selbst dauert etwa zwei Stunden (Nilsson, 1977; 1987).

2.1.3 *Tetrahymena* als Modellorganismus

Tetrahymena spp. haben sich im Laufe der Zeit als Modellorganismen für tierische Zellen oder Organismen etabliert. Einige Autoren sprechen sogar über *Tetrahymena* als *Escherichia coli* unter den nicht photosynthetischen Eukaryoten (nach Hutner *et al.*, 1972; zitiert aus Corliss, 1973). Die einfache axenische Kultivierung in definierten Medien sowie relativ schnelle Generationszeiten in Verbindung mit recht hoher genetischer Stabilität durch den Zellkerndimorphismus machen *Tetrahymena* spp. zu einem geeigneten Modell für biochemische, physiologische, genetische, entwicklungs- und zellbiologische Untersuchungen. Zudem wurden Genome einiger Spezies teilweise oder vollständig sequenziert.

Die wohl bekanntesten Erkenntnisse, die mit *Tetrahymena thermophila* als Modell errungen wurden, sind die Entdeckung katalytischer Eigenschaften von RNA (Nobelpreis für Chemie 1989) und der Telomeraseaktivität (Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2009). *Tetrahymena pyriformis* spielt vor allem bei Untersuchungen zur Nährstoff- oder Partikelaufnahme eine Rolle als Modellorganismus oder bei Untersuchungen, wie sich spezifische Substanzen oder die Zusammensetzung des Mediums auf Organismen auswirkt. *Tetrahymena pyriformis* hat sich beispielsweise als Modell für toxikologische Studien etabliert, in denen der Einfluss spezifischer Wirkstoffe auf tierische Zellen oder Organismen geprüft wird (Sauvant *et al.*, 1999). Ebenso fungiert *Tetrahymena pyriformis* als Modell für Macrophagen bei Wirksamkeitstests neuer Bakteriostatika *in situ* (z. B. Benghezal *et al.*, 2007). Auch die Auswirkung verschiedener Wirbeltierhormone auf *Tetrahymena pyriformis* wird untersucht, um hormonelle Netzwerke in Einzellern zu verstehen oder gar Modelle für

Hormonsysteme in Vielzellern zu etablieren (Csaba und Pállinger, 2008; Csaba *et al.*, 2011). Aufgrund der hervorragenden Ingestionsrate (Holz, 1973) wird *Tetrahymena pyriformis* seit mehreren Dekaden für Studien zu selektivem Fressverhalten freilebender Protisten oder zu Einflüssen verschiedener Substanzen auf die Aufnahmerate genutzt (z. B. Seaman, 1961; Elliott und Clemmons, 1966; Ricketts, 1971a; Rasmussen und Modeweg-Hansen, 1973; Boenigk und Novarino, 2004; Thurman *et al.*, 2010). Ebenso gibt es zahlreiche Untersuchungen zu Interaktionen mit anderen Mikroorganismen sowie dem Überleben pathogener und nicht pathogener Bakterien (siehe folgendes Kapitel 2.1.4). Aufgrund der angeführten Studien, aber auch wegen der detailreichen Untersuchungen zum Ingestions- und Verdauungsprozess wurde in dieser Arbeit mit *Tetrahymena pyriformis* gearbeitet.

2.1.4 *Tetrahymena* in Interaktionen mit Mikroorganismen

Bisher ist nichts über natürlich vorkommende Endosymbionten in *Tetrahymena pyriformis* bekannt. Die nachfolgend dargestellten Interaktionen stellen daher eher modellhafte Assoziationen dar.

Die wohl am häufigsten untersuchten Modellinteraktionen mit *Tetrahymena pyriformis* widmen sich dem Überleben pathogener Mikroorganismen in Protozoen sowie deren Effekte auf das Pathogen. Hierbei gibt es verschiedene Abstufungen, vom Umgehen der Verdauung durch den Wirt ohne Vermehrung, über die Vermehrung des Pathogens im Wirt ohne diesen zu töten, bis hin zur Vermehrung und den erzwungenen Zelltod des Wirts (Barker und Brown, 1994). Dabei ist das Wirt-Parasitenspektrum recht breit; nicht jedes Pathovar kann jeden Stamm infizieren (Steele und McLennan, 1996; Smith *et al.*, 2012).

Zu den pathogenen Bakterien, die die Verdauung seitens *Tetrahymena pyriformis* umgehen können, gehört unter anderem das bodenbewohnende, endosporenbildende Insektenpathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Manasherob *et al.*, 1998). Nachdem dem Ciliaten Endosporen verfüttert wurden, wurde der Inhalt der Fäkalpellets, den Ausscheidungsprodukten aus Nahrungsvakuolen, auf Keimung der Endosporen untersucht. Nach dem vegetativen Wachstum bildet *Bacillus thuringiensis* erneut Endosporen. Bei Inkubation der Sporen in Medium ohne *Tetrahymena pyriformis*

keimen und sporulieren diese mit einem anderen, verzögerten zeitlichen Verlauf. Bei Zugabe von Hitzeschock-getöteten *Tetrahymena pyriformis* Zellen, ähnelt der Verlauf den Kulturen mit lebendigen Ciliaten, sodass diese den Verlauf von Keimung, Wachstum und Sporulation positiv beeinflussen zu scheinen (Manasherob *et al.*, 1998).

Neben *Bacillus thuringiensis* sind auch verschiedene Pathotypen von *Escherichia coli* in der Lage, die Verdauung durch *Tetrahymena* sp. zu umgehen (Smith *et al.*, 2012). Sowohl über Lebendzellfärbung der Bakterien in *Tetrahymena* sp. als auch über die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (*colony forming units*, cfu) aus Fäkalpellets wurde nachgewiesen, dass die getesteten Pathotypen von *Escherichia coli* die Verdauung durch den Ciliaten überleben. Propidiumiodid-Färbung zeigt an, dass nur etwa 1 % der in Fäkalpellets ausgeschiedenen Bakterien nicht lebensfähig ist. Interessanterweise konnte ähnliches auch für den nicht pathogenen *Escherichia coli* Stamm K12 gezeigt werden (Smith *et al.*, 2012). Für den pathogenen *Escherichia coli* Stamm O157 wurde über Biolumineszenzmessung gezeigt, dass die Bakterien die Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* für einige Zeit überstehen (Nelson *et al.*, 2003). Da die Messung der Überlebensfähigkeit hier nur indirekt erfolgt, bleibt unklar, ob die Bakterien später vollständig verdaut werden oder nicht.

Ein interessanter Effekt tritt auf, wenn *Campylobacter jejuni*, ein Pathogen, das Menschen häufig über den Verzehr rohen Geflügelfleisches infiziert, von *Tetrahymena pyriformis* aufgenommen wurde. Die Bakterien überleben nicht nur die Verdauung durch den Ciliaten, sondern sind nach der Internalisierung gegenüber Desinfektionsmitteln in Wasseraufbereitungsanlagen deutlich resistenter und länger lebensfähig als nicht internalisierte Bakterien. Somit scheint die Aufnahme durch *Tetrahymena pyriformis* physiologische Änderungen bei *Campylobacter jejuni* zu induzieren (Snelling *et al.*, 2005). Vergleichbare Ergebnisse erhielt man mit *Salmonella enterica* und einem nicht näher bestimmten Bodenisolat von *Tetrahymena*. Phagozytierte und anschließend ausgeschiedene, in Vesikeln aggregierte Bakterien sind widerstandsfähiger gegenüber Calciumhypochlorit (Brandl *et al.*, 2005).

Neben dem Entgehen der Verdauung gibt es Pathogene, die in der Lage sind, sich im Wirt, in diesem Fall *Tetrahymena pyriformis*, zu vermehren, ohne ihn zu schädigen. Ein Beispiel hierfür sind *Mycobacterium* spp. (Strahl *et al.*, 2001), zu denen unter anderem

die Erreger von Tuberkulose und Lepra zählen. Diese wurden in der Studie aber nicht untersucht. Die getesteten Spezies der Gattung *Mycobacterium* vermehrten sich innerhalb von fünf Tagen in *Tetrahymena pyriformis* 4- bis 40fach, ohne die Lebensfähigkeit des Ciliaten zu beeinflussen. Selbst nach 25 Tagen der Internalisierung war die intrazelluläre Bakterienzahl konstant. Dabei gibt es kleinere Unterschiede zwischen den getesteten Spezies. Während *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium intracellulare* sich recht schnell in *Tetrahymena pyriformis* vermehrten, wuchs *Mycobacterium scrofulaceum* langsamer. Leider bleibt unklar, in welchem Kompartiment der Zelle die Mycobakterien persistieren. Außerdem überlebt *Mycobacterium avium* die Encystierung und Keimung von *Tetrahymena pyriformis* (Strahl *et al.*, 2001). Allerdings ist für *Tetrahymena pyriformis* beschrieben, dass es Cystenbildung nicht gibt bzw. sie ein abnormales Phänomen innerhalb dieser Spezies darstellt (Corliss, 1973).

Andere Pathogene nutzen Protozoen nicht nur zur Vermehrung, sondern induzieren nach Abschluss den Zelltod des Wirts. Hierunter fallen die humanpathogenen Bakterien *Legionella* spp. und *Listeria monocytogenes* (Barker und Brown, 1994). *Legionella longbeachae*, die in Australien sehr häufig für den Ausbruch von Legionellose verantwortlich ist, infiziert *Tetrahymena pyriformis* sehr effektiv und zwingt den Ciliaten innerhalb von fünf Tagen zur Lyse, während sich das Bakterium um einen Faktor von bis zu 10^4 vermehrt. Dabei ist die Wachstumsrate des Bakteriums abhängig vom Ausgangsverhältnis von Protozoon zu Pathogen. Zudem sinkt die Infektionsrate bei niedrigem Nährstoffangebot (Steele und McLennan, 1996). *Listeria monocytogenes* infiziert *Tetrahymena pyriformis in vitro* und vermehrt sich innerhalb des Ciliaten. Nach acht bis 15 Tagen lysiert das Protozoon und gibt teilungsfähige Listerien frei (Ly und Müller, 1990).

Wie pathogene und nicht pathogene Bakterien der Verdauung seitens *Tetrahymena pyriformis* oder anderen Protozoen entgehen, ist bisher unklar. Für *Listeria monocytogenes* wurde der hämolytische, Poren bildende, cholesterinabhängige Virulenzfaktor Listeriolysin O (Geoffroy *et al.*, 1987) als eine mögliche Ursache identifiziert. Listeriolysin O wird vom *hly* Gen kodiert und ermöglicht es *Listeria monocytogenes*, nach der Phagozytose aus Nahrungsvakuolen zu entkommen und

folglich im Cytoplasma zu persistieren, wohingegen Defektmutanten im *hly* Gen dies nicht mehr können. Erst nach Komplementierung des Gens ist die Virulenz von *Listeria monocytogenes* wiederhergestellt (Dramsi und Cossart, 2002). Es gibt vergleichbare Beobachtungen mit Defektmutanten und der erzwungenen Lyse bei *Tetrahymena pyriformis* (Pushkareva und Ermolaeva, 2010). Wird die Permeabilität der Zellwand von *Mycobacterium smegmatis*, eine opportunistische Spezies der Mycobakterien, reduziert, indem die Poringene *mspA* und *mspC* deletiert werden, zeigen sie verstärkte Resistenz gegenüber der Verdauung durch *Acanthamoeba castellanii* oder Makrophagen; folglich können sie länger in den Zellen persistieren (Sharbati-Tehrani *et al.*, 2005). *Mycobacterium avium* hingegen verhindert über einen unbekanntem Mechanismus die Lysosomfusion mit Nahrungsvakuolen in *Acanthamoeba castellanii* und ist dadurch in der Lage, länger in der Amöbe zu persistieren und sich zu vermehren. Zudem ist die Virulenz intrazellulär gewachsener Bakterien höher als bei Kultivierung in Medium (Cirillo *et al.*, 1997).

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit pathogener Bakterien sind oft darin begründet, dass die Krankheitserreger Wasseraufbereitung, z. B. in Kliniken oder Tierzuchtanlagen, überstehen, weil sie internalisiert in Protozoen geschützt sind. Deswegen bezeichnen Barker und Brown (1994) Protozoen als Trojanische Pferde. Es gibt sogar endosymbiontische Formen pathogener Mikroorganismen, z. B. eine Unterart des Fischpathogens *Francisella noatunensis* im Ciliaten *Euplotes raikovi* (Schrallhammer *et al.*, 2011). Die Internalisierung pathogener Mikroorganismen hat Effekte auf deren Physiologie. Die Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln kann gesteigert (Brandl *et al.*, 2005; Snelling *et al.*, 2005) oder die Virulenz erhöht werden (Cirillo *et al.*, 1997). So könnte man vermuten, dass die Fähigkeit mancher Bakterien, der Verdauung durch Protozoen zu entgehen, eine treibende Kraft in der Evolution pathogener Mikroorganismen gewesen sein könnte.

Neben Untersuchungen zu Interaktionen zwischen *Tetrahymena* und Pathogenen gibt es auch Studien mit nicht pathogenen Mikroorganismen. Näheres dazu findet sich in Kapitel 2.2.2 (Endosymbiosemodelle).

2.2 Endosymbiosen

In dieser Arbeit wird der Begriff Symbiose [griechisch: (σύν, *syn*) zusammen (βίος *bíos*) Leben)] basierend auf der Definition nach Anton de Bary benutzt. Auf einer naturwissenschaftlichen Konferenz 1878 verwendete er das Wort Symbiose erstmals als Beschreibung für das Zusammenleben zweier ungleichnamiger Organismen (Goff, 1982). Dabei ist es unerheblich, ob die Assoziation der beteiligten Lebewesen mutualistisch, kommensalistisch oder parasitisch ist. Einerseits ist in etlichen Vergesellschaftungen unklar, welche Art des Zusammenlebens diese verkörpern, andererseits kann oftmals auch innerhalb einer Interaktion zweier Organismen das Spektrum von Mutualismus bis Parasitismus auftreten oder sich in Abhängigkeit wechselnder Bedingungen ändern (Schmidt *et al.*, 1988; Görtz, 2010; Bosch und Miller, 2016). Die Definition der Symbiose *sensu lato*, also ohne die Annahme des gegenseitigen Nutzens, ist zudem auch gängige Praxis in der Symbioseforschung (Schweikert *et al.*, 2013).

2.2.1 Endosymbiosen in Ciliaten

Protozoen, insbesondere aber Ciliaten, sind häufig mit anderen, pro- oder eukaryotischen Mikroorganismen endo-, aber auch ectosymbiontisch assoziiert. Seit mehr als einem Jahrhundert sind diese Interaktionen Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, was unter anderem in ihrer großen Vielfalt begründet ist. Mehr als 200 (Fokin, 2004) bzw. 250 (Germond und Nakajima, 2016) Ciliatenspezies sind bisher gefunden worden, die endosymbiontische Mikroorganismen beherbergen. Dabei kann ein Individuum sogar zeitgleich mehrere Endocytobionten innerhalb verschiedener Zellkompartimente in sich tragen, wie z. B. in der Gattung *Spirostomum* (Fokin *et al.*, 2005a). Eine Ursache für die Häufigkeit und Vielfältigkeit von Endosymbiosen in heterotrophen Einzellern ist deren phagotrophe Lebensweise. Als bakterielle Prädatoren setzen sie sich einem höheren Risiko aus, von Mikroorganismen infiziert zu werden (Görtz, 2010). Dazu müssen phagozytierte Bakterien oder andere Mikroorganismen die Verdauung seitens des Wirts überleben. Bisher werden hierfür drei mögliche Strategien benannt, nämlich 1) das Entkommen aus den Nahrungsvakuolen vor der Lysosomfusion, 2) das Verhindern der Fusion von Nahrungsvakuole und Lysosom und 3) das Überstehen der Verdauung nach

Lysosomfusion (Kodama und Fujishima, 2016). Für eine dauerhafte Etablierung von Endosymbiosen erscheint das Entkommen aus den Nahrungsvakuolen allerdings unerlässlich, da deren Inhalt am Ende des Verdauungsprozesses wieder ausgeschieden wird. In den meisten Fällen scheint der Weg über Endocytose und Entkommen aus den Phagosomen des Wirts der typische für Endosymbionten zu sein. Eine Ausnahme bildet hierbei der Symbiont, von den Autoren als Xenosom bezeichnet, des marinen Ciliaten *Parauronema acutum*. Dieser infiziert den Wirt direkt über die Zellmembran. Innerhalb von ein bis zwei Minuten nach Exposition entert das Xenosom, ein Gram-negatives Bakterium, das Protozoon. Dabei scheint es die Zellmembran des Wirts kurzfristig aufzulösen, dauerhafte Schäden sind allerdings nicht sichtbar; die Membran wird offenbar sofort wieder geschlossen. Nach der Infektion liegt es „nackt“, also ohne von einer zusätzlichen Wirtsmembran umgeben zu sein, im Cytoplasma von *Parauronema acutum*. Über den Weg der Phagocytose können diese Bakterien den Ciliaten nicht infizieren, da sie verdaut werden (Soldo *et al.*, 1993).

Endosymbionten liegen entweder mit oder ohne zusätzliche Membran des Wirts vor. Zudem können sie auch diverse Zellkompartimente besiedeln. Neben beiden Nuclei, die z. B. in *Paramecium* von Bakterien der Gattung *Holospora* infiziert werden, finden sich intrazelluläre Bakterien zwischen beiden Kernmembranen des Macronucleus, im Cytoplasma, assoziiert mit Mitochondrien oder gar in diesen sowie im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums oder mit Cortexstrukturen assoziiert und in Nahrungsvakuolen. Die Ciliatenzelle stellt somit einen Mikrokosmos für intrazelluläre Mikroorganismen dar (Fokin, 2004; Schweikert *et al.*, 2013).

Neben fakultativen Symbiosen, z. B. zwischen *Paramecium bursaria* und der Alge *Chlorella*, ist die intrazelluläre Lebensweise für die Mehrheit prokaryotischer Symbionten obligat. Sie können nicht mehr außerhalb des Wirts kultiviert werden und haben häufig reduzierte Genome (Görtz, 2010; Schweikert *et al.* 2013; Kodama und Fujishima, 2016). Eine sehr seltene Ausnahme stellt ein aus dem Macronucleus des Ciliaten *Spirostomum ambiguum* isoliertes Bakterium dar, das immerhin auf Blutagar kultiviert werden kann (Harrison *et al.*, 1976a; b). Im Gegensatz zur obligat intrazellulären Lebensweise sind die Symbionten, zumindest unter Laborbedingungen, für den Großteil ihrer Wirte entbehrlich. Ein Beispiel für gegenseitige Abhängigkeit

voneinander ist die Endosymbiose von *Euplotes aediculatus* und *Polynucleobacter necessarius* (früher Omikron; Heckmann, 1975; Heckmann und Schmidt, 1987). Wenn der Ciliat mit Antibiotikumbehandlung oder Röntgenstrahlen von seinem cytoplasmatischen Endosymbionten kuriert wird, ist er nicht mehr teilungsfähig und stirbt schließlich mehrere Tage nach der letzten Teilung. Erst nach der Reinfektion kann sich *Euplotes aediculatus* wieder vermehren (Heckmann, 1975). In anderen Süßwasserspezies von *Euplotes*, die das Gleiche fronto-ventrale Cirrusmuster wie *Euplotes aediculatus* aufweisen, finden sich ebenfalls Omikron-ähnliche Endosymbionten, wohingegen Spezies mit abweichendem Muster diese nicht in sich tragen. Auch diese Assoziationen sind für beide Partner obligat. Deshalb wird vermutet, dass diese Spezies auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, der bereits über ein Defizit verfügte, das mit Hilfe eines Endosymbionten kompensiert wurde. Folglich gingen auch *Polynucleobacter necessarius* sowie die Omikron-ähnlichen Bakterien auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück (Heckmann *et al.*, 1983). Rezentere phylogenetische Analysen mehrerer Stämme lassen allerdings vermuten, dass *Euplotes* spp. während ihrer Evolution mehrfach unabhängig *Polynucleobacter*-ähnliche Endosymbionten rekrutiert haben (Vannini *et al.*, 2012).

Polynucleobacter necessarius ist ein Gram-negatives Bakterium, das mehrere Nucleoide aufweist (meist 3 bis 9; Heckmann, 1975) und zu den β -Proteobakterien gehört (Springer *et al.*, 1996). Weiterhin wurden in den vergangenen Jahren freilebende Bakterien in diversen Süßwasserhabitaten isoliert, die eine starke Sequenzähnlichkeit des 16S rRNA Gens zu *Polynucleobacter necessarius* aufweisen (99,1 – 99,4 %). Dies führte zu einer veränderten Beschreibung der Gattung *Polynucleobacter* und der Spezies *Polynucleobacter necessarius*, innerhalb deren sowohl die endosymbiontische (subsp. *necessarius*) als auch die freilebende Art (subsp. *asymbioticus*) auf dem Subspezieslevel unterschieden werden (Hahn *et al.*, 2009). Sowohl das Genom des Typusstamms der freilebenden Form *Polynucleobacter necessarius* subsp. *asymbioticus* (QLW-P1DMWA-1; 2,16 Mbp; Meincke *et al.* 2012) als auch das Genom der symbiontischen Form isoliert aus *Euplotes aediculatus* STIR1 (1,56 Mbp; Boscaro *et al.*, 2013a) wurden sequenziert. Obwohl die Gesamtgenomgröße des Symbionten nur um 27,7 % reduziert ist, zeigt sich ein dramatischer Verlust von 42,3 % codierender DNA im Vergleich zum freilebenden Isolat, was mit dem großen Anteil an Pseudogenen begründet wird. Einen

Nachweis für horizontalen Gentransfer von Symbiont zu Wirt gibt es bisher nicht (Boscaro *et al.*, 2013a). Kürzlich wurde, basierend auf Genomsequenzierungen und -Analysen von vier freilebenden Isolaten sowie einer Neutypisierung, weil der ursprüngliche Typus nicht mehr verfügbar ist, des symbiontischen Stammes von *Polynucleobacter necessarius*, eine Reklassifizierung der Spezies vorgenommen. Die Multilocusanalysen legen nahe, dass es sich bei den getesteten Stämmen eher nicht um Stämme derselben Art handeln kann. Folglich werden für die vier Isolate, die vorher als *Polynucleobacter necessarius* subsp. *asymbiomaticus* geführt wurden, vier neue Spezies vorgeschlagen, nämlich *Polynucleobacter asymbiomaticus* comb. nov., *Polynucleobacter duraquae* sp. nov., *Polynucleobacter yangtzensis* sp. nov. und *Polynucleobacter sinensis* sp. nov.; die Artbeschreibung von *Polynucleobacter necessarius* wurde angepasst (Hahn *et al.*, 2016).

Im Gegensatz zur obligaten Endosymbiose von *Euplotes* und *Polynucleobacter* sind die meisten Wirte, zumindest unter Laborbedingungen, nicht auf ihren Symbionten angewiesen. Dennoch finden sich z. B. bei der Gattung *Paramecium* in frischen Naturisolaten in einem Großteil der Fälle intrazelluläre Bakterien (Beale *et al.*, 1969; Schweikert *et al.*, 2013). Eine mögliche Ursache dafür stellen physiologische Effekte dar, die über die Endosymbionten vermittelt werden und eventuell einen selektiven Vorteil bringen. In diesem Zusammenhang ist der von Endosymbionten hervorgerufene Killer-Phänotyp ein interessantes Phänomen (Schrallhammer und Schweikert, 2009). Aus Feldstudien geht hervor, dass Killerzellen von *Paramecium tetraurelia* in natürlichen Habitaten im Vergleich zu sensitiven Stämmen ohne Symbionten höhere Zelldichten erreichen und innerhalb eines untersuchten Bereichs selten Killerzellen und Sensitive gleichzeitig gefunden werden. Beide Ergebnisse deuten auf einen selektiven Vorteil für *Paramecium* mit Endosymbionten, die den Killerphänotyp hervorrufen (Landis, 1981). Dieser wird oft, aber nicht ausschließlich, von Bakterien der Gattung *Caedibacter* verursacht. Eine der vermutlich bekanntesten Spezies innerhalb dieser Gattung ist *Caedibacter taeniospiralis* (früher Kappa), weil sie zunächst zur Entwicklung der „Plasmagenhypothese“ Sonneborns führte (Sonneborn, 1950; Beale und Preer, 2008). Beim Kultivieren verschiedener Stämme von *Paramecium aurelia* entdeckte er, dass einige Stämme andere töten konnten und teilte sie in Killer, die zeitgleich resistent gegenüber den Toxinen sind, und Sensitive ein. Nach der

Konjugation zwischen einem sensitivem Stamm und dem Stamm mit Killerphänotyp zeigten die Nachkommen jeweils beide Phänotypen. Dabei wurden diejenigen zu Killerzellen, die das Cytoplasma des Killereltern erhielten, was schließlich dazu führte, dass Sonneborn annahm, dass ein über das Cytoplasma vererbter Faktor unter anderem für den Killerphänotyp verantwortlich ist. Daneben spielt aber auch ein kerncodiertes Gen des Wirts, das in zwei Allelen, K und k, vorliegen kann, eine Rolle beim Erwerb bzw. Erhalt des Killerphänotyps, da nur Paramecien mit mindestens einem K-Allel den Killerphänotyp zeigten, aber auch nur, wenn der cytoplasmatische Faktor mit übertragen wurde. Das Allel K allein reichte nicht, um die Killerfähigkeit zu induzieren (Sonneborn, 1943a; b). Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass es sich beim „Plasmagen“ Kappa und ähnlichen Partikeln um Bakterien handelt und den zunächst mit griechischen Buchstaben benannten Bakterien wurden binominale Namen entsprechend den Nomenklaturregeln gegeben (Preer et al., 1974). Bisher sind fünf Spezies der Gattung *Caedibacter* gültig beschrieben (Preer und Preer, 1982; Quackenbush, 1982; Schmidt et al., 1987). Die *Caedibacter* spp. besiedeln verschiedene Zellkompartimente in *Paramecium* spp. und rufen unterschiedliche Tötungsmodi bei Sensitiven hervor (Beale und Preer, 2008; Schrallhammer und Schweikert, 2009; Schweikert et al., 2013). *Caedibacter varicaedens*, ein cytoplasmatischer Symbiont aus *Paramecium biaurelia*, und *Caedibacter pseudomutans* aus *Paramecium tetraurelia* sind sogenannte Spin-Killer. *Paramecium biaurelia* mit *Caedibacter varicaedens* verursacht aber auch starke Vakuolisierung sowie Paralyse in Sensitiven Stämmen. *Caedibacter caryophilus* (Synonym mit *Caedibacter caryophila*) verwandelt seinen Wirt ebenfalls in Paralyse-Killer. *Caedibacter caryophilus* kommt sowohl im Macronucleus von *Paramecium caudatum* als auch im Cytoplasma von *Paramecium novaurelia* vor (Kusch et al., 2000). Um einen toxischen Effekt auf Sensitive auszulösen, ist für *Paramecium biaurelia* mit dem cytoplasmatischen Endosymbionten *Caedibacter paraconjugatus* erforderlich, mit dem sensitiven Stamm zu konjugieren, weshalb diese auch als Kreuzungskiller bezeichnet werden. Die Gattung *Caedibacter* ist vermutlich polyphyletisch. Aus DNA-Sequenzvergleichen des 16S rRNA Gens ergibt sich, dass *Caedibacter taeniospiralis* aus *Paramecium tetraurelia* in die Gruppe der γ -Proteobakterien gehört (Beier et al., 2002), wohingegen *Caedibacter caryophilus* zu den α -Proteobakterien zählt (Springer et al., 1993).

Eine Gemeinsamkeit der *Caedibacter* spp. ist die Fähigkeit zur Bildung sogenannter R-Körper (von Englisch: *refractile* – lichtbrechend), proteinöse Zelleinschlüsse, die oftmals mit Plasmid-DNA oder Bakteriophagen assoziiert sind, die Gene für die R-Körper-Synthese tragen (z. B. Pond *et al.*, 1989; Schrallhammer und Schweikert, 2009). Bei geeigneten Triggern, wie dem Ansäuern der Nahrungsvakuolen nach Phagozytose R-Körper-haltiger Bakterien, können sich diese aufrollen und die Phagosomenmembran durchstoßen (Preer *et al.*, 1974). Die R-Körper scheinen für die Toxizität der Killerstämme mit verantwortlich zu sein, da nur *Caedibacter* spp. mit R-Körpern Sensitive töten können (Mueller, 1963; Smith-Sonneborn und Van Wagtenonk, 1964). Des Weiteren wirken manche isolierten R-Körper toxisch auf sensitive Paramecien (Preer *et al.*, 1972). Ein zusätzlicher Beweis für die Beteiligung der R-Körper am Killerphänotyp des Wirts sind Mutanten von *Caedibacter taeniospiralis*, die die Fähigkeit der R-Körper-Bildung verloren haben und nicht mehr toxisch auf Sensitive wirken. Auf die Resistenz gegenüber Killerzellen hat der Verlust der R-Körper keinen Einfluss, sodass diese dafür wahrscheinlich nicht benötigt werden (Dilts und Quackenbush, 1986). Was genau die toxischen Effekte hervorruft, ist bis dato unklar. Untersuchungen mit rekombinanten *Escherichia coli* Zellen, die R-Körper von *Caedibacter taeniospiralis* synthetisieren können, zeigen keine cytotoxischen Effekte auf sensitive Zellen von *Paramecium tetraurelia*. Vermutlich dienen die R-Körper als Transportsystem für ein bisher unbekanntes, von *Caedibacter taeniospiralis* gebildetes Toxin (Schrallhammer *et al.*, 2012).

Während für eine große Mehrheit der Symbionten unklar ist, vom vertikalen Transfer an die Tochterzellen abgesehen, wie sie ihre Wirte infizieren, gibt es mit *Holospora* eine Gattung, die hochgradig infektiös ist und einen daran angepassten Lebenszyklus aufweist (Schweikert *et al.*, 2013; Kodama und Fujishima 2016). *Holospora* ist ein obligat intrazellulär lebendes Bakterium, das für den Wirt entbehrlich ist. Allerdings gewinnt *Paramecium* mit *Holospora* als Endosymbionten Stressresistenzen, etwa gegenüber Hitzeschocks (Hori und Fujishima, 2003; Hori *et al.*, 2008) und osmotischem Schock (Duncan *et al.*, 2010). In Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen und der Wachstumsphase des Wirts hat *Holospora* sowohl positive als auch negative physiologische Effekte. So kann z. B. innerhalb derselben Kultur die Teilungsrates während der exponentiellen Wachstumsphase gesteigert, wohl

aber die Gesamtzellichte in der stationären Phase im Vergleich zu symbiontenfreien Kulturen reduziert sein, womit innerhalb einer Kultur das Spektrum von Mutualismus bis Parasitismus abgedeckt ist (Bella *et al.*, 2016).

Holospora spp. sind Gram-negative Bakterien aus der Gruppe der α -Proteobakterien und gehören innerhalb dieser Gruppe zu den Rickettsiales (Amann *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2005; Boscaro *et al.*, 2013b). *Holospora* spp. infizieren beide Nucleustypen in verschiedenen *Paramecium* spp. Dabei ist die Infektion sowohl Nucleus- als auch Spezies-spezifisch, wobei manche *Holospora* spp. auch verschiedene Wirtsstämme befallen können; so ist z. B. *Holospora caryophila* in Macronuclei von *Paramecium caudatum*, *Paramecium biaurelia* und *Paramecium novaurelia* zu finden. Beispiele für Micronucleus-spezifische Endosymbionten sind *Holospora elegans* und *Holospora undulata* aus *Paramecium caudatum* (Fokin *et al.*, 1996). Die Wirtsspezifität könnte von den Wirten selbst mitbestimmt sein, da *Holospora* nach der Infektion in „falschen“ Wirten aktiv wieder entfernt wird (z. B. Fokin und Skovorodkin, 1997; Skovorodkin *et al.*, 2001; Fokin *et al.*, 2005b).

Eine Gemeinsamkeit aller *Holospora* spp. stellen die zwei möglichen Formen dar, die sie innerhalb ihres Lebenszyklus annehmen können, eine kurze, reproduktive Form sowie eine längere, infektiöse Form (Fokin *et al.*, 1996). Während die reproduktive Form, die sich innerhalb der Wirtsnuclei vermehrt, vertikal über die Kernteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden kann, können freigesetzte, infektiöse Formen lateral übertragen werden, wenn sie über Phagocytose aufgenommen werden. Bis dato sind zwei mögliche Infektionsmodi beschrieben. Eine Möglichkeit stellt der Transport zum Nucleus in Vesikeln dar (Görtz und Wiemann, 1989; Schweikert *et al.*, 2013), eine zweite die Penetration der Nahrungsvakuolenmembran mit anschließendem, über Actinfilamente des Wirts vermitteltem Transport zum Zielnucleus (Fujishima, 2009; Kodama und Fujishima, 2016). Infektiöse Formen von *Holospora* weisen eine unter Endosymbionten einzigartige Morphologie und polare Organisation auf. An einem Ende befindet sich das Cytoplasma, das nur etwa die Hälfte des Gesamtvolumens einnimmt. Somit besteht der Rest der Zelle aus Periplasma, dem Raum zwischen innerer und äußerer Membran, das stark osmiophiles Material enthält, das lediglich an der Spitze weniger elektronendicht ist (Görtz *et al.*, 1989). Über diese spezialisierte Struktur

infiziert *Holospora* die Nuclei des Wirts (Fujishima und Fujita, 1985). Das Periplasma enthält vermutlich einige infektionsphasenabhängige Proteine, die an der Interaktion zwischen Wirt und Symbiont beteiligt sind, deren Zusammensetzung bzw. Lokalisation sich während der Differenzierung innerhalb des Infektionsprozesses ändert (z. B. Görtz *et al.*, 1990; Fujishima *et al.*, 1990; Wiemann und Görtz, 1991; Iwatani *et al.*, 2005; Abamo *et al.* 2008). Die Differenzierung beginnt bereits innerhalb der Nahrungsvakuolen und wird vermutlich vom Ansäuern des Vakuoleninhalts oder Lysosomfusion getriggert (Kodama und Fujishima, 2016). Protein-Protein-Interaktionen sind wahrscheinlich an der Erkennung von Wirt und Symbiont beteiligt (Wiemann und Görtz, 1991; Fujishima *et al.*, 1997; Ehrsam und Görtz, 1999; Iwatani *et al.*, 2005). Zudem scheinen an der Bakterienoberfläche liegende Lipopolysaccharide in die Rezeption des Zielnucleus involviert zu sein (Fujishima und Kawai, 2004). Sobald die infektiöse Form von *Holospora* den Nucleus erreicht hat, wird die Differenzierung zur reproduktiven Form abgeschlossen. Die reproduktive Form bindet mit hoher Affinität an das Wirtschromatin und nutzt so den Zellteilungsapparat für den vertikalen Transfer auf die Tochterzellen (Fokin *et al.*, 1996; Ehrsam und Görtz, 1999). Sobald der Wirt hungert oder dessen Proteinsynthese inhibiert ist, differenzieren die reproduktiven zu den infektiösen Formen (Schweikert *et al.*, 2013; Kodama und Fujishima 2016). Für die Freisetzung der infektiösen Formen gibt es mehrere Möglichkeiten. Einerseits können die Symbionten die Nuclei in einer so großen Anzahl befallen, dass der Wirt sich nicht mehr teilen kann, in Folge dessen stirbt und die Symbionten frei gibt (Kodama und Fujishima, 2016), andererseits können infektiöse Formen auch intakte Nuclei in lebenden Wirten verlassen. Hierbei teilen sich die *Holospora* spp. in zwei verschiedene Gruppen. Ein Teil der Spezies, unter anderem *Holospora obtusa*, *Holospora undulata* und *Holospora elegans*, wird während der Kernteilung im Verbindungsteil beider Tochnuclei akkumuliert, welcher sich schließlich von beiden löst und die infektiösen Formen von *Holospora* umgibt. Das Vesikel wird abschließend über den Cytoproct an das umgebende Medium abgeben. Bei *Holospora caryophila*, *Holospora bacillata* und *Holospora curvata* ist dies nicht der Fall (Fokin *et al.*, 1996). Für *Holospora bacillata* und *Holospora curvata* ist eine Art Umkehr des Infektionsprozesses als möglicher Mechanismus beschrieben (Fokin und Sabaneyeva, 1997). Die Einteilung in diese beiden Gruppen bestätigt sich ebenfalls dadurch, dass spezifisch für *Holospora obtusa* generierte Proben für *in situ* Hybridisierung nicht an *Holospora bacillata*, *Holospora*

caryophila und *Holospora curvata* binden, wohl aber an andere Spezies, die wie *Holospora obtusa* aus den Wirtszellen geschleust werden. Folglich gehören die Spezies der Gattung *Holospora* vermutlich in zwei verschiedene Bakteriengruppen (Fokin et al., 1996).

Die große Mehrheit der prokaryotischen Endosymbionten gehört zu verschiedenen Untergruppen der Proteobakterien. Es gibt aber auch, speziell bei Ciliaten in anaeroben Umgebungen, methanogene Endosymbionten. So sind z. B. *Metopus contortus* und *Trimyema compressum* mit methanogenen Archaeen assoziiert (z. B. van Hoek et al., 2000). Außerdem gibt es nicht nur prokaryotische Endosymbionten, sondern auch eukaryotische. Das wohl bekannteste Beispiel stellt vermutlich die Interaktion zwischen *Paramecium bursaria* und *Chlorella* sp. dar. Diese Assoziation ist auch deshalb von Bedeutung, weil durch das Studium der Reetablierung dieser Endosymbiose Erkenntnisse über die Erkennung beider Partner sowie dem Erhalt dieser Assoziation gewonnen wurden. Die intrazellulären Algen liegen umgeben von einer Wirtsmembran, die die Lysosomfusion verhindert, im Cytoplasma und assoziiert am Cortex vor (Gu et al., 2002; Kodama und Fujishima 2009a). Etwa 30 Minuten nach dem Mischen von Algen und symbiontenfreien Zellen von *Paramecium bursaria* beginnen die Algen über Knospung aus den Nahrungsvakuolen, in denen die Verdauung ungestört abläuft, zu entkommen (Kodama und Fujishima, 2009b). Der Knospungsprozess ist einerseits größenabhängig, da auch durch Hitze getötete oder fixierte Algen sowie Mikropartikel mit einem Durchmesser von 3,0 µm oder größer die Knospung induzieren, während kleinere Mikropartikel, Bakterien oder Farbpartikel dies nicht können (Kodama und Fujishima, 2012). Andererseits scheint auch die Erkennung der Algenzellwand am Erkennungsprozess beteiligt zu sein, da mit Concanavalin A oder Antikörpern ummantelte Algen verdaut und ausgeschieden werden (Germond und Nakajima, 2016). Nach der Knospung differenziert sich die die einzelne Alge umgebende Nahrungsvakuolenmembran innerhalb von etwa 15 Minuten, sodass die Alge vor der Verdauung des Wirts geschützt ist. Zeitgleich wird die Alge Richtung Cortex transportiert (Kodama und Fujishima, 2009b). Ob internalisierte Algen verdaut werden oder nicht, ist vermutlich zusätzlich von ihrer vorherigen photosynthetischen Aktivität abhängig, weil Algen aus vorheriger konstanter Kultivierung in Dunkelheit nahezu

vollständig verdaut werden, Algen mit konstanter Lichtzufuhr jedoch nicht (Kodama und Fujishima, 2014).

Natürlich sind Endosymbiosen in Ciliaten noch weitaus vielfältiger, als in den vorangegangenen Ausführungen dargestellt, für mehr Informationen empfiehlt sich die Konsultation der zitierten Original- und Review-Artikel.

2.2.2 Endosymbiosemodelle

Eine interessante Studie zur Untersuchung von entstehenden Endosymbiosen stellt die Interaktion zwischen dem D-Stamm von *Amoeba proteus* und einem nicht näher charakterisierten Gram-negativen, stäbchenförmigen, nicht kultivierbaren Bakterium dar. Die Amoebe wurde spontan von diesen Bakterien infiziert und im Laufe der Zeit entwickelte sich aus anfänglich negativen Effekten für den Wirt eine obligate Endosymbiose (Jeon, 1987; 1995; 2006).

Nach spontaner Infektion liegen die Bakterien in großer Zahl (60 000 bis 150 000 Bakterien pro Zelle) in Vesikeln verpackt im Cytoplasma von *Amoeba proteus* vor. Zunächst beeinflussen die Bakterien den infizierten Stamm, genannt xD, negativ. So ist die Zellgröße reduziert, die Generationszeit verlängert, die Amoeben sind fragiler und sensitiver gegenüber Hungerbedingungen. Außerdem führt die Infektion zuvor bakterienfreier Stämme von *Amoeba proteus* zu deren Zelltod (Jeon und Lorch, 1967). Bereits nach einem Jahr der Kultivierung des xD-Stammes mit seinen Endosymbionten verringern sich die negativen Effekte auf den Wirt und die Bakterien sind weniger virulent, da sie nach der Infektion in vorher symbiontenfreien Zelllinien nicht mehr zum Tod führen. Nach etwa fünf Jahren ist die Assoziation beider Organismen obligat (Jeon, 1972). Wenn die Symbionten entfernt werden, ist der xD-Stamm nicht länger lebensfähig (Jeon und Jeon, 1976; Jeon und Hah, 1977). Nur die Reinfektion mit den X-Symbionten führt zum Überleben des xD-Stammes von *Amoeba proteus* (Lorch und Jeon, 1980). Wenn ein symbiontenfreier Stamm von *Amoeba proteus* mit den Bakterien aus dem xD-Stamm infiziert wird, zeigt sich bereits nach 200 Generationen bzw. 18 Monaten eine Abhängigkeit des Wirts vom Bakterium (Jeon, 1987). Allerdings gibt es bereits nach wenigen Zellteilungen physiologische Anpassungen des Wirtsnucleus an den Symbionten, wie Nucleus-Transplantationsexperimente zeigen (Lorch und Jeon

1981; 1982). Diese Anpassungen könnten im Zusammenhang mit einem 29 kDa großen Protein stehen, das vom Symbionten exprimiert und in den Wirtsnucleus transportiert wird (Kim und Jeon, 1986; 1987; Pak und Jeon, 1997).

Eine weitere interessante Studie befasst sich damit, wie sich eine Cokultivierung von *Escherichia coli*, zwei Kreuzungstypen von *Tetrahymena thermophila* und der Alge *Micractinium* sp. (vorher bestimmt als *Chlorella vulgaris*; Germond *et al.*, 2013a) über eine Dauer von fünf Jahren auf die Entwicklung der beteiligten Organismen auswirkt (Nakajima *et al.*, 2009; Sano *et al.*, 2009; Germond *et al.*, 2013b; Nakajima *et al.*, 2013; Nakajima *et al.*, 2015). Das Medium zur Kultivierung enthielt keine organischen Substanzen, sondern nur Mineralsalze. *Micractinium* sp. wächst photoautotroph; zudem sekretiert es photosynthetisch gebildete, organische Substanzen ins Medium, die wiederum von *Escherichia coli* verstoffwechselt und zur Vermehrung genutzt werden. *Tetrahymena thermophila* phagozytiert die Bakterien als Nahrungsgrundlage. Nach etwa 100 Tagen der Cokultivierung enthalten 80 bis 90 % der Ciliaten intrazelluläre Algen. Dieser Anteil bleibt in etwa gleich hoch bis zum Ende des Betrachtungszeitraums nach drei Jahren (Nakajima *et al.*, 2009). Beim Vergleich dieser Cokulturen mit frisch zusammengeführten Kulturen aus *Tetrahymena thermophila* und *Micractinium* sp. zeigt sich, dass *Tetrahymena thermophila* aus den älteren Cokulturen den Entzug von *Escherichia coli* als Nahrungsgrundlage länger überleben kann. Jedoch verringert sich der Anteil an Protozoen mit intrazellulären Algen. Ähnliche Ergebnisse erhält man beim Vergleich der Auswirkung konstanter Dunkelheit auf die verschiedenen Kulturen (Sano *et al.*, 2009). So scheint es, dass sich nach längerer Cokultivierung Anpassungen von Symbiont und Wirt aneinander ergeben, die beiden Partnern ermöglichen, mit plötzlichem Nährstoffentzug umzugehen. Neben intrazellulären Formen treten auch extrazelluläre Aggregate mehrerer *Micractinium*-Zellen mit *Escherichia coli* auf, die als eine Art Ectosymbiose beschrieben werden (Nakajima *et al.*, 2009). Isoliert man intrazelluläre *Micractinium* sp. und gibt sie in Kulturen mit *Tetrahymena thermophila* aus Cokulturen oder den ursprünglichen Ciliaten, erhöhen sie deren Lebensfähigkeit in Abwesenheit von *Escherichia coli*, während aus den extrazellulären Aggregaten isolierte Algen diesen Effekt nicht haben (Nakajima *et al.*, 2013). Außerdem sekretieren intrazelluläre Isolate größere Mengen von Photosyntheseprodukten ins Medium als extrazelluläre Isolate (Germond *et al.*,

2013b). Die Ergebnisse zeigen, dass sich sympatrisch aus einem Ausgangsorganismus zwei verschiedene auto-heterotrophe Assoziationen innerhalb von fünf Jahren entwickelt haben. Zudem haben sich beide Typen der Algen an ihre jeweilige Lebensweise angepasst. Isolate aus aggregierten, extrazellulären *Micractinium* sp. können in Abwesenheit von *Tetrahymena thermophila* besser überleben als intrazelluläre Isolate. Dies deutet darauf hin, dass sich aus dem Ciliaten isolierte Algen bereits an die intrazelluläre Lebensweise adaptiert haben (Nakajima *et al.*, 2015).

2.3 Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung der Initiation endosymbiontischer Assoziationen am Beispiel der Interaktion von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli*. Dabei soll festgestellt werden, ob es *Escherichia coli* möglich ist, der Verdauung zu entgehen und aus den Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* zu entkommen. Zusätzlich wird geprüft, ob *Tetrahymena pyriformis* unter selektiv gewählten Bedingungen von der Internalisierung der Bakterien profitieren kann.

Da die Erkennung von Wirt und Symbiont in einigen Fällen oberflächenabhängig ist, wird der Einfluss biochemischer Oberflächenmodifikation von synthetischen Mikropartikeln und Bakterien auf die Ingestion und Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* im Hinblick darauf untersucht, ob bestimmte, im Experiment manipulierbare Oberflächeneigenschaften das Entkommen aus Nahrungsvakuolen des Ciliaten fördern können.

Zur Untersuchung wurden unterschiedliche experimentelle Techniken angewandt. Internalisierte Bakterien aus verschiedenen Cokulturen wurden einerseits mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion detektiert, andererseits wurden sie über Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie innerhalb der Ciliatenzelle lokalisiert. Der Einfluss verschiedener Oberflächenkompositionen wurde ebenfalls mit Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht. Da alle diese experimentellen Techniken jeweils eine begrenzte Auflösung haben, müssen die Ergebnisse im Zusammenhang betrachtet, ausgewertet und diskutiert werden.

3 Material und experimentelle Techniken

Die nachfolgenden Kapitel sollen dem Leser nicht nur die Reproduktion der Versuche ermöglichen, sondern die Gründe für die angewandten Techniken sowie deren Rationale verdeutlichen.

3.1 Geräte und Verbrauchsmittel

In der nachfolgenden Liste sind alle Geräte und Verbrauchsmittel sowie deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt, die zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden. Die mit einem Stern (*) markierten Geräte und Verbrauchsmittel wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie an der Universität Stuttgart verwendet.

Brutschränke	Kelvitron [®] , Heraeus; Memmert (*)
Crimper	DuPont
Dampfsterilisator	
Dampfkochtopf Sitramax	Sitram
Varioklav Typ 400 E	H+P Labortechnik GmbH
Dialyseschlauch VISKING	Roth
Diamantmesser	Diatome *
Einbettungskapseln Größe 00, pyramidenförmig	Beem [®] (*)
Einmalkanülen, steril	B. Braun
Einmalspritzen, steril	B. Braun
Geldokumentationsanlage INTAS GDS	INTAS [®]
Gelelektrophoresekammer	GNA 200, Pharmacia
Glasmesserbrecher EM KMR2	Leica *
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Heiz-und Magnetrührgerät	IKAMAG [®] RET
Jessen-Zählkammer	Assistent
Kolbenhubpipetten, FinnpiPETTE [®]	ThermoLabsystem
(0,5 – 10 µl, 10 – 40 µl, 40 – 200 µl, 200 – 1000 µl)	
Kupfergrids, 100 mesh	Agar Scientific *

Mikroskope:

Durchlichtmikroskop BX300	Will, Wetzlar
Durchlichtmikroskop, Standard	Carl Zeiss, Jena
Elektronenmikroskop EM10	Carl Zeiss, Oberkochen *
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Jena

Negativfilme, 3 x 4 Zoll

Kodak *

Netzgerät UNIPACK 250

UNIEQUIP

Öltest-Zentrifugengläser

Schott

Pasteurpipetten

PCR-Geräte:

Trockenblock-PCR, Primus

MWG Biotech

Wasserbad-PCR, Autogene II

Grant

Petrischalen

Greiner GmbH, Sarstedt

pH-Meter pH 523

WTW

Photometer 1101 M

Eppendorf

Pipettenspitzen

DASLAB®

Pipettierhilfe acu-jet®*pro*

Brand

Probentrimmer EM Trimm

Leica *

Rasierklingen

Wilkinson *

Reagenzgefäßschüttler Vortex-Genie 2

Scientific Industries

Reagenzglasroller TC-7

New Brunswick Scientific C.O.

Reaktionsgefäße, Eppendorf-Typ

DASLAB®

(0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)

(2 ml)

Sarstedt *

Reaktionsgefäßschüttler

Eppendorf

Rotoren:

Rotor SLA-1500

Sorvall® DuPont

Rotor SS-34

Sorvall® DuPont

Rotor TV-860

Sorvall® DuPont

Sterilfilter, 0,45 µm

Schleicher & Schuell

Thoma-Zählkammer

Feinoptik Bad Blankenburg

Trockensterilisator

Heraeus Instruments

Ultramikrotom UltraCut UCT

Leica *

Ultra Turrax T18 digital mit Dispergierwerkzeug S18N-19g	IKA Labortechnik
Waagen	Sartorius, Kern
Wasserbäder	GFL 1083, Haake D1, MLW W1
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus Christ *
Biofuge 13	Heraeus Instruments
Laborzentrifuge 6-10	Sigma *
Kühlzentrifuge Sorvall® RC 6	Thermo-Electron-Corporation
Ultrazentrifuge Sorvall® WX Ultra	Thermo-Electron-Corporation
Zentrifugenbecher SLA	Sorvall®
Zentrifugenröhrchen SS-34	Sorvall®
Zentrifugenröhrchen TV-860	Sorvall®

3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, die für die experimentellen Arbeiten benötigt wurden sowie deren Bezugsquellen sind in der folgenden alphabetischen Auflistung zu finden. Die mit einem Stern (*) markierten Chemikalien wurden zur Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie an der Universität Stuttgart verwendet.

Aceton	Roth (*)
Agar-Agar, Kobe	Roth
Agarose	peqlab
7-Amino-4-methyl-3-cumarinylacetat (AMCA)	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Roth
Bleicitrat-trihydrat	Serva
Bromphenolblau	BioRad
Butylamin	Merck
Cacodylsäure (Natriumsalz Trihydrat)	Serva; Roth *
Cadaverin	Sigma-Aldrich
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid, Dihydrat	Roth

Caesiumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth *
4',6-Diamidin-2-phenylindol- Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich
Diaminopropan	
Desoxy-Nucleosidtriphosphate	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Roth
DNA-Größenmarker, 1 kb DNA-Leiter	Fermentas
DNase I, aus Rinderpankreas	Boehringer Mannheim
Endo-Porter	Gene-Tools
Entwickler D19	Kodak *
Epoxidharz Spurr's Resin Einbettungs-Kit	Sigma-Aldrich; Polysciene *
Diglycidylether aus Polypropylenglycol	
Dimethylaminoethanol	
ERL 4221 (Vinylcyclohexendioxid)	
Nonenylsuccinylanhydrid	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol 100 %	Roth
Ethanolamin	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamin	Merck
Fixierer superfix Plus	Tetenal *
Glycerin	Roth
Glycin	Roanal
Glutamin	Ferak
Glutardialdehyd	Sigma (*)
Hefeextrakt, pulverisiert	Roth
Hexylamin	Merck
Isopropyl- β -D-galactopyranosid (IPTG)	Roth
Isopropanol	Roth
Isoleucin	Sigma

Lactose	Sigma
Lysozym	Serva
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Roth
Methanol	Roth
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDAC)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat	VK– Labor- und Feinchemikalien
Nilrot	Sigma-Aldrich
Osmiumtetroxid	Sigma; Electron Microscopy Sciences *
Octylamin	Merck
Paromomycin	Sigma
Pentylamin	Merck
Pioloform	Plano *
Phenylalanin	Roanal
Primer, Oligonucleotide	Biomers.net GmbH
Propylamin	Merck
Proteose-Pepton	Sigma-Aldrich
Putrescin	Roth
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth
Salzsäure, 32 %	Roth
Spermidin	Roth
Spermin	Roth
Taq-Polymerase	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth
Tween 20	Roth

Uranylacetat, Dihydrat	Ted Pella Inc. *
Xylencyanol	BioRad

3.3 Stämme, Stammhaltung und Kultivierung

3.3.1 *Tetrahymena pyriformis*

Tetrahymena pyriformis CCAP 11630/1W (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, Schottland) ist ein Isolat aus dem Jahr 1939 und kann axenisch gehältert werden. Dieser Stamm ist amiconucleat und folglich steril. *Tetrahymena pyriformis* wurde in sterilisiertem, flüssigem Proteosepepton-Hefeextrakt-Medium (PPY) kultiviert. PPY (modifiziert nach Curds und Cockburn, 1968) setzt sich folgendermaßen zusammen:

20 g Proteosepepton
2,5 g Hefeextrakt
ad 1000 ml deionisiertes Wasser

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Zur Stammhaltung von *Tetrahymena pyriformis* wurden Reagenzgläser mit 10 ml PPY genutzt. Alle zwei bis sechs Wochen wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden je nach Zelldichte 0,5 – 2 ml Kultur in frisches PPY übertragen. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus. Unter denselben Bedingungen wurde *Tetrahymena pyriformis* für Experimente gehältert; unterschiedlich alte Kulturen wurden vorgehalten. Falls für Untersuchungen sehr große Mengen benötigt wurden, wurde *Tetrahymena pyriformis* in größeren Volumina in Erlenmeyerkolben kultiviert.

Da die Nahrungsaufnahme in *Tetrahymena pyriformis* vom Zellzyklus abhängig ist (Chapman-Andresen und Nilsson, 1968; Nilsson, 1972) und um Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Fütterungsexperimenten zu gewährleisten, sollten die Zellzyklen der Individuen in einer *Tetrahymena pyriformis* Kultur synchronisiert werden. Dazu wurde die Hungermethode nach Cameron und Jeter (1970) angewandt. Diese schafft eine Synchronie von etwa 70 % nach erneuter Fütterung. Je nach Bedarf wurden *Tetrahymena pyriformis* Kulturen entweder in 1,5 ml Reaktionsgefäße oder 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und 3 min bei 300 – 7 000 g zentrifugiert, um sie vom

umgebenden PPY zu separieren. Der Zelniederschlag wurde in Phosphatpuffer bei pH 6,5 aufgenommen und suspendiert. Nach drei Waschschrinen mit diesem Puffer wurden die Zellen schließlich darin suspendiert und für mindestens 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Da der Puffer (Zusammensetzung nachfolgend) keine organischen Substanzen enthält, hungern die Ciliaten aus.

Phosphatpuffer pH 6,5 (Cameron und Jeter, 1970):

0,6 g/l KH_2PO_4

0,15 g/l K_2HPO_4

0,25 g/l MgSO_4

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit NaOH auf 6,5 eingestellt.

3.3.2 *Escherichia coli*

Für alle Experimente in dieser Arbeit wurde *Escherichia coli* XL1-blue verwendet, ein nicht pathogener K12 Stamm, der unter anderem durch das F-Plasmid $\text{F}'::\text{Tn10-Tet}^R$ gekennzeichnet ist, das sowohl Tetracyclinresistenz vermittelt als auch die Fähigkeit, Sex-Pili für aktive Konjugation zu bilden (Bullock *et al.* 1987). *Escherichia coli* XL1-blue diente als Kontroll- und Vergleichsstamm in verschiedenen Experimenten sowie als Rezipient für verschiedene Transformationsexperimente (nähere Charakterisierung unter 3.3.2.1). Außerdem wurde *Escherichia coli* XL1-blue vom F-Plasmid kuriert (siehe Abschnitt 3.3.2.2), um den Einfluss der Sex-Pili auf die Interaktion zwischen beiden Organismen zu prüfen, da einerseits gezeigt wurde, dass die Aufnahme durch Protozoen die Konjugation zwischen den Futterbakterien induziert (Schlimme *et al.*, 1995), und andererseits, dass *Escherichia coli* auch Konjugationsbrücken zu Zelloberflächen anderer Spezies bildet (Heinemann und Sprague, 1989).

Escherichia coli wurde auf Luria-Bertani Medium (LB; Miller, 1977) kultiviert:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

15 g Agar-Agar, entfällt bei Flüssigmedium

ad 1 000 ml deionisiertes Wasser

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Dem Medium wurde bei Bedarf nach dem Autoklavieren Ampicillin (50 µg/ml) oder Isopropyl-β-D-galactopyranosid (IPTG; 0,5 mM) zugegeben.

Zur Stammhaltung von *Escherichia coli* wurden zwei alternative Möglichkeiten angewandt. Die Bakterien wurden auf Schrägagarröhrchen (5 ml festes LB in 20 ml Reagenzgläsern mit Schüttkappen) kultiviert. Sobald nach dem Beimpfen erste Kolonien wuchsen, wurden die Röhrchen mit Parafilm verschlossen. Diese Maßnahme sowie die Lagerung bei Raumtemperatur an einem Ort ohne intensive Lichteinstrahlung verhindern das Austrocknen der Kulturen. Außerdem wurden Glycerinröhrchen (5 ml Schraubverschlussröhrchen) zur Stammhaltung angelegt. Hierfür wurde zu 2 ml einer frischen, aber stationären *Escherichia coli* Kultur Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % gegeben. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Röhrchen bei -20 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Für den Laboralltag wurden Einzelkolonieausstriche von *Escherichia coli* auf festem LB in Petrischalen angefertigt. Zur Selektion auf den Plasmiderhalt der Transformantenstämme wurde dem Medium 50 µg/ml Ampicillin (LB_{Amp}) zugesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit Parafilm verschlossen können die Petrischalen für mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, jedoch sollten etwa alle vier Wochen frische Einzelkolonieausstriche angefertigt werden.

Für Experimente wurden grundsätzlich frische Übernachtkulturen von *Escherichia coli* benutzt. Eine Einzelkolonie wurde in 3 ml flüssiges LB in einem Reagenzglas überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C auf einem Reagenzglasroller inkubiert. Für die Überexpression bestimmter Gene der Transformantenstämme können die Induktoren bereits den Vorkulturen beigegeben werden (siehe 3.3.2.1).

3.3.2.1 Charakterisierung der Transformanten von *Escherichia coli*

Je nach Fragestellung wurden verschiedene Transformantenstämme von *Escherichia coli* genutzt, die nachfolgend näher charakterisiert werden.

3.3.2.1.1 *Escherichia coli* pBS-neoTet

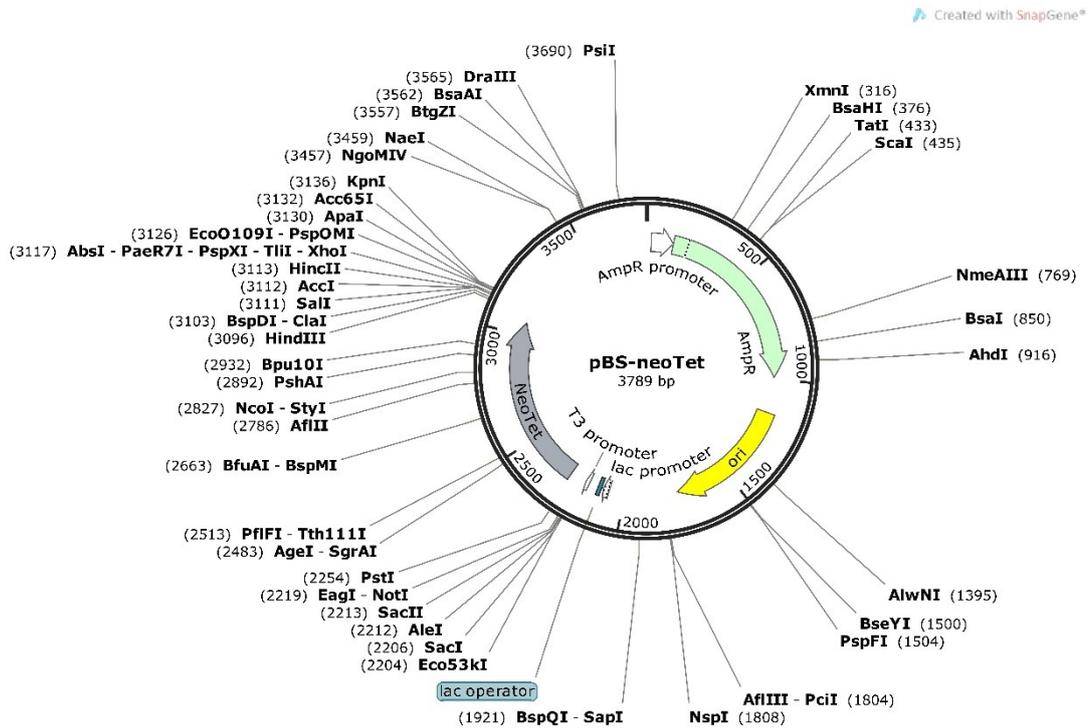


Abb. 3-1: Plasmidkarte von pBS-neoTet. Auf dem Vektor pBlueskriptSK (+) liegt das hinsichtlich des Codongebrauchs für *Tetrahymena thermophila* optimierte Neomycinresistenzgen neoTet. Die Plasmidkarte wurde mit SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC) erstellt.

Das Grundgerüst des transformierten Plasmids bildet der Vektor pBlueskript SK(+), der aufgrund des *bla*⁺-Gens, das für β -Lactamase kodiert, Ampicillinresistenz vermittelt (Abb. 3-1). Zusätzlich trägt es ein Derivat des *nptII*⁺-Gens, ein Neomycinresistenzgen, das aus dem bakteriellen Transposon Tn5 stammt. Dieses Gen codiert für das Enzym Aminoglycosid-3'-phosphotransferase II, das Aminoglycosidantibiotika der Neomycinfamilie über Phosphorylierung deaktiviert (Beck *et al.*, 1982). Das *nptII*⁺-Gen wurde in diesem Fall für den Codongebrauch des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* optimiert und trägt den Namen neoTet (Mochizuki, 2008). Das Plasmid pBS-neoTet wurde von Kazufumi Mochizuki (Wien) zur Verfügung gestellt.

3.3.2.1.2 *Escherichia coli* pNeo4

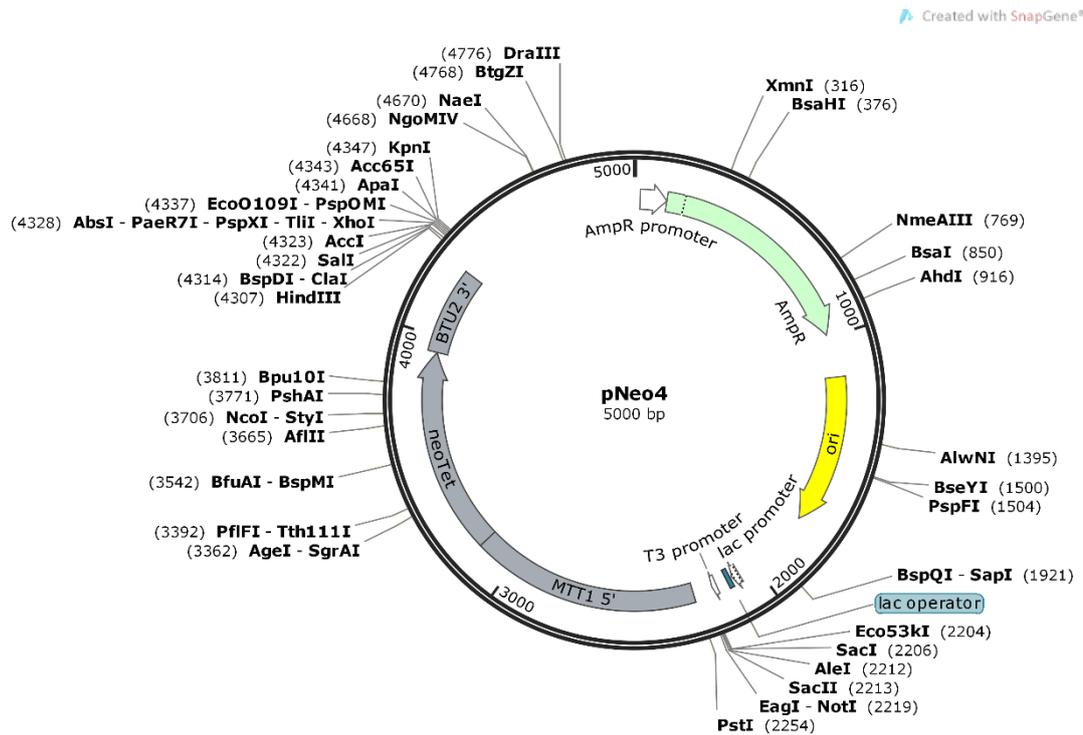


Abb. 3-2: Plasmid-Karte von pNeo4. Dem pBlueskript-Rückgrat wurde die Neo4-Kassette bestehend aus dem *Tetrahymena thermophila* Promotor *MTT1*, dem NeoTet-Gen und der untranslatierten Region *BTU2* aus *Tetrahymena thermophila* hinzugefügt. Die Plasmid-Karte wurde mit SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC) erstellt; die zugrunde liegende Sequenz ist auf NCBI unter folgender Nummer abrufbar: EU606202.

Das Plasmid beruht auf pBS-neoTet (Abb. 3-2), allerdings wurden zusätzliche Optimierungen für die Expression in *Tetrahymena thermophila* unternommen (Mochizuki, 2008). Das Resistenzgen *neoTet* steht unter der Kontrolle des *MTT1*-Promotors aus *Tetrahymena thermophila*. Dieser ist mit Schwermetallen induzierbar, sodass den Kulturen zur Induktion des Promotors 1,0 µg/ml Cadmiumchlorid zugesetzt wurde. Am 3'-Ende des Gens wurde die untranslatierte Region des *BTU2*-Gens hinzugefügt, das in *Tetrahymena* für β-Tubulin codiert. Auch dieses Plasmid wurde von Kazufumi Mochizuki (Wien) zu Verfügung gestellt.

3.3.2.1.3 *Escherichia coli* pNeo4-DsRed

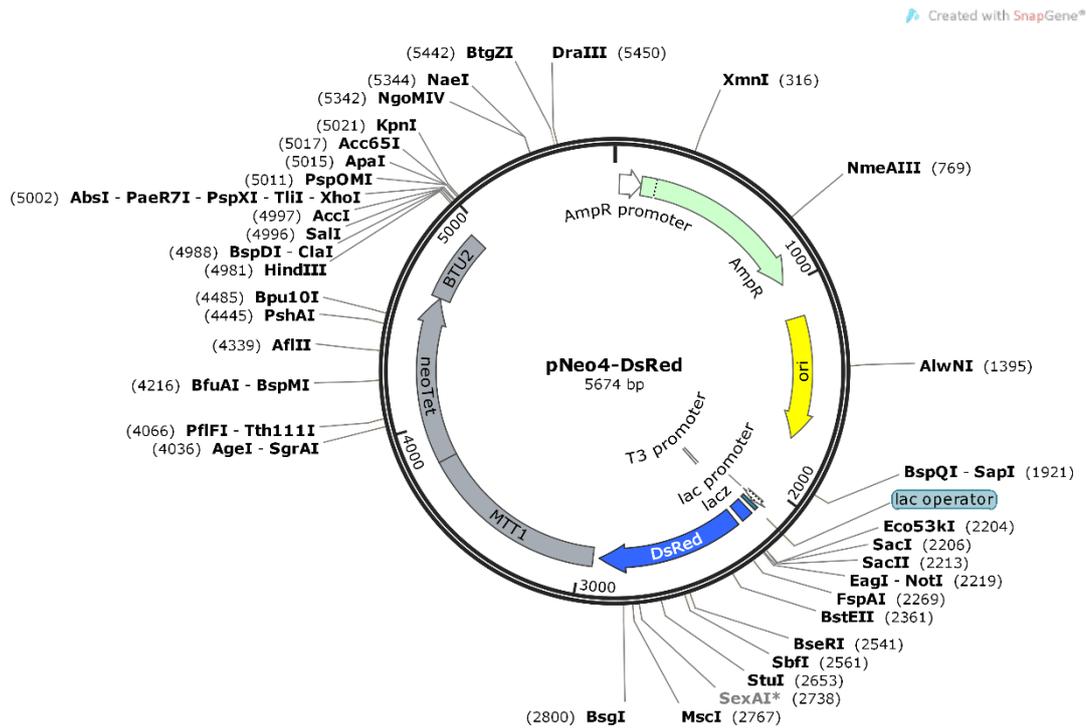


Abb. 3-3: Plasmid-Karte von pNeo4-DsRed. Es basiert auf pNeo4, dem zusätzlich das Gen für die Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed unter der Kontrolle des *lac*-Promotors hinzugefügt wurde. Die Plasmid-Karte wurde mit SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC) erstellt.

Dieses Plasmid (Abb. 3-3) beruht auf pNeo4 und trägt zusätzlich das Gen für das rot fluoreszierende Protein DsRed aus der Anthozoen-Gattung *Discosoma* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (Baird *et al.*, 2000; Behnsen *et al.*, 2007), sodass es durch Zugabe von Lactose bzw. 0,5 mM Isopropyl- β -D-galactopyranosid (IPTG) induziert werden kann. Die Stoffe binden an den *lac*-Repressor und ermöglichen so die Transkription des nachfolgenden Gens. Das Plasmid pNeo4-DsRed wurde am Lehrstuhl von Anke Burmester (Jena) konstruiert und zur Verfügung gestellt.

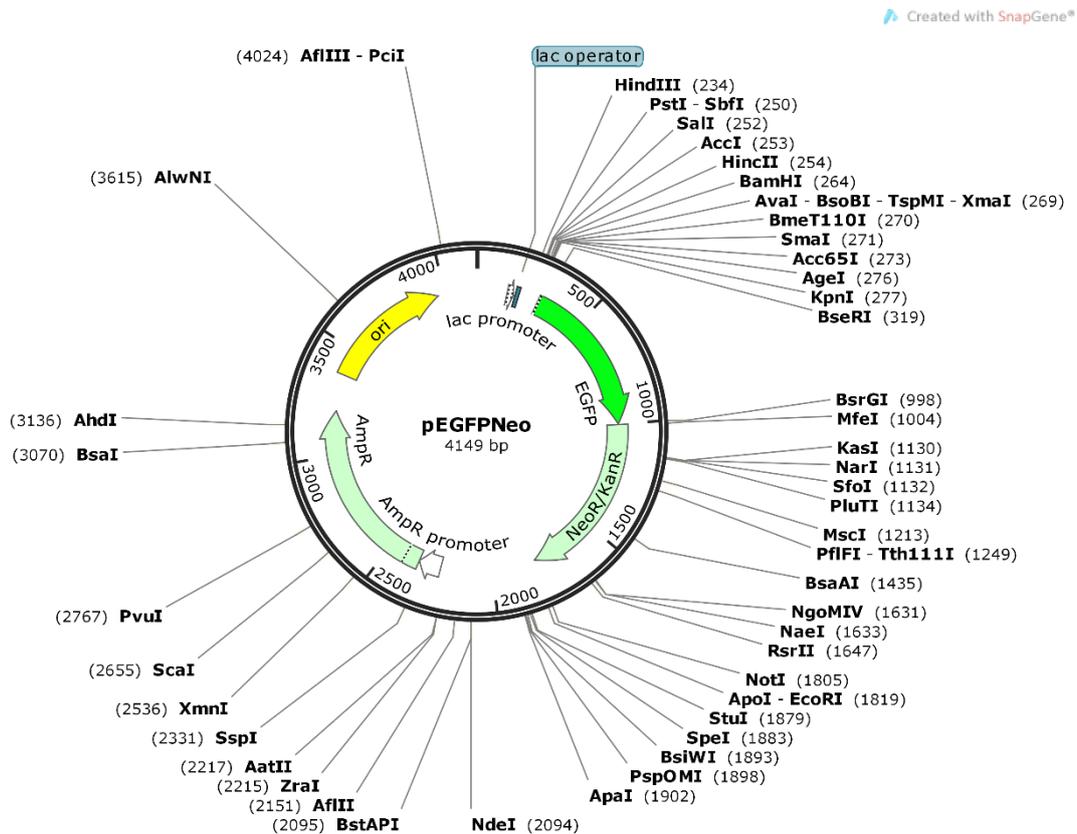
3.3.2.1.4 *Escherichia coli* pEGFP-neo

Abb. 3-4: Plasmid-Karte von pEGFPNeo. Unter der Kontrolle des lac-Promotors liegt das Gen, das für ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein GFP und der Neomycinphosphotransferase codiert. Die Plasmid-Karte wurde mit SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC) erstellt.

Das Grundgerüst dieses Plasmids bildet pBlueskript SK(+) (Abb. 3-4). Es codiert zudem für ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein eGFP (Zhang *et al.*, 1996) und der Neomycinphosphotransferase (*nptII*; Beck *et al.*, 1982). Das Gen steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, sodass die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert werden kann. Das Plasmid wurde von Anke Burmester (Jena) zur Verfügung gestellt.

3.3.2.2 Kurieren des F-Plasmids

Wie unter 3.3.2 erwähnt, wurde *Escherichia coli* vom F-Plasmid kuriert, um den Einfluss der Sex-Pili auf die Interaktion zwischen Bakterium und *Tetrahymena pyriformis* zu prüfen. Die angewandte Methode wurde von Hirota (1960) beschrieben. Zum Kurieren wurden etwa 10^4 Zellen einer frischen Übernachtskultur von *Escherichia*

coli XL1-blue in flüssiges LB überführt, dessen pH mit Natriumphosphatpuffer auf 7,6 eingestellt wurde. Dem Medium wurde zusätzlich noch 20 µg/ml Acridinorange beigegeben und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter guter Belüftung inkubiert. Eine dekadische Verdünnungsreihe wurde auf LB ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden 249 Klone auf LB und zusätzlich auf LB mit 50 µg/ml Tetracyclin (LB_{Tet}) gepickt, um für Bakterien ohne F-Plasmid zu screenen, da diese nach Plasmidverlust nicht mehr auf tetracyclinhaltigem Medium wachsen können. Die Verlustrate lag bei 3,2 %. Um solche Bakterien zu erkennen, die nur das Tetracyclinresistenzgen, nicht aber das gesamte Plasmid verloren haben, wurden die sensitiven Bakterien mit dem Bakteriophagen M13 infiziert, der bei der Infektion auf die Bindung an F-Pili angewiesen ist (Salivar *et al.*, 1964; Henry und Pratt, 1969). Zur Infektion wurden 100 µl einer frischen Übernachtskultur der Teststämme mit 100 µl des Phagenlysats vermischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Mischung wurde im Anschluss mit 3 ml LB-Weichagar (6 g/l Agar-Agar) versetzt und das Gemisch auf LB Platten gegossen. Nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C wurden die Platten hinsichtlich des Vorhandenseins der M13-typischen trüben Plaques überprüft. Als Kontrolle wurde *Escherichia coli* XL1-blue infiziert. Lediglich auf den Kontrollplatten wurden Plaques gefunden. Somit hatten alle getesteten Stämme das F-Plasmid verloren und konnten folglich keine Sex-Pili mehr bilden. Der erhaltene F⁻ Stamm wurde mit allen unter 1.3.2.1 aufgeführten Plasmiden transformiert.

Um zusätzlich zu prüfen, ob die gemessenen Effekte tatsächlich ursächlich mit den Sex-Pili verbunden sind, wurde der F⁻ Stamm mit dem F-Plasmid reinfiziert. Als Rezipient fungierte der Transformantenstamm *Escherichia coli* F⁻ pNeo4-DsRed, als Spender *Escherichia coli* XL1-blue. Dies ermöglichte die Selektion auf mehrere Merkmale. Um Rezipienten von Empfängern zu unterscheiden, wurde mit der auf dem Plasmid pNeo4-DsRed codierten Ampicillinresistenz gearbeitet, die der Spenderorganismus nicht aufweist. Zusätzlich erhalten Rezipienten die Tetracyclinresistenz durch das F-Plasmid. Für die Reinfektion wurden jeweils frische Übernachtskulturen beider Stämme zusammen in 5 ml LB zu einer finalen Verdünnung von 1:100 gegeben und für 15 min bei 37 °C sanft geschüttelt. Danach wurde die Kultur für weitere 15 min bei 37 °C ohne Agitation bebrütet. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur wurde die Mischkultur schließlich auf LB plattiert, so dass etwa 100 Kolonien pro Platte zu erwarten waren.

Nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C wurden rötliche Kolonien auf LB_{Tet}, LB_{Amp} und LB gepickt. Die rötlichen Kolonien wurden gewählt, da diese wegen der dsRed-Expression definitiv dem genetischen Hintergrund des Rezipienten entsprechen. Nur solche Klone, die auf beiden Selektivmedien wachsen, sind reinfizierte F⁻ Stämme. Die Reinfektionsrate lag mit dieser Technik bei 15,4 %.

3.3.2.3 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration von Paromomycin

Um zu testen, ob die verschiedenen Neomycinresistenzgenkonstrukte zu unterschiedlich starker Resistenz der *Escherichia coli* Transformanten gegen Paromomycin führen, wurde mit dem Plattendiffusionstest die minimale Hemmstoffkonzentration bestimmt (Hewitt und Vincent, 1989). Paromomycin wurde verwendet, da es zusätzlich das Wachstum von *Tetrahymena pyriformis* hemmt und deshalb in verschiedenen Cokultivierungsversuchen mit Transformanten festgestellt wurde, ob die Cokultivierung die Überlebensfähigkeit des Ciliaten erhöht.

Für den Plattendiffusionstest wurden 200 µl frischer Übernachtskulturen aller Transformantenstämme sowie *Escherichia coli* XL1-blue und des F⁻-Derivats mit jeweils 3 ml LB-Weichagar (6 g/l Agar-Agar) vermischt und auf LB Platten gegeben. Nach Erkalten und Verfestigen des Weichagars wurden mit einer sterilen Pasteur-Pipette je vier Löcher in das Medium gestanzt. In diese wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an Paromomycin bei gleichbleibendem Volumen gegeben. Nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C bildeten sich um die ausgestanzten Löcher Hemmhöfe im Bakterienrasen, da an diesen Stellen das Bakterienwachstum durch das Antibiotikum unterdrückt wurde. Die Hemmhofdurchmesser wurden gemessen. Nach Abzug des Lochradius wurde der Radius der Höfe gegen die Konzentration aufgetragen und die minimale Hemmstoffkonzentration durch Extrapolation auf den Hemmhofdurchmesser Null bestimmt. Die Tests wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt.

3.3.3 Cokultivierung von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli*

Tetrahymena pyriformis und *Escherichia coli* wurden zu verschiedenen Zwecken und für unterschiedlich lange Dauer in PPY cokultiviert. Zur besseren Sauerstoffversorgung wurden Erlenmeyerkolben als Kulturgefäße verwendet, da die größere Oberfläche den Gasaustausch zwischen Atmosphäre und Medium erhöht. Die Volumina waren an den

Bedarf angepasst. Zum Beimpfen wurde eine hinreichend dichte Vorkultur von *Tetrahymena pyriformis* (ca. 10^5 Zellen/ml) im Verhältnis 1:4 bis 1:5 angeimpft. Eine frische Übernachtskultur von *Escherichia coli* oder deren Transformanten wurde 200fach verdünnt hinzugegeben. Nach etwa zwei Tagen Inkubation bei sanfter Agitation und Raumtemperatur wurden die Kulturen ohne Schütteln weiterhin bei Raumtemperatur bebrütet, da die Bakterien *Tetrahymena pyriformis* sonst überwachsen, wie in früheren Cokultivierungsversuchen im Rahmen meiner Diplomarbeit ermittelt wurde. Die Standkultur ruhte so lange, bis der Ciliat die für Experimente erforderliche Zelldichte erreichte. Im Falle von Langzeitcokultivierung, die auf die hier beschriebene Weise initiiert wurde, wurden alle zwei bis drei Wochen frische Subkulturen angefertigt und regelmäßig auf Kontaminationen überprüft.

3.4 Transformation von *Escherichia coli*

Escherichia coli weist keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme freier DNA auf, sodass vor der Transformation die Kompetenz artifiziell induziert werden muss. Hierfür wurden die Zellen mit eiskaltem Calciumchlorid behandelt (Cohen *et al.*, 1972). Eine frische Übernachtskultur von *Escherichia coli* wurde in einer Verdünnung von 1:100 zu 100 ml LB in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Zellen wurden bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,4 unter starker Belüftung bei 37 °C wachsen gelassen und anschließend durch Schwenken in Eiswasser abgekühlt. Die Zellsuspensionen wurden in Sorvall-SS34 Zentrifugenbecher überführt und für 7 min bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelleniederschlag aus je einem Becher in 5 ml einer eiskalten, filtersterilisierten Lösung aus 60 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin, 10 mM Tris-Cl pH 7,2 suspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut für 5 min bei 2 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml der oben genannten Lösung suspendiert. Zu ca. 0,5 µg Plasmid-DNA wurden 0,2 ml Aliquots der kompetenten Zellen gegeben und diese Mischung wurde für 40 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet die Plasmid-DNA an die Oberfläche von *Escherichia coli*. Durch einen Hitzeschock für 3 min bei 42 °C wird diese dann in die Zellen aufgenommen. Um die Expression der auf dem Plasmid codierten Resistenzgene zu ermöglichen, wurden die Zellen mit 1 ml LB versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor jeweils 0,2 ml des Transformationsansatzes auf

Selektivmedium (LB mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet wurden. Am Folgetag wurden Einzelkolonieausstriche individueller Transformanten auf LB_{Amp} angefertigt.

3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmide aus den Transformanten wurden zwei verschiedene Techniken angewandt. Eine Prozedur basiert auf dem Prinzip der Gleichgewichtsdichtezentrifugation im Caesiumchloridgradienten, das in der Erstbeschreibung zur Darstellung von Supercoil-DNA beschrieben wurde (Clewell und Helinski, 1969).

200 ml LB in 1 000 ml Erlenmeyerkolben wurden mit einer frischen Übernachtskultur der Transformanten zu einer Verdünnung von 1:100 beimpft und bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln bis zu einer OD_{578 nm} von 0,6 wachsen gelassen, die in etwa die frühe exponentielle Wachstumsphase von *Escherichia coli* markiert. Den Kulturen wurde beim Erreichen dieser Phase Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml hinzugegeben, da alle Plasmide in dieser Arbeit auf dem ColE1-ori basieren und die Zugabe von Hemmstoffen der Translation die Amplifikation der Plasmide bewirkt. Die Kulturen wurden für mindestens 4 h weiter geschüttelt, bevor sie in Sorvall-SLA-Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 6 000 rpm (Rotor SLA 1500) und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Niederschlag wurde in 8 ml einer Lösung aus 25 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris-Cl pH 8,0 suspendiert. Dem Gemisch wurde 0,8 ml 10 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,01 M EDTA hinzugegeben und die Reaktion wurde auf Eis für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml 0,25 M Tris-Cl pH 8,0, 0,25 M EDTA wurde die Reaktion für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurde dem Lyseansatz 12 ml 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2 % Triton X-100 zugegeben. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde das Lysat für 1 h bei 20 000 rpm und 2 °C zentrifugiert. Dieses *cleard lysate* wurde in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und pro ml Lysat mit 0,95 g CsCl sowie 0,02 ml 10 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Mischung wurde in Zentrifugenröhrchen für den Vertikalrotortyp TV-860 überführt, die nach dem Tarieren mit dem Crimper verschlossen wurden. Die Proben wurden für 20 h bei 44 000 rpm und 25 °C zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Caesiumchlorid-Dichtegradient, in dem sich die Plasmid-DNA ihrer Dichte

entsprechend einordnet. Aufgrund ihrer kompakten Konformation lagert sie erheblich weniger Ethidium-Ionen ein, ist somit dichter als die lineare genomische DNA und bildet folglich eine Bande an einer niedrigeren Position im Zentrifugenröhrchen. Die Plasmid-DNA wurde unter langwelligem UV-Licht mit sterilen Einmalkanülen und Spritzen geerntet. Zur Entfernung des Ethidumbromids wurden die Proben mit NaCl-gesättigtem Isopropanol eluiert und anschließend in Dialyseschläuche überführt. Die Plasmid-DNA wurde sukzessive für 3 h, 6 h und über Nacht gegen jeweils 1 l 10 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1 mM EDTA dialysiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Absorptionsspektren zwischen 200 nm und 400 nm am UV-Spectrophotometer aufgenommen.

Diese Technik zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* fand Anwendung, wenn größere Mengen sowie sehr saubere Plasmid-DNA benötigt wurden. Für kleinere Mengen wurde eine Plasmidpräparation im Alkalischen nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur eines Transformantenstammes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl pH 8,0 suspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml in 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA) wurde die Suspension für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellwand zu verdauen. Anschließend wurden zunächst 300 µl 0,2 M NaOH, 1 % SDS und nach vorsichtigem Mischen 300 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 hinzugegeben. Die Reaktion wurde mindestens 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie bei 12 000 rpm 10 min zentrifugiert wurde. 400 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform vermischt und 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert, um die restlichen proteinösen Bestandteile zu entfernen. Die anorganische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit einem gleichen Volumen Isopropanol vermischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 15 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 12 000 rpm für 5 min). Nach der vollständigen Trocknung des Niederschlags wurde die Plasmid-DNA in 25 µl doppelt deionisiertem Wasser aufgenommen und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

3.6 Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Es gibt verschiedene Verfahren, die Zellzahl in Kulturen zu bestimmen. Man unterscheidet direkte und indirekte Methoden. Zur direkten Messung eignet sich das Zählen der Zellen in Zählkammern, die aufgrund der definierten Fläche des Zählnetzes sowie der Tiefe der Zählkammer die Ermittlung der Zellzahl in einem definierten Volumen ermöglichen. Für *Tetrahymena pyriformis* wurde die Jessen-Zählkammer genutzt. Die Kleinquadrate haben eine Fläche von $0,0625 \text{ mm}^2$, die Kammer eine Tiefe von $0,4 \text{ mm}$, sodass sich ein Kleinkammervolumen von $0,025 \text{ mm}^3$ ergibt. Im Regelfall wurden sechs Großquadrate ausgezählt. Da die Motilität lebender *Tetrahymena pyriformis* Kulturen das Zählen erschwerte, wurden die Zellen unmittelbar vor der Titerbestimmung mit dem Atmungsgift Natriumazid getötet. Dennoch konnte zwischen vorher lebenden und toten Individuen unterschieden werden, weil letztere schnell lysieren und sich folglich von intakten Zellen unterscheiden.

Für *Escherichia coli* wurde die Zählkammer nach Thoma genutzt, deren Kleinquadrate eine Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ haben. Die Kammertiefe ist mit $0,1 \text{ mm}$ angegeben, sodass das Kleinkammervolumen $0,00025 \text{ mm}^3$ beträgt. Anders als bei *Tetrahymena pyriformis* kann mit dieser Technik nicht zwischen lebenden und toten Bakterien unterschieden werden. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl (*colony forming units/ml*; *cfu/ml*) von *Escherichia coli* wurden geeignete Verdünnungen auf LB ausplattiert und nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C Kolonien gezählt und die Lebendzellzahl berechnet.

Ein indirektes Verfahren zur Zellzahlbestimmung ist das Messen der optischen Dichte (OD) einer Kultur mit einem Photometer bei einer Wellenlänge, bei der weder das Medium noch die Zellen Licht absorbieren, hier 578 nm . Das Photometer misst folglich im Fall von Zellkulturen, wie stark das einfallende Licht gestreut wird. Je dichter eine Kultur ist, desto stärker wird das Licht gestreut und desto weniger erreicht die Photozelle. Mit dieser Technik kann nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Zudem muss die Korrelation zwischen der OD und der Zellzahl/ml ermittelt werden. Hierfür wurden OD-Werte mit den in Zählkammern gemessenen Titern verglichen. Für *Tetrahymena pyriformis* entspricht die $OD_{578 \text{ nm}}$ von $1,0$ einer Zellzahl von $5,8 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Für die in der Arbeit verwendeten

Escherichia coli-Stämme wurde aus den Vergleichen beider Werte abgeleitet, dass die Zellzahl/ml bei einer OD_{578 nm} von 1,0 etwa $2 \cdot 10^8$ beträgt.

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde die Zellzahl, zumeist mit Bestimmung der OD, über einen zeitlichen Verlauf gemessen. Zusätzlich oder alternativ wurden die Titer mit Zählkammern, bzw. die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. Die ermittelten Werte (OD oder Titer) wurden logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, um die Bestimmung der exponentiellen Wachstumsphase sowie der Generationszeit zu erleichtern. Wachstumskurven wurden von unterschiedlichen *Tetrahymena pyriformis* Kulturen ermittelt. Neben axenischen Kulturen wurden Cokulturen mit verschiedenen Bakterien angelegt. Mikropartikel wurden in PPY und Phosphatpuffer pH 6,5 verfüttert, um ihre Eignung als Nahrungsquelle sowie deren Einfluss auf die Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* zu prüfen. Jede dieser Kulturen wurde sowohl stehend als auch unter Agitation inkubiert.

Tetrahymena pyriformis weist diverse Auxotrophien auf (Holz, 1973). Um zu sehen, ob die Zugabe der benötigten Substanzen das Wachstum von *Tetrahymena pyriformis* mit Mikropartikeln in Phosphatpuffer verbessert, wurden in Anlehnung an ein für *Tetrahymena* spp. definiertes Medium (Holz, 1973) verschiedene Kulturansätze angelegt und die Entwicklung der Zellzahl über mehrere Tage gemessen. Die essentiellen Aminosäuren sind durch die Rinderserumalbumin-haltigen Mikropartikel abgedeckt. Für den Bedarf an Spurenelementen wurde einer Kultur sterile SL8-Lösung pH 6,5 (Biebl und Pfennig, 1978) zu folgender Konzentration zugegeben: 26 mg/l EDTA, 7,5 mg/l FeCl₂, 350 µg/l ZnCl₂, 500 µg/l MnCl₂ x 4 H₂O, 310 µg/l H₃BO₃, 950 µg/l CoCl₂ x 6 H₂O, 85 µg/l CuCl₂ x 2 H₂O, 120 µg/l NiCl₂ x 6 H₂O, 180 µg/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O. Einer weiteren Kultur wurden 40 mg/l Uracil und 41 mg/l Guanin zugegeben. Eine dritte Kultur erhielt eine Vitaminlösung mit folgender Konzentration: 10 µg/l Folsäure, 10 µg/l Liponsäure, 1 µg/l Biotin, 100 µg/l Pyridoxamin, 150 µg/l Riboflavin, 500 µg/l Thiamin, 750 µg/l Pantothenensäure, 900 µg/l Nikotinsäure. Eine vierte Kultur enthielt alle Zusatzstoffe.

3.7 Herstellung synthetischer Mikropartikel

Die Synthese der Rinderserumalbumin-Polymethacrylat-Mikropartikel basiert auf der von Seljelid *et al.* (1997) publizierten Prozedur. Als Methacrylat wurde Poly(methylmethacrylat-*co*-butylmethacrylat) mit der mittleren Molmasse 75 000 verwendet (Sigma-Aldrich). 8 ml einer Lösung von 20 g Rinderserumalbumin in 100 ml Wasser wurden in einem 100 ml Becherglas mit 50 ml Methacrylat versetzt, das in 66 ml Toluol und 66 ml Chloroform gelöst wurde. Die Mischung wurde zunächst unter ständiger Kühlung im Eisbad für 4 min bei 10 000 rpm ohne Zusätze mit dem Ultra Turrax dispergiert. Während der nächsten drei Minuten wurden tropfenweise 7 ml einer Mischung von 100 ml Toluol und 25 % Glutaraldehyd zugegeben. Der Ansatz wird in dieser Zeit etwa 50 °C warm. Nach Abkühlen im Eisbad bei langsamer Rührgeschwindigkeit wurde nochmals für 3 Minuten bei 15 000 rpm dispergiert. Die Viskosität steigt in dieser Zeit stark an. Nach Verdünnung mit weiteren 100 ml der Toluol/Chloroform-Mischung wurde der Ansatz nochmals für 2 min dispergiert. Im mikroskopischen Bild sieht man nahezu ideal kugelförmige, homogene Partikel. Die Partikelpräparation wurde nach dem Absetzen über Nacht bei Zimmertemperatur mit ca. 5 000 g zentrifugiert und zunächst in 150 ml Toluol/Chloroform, dann in 150 ml Aceton und schließlich in 150 ml Wasser gewaschen. Anschließend werden die Mikropartikel zunächst auf dem Schüttler, anschließend für 5 min mit dem Ultra Turrax bei 10 000 rpm in Wasser suspendiert.

Zum Färben der Mikropartikel wurden 10 ml der Partikelsuspension mit 1 ml 1 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat (FITC) vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach 30 min wurde der pH-Wert mit 0,05 M NaOH auf 8,5 eingestellt. Die Mikropartikel wurden anschließend 2 x mit sterilem demineralisiertem Wasser gewaschen.

Die Oberflächenmodifikation der Mikropartikel beruht auf einer Prozedur, die von Drabick *et al.* (1998) publiziert wurde und folgendermaßen modifiziert wurde. 1 ml einer Partikel-Suspension wurde mit 10 mg/ml des zu bindenden Liganden versetzt. 30 mg/ml N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDAC) wurden für die kovalente Bindung der Liganden an die Oberfläche hinzugegeben. Hierbei wird das EDAC selbst kein Bestandteil des fertigen Produkts. Der Kopplungsansatz wurde für

70 min auf einem Reaktionsgefäßschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min wurde der pH-Wert mit 0,05 M HCl auf 5,5 eingestellt, um optimale Kopplungsbedingungen zu schaffen. Nach zweimaligem Waschen der Partikel mit Wasser wurden diese in steriler Saline suspendiert und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Mikropartikel wurden von Johannes Wöstemeyer (Jena) hergestellt.

3.8 Chemische Oberflächenmodifikation von *Escherichia coli*

Da die modifizierten Mikropartikel einen erheblichen Einfluss auf die Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* hatten, wurde die Methode auf die Oberflächenmodifikation von *Escherichia coli* übertragen (Siegmond und Wöstemeyer, 2016). Für die Arbeiten wurde der rot fluoreszierende Transformantenstamm pNeo4-DsRed verwendet. 25 ml LB mit 0,5 mM IPTG in einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden mit einer frischen Übernachtskultur von *Escherichia coli* (Verdünnung 1:100) beimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Aliquots von 1 ml wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei 10 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach drei Waschschrritten mit steriler Saline wurden die Zellen erneut in Saline suspendiert und mit EDAC zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt. Die Reaktion wurde für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Reaktionsgefäßschüttler inkubiert, bevor die Liganden zu einer finalen Konzentration von 1 mM zugefügt wurden. Für optimale Kopplungsbedingungen wurde der pH-Wert mit Kaliumphosphatpuffer auf 4,9 eingestellt. Nach erneuter Inkubation von 20 min wurden die modifizierten Zellen 3 x mit steriler Saline gewaschen, in Saline mit 1 mM Glycin suspendiert und schließlich für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Reaktionsgefäßschüttler inkubiert, um EDAC-Reste zu binden. Bevor die modifizierten Bakterien an *Tetrahymena pyriformis* verfüttert wurden, wurden sie nach drei weiteren Waschschrritten in Saline suspendiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mitgeführt, die zwar wie die modifizierten Bakterien behandelt wurde, allerdings nur mit sterilem Wasser anstelle von Kopplungsreagenz und Liganden versetzt wurde. Zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit von *Escherichia coli* nach der Kopplung und Lagerung im Kühlschrank wurden dekadische Verdünnungen der behandelten und unbehandelten

Bakterien an drei aufeinander folgenden Tagen auf LB plattiert und nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C Kolonien gezählt (Abb. 3-5).

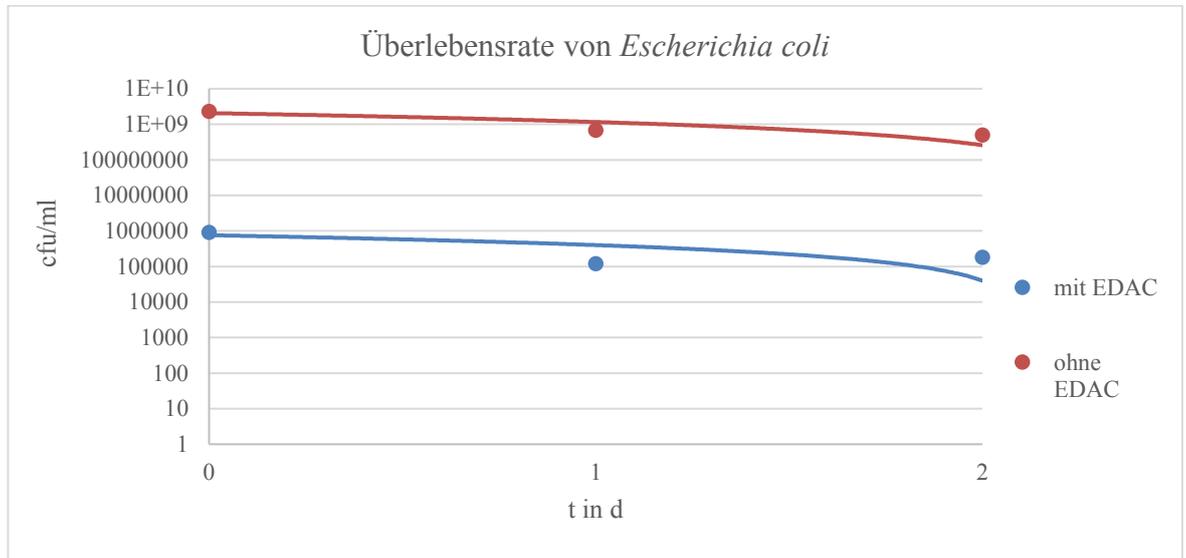


Abb. 3-5: Semilogarithmische Darstellung der Lebendzellzahl von *Escherichia coli* gegen die Zeit. Die Überlebensrate der Bakterien wurde am Beispiel der Kopplung mit 7-Amino-4-methyl-3-cumarinylacetat (AMCA) bestimmt (verändert aus Siegmund und Wöstemeyer, 2016).

Am Beispiel der Kopplung mit dem Farbstoff 7-Amino-4-methyl-3-cumarinylacetat (AMCA) wurde die Überlebensfähigkeit von *Escherichia coli* nach der Oberflächenmodifikation ermittelt. Etwa 10⁶ Zellen/ml überleben die Kopplung und sind in der Lage, sich zu teilen. Auch die Lagerung im Kühlschrank senkt die Zahl an teilungsfähigen Bakterien nicht erheblich, sodass für Fütterungsexperimente mit *Tetrahymena pyriformis* hinreichende Mengen lebensfähiger, modifizierter Bakterien vorhanden sind.

3.9 Fütterungsexperimente mit *Tetrahymena pyriformis*

Tetrahymena pyriformis wurde zu verschiedenen Zwecken mit *Escherichia coli* oder synthetischen Mikropartikeln gefüttert. Hauptsächlich sollte der Einfluss von biochemischen und biophysikalischen Oberflächeneigenschaften auf Ingestion und Verdauung des Ciliaten untersucht werden. Für die Fütterungsexperimente wurden synchronisierte Kulturen verwendet, wie unter 3.3.1 beschrieben wurde. Dies dient vor allem der Vergleichbarkeit verschiedener Experimente.

Zur Untersuchung der Oberflächeneinflüsse wurden einer Hungerkultur von *Tetrahymena pyriformis* entweder modifizierte Mikropartikel oder Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mikroskopisch untersucht wurden (Kapitel 3.10).

In einem weiteren Fütterungsexperiment sollte der Einfluss der Sex-Pili auf die Interaktion zwischen *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* überprüft werden. Basierend auf der Erkenntnis, dass die Membranzusammensetzung der Nahrungsvakuolen sich beim Abkühlen der Zellen auf 10 °C ändert, um die Fluidität zu erhalten (Wunderlich *et al.*, 1973; Nozawa und Kasai, 1978), wurde *Tetrahymena pyriformis* mit rot fluoreszierenden Transformanten mit und ohne F-Plasmid sowie den reinfizierten F⁺-Bakterien gefüttert und zunächst bei Raumtemperatur für 1 – 2 h inkubiert. Vor dem Abkühlen wurden die Kulturen mikroskopisch untersucht. Nach 16 h bei 10 °C ist der Prozess der Membranadaptation abgeschlossen und die Ciliaten beginnen erneut mit der Nahrungsaufnahme. Die Kulturen wurden im Anschluss während der Kühlung sowie nach erneuter Erwärmung auf Raumtemperatur mikroskopiert, um die Annahme zu bestätigen, dass durch die erhöhte Fluidität der Membran Bakterien häufiger aus den Nahrungsvakuolen entkommen und ob die Fähigkeit, Konjugationsbrücken zu bilden, diesen Effekt zusätzlich verstärkt.

3.10 Mikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden entweder digital oder analog angefertigt. Bei analogen Aufnahmen wurden die Negative bzw. Dias anschließend eingescannt. Zur Bildbearbeitung wurden Axio Vision (Zeiss) und PhotoFiltre 7 verwendet. Alle Abbildungen in dieser Arbeit sowie die dazugehörigen Originale finden sich auf der beigefügten DVD.

3.10.1 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für mikroskopische Untersuchungen von *Tetrahymena pyriformis* wurden je nach Aufgabenstellung verschiedene Mikroskope verwendet. Zur Bestimmung von Zellzahlen und zum Überprüfen der Kulturen auf Kontaminationen wurde ein einfaches Durchlichtmikroskop benutzt. Zum Erstellen mikroskopischer Aufnahmen der verschiedenen Experimente sowie zur Verfolgung fluoreszenzmarkierter Bakterien oder

Mikropartikel diente ein Auflichtfluoreszenzmikroskop, das zusätzlich Phasenkontrast- und Interferenzkontrastoptik besitzt.

Soweit nicht anders angegeben, wurde *Tetrahymena pyriformis* lebend beobachtet. Um die Motilität der Ciliaten einzuschränken und so Aufnahmen mit längerer Belichtungszeit zu ermöglichen, wurden Objektträger benutzt, deren Oberfläche mit 2 % (w/v) Agarose in Wasser bedeckt wurde (modifiziert nach Glaser *et al.*, 1997; Hoppert, 2003). Da die Fluoreszenz der transformierten *Escherichia coli* Stämme (DsRed Filterkombination III, eGFP Filterkombination IV) nicht immer genutzt werden konnte, wurden die Bakterien mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Außerdem wurden die Mikropartikel mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gefärbt, da sie einen ähnlichen Lichtbrechungsindex wie *Tetrahymena pyriformis* aufweisen. Eine Übersicht über die verwendeten Farbstoffe findet sich in Tabelle 3-1.

Tab. 3-1: Übersicht über die verwendeten Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie

Farbstoff	Gefärbte Struktur	Filter	Konzentration	Lösungsmittel
DAPI	DNA	I, II	5 – 10 µg/ml	Ethanol
FITC	Mikropartikel	IV	0,1 mg/ml	Wasser
Nilrot	Membranen	III	0,5 µg/ml	Aceton

Die Filterkombinationen wurden wie folgt verwendet:

- I: Anregungsfilter BP 365, Farbteiler FT 395, Sperrfilter LP 397
- II: Anregungsfilter BP 436, Farbteiler FT 460, Sperrfilter LP 470
- III: Anregungsfilter LP510-KP560, Farbteiler FT 580, Sperrfilter LP 590
- IV: Anregungsfilter BP 485, Farbteiler FT 510, Sperrfilter 515-565

Die Farbstoffe wurden als konzentrierte Stammlösungen in den in der Tabelle aufgeführten Lösungsmitteln angesetzt. Für die Anwendung wurden entsprechend verdünnte Lösungen in 40 mM Natriumphosphat-gepufferter Saline, pH 7,0 (PBS) genutzt. Vor dem Mikroskopieren wurden die Farbstoffe hinzugegeben und die Organismen für 30 min im Dunkeln inkubiert.

Um die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* zu untersuchen, wurden die Ciliaten nach der Fütterung mit Bakterien oder Mikropartikeln mit dem pH-Indikator Neutralrot gefärbt, da das Ansäuern von Nahrungsvakuolen eine wichtige Voraussetzung für optimale Verdauungsbedingungen darstellt (Nilsson, 1977). Hierfür wurde Neutralrot zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml direkt auf den Objektträger gegeben (Mohr, 1981).

3.10.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Alle Proben wurden mit Glutardialdehyd und Osmiumtetroxid fixiert und anschließend in Epoxidharz eingebettet. Eine Übersicht der diversen Proben findet sich in Tab. 3-2.

Tab. 3-2: Übersicht über die für die Elektronenmikroskopie eingebetteten Kulturen. Angegeben sind nur solche Präparate, von denen Aufnahmen für diese Dissertation angefertigt wurden.

Name	Organismen	Inkubation vor der Einbettung
Axenisch	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Die Kulturen wurden ca. 2 Wochen in 100 – 200 ml PPY in 500 ml-Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur kultiviert.
Kurzzeitkokultur	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4	Beide Organismen wurden für ca. 1 Woche in 100 – 200 ml PPY bei Raumtemperatur kokultiviert.
Kurzzeitkokultur kuriert	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4	Beide Organismen wurden für 1 Woche in 100 – 200 ml PPY bei Raumtemperatur kokultiviert. Nach Zugabe von 250 µg/ml Paromomycin zur Kurierung externer Bakterien wurde die Kokultur in frisches PPY überführt und 1 Woche kultiviert.
Langzeitkokultur	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4	Beide Organismen wurden für ca. 1 Jahr in PPY kokultiviert. Zur Einbettung wurde eine ca. 2 Wochen alte Subkultur verwendet.
Langzeitkokultur kuriert	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4	Beide Organismen wurden für ca. 1 Jahr in PPY kokultiviert. Eine Subkultur wurde nach Zugabe von 250 µg/ml Paromomycin in frisches PPY überführt und 1 Woche kultiviert.

Kontrolle	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Putrescin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Putrescin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Cadaverin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Cadaverin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Spermin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Spermin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Spermidin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Spermidin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Hexylamin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Hexylamin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
Octylamin	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit Octylamin behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.

1 µM Endo-Porter	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit 1 µM Endo-Porter behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
10 µM Endo-Porter	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit 10 µM Endo-Porter behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.
5 µM Endo-Porter ohne EDAC	<i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> XL1-blue pNeo4-DsRed	Zu einer Hungerkultur von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in Phosphatpuffer pH 6,5 wurden mit 5 µM Endo-Porter behandelte Bakterien im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. 3 h nach Fütterung wurde die Probe fixiert.

Vor der Fixierung wurden die Zellen mit sanfter Zentrifugation (300 g, 5 bis 10 min) konzentriert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 2,5 % Glutardialdehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4 (Endkonzentrationen) wurden die Proben 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 300 g, 5 min). Die Zellen wurden in 1 % Osmiumtetroxid und 0,1 M Cacodylatpuffer aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur fixiert und kontrastiert. Nach drei Waschschritten in 0,1 M Cacodylatpuffer mussten die Proben vor der Einbettung dehydriert werden. Hierzu wurden die Proben für jeweils 15 min in Aceton mit ansteigender Konzentration [30 %, 50 %, 70 %, 90 % (v/v) und 2 x 100%] schrittweise entwässert.

Die entwässerten Proben wurden abschließend konsekutiv in das Epoxidharz eingebettet. Zunächst wurden die Zellen in eine Mischung aus 1/3 Volumen Spurr (Standard Medium, 4,1 g ERL 4221, 1,43 g D.E.R., 5,9 g NSA, 0,1 g DMAE; Spurr, 1969) und 2/3 Volumen 100 % Aceton überführt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben über Nacht mit geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes ruhen gelassen, sodass durch die Verdunstung des Acetons die Konzentration des Epoxidharzes stetig anstieg. Am Folgetag wurden die Proben noch

zweimal für 1 – 2 h in frischem Spurr aufgenommen, bevor sie jeweils auf mehrere Einbettungskapseln verteilt wurden. Abschließend härteten die eingebetteten Proben für 2 d bei 60 °C im Trockenschrank aus.

Bevor Ultradünnschnitte der Proben angefertigt wurden, musste die Spitze des Präparats entweder mit einem Probentrimmer oder konventionellen Rasierklingen auf die richtige Größe und den korrekten Bereich zurechtgeschnitten werden. Die Ultradünnschnitte (ca. 70 nm) wurden mit Glasmessern oder einem Diamantmesser am Ultramikrotom gefertigt und auf ein mit 0,8 % (w/v) Pioloform-befilmtes Kupfergrid aufgenommen.

Vor der Betrachtung der Schnitte im Elektronenmikroskop wurden die Proben zum Zweck der optimalen Sichtbarkeit der Strukturen nachkontrastiert. Dazu wurden die Grids mit der Schnittseite für 6 min auf einen Tropfen 1 % (w/v) Uranylacetat und für 4 min auf einen Tropfen 0,1 – 0,4 % (w/v) Bleicitrat gelegt (Venable und Coggeshall, 1965).

Die verschiedenen Proben wurden an einem Zeiss EM10 bei 60 kV mikroskopiert und Aufnahmen auf 3 x 4 Zoll Filme angefertigt. Die Negative wurden anschließend für 5 min entwickelt und 10 min fixiert.

3.11 Polymerase-Kettenreaktion

Zusätzlich zu mikroskopischen Techniken wurden intrazelluläre Bakterien mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) detektiert. Der Nachweis bestimmter Gensequenzen über Amplifikation mit der PCR ist äußerst empfindlich, da spezifisch an Zielsequenzen bindende Primerpaare entworfen wurden (Tab. 3-3). Die Sequenzen, auf deren Grundlage die Primer entworfen wurden, finden sich im Appendix.

Tab. 3-3: Übersicht über die Primerpaare

Zielgen	Primer 1	Primer 2	Größe des Amplifikats
Phosphoglyceratkinase (<i>PGK</i>)-Gen, kerncodiert	5' ttctaatagattctctcc cagg 3'	5' ggtgttatgtttaactct attggc 3'	756 bp
Cytochrom-Oxidase Untereinheit I (<i>COI</i>)-Gen, mitochondrial	5' aggatggaattagcaca ccccg 3'	5' gcacgtatcaaaaa gattcaggg 3'	517 bp
Ampicillinresistenzgen (<i>bla</i> , Amp ^R), Plasmid	5' cgtgtagataactacgat acggg 3'	5' actcattactctagcttc ccggc 3'	198 bp
Neomycinresistenzgen (<i>nptII</i> , neoTet), Plasmid	5' gcttgggtcgaaagactt ttcgg 3'	5' gcacgtacgatacgat gtttggc 3'	389 bp

Der Nachweis der DNA beider Organismen erfolgte jeweils mit zwei verschiedenen Zielgenen. Für *Tetrahymena pyriformis* wurden das kerncodierte Einzelkopiegen *PGK* und das mitochondriale Multikopiegen *COI* genutzt. Die Transformantenstämme von *Escherichia coli* sollten mit zwei plasmidcodierten Genen nachgewiesen werden. Dabei wurde einerseits das Gen *neoTet* gewählt, das dem Druck des selektiven Systems unterliegt, andererseits diente die Sequenz des *bla*-Gens als Grundlage. Diese beiden Gene wurden gewählt, um zu prüfen, ob das Plasmid die Integrität während längerer Cokultivierung verliert.

Als Template-DNA diente nicht wie üblich isolierte und gereinigte DNA, sondern aufgeschlossene Proben, die aus den Kulturen entnommen wurden. DNA-Isolation und Reinigung könnten zu artifiziellen Verschiebungen im Verhältnis von Protozoen- und Bakterien-DNA führen. Vor dem Aufschluss der Kulturen wurden die Proben lediglich mit DNase I behandelt, um auszuschließen, dass detektierte DNA aus lysierten Zellen im Kulturmedium stammt. Hierfür wurde die entnommene Kultur mit 2 µg/ml DNase I, 10 mM CaCl₂, 25 mM MgCl₂ versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10 000 rpm wurde der Überstand verworfen und der Zellniederschlag

in etwa gleichem Volumen deionisiertem Wasser gelöst. Zur Inaktivierung der DNase und zum Zellaufschluss wurde die Probe für 10 min auf 95 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für alle Primerpaare ließen sich die Reaktionsbedingungen der PCR standardisieren. Der Reaktionsansatz enthielt:

- 2,5 µl Template
- 0,4 µM Primer 1
- 0,4 µM Primer 2
- 2,5 µl 10x PCR Puffer
- 2 mM MgCl₂
- 0,2 mM Desoxynukleosidtriphosphat-Mix
- 5 units Taq-Polymerase
- Ad 25 µl deionisiertes Wasser

Der 10x konzentrierte PCR Puffer enthielt 750 mM Tris-Cl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20.

Die Reaktionsbedingungen der PCR lagen bei (1) 5 min Denaturierung bei 95 °C, (2) 45 sec Primerbindung bei 55 °C, (3) Extension für 1 min bei 72 °C gefolgt von (4) 30 sec Denaturierung bei 95 °C. Die Schritte (2) bis (4) wurden insgesamt 30x wiederholt und enden mit der Extension für 2 min bei 72 °C.

Zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse wurden die Proben nach der Amplifikation gelelektrophoretisch getrennt. Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach der Größe getrennt, da das Agarose-Polymer eine Art Maschennetzwerk bildet, das größere Fragmente nur langsamer als kürzere durchwandern können. Um zu ermitteln, ob es sich um die korrekten Amplifikate handelt, wurde eine Größenreferenz (kb-Leiter) genutzt (Abb. 3-6).

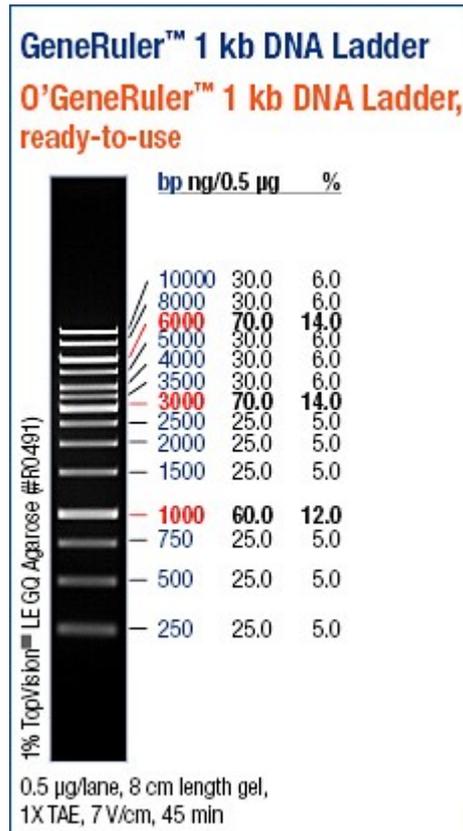


Abb. 3-6: Größenverteilung der kb-Leiter unter Angabe der prozentualen und absoluten Anteile der Banden im Gesamtgemisch (Bild: Fermentas Onlinekatalog).

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden die PCR-Produkte vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer [6x konzentriert: 10 mM Tris-Cl pH 7,7, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin] versetzt. Das Agarose-Gel enthielt 1 % (w/v) Agarose in 1x konzentriertem Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE; 10x konzentrierte Stammlösung: 48,8 g/l Tris-Base, 16,4 g/l Natriumacetat, 3,8 g/l EDTA, der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,8 eingestellt, bevor mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt wurde). Die DNA wurde bei einer Feldstärke von 2 V/cm für 2 – 3 h aufgetrennt. Zur Visualisierung und Dokumentation der Banden unter UV-Licht wurde das Gel für 20 min mit 1,0 µg/ml Ethidiumbromid in 1x konzentriertem TAE gefärbt.

4 Ergebnisse und Auswertung

Im Sinne der Lesbarkeit dieses Kapitels sind ältere eigene Ergebnisse sowie Ergebnisse aus der von mir mitbetreuten Masterarbeit von Hendrike Dürichen integriert und als solche gekennzeichnet.

Die Abbildungen mikroskopischer Aufnahmen und deren korrespondierende Originale finden sich auf der beigelegten DVD.

4.1 Cokultivierung von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli*

Für die Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung von entstehenden Endosymbiosen sind das Vermeiden der Verdauung und das Entkommen aus den Nahrungsvakuolen seitens des potentiellen Symbionten unerlässliche Voraussetzungen. Um festzustellen, ob *Escherichia coli* dazu in der Lage ist, wurde eine Cokultur aus Bakterien und *Tetrahymena pyriformis* fünf Stunden nach Zugabe der Bakterien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Da die verwendete Transformante von *Escherichia coli* das rot fluoreszierende Protein DsRed exprimiert, war für die Untersuchung keine zusätzliche Färbung nötig (Abb. 4-1).

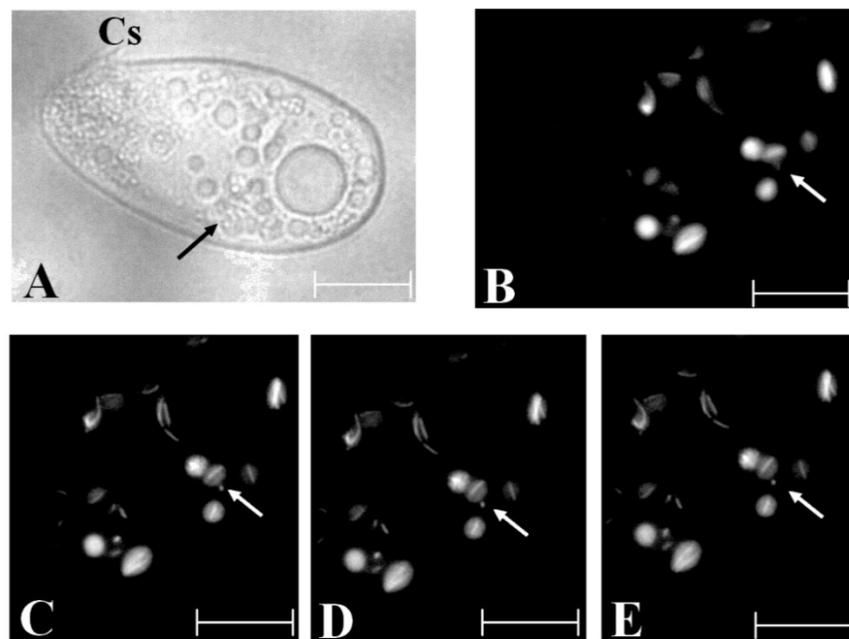


Abb. 4-1: Mikroskopische Aufnahmen eines Individuum von *Tetrahymena pyriformis* fünf Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli*. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B – E: Fluoreszenz-

mikroskopische Aufnahmen (Emission: DsRed). Cs: Cytostom. Der schwarze Pfeil markiert die observierte Region, der weiße Pfeil das entkommene Bakterium. Zunächst sieht es so aus, als ob sich ein Vesikel an der Nahrungsvakuole bildet, das sich schließlich vollständig von dieser löst und ein einzelnes, fluoreszierendes Bakterium enthält. Maßstab: 20 μm . Die Aufnahmen sind im Rahmen meiner Diplomarbeit entstanden (modifiziert aus Siegmund *et al.*, 2013).

Während der Lebendbetrachtung eines Individuums von *Tetrahymena pyriformis* über etwa 15 Minuten entkam ein einzelnes Bakterium aus einer Nahrungsvakuole. Zunächst scheint es, als ob sich ein Vesikel von der Nahrungsvakuole abschnürt (Abb. 4-1 B), welches sich sukzessive von dieser löst, bis es vollständig getrennt im Cytoplasma vorliegt (Abb. 4-1 E). Die fluoreszierende Struktur korrespondiert in Form und Größe mit *Escherichia coli*. Somit ist die Voraussetzung des Entkommens aus Nahrungsvakuolen in der Modellinteraktion von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* erfüllt.

Zusätzlich zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sollten transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Cokulturen Klarheit darüber schaffen, ob *Escherichia coli* der Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* entgeht, aus den Nahrungsvakuolen entkommt und folglich im Cytoplasma persistiert. Außerdem sollte hierbei gezeigt werden, wie das Bakterium vorliegt, ob es also von einer zusätzlichen Membran des Ciliaten umgeben ist oder nicht. Um die Bakterien sicher von anderen Zellkompartimenten unterscheiden zu können, ist es essentiell, die typischen Zellbestandteile von *Tetrahymena* erkennen zu können. Hierfür wurde eine axenische Kultur von *Tetrahymena pyriformis* transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 4-2).

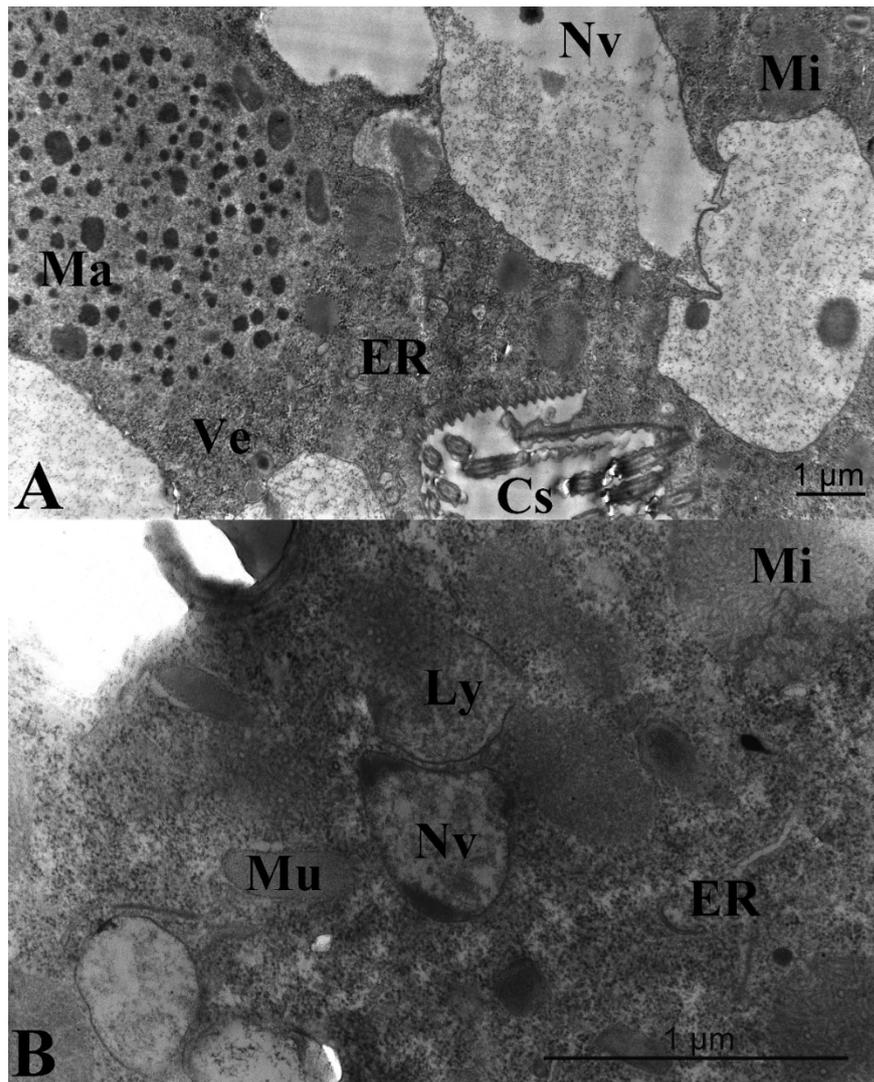


Abb. 4-2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer axenischen *Tetrahymena pyriformis* Kultur. Beide Aufnahmen zeigen die typischen Zellbestandteile. Cs: Cytostom. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ly: Lysosom. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium. Mu: Mucocysten. Nv: Nahrungsvakuolen. Ve: Vesikel.

Die beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen zwei verschiedene Individuen bei unterschiedlicher Vergrößerung. Alle typischen Zellbestandteile können identifiziert werden. Abbildung 4-2 A ist ein Querschnitt durch die Cytostomregion. Neben der *oral ridge* sind auch die Cilien der undulierenden Membran und die cytostomale Lippe angeschnitten. Posterior des Cytostoms befinden sich mehrere Nahrungsvakuolen sowie der Macronucleus. An einer der Vakuolen (links) steht die Fusion mit einem Vesikel unmittelbar bevor. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Vesikel, das am Ansäuern der Nahrungsvakuolen beteiligt ist (Nilsson, 1977).

Zahlreiche Mitochondrien sind im Cytoplasma sichtbar, außerdem findet sich im Bereich des Cytostoms Endoplasmatisches Reticulum.

Die untere Aufnahme (Abb. 4-2 B) zeigt einen Schnitt im Bereich des Cortex. Neben Mitochondrien sind auch zwei reife Mucocysten und einige angeschnittene Nahrungsvakuolen erkennbar. Oberhalb der mittleren Nahrungsvakuole liegt vermutlich ein Lysosom. Es wird angenommen, dass Lysosomen als Erweiterungen des Endoplasmatischen Reticulums entstehen (Elliot und Kennedy, 1973), was auch erklärt, dass das Lysosom nicht von einer kontinuierlichen Membran umgeben ist.

Neben der Kenntnis der Morphologie *Tetrahymenas* ist es zusätzlich von Vorteil zu wissen, wie *Escherichia coli* aussieht, bevor es von *Tetrahymena pyriformis* ingestiert wurde. In Abb. 4-3 sind nicht aufgenommene Bakterien abgebildet.

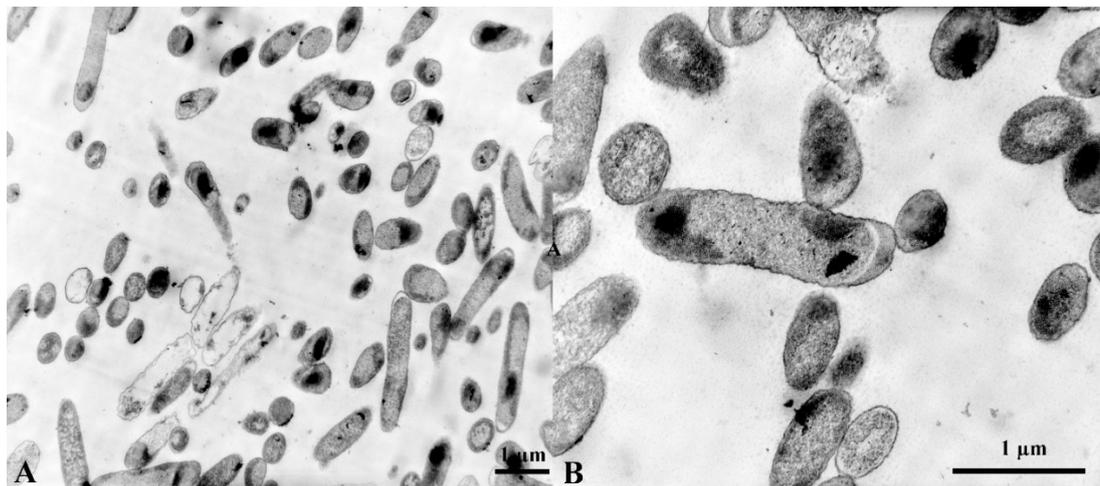


Abb. 4-3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Escherichia coli*. Die mit 10 µM Endo-Porter behandelten Bakterien wurden an *Tetrahymena pyriformis* verfüttert, aber zum Zeitpunkt der Fixierung noch nicht aufgenommen.

Die Abbildungen zeigen, dass *Escherichia coli* eine ausgeprägte Pleiomorphie aufweist. Während der Durchmesser der Bakterien konstant 0,4 – 0,6 µm beträgt, variiert die Länge erheblich zwischen 1,0 µm bis zu 2,5 µm oder mehr. Normalerweise ist *Escherichia coli* als Gram-negatives Bakterium von zwei Membranen umgeben. Allerdings ist in diesem Fall die äußere Membran nicht mehr oder nur unvollständig vorhanden. Bei der späteren Identifizierung innerzellulärer Bakterien ist diese Information entscheidend, da Bakterien folglich von maximal zwei Membranen

umgeben sein können. Das Zellinnere der Bakterien ist meist recht homogen. Dabei gibt es Bereiche, die etwas osmiophiler als andere sind.

Während fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde beobachtet, dass einige Bakterien, die kurz zuvor verfüttert wurden, der Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* entgangen sind und ins Cytoplasma übertraten. Färbungen zeigten außerdem, dass einzelne *Escherichia coli* Zellen außerhalb von Nahrungsvakuolen liegen, wenn sie für kürzere oder längere Zeit mit *Tetrahymena pyriformis* kokultiviert wurden. Um diese Ergebnisse zusätzlich zu stützen und Kenntnisse darüber zu erlangen, wie *Escherichia coli* im Cytoplasma vorliegt, wurden verschiedene Kokulturen für die Elektronenmikroskopie eingebettet und untersucht.

Eine wenige Tage alte Kokultur von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* mit und ohne Antibiotikumbehandlung zum Entfernen externer Bakterien ist in Abbildung 4-4 dargestellt.

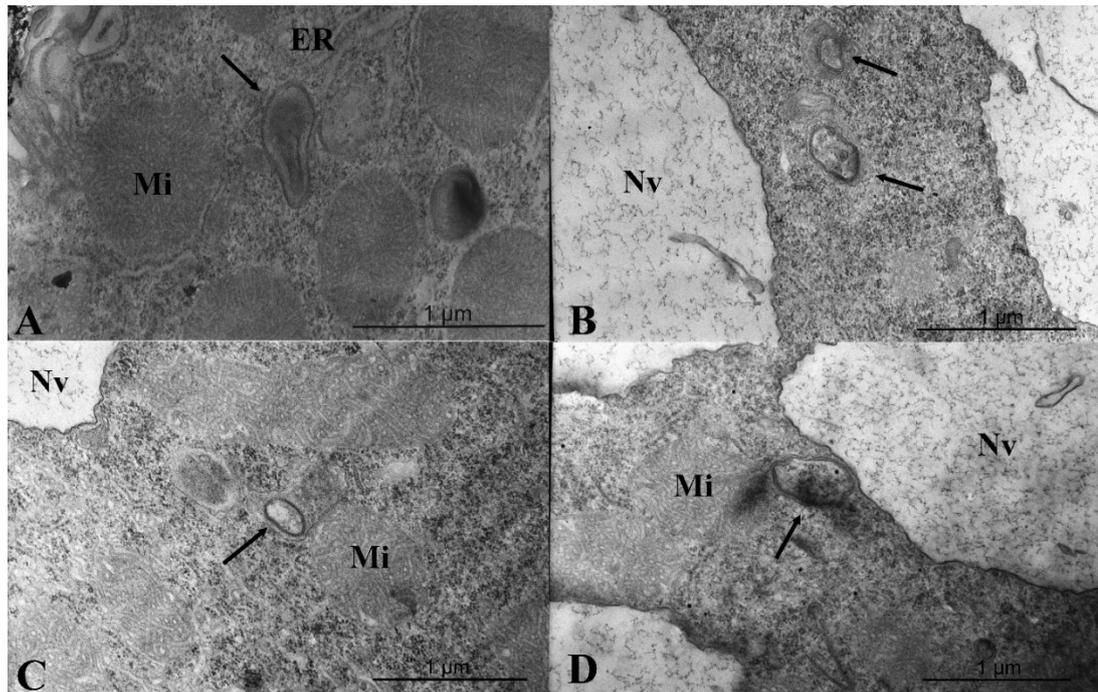


Abb. 4-4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* aus einer Kurzzeitkokultur mit *Escherichia coli* ohne (A) und mit Paromomycinbehandlung (B bis D). Die mit Pfeilen gekennzeichneten Strukturen sind in axenisch kultivierten Organismen nicht vorhanden und zumeist von einer Doppelmembran umgeben. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Sollte keine zusätzliche Membran von *Tetrahymena pyriformis* hinzukommen, wäre *Escherichia coli* nur von der eigenen Membran umgrenzt, so wie in Abbildung 4-4 A, die ein Individuum aus einer Kurzzeitkokultur zeigt. Die mit dem Pfeil markierte Struktur scheint nur von einer Membran umgrenzt zu sein und ist in axenisch kultivierten Organismen nicht zu finden. Mit einer Länge von 0,7 μm und einem Durchmesser von 0,2 – 0,3 μm ist die angezeigte Struktur zwar recht klein, dennoch spricht die Größe nicht gegen *Escherichia coli*.

Sollten die Bakterien zusätzlich zur eigenen Membran noch von einer Membran des Wirts umgeben sein, müssten sie von einer Doppelmembran umschlossen sein. In *Tetrahymena pyriformis* gibt es nur wenige Strukturen, die von zwei Membranen begrenzt werden, nämlich Mitochondrien, der Zellkern und parasomale Säcke, die am Cortex assoziiert sind. Von diesen Strukturen lassen sich die von einer Doppelmembran umgebenen in Abbildung 4-4 (B bis D) klar unterscheiden. Die dargestellten Individuen stammen aus einer mit Paromomycin behandelten, einige Tage alten Kokultur. Mit Größen von 0,3 μm über 0,4 μm bis zu 0,6 μm sind alle gekennzeichneten Strukturen sehr klein. In Abbildung 4-4 B und C scheinen sie zudem mit erweitertem, weichem Endoplasmatischem Reticulum assoziiert zu sein. In allen Fällen enthält das Zellinnere wenig osmiophiles Material und unterscheidet sich von extern beobachteten Bakterien. Allerdings ist nicht klar, welchen physiologischen Änderungen die internalisierten Bakterien unterliegen oder in welchem Bereich sie angeschnitten wurden, sodass es sich mit einiger Wahrscheinlichkeit um aus Nahrungsvakuolen entkommene *Escherichia coli* Bakterien handelt.

Ähnliche Strukturen finden sich auch in Langzeitkokulturen von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* nach Paromomycinbehandlung (Abb. 4-5). Mit einer Größe von 0,4 μm (A) und 0,3 μm (B) sind auch diese sehr klein und enthalten ebenso wenig elektronendichtes Material. Die sie umgebenden Membranen liegen eng aneinander und unterscheiden sich ultrastrukturell, was für eine Bakterienmembran (innen) und einer zusätzlichen Membran von *Tetrahymena pyriformis* (außen) spricht.

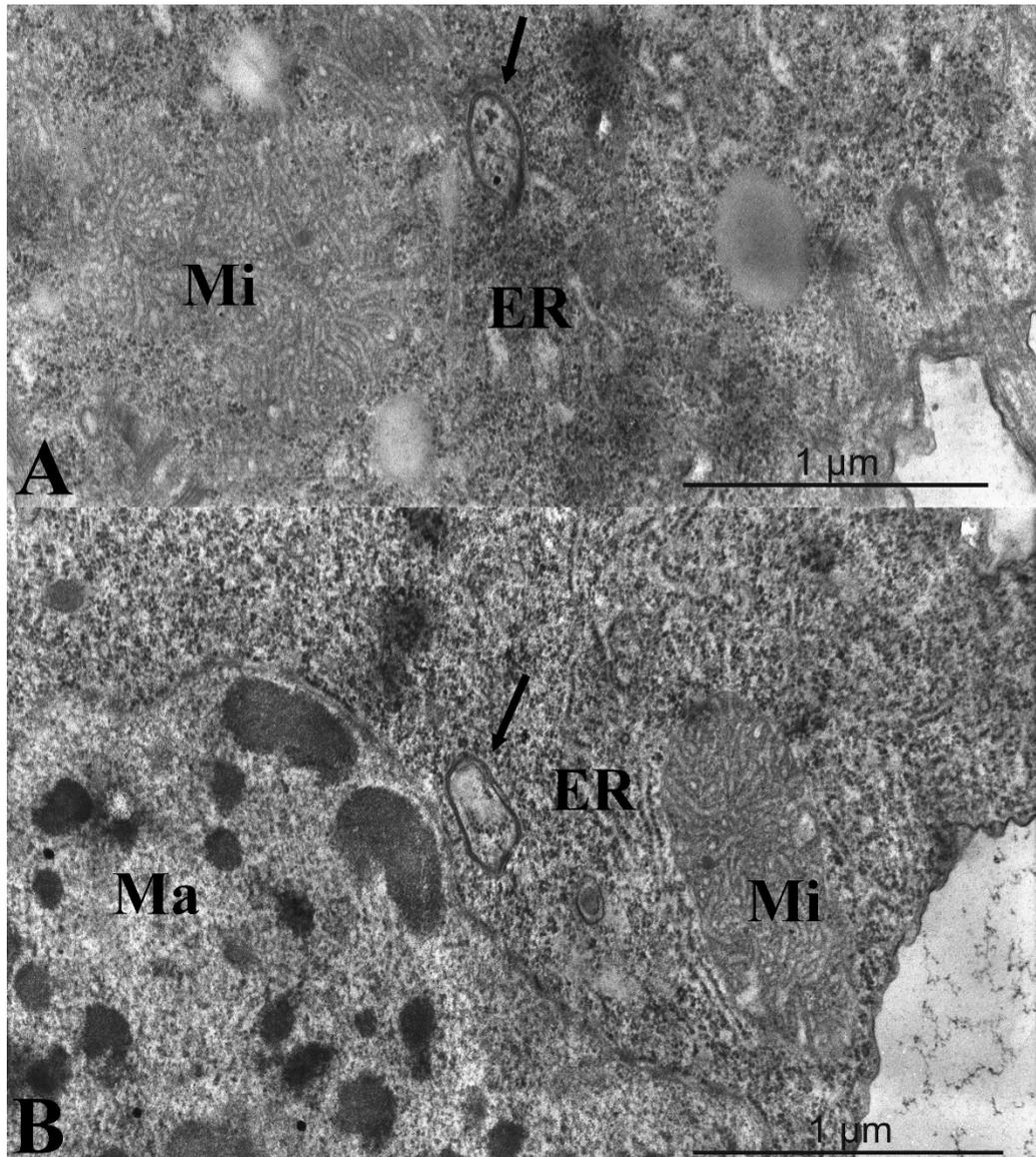


Abb. 4-5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* aus einer Langzeitkokultur mit *Escherichia coli* nach Paromomycinbehandlung. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Strukturen sind in axenisch kultivierten Organismen nicht vorhanden und von einer Doppelmembran umgeben. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium.

In Langzeitkokulturen ohne Antibiotikum finden sich neben den bisher observierten Strukturen (B) auch andere (Abb. 4-6).

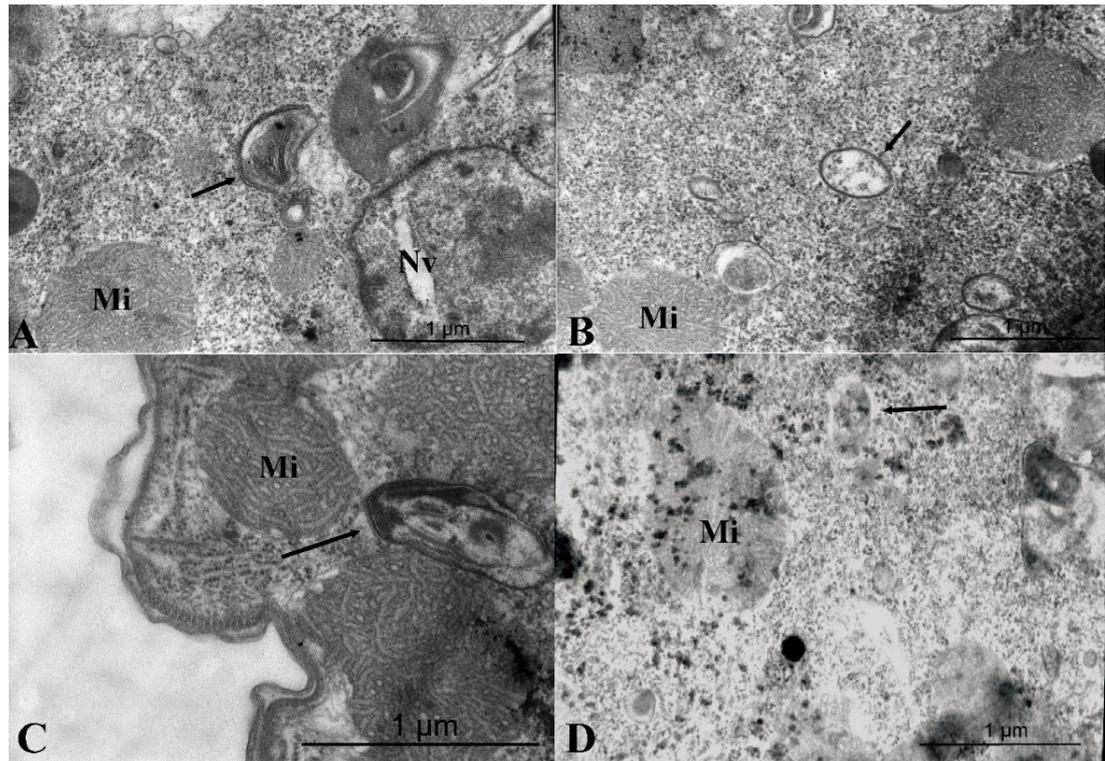


Abb. 4-6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* aus einer Langzeitkokultur mit *Escherichia coli*. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Strukturen sind in axenisch kultivierten Organismen nicht vorhanden und zumeist von einer Doppelmembran umgeben. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Die in Abbildung 4-6 A gekennzeichnete Struktur ist etwa 0,6 µm groß und von zwei morphologisch verschiedenen Membranen umgeben. Interessanterweise finden sich im Inneren drei weitere membranartige Strukturen.

Interessanter ist die gekennzeichnete Struktur in Abbildung 4-6 C. Sie ist nur von einer Membran umgeben und mit einer Länge von 0,9 µm recht nah an der Größe externer *Escherichia coli* Zellen und fällt in jedem Fall in den Toleranzbereich der Pleiomorphie. Auch das Zellinnere mit mehr osmiophilem Material entspricht eher dem externer Bakterien. Sollte es sich um *Escherichia coli* handeln, liegt dieses ohne Wirtsmembran im Cytoplasma vor. Dieser Status ist nicht auszuschließen.

Die Struktur in Abbildung 4-6 D hingegen ist von einer Doppelmembran umgeben. Mit einer Länge von 0,6 µm ist sie zwar etwas kleiner, aber das Zellinnere entspricht dem externer Bakterien. Zudem liegen beide Membranen recht dicht beieinander, was eine Kommunikation beider Organismen ermöglicht.

4.2 Paromomycinverträglich in Abhängigkeit der Kultivierung

Tetrahymena pyriformis reagiert sensitiv auf das Aminoglykosid-Antibiotikum Paromomycin, ein chemischer Verwandter des Neomycins. Mit Cokultivierungsversuchen sollte ermittelt werden, ob der Ciliat einen selektiven Vorteil erhält, wenn er unterschiedliche Transformantenstämme von *Escherichia coli* internalisiert, die ein Neomycinresistenzgen exprimieren. Dabei ist entscheidend, ob sich die Transformanten hinsichtlich der Paromomycinresistenz unterscheiden. Hierzu wurde die minimale Hemmstoffkonzentration mit dem Plattendiffusionstest bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2.3). Die minimale Hemmstoffkonzentration ergibt sich durch Auftragung des Hemmhofradius gegen die Antibiotikumskonzentration mit anschließender linearer Regression und Extrapolation auf den Hemmhofradius 0 mm (Beispiel in Abb. 4-7). Die minimalen Hemmstoffkonzentrationen für alle getesteten Bakterienstämme finden sich in Tabelle 4-1.

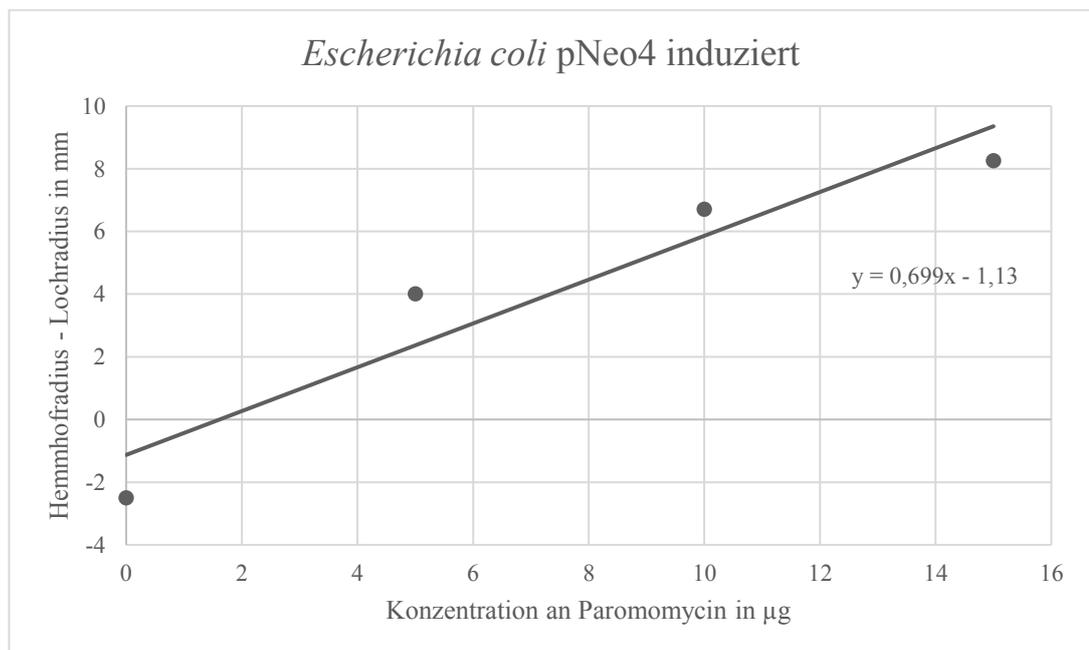


Abb. 4-7: Graphische Darstellung des Hemmhofradius abzüglich des Lochradius gegen die Paromomycinkonzentration am Beispiel von *Escherichia coli* pNeo4 mit Promotorinduktor im Medium. Durch Extrapolation der von Excel ermittelten Funktion auf den Hemmhofradius 0 mm ergibt sich die minimale Hemmstoffkonzentration für Paromomycin von 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tab. 4-1: Minimale Hemmstoffkonzentrationen von Paromomycin für die verschiedenen verwendeten Bakterienstämme. Der Stern (*) markiert Kulturen, denen Promotorinduktoren beigegeben wurden.

Bakterienstamm	Minimale Hemmstoffkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	1,2
<i>Escherichia coli</i> pBS-neoTet	1,7
<i>Escherichia coli</i> pNeo4	1,3
<i>Escherichia coli</i> pNeo4 *	1,6
<i>Escherichia coli</i> pNeo4-DsRed	2,0
<i>Escherichia coli</i> pNeo4-DsRed *	1,7
<i>Escherichia coli</i> pEGFP-Neo	6,7
<i>Escherichia coli</i> pEGFP-Neo *	9,6
<i>Escherichia coli</i> F ⁻	2,0
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pBS-neoTet	2,4
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pNeo4	2,1
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pNeo4 *	2,9
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pNeo4-DsRed	3,3
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pNeo4-DsRed *	3,8
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pEGFP-Neo	4,9
<i>Escherichia coli</i> F ⁻ pEGFP-Neo *	5,3

Insgesamt ist die minimale Hemmstoffkonzentration für Paromomycin in allen Stämmen sehr niedrig, die Bakterien sind folglich sehr sensitiv gegenüber dem Antibiotikum. Einzig die Bakterien mit dem Plasmid pEGFP-Neo sind etwas resistenter, was darin begründet ist, dass das Neomycinresistenzgen unter der Kontrolle des bakterieneigenen *lac*-Promotors steht, während in den anderen Fällen ein *Tetrahymena*-Promotor das Gen kontrolliert.

Verschiedene Cokulturen wurden im Hinblick auf die Paromomycinsensitivität untersucht (Abb. 4-8 und 4-9).

4 Ergebnisse und Auswertung

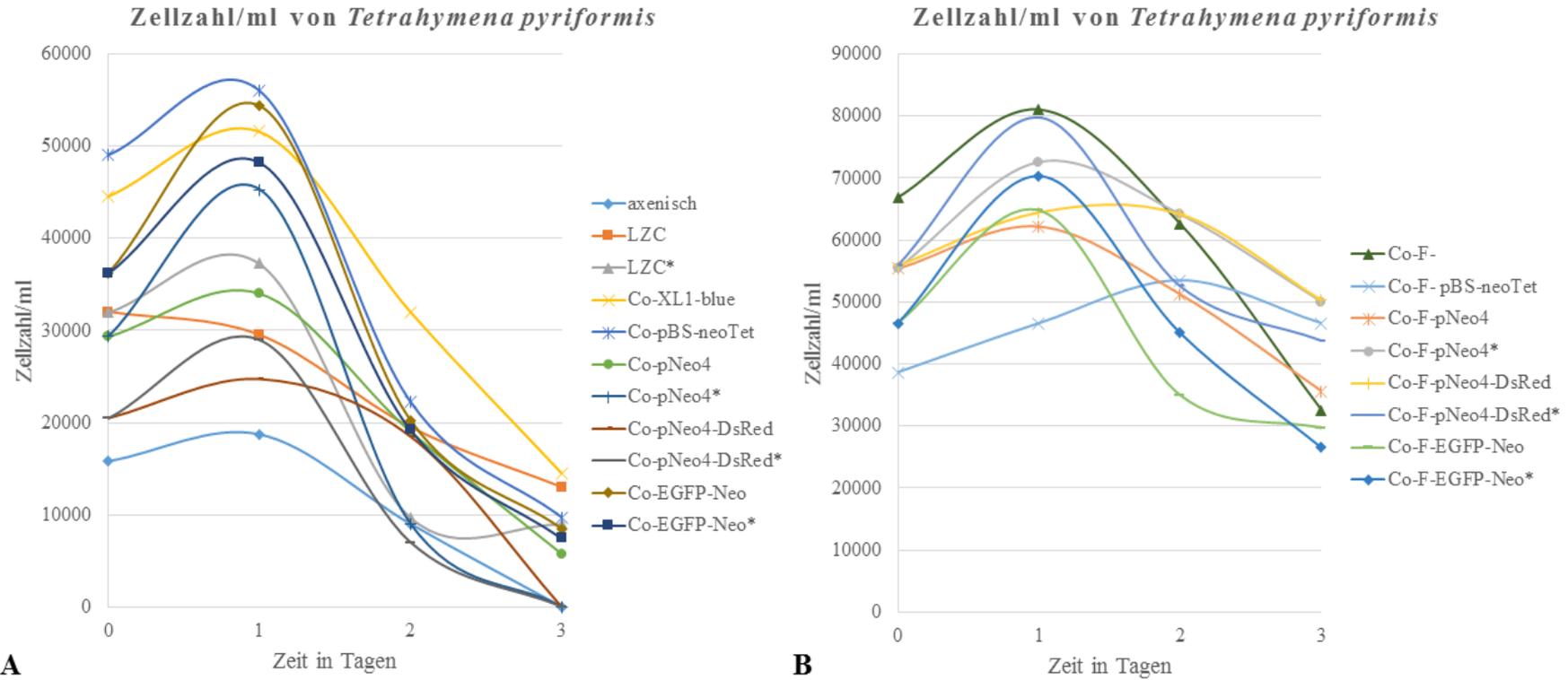


Abb. 4-8: Graphische Darstellung der Entwicklung der Zellzahl/ml von *Tetrahymena pyriformis* über die Zeit nach Überführung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin. A: Axenische Kultur, Langzeitkokultur (LZC; mit *Escherichia coli* pNeo4) und Kokulturen mit Bakterien, die zur Pili-Bildung befähigt sind. B: Kokulturen mit Bakterien ohne F-Plasmid. Der Stern (*) markiert Kulturen mit Promotorinduktoren im Medium. Kulturen mit transformierten Bakterien überleben zumeist in größerer Anzahl, dabei scheint die Bildung von Konjugationspili keinen starken Einfluss zu haben.

4 Ergebnisse und Auswertung

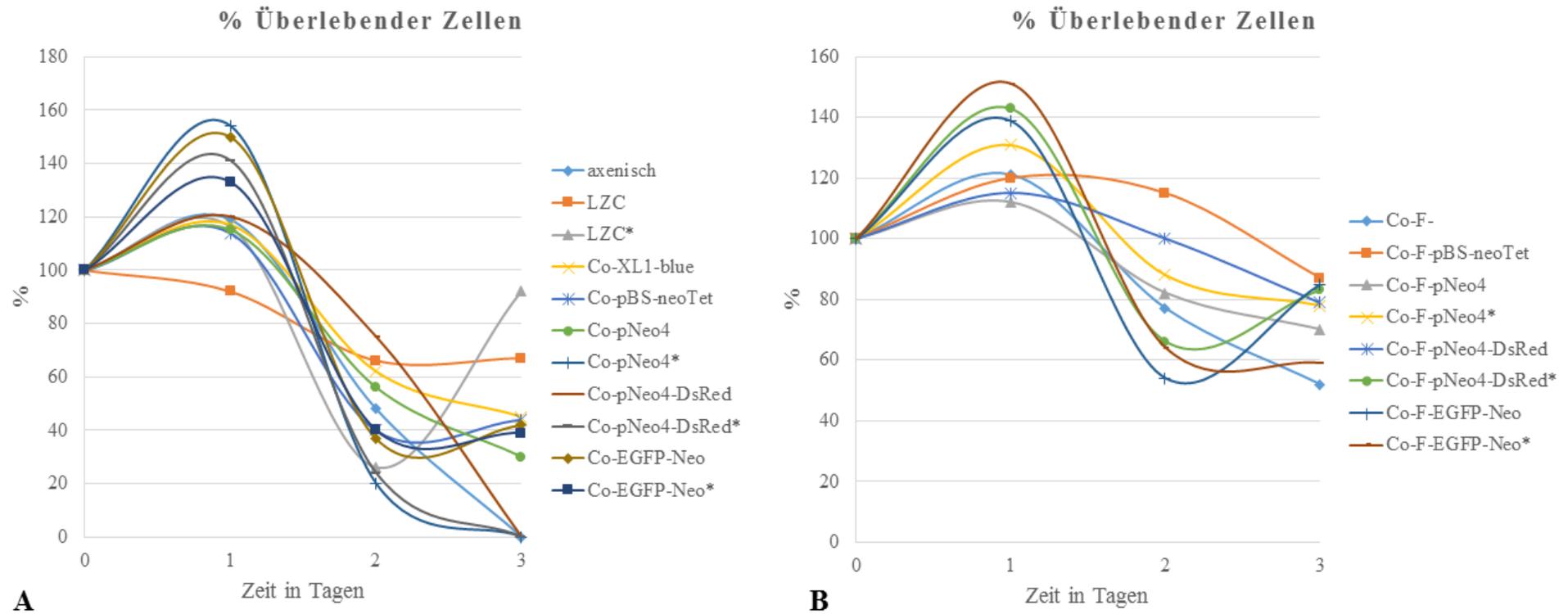


Abb. 4-9: Graphische Darstellung der überlebender Zellen von *Tetrahymena pyriformis* (in Abhängigkeit vom Vortag) über die Zeit nach Überführung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin. A: Axenische Kultur, Langzeitkokultur (LZC; mit *Escherichichia coli* pNeo4) und Cokulturen mit Bakterien, die zur Pili-Bildung befähigt sind. B: Cokulturen mit Bakterien ohne F-Plasmid. Der Stern (*) markiert Kulturen mit Promotorinduktoren im Medium. Kulturen mit transformierten Bakterien zeigen meist einen größeren prozentualen Anteil überlebender Zellen. Die Bildung von Konjugationspili scheint keinen starken Einfluss zu haben.

Die Bestimmung der Paromomycinsensitivität verschiedener Kulturen wurde mehrfach durchgeführt. Da sich Zellzahlen und davon abhängige Größen schwer mitteln lassen, wurde ein repräsentativer Versuchsdurchlauf zur Darstellung und Auswertung ausgewählt. Eine Bestimmung über insgesamt mehr als vier Tage war nicht sinnvoll, da bei Paromomycin, ähnlich wie bei vielen Aminoglykosidantibiotika, eine physiologische Adaption der Mikroorganismen an das Antibiotikum stattfindet. Zudem wird die Toxizität des Mediums durch lysierte Zellen immer höher, sodass diese Effekte zusätzlich die Zelldichte und Überlebensrate beeinträchtigen.

Insgesamt sind die Titer von *Tetrahymena pyriformis* aus Cokulturen mit transformierten Bakterien, unabhängig ob mit oder ohne F-Plasmid, höher als die der axenischen Kultur oder Cokulturen mit untransformierten Bakterien, wobei die Cokultur mit *Escherichia coli* XL1-blue in diesem Versuchsdurchlauf ungewöhnlich hohe Zellzahlen bzw. Überlebensraten aufweist. Auch die drastische Reduktion der Zellzahlen in der axenischen Kultur und den Cokulturen mit *Escherichia coli* pNeo4 (induziert), pNeo4-DsRed mit und ohne Induktion ist eher untypisch.

Mit Ausnahme der Langzeitcokultur vermehrt sich *Tetrahymena pyriformis* in allen Kulturen einen Tag nach der Überführung in das paromomycinhaltige Medium. Ab dem Folgetag sinkt die Zelldichte in allen Kulturen, außer der Cokultur mit F⁻ pBS-neoTet mit einem Tag Verzögerung, mehr oder weniger drastisch ab, im Falle der axenischen Kultur und den Cokulturen mit *Escherichia coli* pNeo4 (induziert), pNeo4-DsRed mit und ohne Induktion sogar auf Null, ein für alle betroffenen Kulturen eher untypischer Verlauf. Von Tag zwei zu Tag drei nach Überführung in paromomycinhaltiges Medium steigen die Zellzahlen in der induzierten Langzeitcokultur sogar wieder leicht an, in der nicht induzierten Langzeitcokultur ist die Reduktion der Zellzahl weniger drastisch. Generell sind die Zellzahlen dennoch sehr unterschiedlich, da die Inokulationsdichten der Kulturen stark variierten. Um dafür zu korrigieren und den Vergleich etwas zu vereinfachen, wurde der prozentuale Anteil überlebender Zellen im Verhältnis zum Vortag berechnet und dargestellt (Abb. 4-9). Die Kurvenverläufe ähneln denen mit Zellzahlen, insgesamt liegen sie aber dichter beieinander. *Tetrahymena pyriformis* vermehrt sich mit Ausnahme der Langzeitcokultur vom Tag der Inokulation auf den Folgetag, aber zum zweiten Tag nimmt der prozentuale Anteil überlebender Zellen

mehr oder weniger stark ab. Ausgenommen der axenischen Kultur sowie den Cokulturen mit *Escherichia coli* pNeo4 (induziert), pNeo4-DsRed (induziert und nicht induziert) und *Escherichia coli* F⁻ stabilisieren bzw. erhöhen sich die Überlebensraten von Tag zwei zu Tag drei. Letzteres trifft vor allem auf die induzierte Langzeitcokultur sowie die Cokulturen mit *Escherichia coli* F⁻ pNeo4-DsRed (induziert) und pEGFP-Neo zu. Mit Ausnahme der Cokultur mit XL1-blue, die im gezeigten Versuch keinen typischen Verlauf aufweist, ähnlich wie die Cokulturen mit *Escherichia coli* pNeo4 (induziert), pNeo4-DsRed (induziert und nicht induziert), aber ebenso der axenischen Kultur, sind die Überlebensraten von *Tetrahymena pyriformis* mit transformierten Bakterien höher als die der axenischen Kultur und der Cokultur mit *Escherichia coli* F⁻. Sie liegen am Ende des Versuchs etwa 5 bis 40 % über der axenischen Kultur bzw. den Cokulturen mit untransformierten Bakterien. Dies deutet auf einen selektiven Vorteil des Internalisierens der Bakterien mit Neomycinresistenzgen hin.

Neben der Überlebensfähigkeit von *Tetrahymena pyriformis* wurde auch die Lebendzellzahl von *Escherichia coli* bestimmt. Weil leider nur in etwa 30 % der Versuche koloniebildende Bakterien nach dem Ausplattieren und Inokulieren gefunden wurden, sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar und nicht repräsentativ. Anhand der ermittelten minimalen Hemmstoffkonzentration lässt sich nur mit Sicherheit sagen, dass die sichtbaren Bakterienkolonien internalisierten Bakterien entstammen, da die externe Antibiotikumkonzentration diese um ein Vielfaches übersteigt. Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse stellen physiologische Änderungen der internalisierten Bakterien dar. Dies spiegelt auch die Beobachtung wider, dass die maximale Zahl der cfu/ml erst nach zwei bis drei Tagen Bebrütung sichtbar war. Normalerweise teilt sich *Escherichia coli* unter den gegebenen Inokulationsbedingungen so schnell, dass nach Bebrütung über Nacht jede koloniebildende Zelle gefunden werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion internalisierter Bakterien stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Da nicht alle Transformantenstämme fluoreszierende Proteine exprimieren und zudem deren Fluoreszenz nach einiger Zeit der Cokultivierung nicht zuverlässig detektierbar war, wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Wiederfindung genutzt (Abb. 4-10 und 4-11).

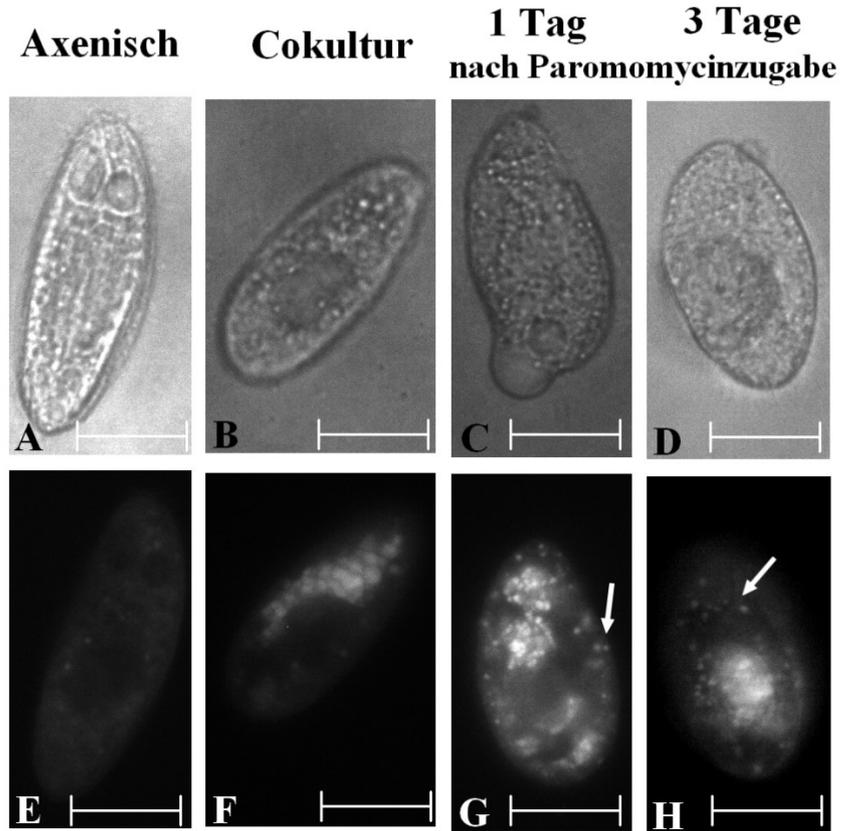


Abb. 4-10: Mikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* aus verschiedenen Kulturen nach der Färbung mit dem Membranfarbstoff Nilrot. A bis D: Lichtmikroskopische Aufnahmen. E-H: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die weißen Pfeile markieren vermutlich einzeln im Cytoplasma vorliegende Bakterien. Diese mikroskopischen Aufnahmen entstanden während meiner Diplomarbeit. Maßstab: 20 μm (modifiziert aus Siegmund *et al.*, 2013).

Axenisch kultivierte Organismen fluoreszieren nach der Färbung mit Nilrot gleichmäßig (Abb. 4-10 E); die Bereiche des Cytostoms, der einzelnen Nahrungsvakuole und des Macronucleus fluoreszieren nicht. Nilrot scheint in diesem Fall nur die Zellmembran von *Tetrahymena pyriformis* zu färben; in jedem Fall aber markiert der Farbstoff keine Mitochondrien, die man aufgrund ihrer Größe und Form mit intrazellulären Bakterien verwechseln könnte. Im Individuum aus einer unbehandelten Cokultur mit *Escherichia coli* sind neben der Plasmamembran ebenso die in den Nahrungsvakuolen befindlichen Bakterien gefärbt (Abb.4-10 F). Die beiden Individuen aus den Cokulturen nach Paromomycinzugabe zeigen sehr viele einzeln liegende und mit Nilrot gefärbte Bakterien (Abb. 4-10 G und H). Ob diese im Cytoplasma vorliegen oder doch in Vakuolen lässt sich am Abgleich mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht in

jedem Fall zweifelsfrei sagen. Zudem ist die Anzahl der Bakterien in beiden Individuen unterschiedlich. Einen Tag nach der Überführung zeigen sich mehr mit Nilrot gefärbte Bakterien als nach drei Tagen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Bakterienzahl pro Zelle durch Teilung von *Tetrahymena pyriformis* verringert. Es ist unklar, ob internalisierte Zellen von *Escherichia coli* weiterhin teilungsfähig sind oder deren Teilungsrate unterhalb derer der Ciliaten liegt.

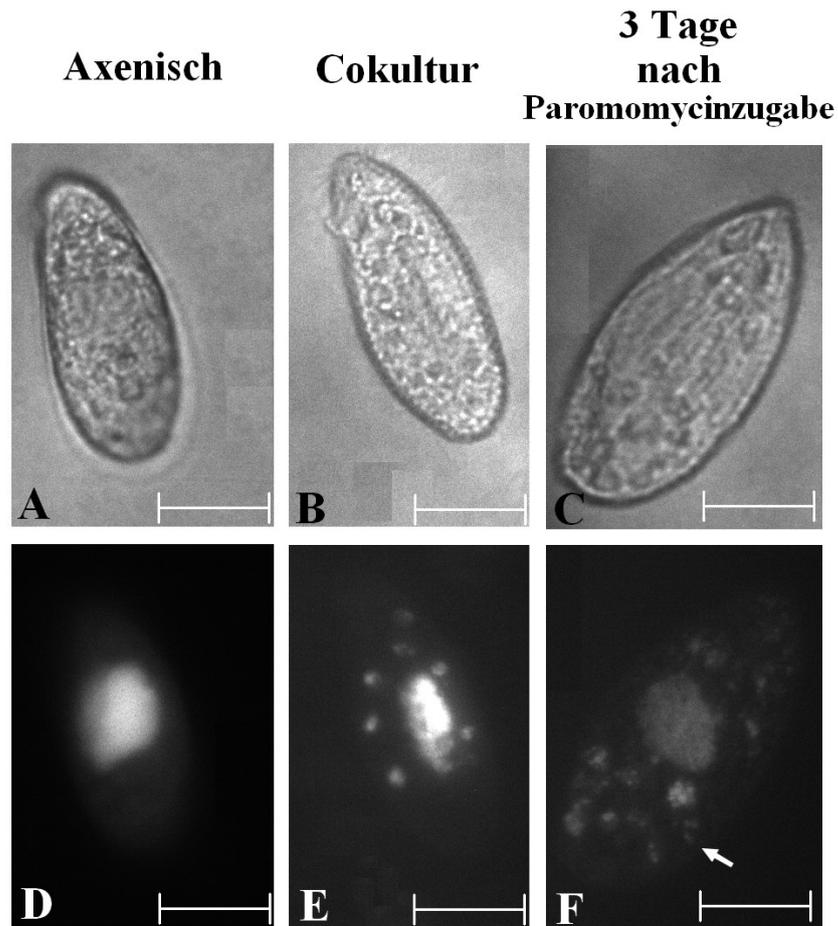


Abb. 4-11: Mikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* aus verschiedenen Kulturen nach der Färbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI. A bis C: Lichtmikroskopische Aufnahmen. D bis F: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Der weiße Pfeil markiert vermutlich einzeln im Cytoplasma vorliegende Bakterien. Diese mikroskopischen Aufnahmen entstanden während meiner Diplomarbeit. Maßstab: 20 µm (modifiziert aus Siegmund *et al.*, 2013).

Vergleichbare Ergebnisse erzielt man nach der Färbung mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI. In axenisch kultivierten Organismen färbt er ausschließlich den Macronucleus (Abb. 4-11 D). Beim Individuum aus einer unbehandelten Cokultur mit

Escherichia coli sind zudem innerhalb von Nahrungsvakuolen befindliche Bakterien mit DAPI sichtbar (Abb. 4-11 B). Bei *Tetrahymena pyriformis* aus der Cokultur mit *Escherichia coli* drei Tage nach Zugabe von Paromomycin sind neben mit Vakuolen assoziierten Bakterien oder deren DNA auch einzelne, vermutlich nicht innerhalb einer Vakuole liegende Bakterien sichtbar, wie sich aus dem Vergleich licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zeigt (Abb. 4-11 C und F). Für beide Färbetechniken gilt, dass detektierte Bakterien vermutlich bereits vor der Überführung in Medium mit Paromomycin internalisiert wurden, da externe Bakterien als Folge der sehr hohen Konzentration des Antibiotikums zuverlässig und schnell lysieren.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Wiederfindung internalisierter Bakterien stellt die Detektion ihrer DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese zur Trennung und Visualisierung der erhaltenen Amplifikate dar. Um externe, im Medium befindliche DNA lysierter Zellen oder Bakterien zu entfernen, wurden die Proben vor der Zentrifugation mit DNase I behandelt (siehe Kapitel 3.11). Beim Vergleich des so erhaltenen Kulturüberstands und dem aufgeschlossenen Zellniederschlag zeigt sich, dass detektierte DNA ausschließlich aus dem Zellinneren stammt (Abb. 4-12).

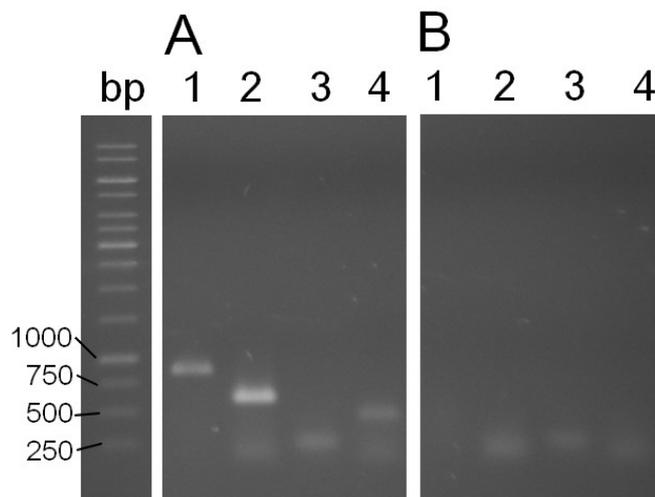


Abb. 4-12: Dokumentation der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben aus Zellniederschlag (A) und Kulturüberstand (B) nach DNase I Behandlung am Beispiel der Cokultur aus *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* pNeo4 zwei Tage nach Applikation von 500 µg/ml Paromomycin. Im Kulturüberstand konnte im Gegensatz zum Zellniederschlag kein Amplifikat gefunden werden. bp: Größenreferenz. 1: Amplifikat mit dem Primerpaar für das Phosphoglyceratkinase-Gen aus *Tetrahymena pyriformis*

(kerncodiert). 2: Amplifikat mit dem Primerpaar für das Cytochrom-Oxidase-I-Gen aus *Tetrahymena pyriformis* (mitochondriales Gen). 3: Amplifikat mit dem Primerpaar für das plasmidcodierte *bla*-Gen aus *Escherichia coli*. 4: Amplifikat mit dem Primerpaar für das plasmidcodierte Gen Neo4 aus *Escherichia coli* (aus Siegmund *et al.*, 2013).

Mit der DNase-Behandlung ist also sichergestellt, dass positive PCR-Signale ausschließlich mit intrazellulärer DNA erhalten werden. Bakterielle DNA lässt sich bis zu 14 Tage nach Kultivierung in paromomycinhaltigem Medium nachweisen (Abb. 4-13). Innerhalb der 14 Tage wurden die Kulturen einmal in frisches, paromomycinhaltiges Medium übertragen, um toxische Effekte lysierter Zellen auf die intakten Zellen zu vermeiden.

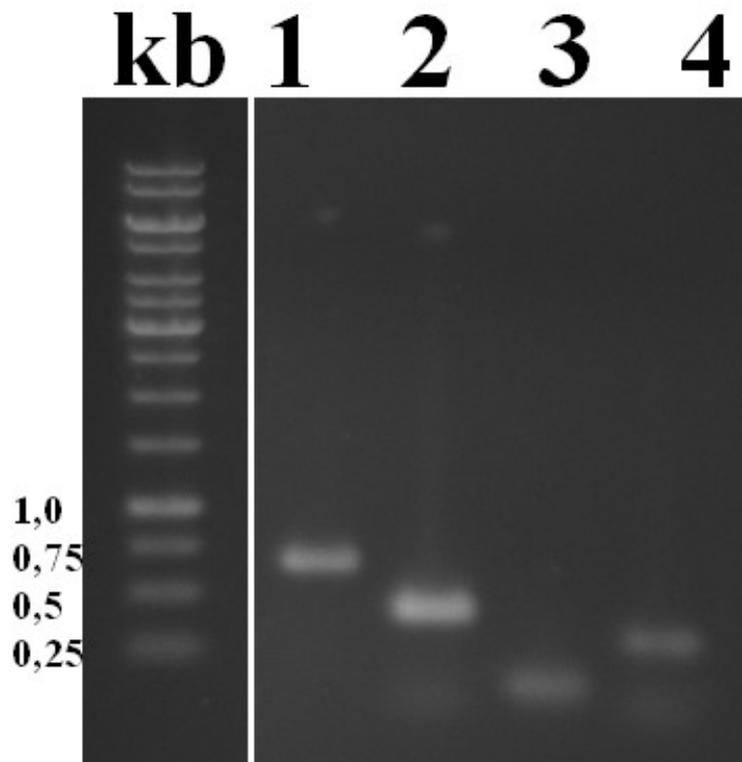


Abb. 4-13: Dokumentation der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Proben am Beispiel der Cokultur aus *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* pNeo4 14 Tage nach Kultivierung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin. Alle Gene konnten mit der PCR detektiert werden. kb: Größenreferenz in Kilobasenpaaren. 1: Amplifikat mit dem Primerpaar für das Phosphoglyceratkinase-Gen aus *Tetrahymena pyriformis* (kerncodiert). 2: Amplifikat mit dem Primerpaar für das Cytochrom-Oxidase-I-Gen aus *Tetrahymena pyriformis* (mitochondriales Gen). 3: Amplifikat mit dem Primerpaar für das plasmidcodierte *bla*-Gen aus *Escherichia coli*. 4: Amplifikat mit dem Primerpaar für das plasmidcodierte Gen Neo4 aus *Escherichia coli* (modifiziert aus Siegmund *et al.*, 2013).

Der Nachweis bakterieller DNA nach 14 Tagen der Kultivierung in paromomycinhaltigem Medium deutet mindestens auf die Persistenz von *Escherichia coli* in *Tetrahymena pyriformis* hin. Dieses Ergebnis konnte mit allen Transformanten bestätigt werden. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da über 14 Tage keine externen Bakterien zugeführt wurden. Zwar lässt die Intensität der erhaltenen bakteriellen PCR-Signale im Vergleich zu denen mit *Tetrahymena pyriformis* etwas nach, dennoch scheinen die Bakterien sich auch innerhalb des Ciliaten, wenngleich auch sehr langsamen, teilen zu können, da sie ansonsten nach der langen Kultivierungszeit und anhaltender Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis* vermutlich nicht mehr nachweisbar wären.

Insgesamt betrachtet, scheint die Cokultivierung von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* unter den selektiv gewählten Bedingungen die andauernde Internalisierung, also folglich eine Endosymbiose, zu befördern.

4.3 Verfütterung synthetischer Mikropartikel an *Tetrahymena pyriformis*

Da sich die gezielte, genetisch bedingte Oberflächenmanipulation von *Escherichia coli* als schwierig erwies, aber auch gezeigt ist, dass Zelloberflächen in die Erkennung von Symbiont und Wirt involviert sind, wurde der Einfluss verschiedener definierter Oberflächen zunächst anhand synthetisch hergestellter Mikropartikel auf der Basis von Rinderserumalbumin untersucht. Dabei musste zunächst festgestellt werden, ob diese Partikel von *Tetrahymena pyriformis* als potentielle Nahrung wahrgenommen wurden.

4.3.1 Eignung synthetischer Mikropartikel als Nahrungsquelle

Die Mikropartikel ohne Oberflächenmodifikationen wurden von *Tetrahymena pyriformis* ingestiert und verdaut (Abb. 4-14 und 4-15).

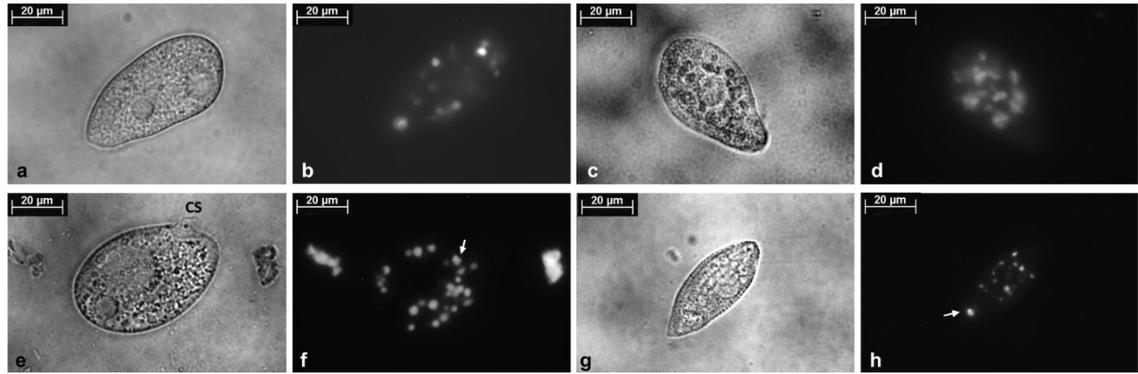


Abb. 4-14: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung mit FITC-gefärbten Mikropartikeln. a und b: 30 min. c und d: 1 h. e und f: 2 h. g und h: 5 h. Der Nahrungsvakuolendurchmesser sowie die Intensität der Fluoreszenz verringern sich mit der Zeit. Die weißen Pfeile markieren neu gebildete Nahrungsvakuolen, die im Vergleich zu älteren größer sind. Die Fluoreszenzintensität der frisch ingestierten Partikel ist zudem höher. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Hendrike Dürichen angefertigt. CS: Cytostom (aus Dürichen *et al.*, 2016).

Tetrahymena pyriformis ingestiert die synthetischen Mikropartikel. Eine halbe Stunde nach der Fütterung finden sich mit Partikeln gefüllte Nahrungsvakuolen. Sie sind über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 4-14 a und b), ein Indikator für die Verdauung, da Vakuolen innerhalb dieses Prozesses posterior transportiert werden. Der Vakuolendurchmesser von 5,5 µm entspricht der Größe der angebotenen Partikel, die unregelmäßig geformt erscheinen. Die Fluoreszenzintensität ist in cytotostomnahen, jüngeren Vakuolen und den älteren noch in etwa gleich. Eine halbe Stunde später ist der Durchmesser älterer Vakuolen bereits auf etwa 3,6 µm geschrumpft (Abb. 4-14 c und d), die Partikel wirken zudem kompakter und gleichmäßiger geformt, die Intensität der Fluoreszenz ist allerdings noch annähernd gleich in jungen und alten Vakuolen. Die Verkleinerung des Vakuolendurchmessers stellt einen zusätzlichen Indikator für die Verdauung der Mikropartikel dar (Müller *et al.*, 1965; Nilsson, 1977). Zwei Stunden nach der Fütterung finden sich nach wie vor Nahrungsvakuolen über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 4-14 e und f), ein Indiz für anhaltende Ingestion. Der Durchmesser älterer Vakuolen ist zudem auf etwa 3,3 µm geschrumpft. Verglichen mit der neu gebildeten Nahrungsvakuole am Cytostom, die im Durchmesser der Partikelgröße entspricht, lässt die Fluoreszenzintensität in den älteren, kleineren Vakuolen nach. Der Unterschied zwischen neu gebildeten und älteren Nahrungsvakuolen wird fünf Stunden nach der

Fütterung noch deutlicher (Abb. 4-14 g und h). Ältere Vakuolen haben nur noch einen Durchmesser von 2,3 μm . Die Fluoreszenzintensität der Partikel ist deutlich schwächer als die des Partikels, der neu ingestiert wurde. Sowohl die verminderte Fluoreszenz als auch die Verkleinerung des Vakuolendurchmessers sind deutliche Indikatoren für die Verdauung der Mikropartikel.

Ein weiterer Hinweis auf die Verdauung stellt das Ansäuern der Nahrungsvakuolen dar. Hierzu wurden einerseits *Tetrahymena pyriformis* Zellen, andererseits die Mikropartikel mit dem pH-Indikatorfarbstoff Neutralrot gefärbt (Abb. 4-15).

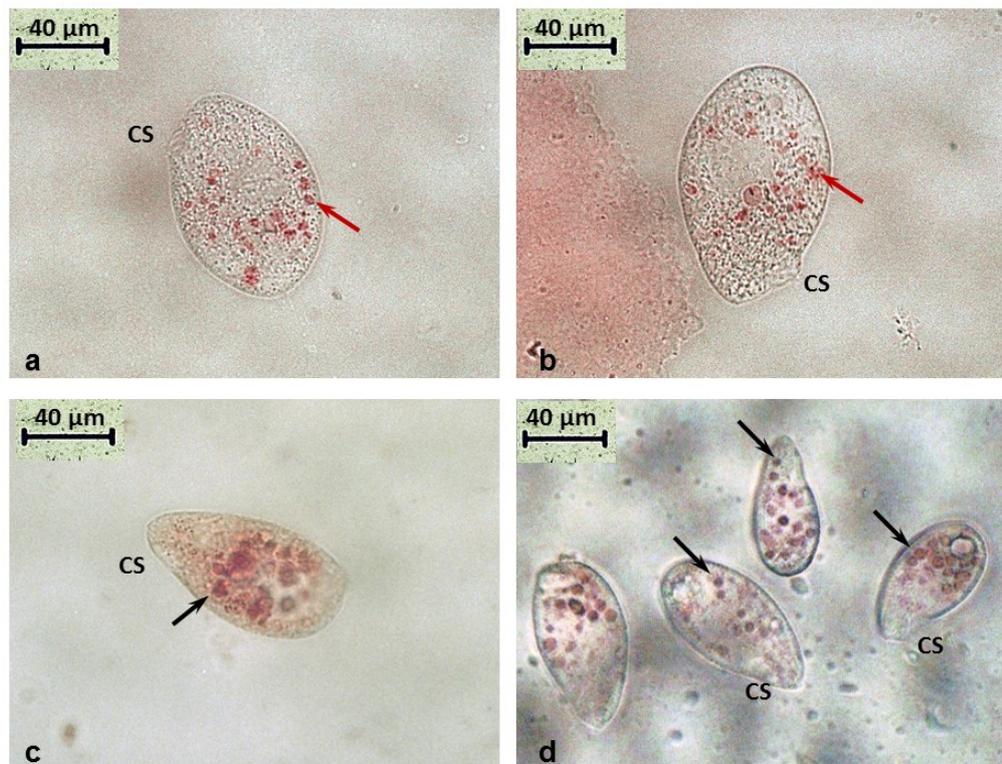


Abb. 4-15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit neutralrotgefärbten Mikropartikeln (a und b) bzw. gefärbt mit Neutralrot nach der Fütterung mit Mikropartikeln (c und d). Die roten und schwarzen Pfeile markieren Vakuolen mit dem typischen Farbumschlag nach Dunkelrot in saurem Milieu. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Hendrike Dürichen angefertigt. CS = Cytostome (aus Dürichen *et al.*, 2016).

Sowohl die Verfütterung mit neutralrotgefärbten Mikropartikeln, als auch die Färbung von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit Mikropartikeln zeigen den deutlichen Farbumschlag nach Dunkelrot und somit das Ansäuern der Nahrungsvakuolen. Während neu gebildete oder ältere, kurz vor der Egestion

befindliche Nahrungsvakuolen eher hellrosa sind, sind im Verdauungsprozess befindliche kirschrot. Das Ansäuern der Nahrungsvakuolen ist eine wichtige Voraussetzung für die Fusion mit Lysosomen und zudem nötig, um optimale Bedingungen für die Verdauungsenzyme zu schaffen (Nilsson, 1977). Zudem zeigen nur Nahrungsvakuolen mit verdaubarem Inhalt eine erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase (Ricketts, 1971a).

Eine weitere Möglichkeit zur Prüfung der Eignung als potentielle Nahrung ist die Erstellung von Wachstumskurven unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Abb. 4-16 und 4-17).

Wachstumskurven von *Tetrahymena pyriformis* unter verschiedenen Kulturbedingungen

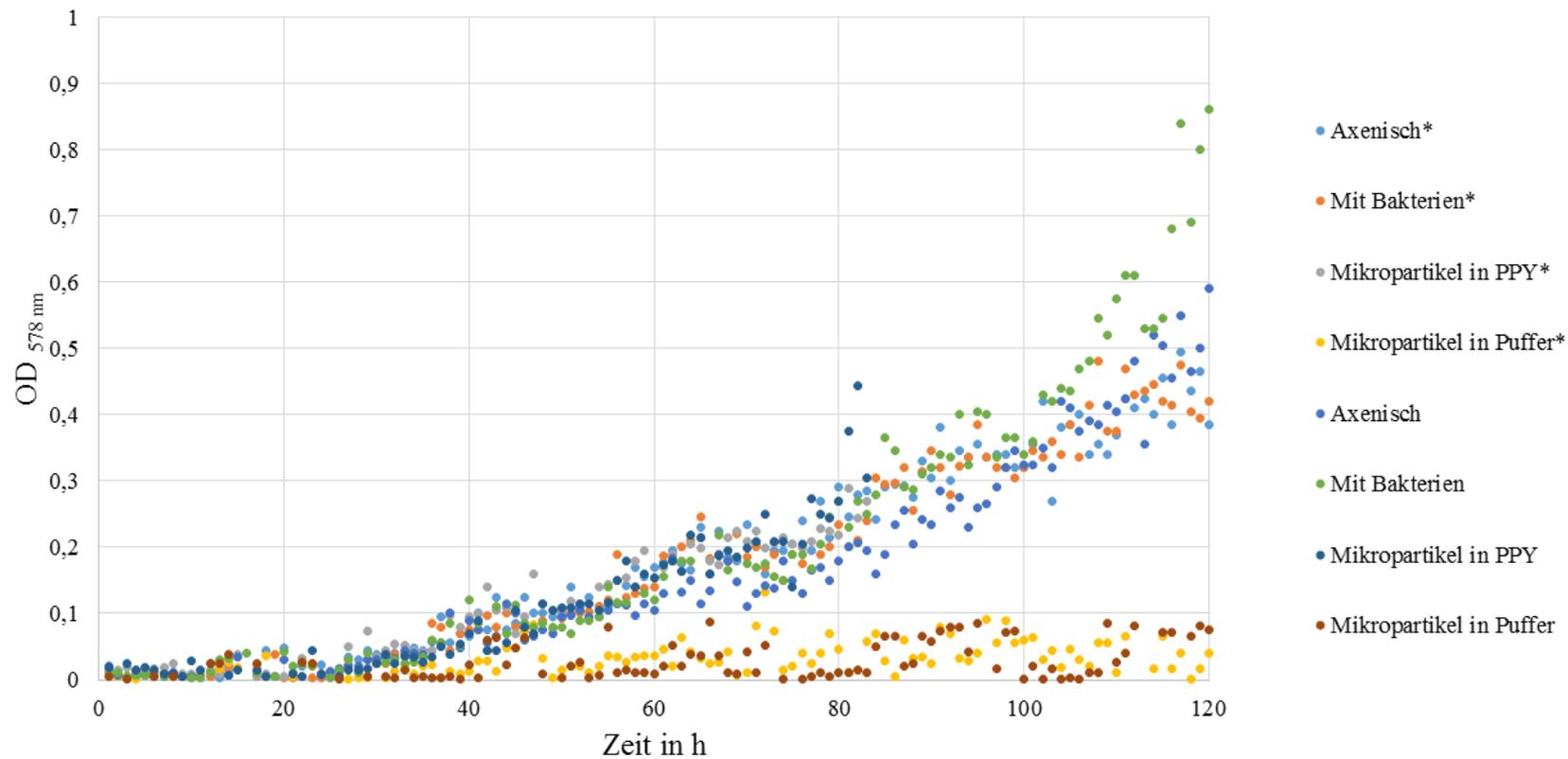


Abb. 4-16: Darstellung der Messpunkte mehrerer Wachstumskurven von *Tetrahymena pyriformis* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Messung der Kulturen in PPY mit Mikropartikeln musste aufgrund von Kontaminationen nach 84 h abgebrochen werden. Bis auf die Kulturen mit Mikropartikeln im Puffer weist *Tetrahymena pyriformis* ähnliche Wachstumsraten auf. Die Datenerhebung wurde zusammen mit Hendrike Dürichen durchgeführt. Der Stern (*) markiert die Schüttelkulturen.

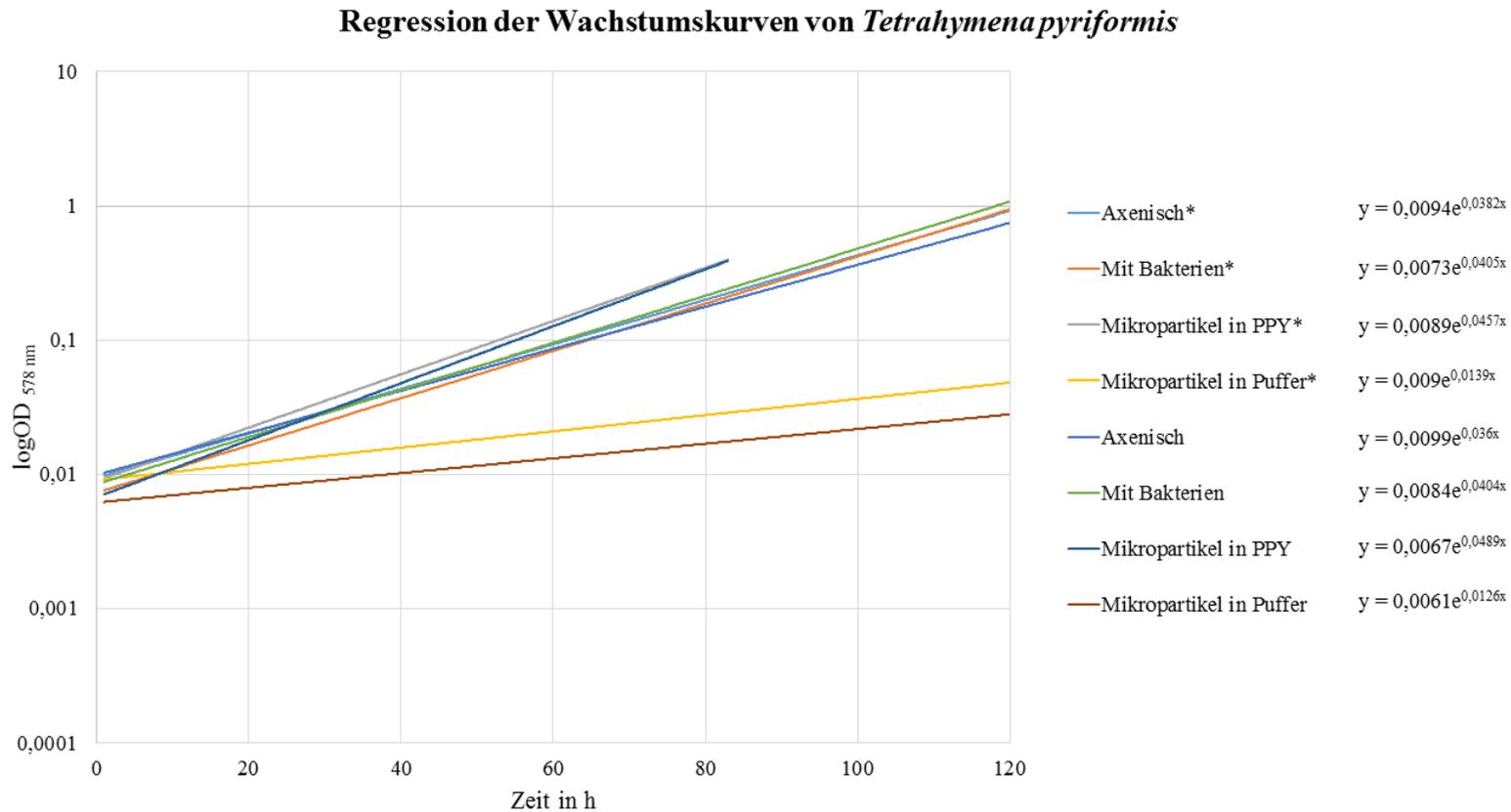


Abb. 4 -17: Semilogarithmische Darstellung der Wachstumskurven von *Tetrahymena pyriformis* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. In der Regression wird der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen deutlicher. Vor allem die Kulturen in Puffer wachsen deutlich langsamer. Angezeigt sind nur die von Excel kalkulierten Regressionsgeraden. Die Funktionsgleichungen befinden sich in der Legende. Die Datenerhebung wurde zusammen mit Hendrike Dürichen durchgeführt. Der Stern (*) markiert die Schüttelkulturen.

Zum Erstellen der Wachstumskurven wurden alle 60 min Proben entnommen und die Zelldichte photometrisch bestimmt. Die Kulturen wurden bei Raumtemperatur entweder unter Agitation (Schüttelkulturen) oder stehend inkubiert. Zum Vergleich wurden eine axenische *Tetrahymena pyriformis* Kultur in PPY und eine zusätzlich mit Bakterien gefütterte Kultur von *Tetrahymena pyriformis* mitgeführt. Einerseits wurde der Einfluss der Partikel im Medium überprüft (Kulturen mit Mikropartikeln in PPY), andererseits die Eignung der Partikel als einzige Nahrungsquelle (Kulturen in Phosphatpuffer mit Mikropartikeln). Die Messung der Kulturen mit Partikeln im Medium musste aufgrund von Kontaminationen nach 84 Stunden beendet werden.

Aus den Regressionsgeraden wird ersichtlich, dass alle Schüttelkulturen kürzere Generationszeiten als deren korrespondierenden Standkulturen aufweisen. Dies ist zum einen in der besseren Sauerstoffversorgung unter Agitation begründet, andererseits bewirkt das Schütteln im Falle der Kulturen mit Mikropartikeln deren Aufwirbeln. In Standkulturen sinken sie zu Boden und sind somit für *Tetrahymena pyriformis* schwerer zugänglich. Anhand der Graphen und dank halblogarithmischer Darstellung lassen sich ebenso die Verdopplungs- bzw. Generationszeiten der verschiedenen *Tetrahymena pyriformis* Kulturen ablesen. Die Generationszeit der axenischen Kultur beträgt 18 Stunden unter ständigem Schütteln und 19 Stunden bei ruhender Kultivierung. Die Zugabe von *Escherichia coli* ins Medium führt zu einer Verkürzung auf 17 Stunden für beide Kulturen. Die Beigabe von Mikropartikeln in PPY verkürzt die Teilungszeit sogar nochmals auf 14 (Schüttelkultur) und 15 Stunden (Standkultur). Die Zugabe partikulären Materials zum Medium stimuliert die Bildung von Nahrungsvakuolen zusätzlich, sodass neben den zusätzlichen Nahrungsquellen (Bakterien oder Mikropartikel) passiv mehr Medium aufgenommen wird, das von *Tetrahymena pyriformis* verwertet werden kann und folglich zu höheren Teilungsraten führt. Eine drastische Erhöhung der Generationszeit zeigt sich, wenn *Tetrahymena pyriformis* mit Mikropartikeln in Puffer kultiviert wird. Eine Teilung findet durchschnittlich erst nach 49,5 (Schüttelkultur) oder 54,5 Stunden statt. Um auszuschließen, dass diversere Auxotrophien (Holz, 1973) die Ursache für diese sehr langsamen Teilungsraten ist, wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen die Zellzahl unterschiedlich supplementierter *Tetrahymena pyriformis* Kulturen in Puffer mit Mikropartikeln bestimmt (Abb. 4-18).

4 Ergebnisse und Auswertung

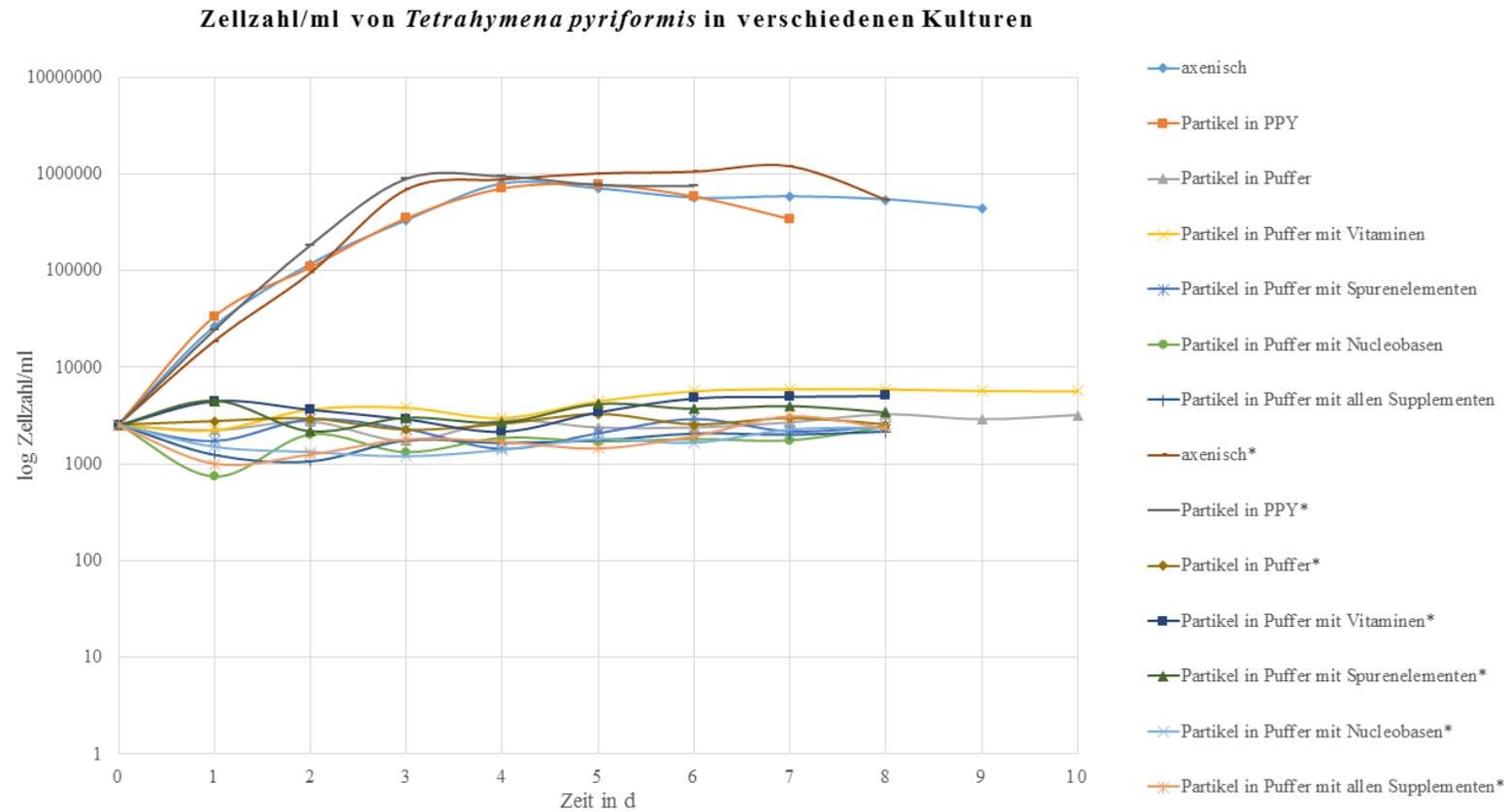


Abb. 4-18: Semilogarithmische Darstellung der Entwicklung des Titors von *Tetrahymena pyriformis* aus verschiedenen Kulturen über die Zeit. Die Graphen sind von Excel interpoliert. Zum Vergleich wurden axenische Kulturen sowie Kulturen mit Partikeln in PPY mitgeführt. Der Stern (*) markiert Kulturen, die unter Agitation inkubiert wurden. Die Supplementierung mit verschiedenen Stoffen beeinflusst die Wachstumsrate von *Tetrahymena pyriformis* nicht.

Sämtliche Kulturen wurden mit derselben Ausgangshungerkultur von *Tetrahymena pyriformis* beimpft. Zum Vergleich mit normalem Wachstum wurden eine axenische Kultur in PPY sowie eine Kultur mit PPY und Mikropartikeln mitgeführt. Diese Vergleichskulturen zeigen die typische Wachstumsrate. Dabei wachsen die zusätzlich mit Mikropartikeln gefütterten Organismen, ähnlich wie bei der Wachstumskurve beobachtet, schneller als die axenischen, auch die Agitation während der Kultivierung bewirkt schnelleres Wachstum. Die schneller wachsenden Kulturen sterben auch eher ab. Sieben bis acht Tage entsprechen in etwa der typischen Lebensdauer einer axenischen Kultur in 25 ml PPY in 100 ml Erlenmeyerkolben, sodass diese Beobachtung nicht ungewöhnlich ist.

Der Vergleich der Kulturen in Puffer mit Mikropartikeln und verschiedenen Supplementen zeigt, dass letztere keinen Einfluss auf die Wachstumsrate von *Tetrahymena pyriformis* haben, da die Zellzahlen in allen Kulturen annähernd gleich sind, um die ursprüngliche Zelldichte bei der Inokulation schwanken und bis zum Absterben der Kulturen bzw. Beendigung des Versuchs diese Zelldichte erhalten. Dies spricht dafür, dass in etwa gleich viele Zellen sterben wie durch Teilung entstehen. Die Teilung der Organismen konnte mikroskopisch während des Zählvorgangs beobachtet werden. Die niedrige Wachstumsrate von *Tetrahymena pyriformis* in Puffer mit Mikropartikeln ist also vermutlich eher mit der *de novo* Synthese zu begründen als mit dem Fehlen essentieller Nährstoffe, da einerseits die Supplementierung nicht zu schnellerem Wachstum führt, andererseits die Ciliaten auf Basis der Mikropartikel als einzige Nahrungsquelle für fünf bis zehn Tage überleben können.

Zusammenfassend können die synthetisch hergestellten Mikropartikel durchaus als geeignetes Mittel zur Untersuchung des Ingestions- und Verdauungsverhaltens bei *Tetrahymena pyriformis* betrachtet werden, da sie vom Ciliaten aufgenommen und verdaut werden. Zudem sind sie aufgrund ihrer Größe von etwa 5 µm sowie der vereinfachten Färbbarkeit gut zu visualisieren. Außerdem können ihre Oberflächen chemisch so manipuliert werden, dass sie definierte biophysikalische und biochemische Eigenschaften aufweisen.

4.3.2 Einfluss der Oberflächeneigenschaften synthetischer Mikropartikel

Zur Überprüfung definierter Oberflächeneigenschaften wurden unterschiedliche Substanzen kovalent an die Mikropartikel gebunden und im Blindversuch im Hinblick auf die Ingestionseigenschaften mikroskopisch untersucht (Abb. 4-19).

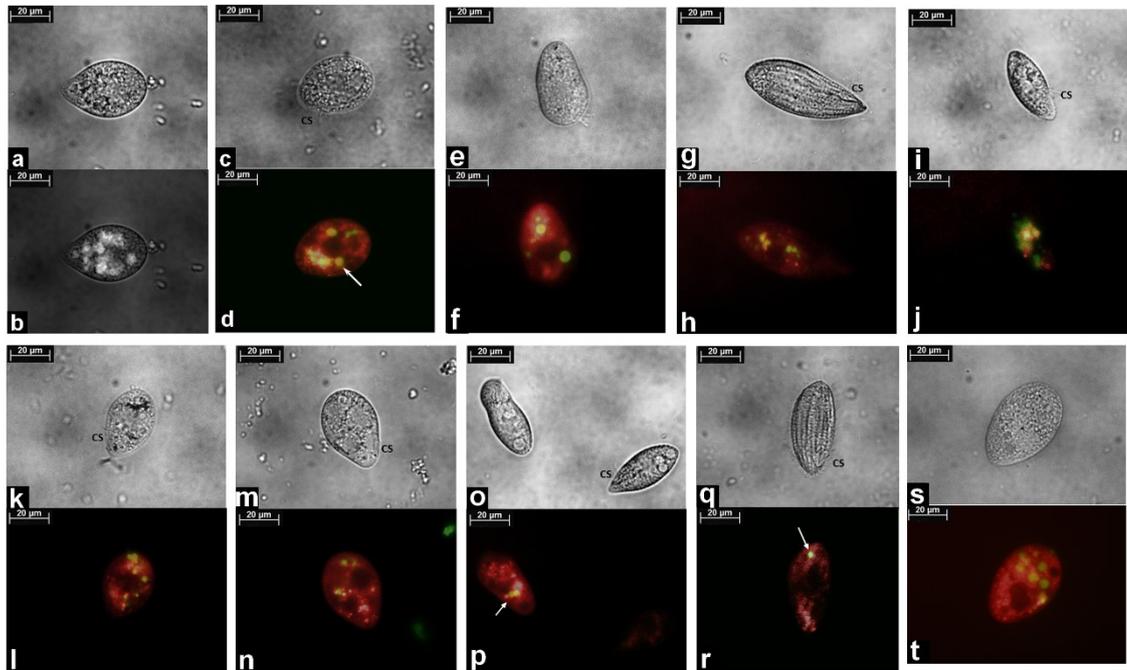


Abb. 4-19: Licht- und fluoreszenzmikroskopische [rekolorierte Mischbilder der Emission mit FITC (grün) und Nilrot (rot)] Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit unterschiedlich modifizierten Mikropartikeln. a und b (Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme bei FITC-Emission): Mikropartikel mit zusätzlichem Rinderserumalbumin. c und d: Kontrollpartikel, die den chemischen Kopplungsprozess ohne Ligandenbindung durchliefen. e bis h: Kontrollpartikel ohne Behandlung (entsprechen den normalen Mikropartikeln). i und j: Partikel mit Glucuronidase. k und l: Partikel mit Pepsin. m und n: Partikel mit Trypsin. o und p: Partikel mit Lysin. q und r: Partikel mit Isoleucin. s und t: Partikel mit Phenylalanin. Mit der Ausnahme der Partikel mit zusätzlichem Rinderserumalbumin, die nicht gefärbt werden konnten, zeigt die Nilrotfärbung, dass die aufgenommenen Partikel in Nahrungsvakuolen liegen, da sich die Fluoreszenzsignale überlappen (weiße Pfeile). Mit Aminosäuren gekoppelte Partikel werden quantitativ weniger ingestiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Hendrike Dürichen angefertigt. CS = Cytostom. Maßstab: 20 µm (aus Dürichen *et al.*, 2016).

Zusätzlich zu den mikroskopischen Aufnahmen wurde die Ingestion der verschiedenen Mikropartikel durch Zählung der partikelenthaltenden Vakuolen zufällig ausgewählter Individuen von *Tetrahymena pyriformis* quantifiziert (Abb. 4-20).

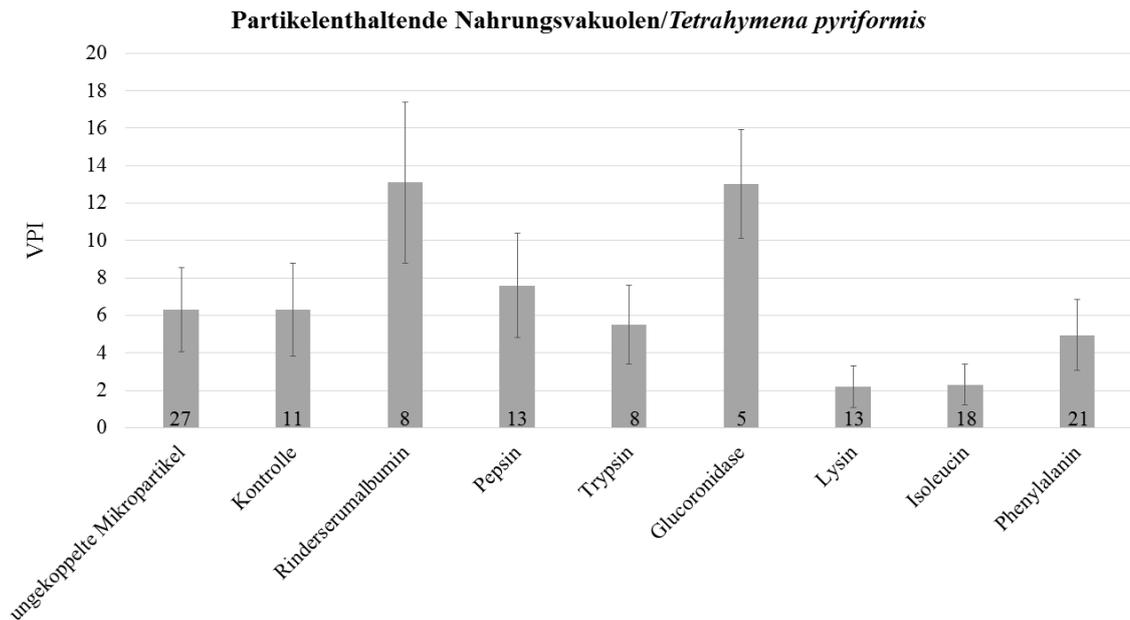


Abb. 4-20: Anzahl der mit Partikeln gefüllten Nahrungsvakuolen pro Individuum (VPI) von *Tetrahymena pyriformis*. Als Vergleichswert für die VPI dienen die unbehandelten Mikropartikel. Die Kontrolle mit behandelten Mikropartikeln ohne Zugabe eines Liganden zeigt, dass der Kopplungsprozess selbst die Ingestion nicht beeinflusst. Während vor allem die kovalente Bindung von zusätzlichem Rinderserumalbumin und Glucoronidase die Ingestion stark erhöhen, sinkt die Aufnahmerate mit gebundenen Aminosäuren drastisch. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Die Zahlen am unteren Ende der Balken entsprechen der jeweiligen Stichprobengröße.

Als Normalwert für die Ingestion der Mikropartikel dienten unbehandelte Mikropartikel (Abb. 4-19 e bis h). Im Schnitt enthielt *Tetrahymena pyriformis* 6,3 mit Partikeln gefüllte Nahrungsvakuolen pro Individuum (VPI). Während der Verdauung dieser Partikel fiel nichts Ungewöhnliches auf. Der chemische Kopplungsprozess mit dem Carbodiimid hat keinen Einfluss auf die Ingestion (Abb. 4-19 c und d). Die Partikel, die den Kopplungsprozess zwar durchliefen, aber an die kein Ligand gebunden wurde, wurden mit gleicher Häufigkeit wie die unbehandelten Partikel ingestiert (6,3 VPI). Die Verdauung war ebensowenig beeinträchtigt. Die höchste Aufnahmerate zeigten Partikel, an deren Oberfläche zusätzliches Rinderserumalbumin gebunden war (Abb. 4-19 a und b). Mit 13,1 VPI wurden diese am besten im Vergleich zu anderen modifizierten Partikeln aufgenommen, obwohl sie durch das zusätzliche Protein etwas größer sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Maskierung der Polymethacrylatmatrix, die die synthetischen Mikropartikel stabilisiert. Außerdem könnte das zusätzlich gebundene Rinderserumalbumin einen weiteren Anreiz für die Ingestion darstellen. Warum diese

Proben nicht mit Nilrot anfärbbar waren, bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung ist die schnelle cytoplasmatische Bewegung, die nach der Ingestion und während der Verdauung dieser Partikel beobachtet wurde und in relativ zügiger Egestion resultierte. Neben den Partikeln mit zusätzlich gebundenem Rinderserumalbumin wurden auch Partikel mit gekoppelter Glucoronidase in sehr hoher Anzahl ingestiert (13 VPI; Abb. 4-19 i und j). Auch mit diesen Partikeln war die Färbung mit Nilrot erschwert, der Verdauungsprozess selbst schien jedoch nicht beeinträchtigt zu sein. Verglichen mit unbehandelten Mikropartikeln wurden Partikel mit den Enzymen Pepsin (7,6 VPI; Abb. 4-19 k und l) und Trypsin (5,5 VPI; Abb. 4-19 m und n) zu normalen Raten aufgenommen. Die einzige Auffälligkeit in diesen Versuchen stellt die etwas schnellere Zellyse von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit Pepsinpartikeln dar. Mit Trypsinpartikeln konnten keine Besonderheiten oder Abweichungen im Verdauungsprozess festgestellt werden. Eine drastische Reduktion der Ingestion zeigt sich bei Partikeln, die mit Aminosäuren gekoppelt sind. Im Durchschnitt enthielt *Tetrahymena pyriformis* nur 2,2 VPI nach der Fütterung mit Lysinpartikeln (Abb. 4-19 o und p). Partikel, die mit der hydrophoben und basischen Aminosäure gekoppelt waren, führten nach der Ingestion zu schnellem cytoplasmatischen Fluss. Auch solche Partikel, die mit der unpolaren, hydrophoben Aminosäure Isoleucin dekoriert waren, wurden nur sehr spärlich aufgenommen (2,3 VPI; Abb. 4-19 q und r). Nach der Ingestion wurden Nahrungsvakuolen mit Partikeln zudem sehr schnell wieder entleert. Eine Ausnahme innerhalb der Aminosäuren stellen Partikel mit der aromatischen, hydrophoben Aminosäure Phenylalanin dar, die mit annähernd normaler Quantität von *Tetrahymena pyriformis* aufgenommen wurden (4,95 VPI; Abb. 4-19 s und t). Einige partikelenthaltende Vakuolen wurden sehr schnell durch den Organismus transportiert.

Die definierten Oberflächeneigenschaften der chemisch modifizierten Mikropartikel haben sowohl auf die Ingestion als auch die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* einen recht erheblichen Einfluss.

4.4 Einfluss bakterieller Oberflächen

Resultierend aus den Beobachtungen mit chemisch modifizierten Mikropartikeln, aber auch aus Studien bereits bestehender Endosymbiosen oder Interaktionen mit pathogenen Mikroorganismen (siehe Einführung) zeigt sich ein deutlicher Einfluss von

Oberflächeneigenschaften auf das Erkennen und die Kommunikation zwischen beiden Partnern. Da Mikropartikel nicht lebendig sind und somit nicht aktiv aus Nahrungsvakuolen entkommen können, sollte der Einfluss bakterieller Oberflächen anhand des von uns gewählten Modells der Interaktion zwischen *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* untersucht werden. Einerseits wurde versucht, definierte Oberflächenmutanten des Bakteriums zu erzeugen, was aber nur im Fall der Konjugationspili erfolgreich war. Um dennoch die Effekte verschiedener Oberflächen auf die Ingestion, Verdauung und auch das Entkommen aus Nahrungsvakuolen studieren zu können, wurde zusätzlich das Verfahren der chemischen Modifikation angepasst, sodass *Escherichia coli* diesen Prozess in hinreichender Anzahl überlebt (siehe Kapitel 3.8).

4.4.1 Einfluss der Sex-Pili von *Escherichia coli* auf das Entkommen aus Nahrungsvakuolen

Zur Untersuchung des Einflusses der Konjugationspili wurde *Tetrahymena pyriformis* mit drei verschiedenen Stämmen von *Escherichia coli* gefüttert. Einer enthielt das F-Plasmid, das zur Bildung von Konjugationspili befähigt, ein weiterer wurde von diesem Plasmid kuriert und der letzte mit diesem reinfiziert. Im Anschluss an die Fütterung wurden die Kulturen bei 10 °C inkubiert. Bei niedrigen Temperaturen ändert sich die Lipidkomposition der Nahrungsvakuolenmembranen, um deren Fluidität zu erhalten (Wunderlich *et al.*, 1973; Nozawa und Kasai, 1978). Nach 16 Stunden ist dieser Prozess abgeschlossen und die Ciliaten beginnen erneut mit der Nahrungsaufnahme. Wenn diese dann wieder erwärmt werden, sollte durch die erhöhte Membranfluidität das Entkommen aus Nahrungsvakuolen für Bakterien leichter sein und somit die Beobachtung des Einflusses der Sex-Pili vereinfacht werden. Vor der Inkubation bei 10 °C wurden alle Kulturen mikroskopisch untersucht, um die Ingestion der Bakterien sicherzustellen (Abb. 4-21).

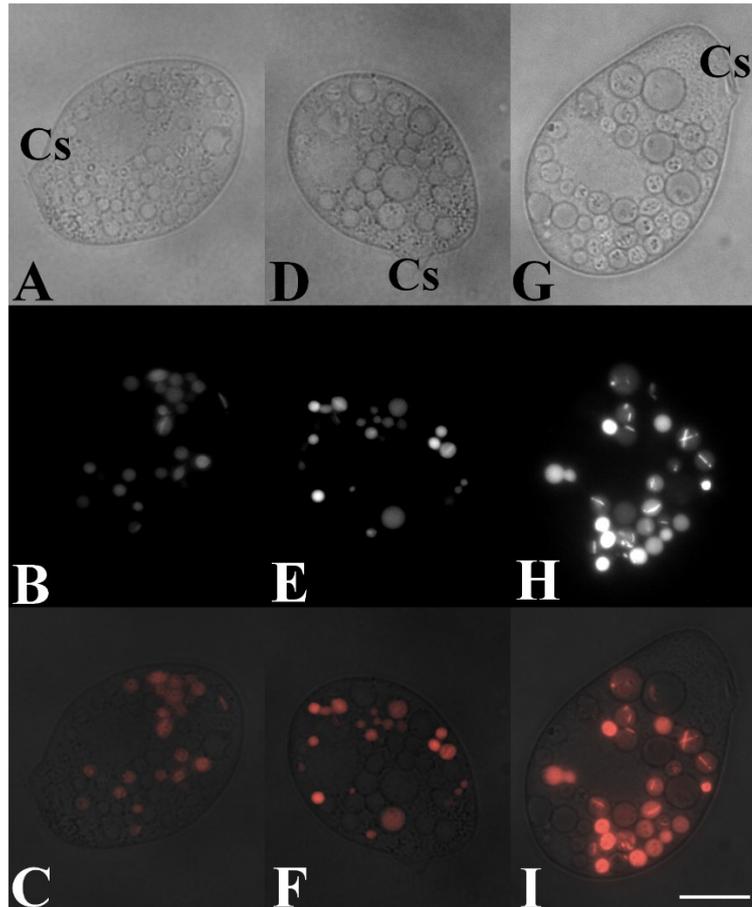


Abb. 4-21: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I). Obere Reihe: Lichtmikroskopische Aufnahmen. Mittlere Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Emission DsRed). Untere Reihe: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Alle Bakterien wurden in großer Anzahl ingestiert. Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Die mikroskopischen Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit den verschiedenen Bakterienstämmen zeigen, dass diese mit gleich hoher Quantität ingestiert wurden. Die Kulturen wurden im Anschluss für mindestens 16 Stunden bei 10 °C inkubiert, um zu gewährleisten, dass der Ingestionsprozess wieder aufgenommen wurde. Die Kulturen wurden während des Kühlens mikroskopiert. Da *Escherichia coli* zu diesem Zeitpunkt nicht mehr fluoresziert, wurden die Proben mit DAPI gefärbt (Abb. 4-22).

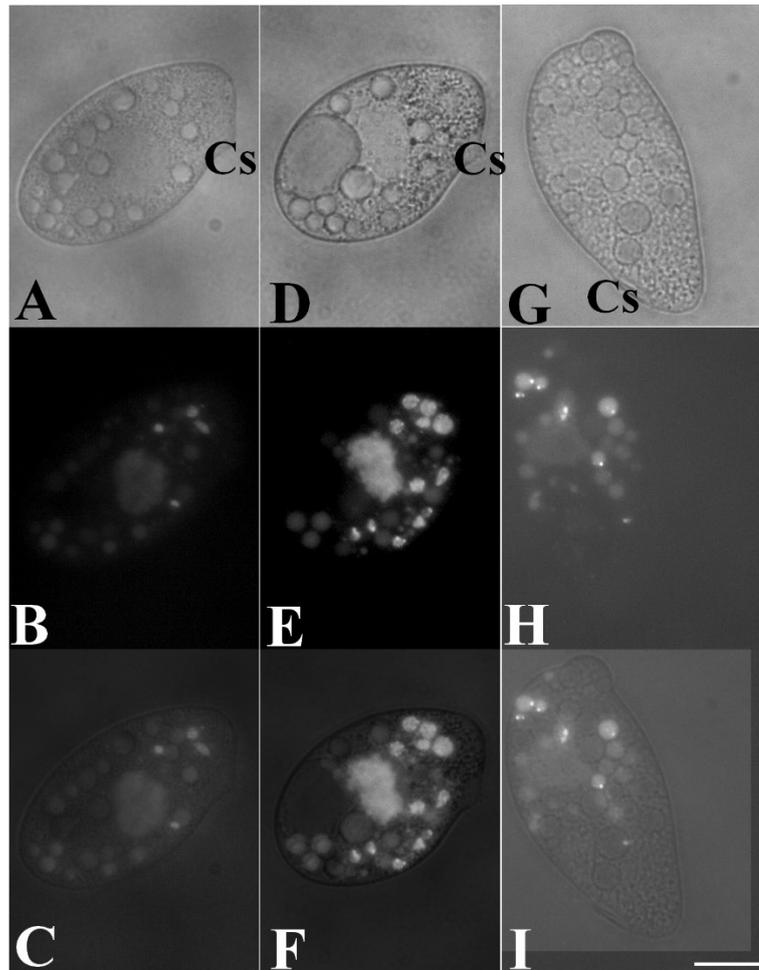


Abb. 4-22: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* während der Inkubation bei 10 °C nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I). Obere Reihe: Lichtmikroskopische Aufnahmen. Mittlere Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Emission DAPI). Untere Reihe: Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Bakterien wurden bereits wieder ingestiert, zwischen den Stämmen fallen keine Unterschiede auf. Cs: Cytostom. Maßstab: 20 µm.

Zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen fallen während der Kühlung keine Unterschiede auf. *Tetrahymena pyriformis* hat den Prozess des Integrierens fluiderer Lipide abgeschlossen und die Nahrungsaufnahme wieder aufgenommen. Im Anschluss wurden die Kulturen für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mikroskopiert wurden, um die Effekte erhöhter Membranfluidität beobachten zu können. Auch diese Kulturen wurden mit DAPI gefärbt (Abb. 4-23).

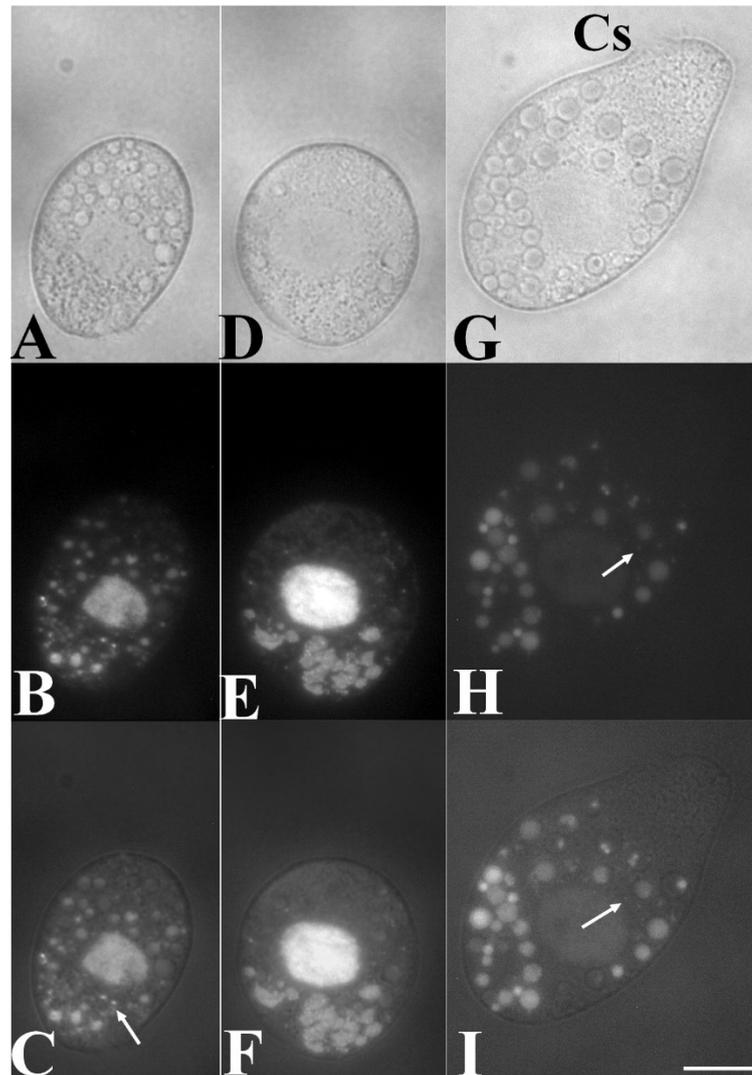


Abb. 4-23: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I). Obere Reihe: Lichtmikroskopische Aufnahmen. Mittlere Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Emission DAPI). Untere Reihe: Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Während in der Kultur mit *Escherichia coli* ohne F-Plasmid alle Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen liegen, sind bei den Proben mit F-Plasmid einzelne Bakterien im Cytoplasma sichtbar (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturansätzen. Wie erwartet, führt die erhöhte Membranfluidität dazu, dass Bakterien häufiger aus den Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* entkommen können. Dabei haben die *Escherichia coli* Stämme mit Befähigung zur Bildung von Konjugationspili einen Vorteil gegenüber dem Stamm ohne F-Plasmid. Während nach der Fütterung mit konjugationsfähigen Stämmen einzelne Bakterien im

Cytoplasma von *Tetrahymena pyriformis* sichtbar sind, sind beim F⁻-Stamm alle Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen zu finden. Somit sind die Pili am Entkommen aus Nahrungsvakuolen beteiligt.

4.4.2 Einfluss chemisch modifizierter, definierter Bakterienoberflächen

Zur Untersuchung des Einflusses definierter Oberflächen wurde das chemische Kopplungsverfahren für Mikropartikel so angepasst, dass *Escherichia coli* in hinreichender Anzahl lebensfähig bleibt. Dies wurde über Ausplattieren und Ermittlung der Lebendzellzahl überprüft (siehe Kapitel 3.8). Die Kopplungsreaktion selbst kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-methyl-3-cumarinylacetat sichtbar gemacht werden (AMCA; Abb. 1-5).

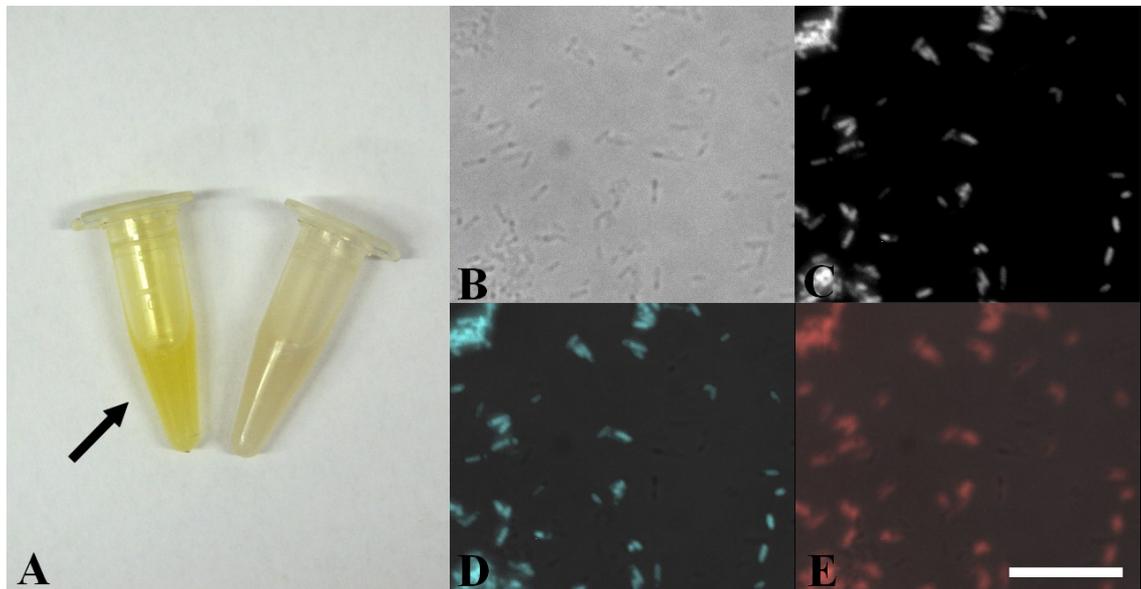


Abb. 4-24: Aufnahmen von *Escherichia coli* nach der Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMCA. A: Makroskopische Aufnahme nach der Kopplung. Der Pfeil markiert die Reaktion, der das Kopplungsreagenz EDAC zugesetzt wurde. Diese zeigt einen deutlichen Farbumschlag im Vergleich zur Probe ohne EDAC. B: Lichtmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* nach der Kopplung mit AMCA. C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission: AMCA). D: Gefärbtes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (Emission: AMCA). F: Gefärbtes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (Emission: DsRed). Maßstab: 20 μm (modifiziert aus Siegmund und Wöstemeyer, 2016).

Die Aufnahmen mit dem Farbstoff AMCA zeigen deutlich, dass die kovalente Bindung verschiedener Substanzen, die Carboxyl- oder Aminogruppen tragen, auch mit Bakterienoberflächen funktioniert, da der Farbstoff erst dann fluoresziert, wenn er über eine Peptidbindung kovalent an eine andere Substanz gebunden ist. Bakterien, denen kein Kopplungsreagenz zugegeben wurde, fluoreszierten nicht im Emissionsbereich des Farbstoffs. Der Farbstoff diente einzig als Nachweis für die erfolgreiche Kopplungsreaktion, da für diese Arbeiten die rot fluoreszierenden Transformanten von *Escherichia coli* verwendet wurden. Nach der Modifikation wurden die Bakterien an synchronisierte Hungerkulturen von *Tetrahymena pyriformis* verfüttert und der Einfluss verschiedener Oberflächen auf Ingestion und Verdauung des Ciliaten sowohl fluoreszenz- als auch transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Als Kontrollen wurden zum einen eine unbehandelte Übernachtskultur von *Escherichia coli*, zum anderen eine wie modifizierte Bakterien behandelte Kultur ohne Ligandenzugabe angeboten.

Die Übernachtskultur wurde von *Tetrahymena pyriformis* ingestiert und im Regelfall traten keine Unregelmäßigkeiten während der Verdauung auf (Abb. 4-25).

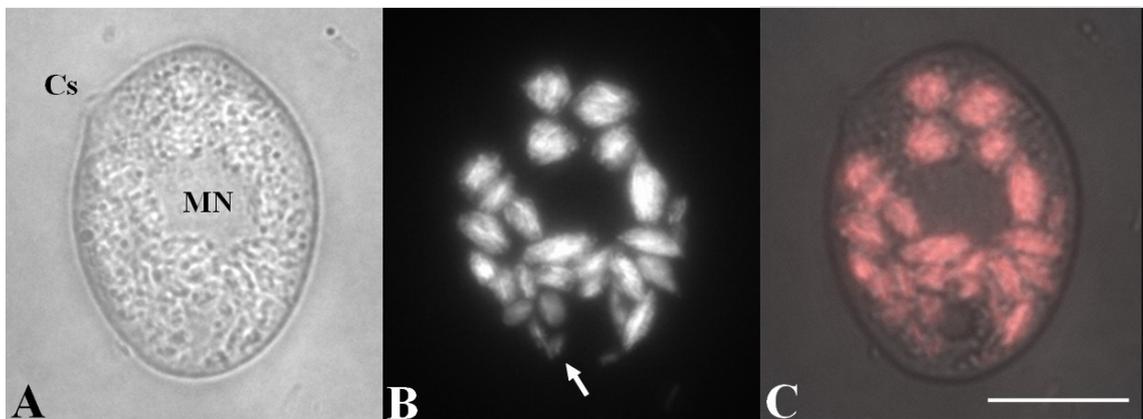


Abb. 4-25: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit einer unbehandelten Übernachtskultur von *Escherichia coli*. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Bakterien werden verdaut, wie die nachlassende Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigt (weißer Pfeil). Cs: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μm .

Die in großer Zahl ingestierten Bakterien wurden von *Tetrahymena pyriformis* verdaut, wie die Verkleinerung des Nahrungsvakuolendurchmessers und die sinkende Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigen. Diese Beobachtung beruht darauf, dass das DsRed-Protein gleichsam mit den Bakterien verdaut wird. Ähnliche Ergebnisse erhält man nach der Verfütterung der Kontrollbakterien (Abb. 4-26).

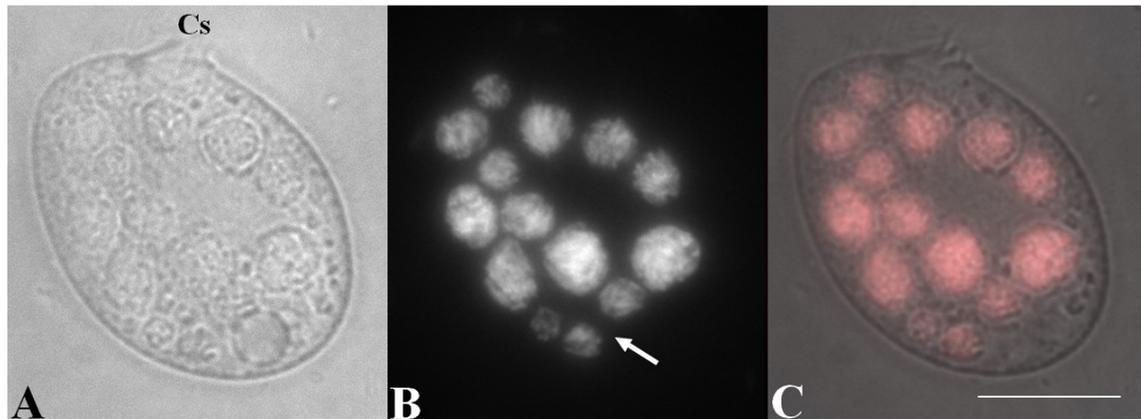


Abb. 4-26: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit der Kontrollkultur von *Escherichia coli*. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Bakterien werden verdaut, wie die nachlassende Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigt (weißer Pfeil). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μ m.

Die Kontrollbakterien wurden ebenso wie die Übernachtskultur in hoher Anzahl ingestiert. Auch in diesem Fall zeigen der verkleinerte Vakuolendurchmesser und die nachlassende Fluoreszenz die Verdauung der Bakterien an. Für Vergleiche auf ultrastruktureller Ebene wurde eine Kultur aus *Tetrahymena pyriformis* und der Kontrolle von *Escherichia coli* für die Transmissionselektronenmikroskopie eingebettet und untersucht (Abb. 4-27).

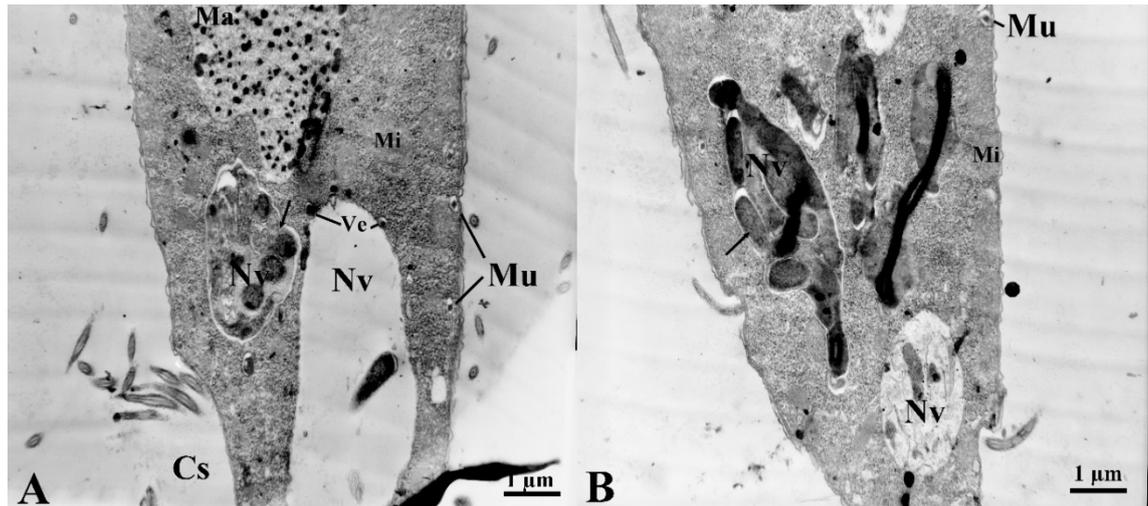


Abb. 4-27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* (Kontrolle). Die Nahrungsvakuolen zeigen unterschiedliche Verdauungsstadien. Der Pfeil markiert Futterbakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen. Cs: Cytostom. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium. Mu: Mucocysten. Nv: Nahrungsvakuolen. Ve: Vesikel.

Die Aufnahmen zeigen neben den üblichen Zellbestandteilen Nahrungsvakuolen, die sich in verschiedenen Verdauungsstadien befinden. Unter anderem ist eine junge Nahrungsvakuole sichtbar (Abb. 4-27 A). Sie entspricht dem ersten Stadium, in dem aufgenommene Bakterien eher locker in den Nahrungsvakuolen liegen (Nilsson, 1987). In diesem Fall ist allerdings nur ein Bakterium sichtbar. Zudem ist erkennbar, dass Vesikel mit der Vakuole fusionieren. Gemessen am Stadium handelt es sich wohl um Vesikel, die im Zusammenhang mit dem Ansäuern des Vakuoleninhalts stehen. Im nächsten Stadium, sichtbar an der benachbarten Vakuole, werden die Bakterien durch Dehydrierung dichter zusammen gepackt. Einige *Escherichia coli* Zellen sind bereits lysiert. Fingerartige Ausbuchtungen (Abb. 4-27 B) von Nahrungsvakuolen treten eher selten auf. Bisher wird angenommen, dass sie dem Ausschleusen verdauten Materials dienen (Elliot und Kennedy, 1973) und folglich tendenziell in späteren Verdauungsstadien auftreten. Der Großteil der enthaltenen Bakterien ist vollständig oder teilweise lysiert, es sind aber auch noch intakte Bakterien sichtbar. Die Vakuole rechts unten (Abb. 4-27 B) zeigt vermutlich das letzte Stadium kurz vor der Egestion, da sie ausschließlich Überreste vollständig verdauter Bakterien enthält.

Um Vergleiche zu den sichtbaren Effekten auf Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit modifizierten Mikropartikeln zu erhalten, wurden verschiedene Aminosäuren und Rinderserumalbumin an die Oberfläche von *Escherichia coli* gebunden (Abb. 4-28).

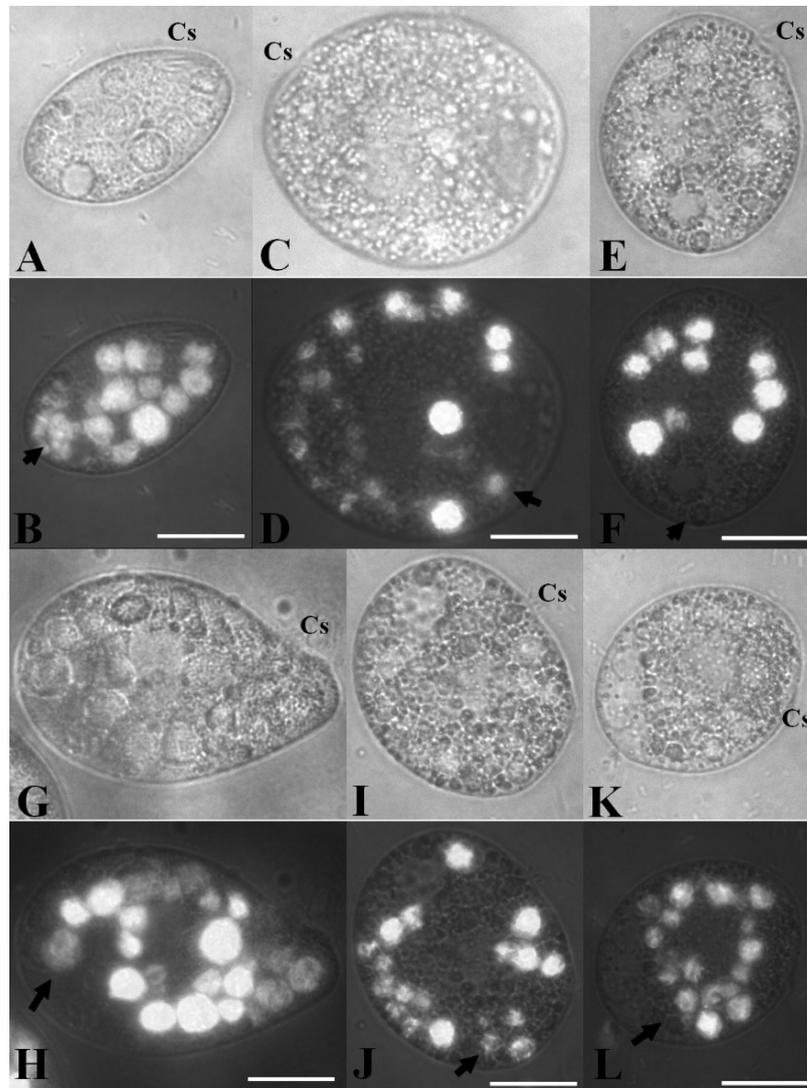


Abb. 4-28: Lichtmikroskopische Aufnahmen und Mischbilder aus licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Emission: DsRed) von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit kovalent gebundenen Aminosäuren und Rinderserumalbumin. A und B: Glycin. C und D: Isoleucin. E und F: Lysin. G und H: Phenylalanin. I und J: Glutamin. K und L: Rinderserumalbumin. Die Bakterien werden normal verdaut, wie die schwächere Fluoreszenz älterer Nahrungsvakuolen zeigt (schwarze Pfeile). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Im Regelfall wurden Bakterien, die mit Aminosäuren oder Rinderserumalbumin gekoppelt waren, normal verdaut, wie nachlassende Fluoreszenz sowie die Verkleinerung des Nahrungsvakuolendurchmessers indizieren. Verglichen mit den Ergebnissen, die mit Mikropartikeln erhalten wurden, sind die Unterschiede in der Quantität der Aufnahme weniger drastisch, was vermutlich in der deutlich geringen Zellgröße von *Escherichia coli* begründet ist.

Da Nahrungsvakuolen angesäuert werden, um optimale Verdauungsverhältnisse zu schaffen, wurden diverse Di- und Polyamine an die Oberfläche von *Escherichia coli* gebunden, weil sie nach der Kopplung mindestens eine freie Aminogruppe hinzufügen und dadurch das Potenzial haben, als Base zu reagieren und der Ansäuerung entgegen zu wirken. Das kürzeste verwandte Diamin war Ethylendiamin (Abb. 4-29).

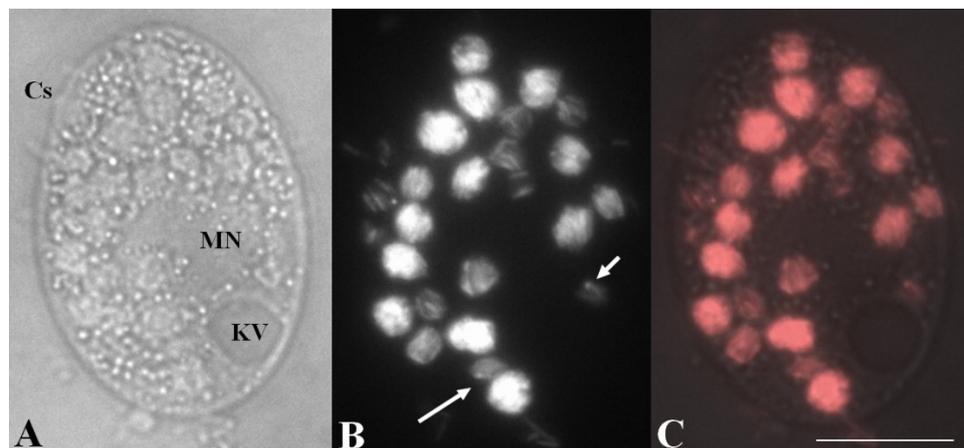


Abb. 4-29: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Ethylendiamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die starke Fluoreszenz sowie intakte Bakterien in späten Nahrungsvakuolen deuten auf eine gestörte Verdauung (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. KV: kontraktile Vakuole. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μm .

Nach der Fütterung mit Ethylendiamin-modifizierten Bakterien scheint die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* teilweise gestört zu sein. Neben der hohen Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen findet sich auch ein an seiner Form erkennbares, intaktes Bakterium in der Nahrungsvakuole oberhalb der kontraktilen Vakuole.

Vergleichbare Ergebnisse erhält man nach der Kopplung mit Diaminopropan (Abb. 4-30).

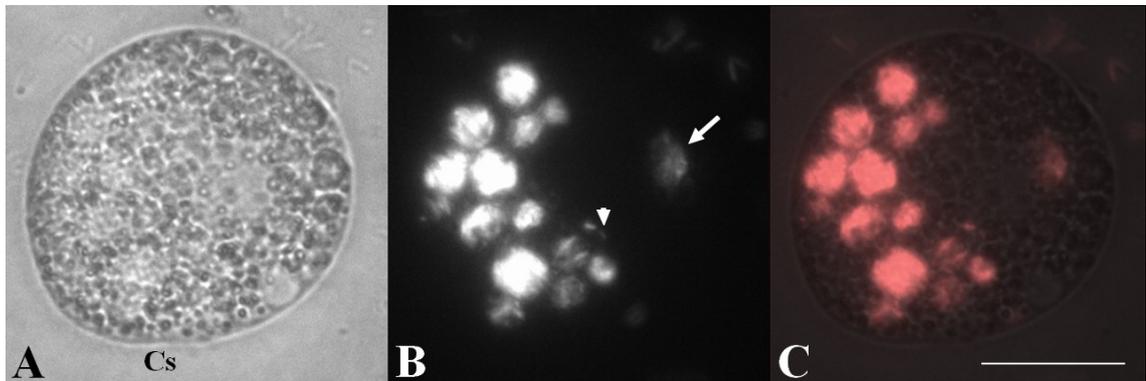


Abb. 4-30: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Diaminopropan. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Intakte Bakterien in einer späten Nahrungsvakuole (weißer Pfeil) deuten auf eine gestörte Verdauung. Zudem scheinen Bakterien im Cytoplasma zu liegen, die nicht von einer Nahrungsvakuole umgeben sind (Pfeilkopf). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μ m.

Neben unvollständig verdauten *Escherichia coli* Zellen wurden auch solche Bakterien gefunden, die vermutlich aus einer Nahrungsvakuole entkommen sind und folglich im Cytoplasma liegen. Unvollständige Verdauung konnte ebenso nach der Fütterung mit Putrescin-gekoppelten Bakterien beobachtet werden (Abb. 4-31).

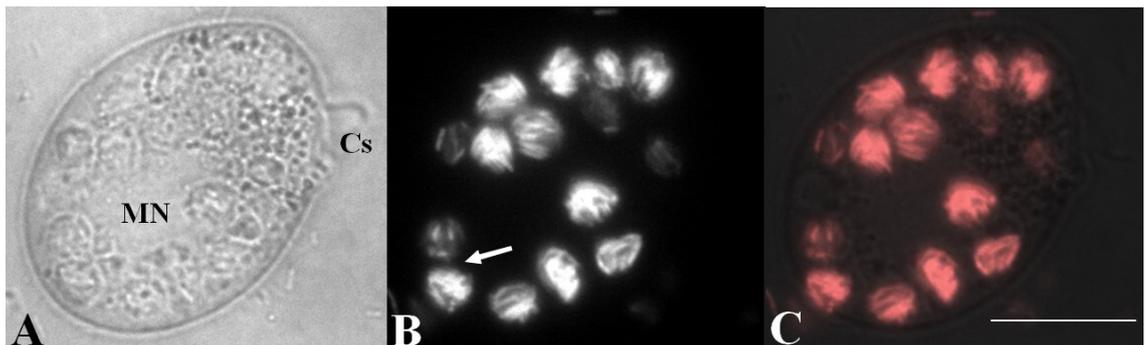


Abb. 4-31: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Putrescin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Nahrungsvakuolen in einem späten Verdauungsstadium zeigen sowohl eine hohe Fluoreszenzintensität als auch intakte Bakterien (weißer Pfeil). Cs: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μ m.

Die starke Fluoreszenz in den älteren Nahrungsvakuolen sowie intakte, anhand ihrer Form erkennbare Bakterien zeigen auch in diesem Fall, dass die Kopplung des Diamins an die Oberfläche von *Escherichia coli* die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* beeinträchtigt. Zudem wurde mit der Transmissionselektronenmikroskopie ein im Cytoplasma vorliegendes, einzelnes Bakterium gefunden (Abb. 4-32).

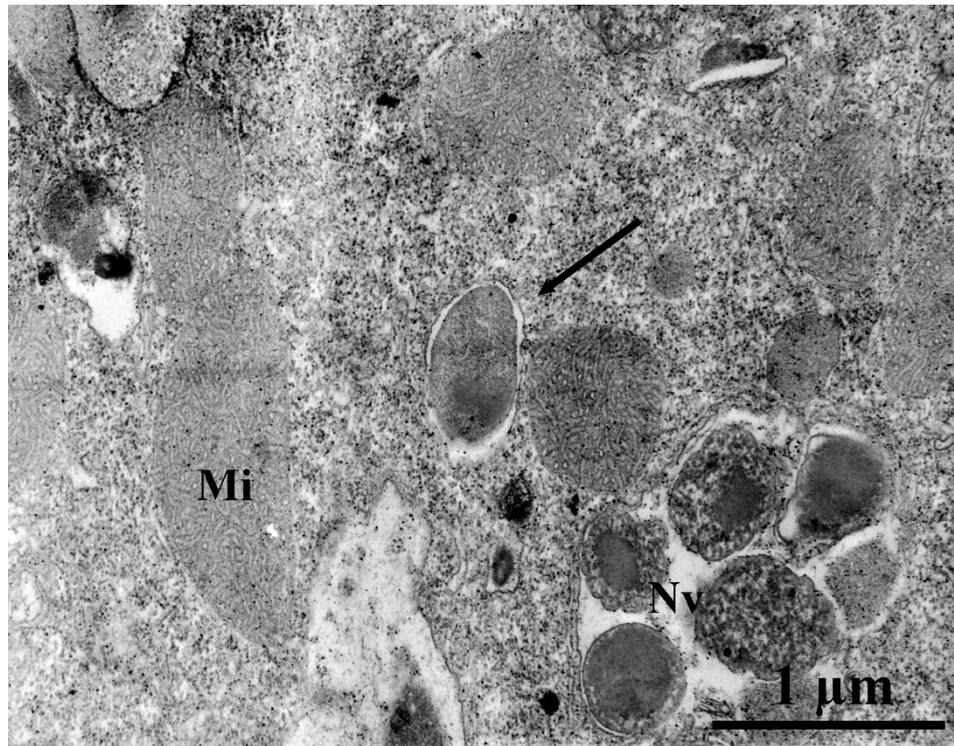


Abb. 4-32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit putrescinbehandelten *Escherichia coli*. Der Pfeil markiert ein einzelnes, im Cytoplasma liegendes Bakterium. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Das markierte Bakterium ($0,7 \times 0,3 \mu\text{m}$) liegt einzeln im Cytoplasma vor. Es wirkt intakt und ist sowohl von seiner eigenen als auch von einer Membran von *Tetrahymena pyriformis* umgeben, die dicht beieinander liegen. Die Nahrungsvakuole rechts unten zeigt neben lysierenden Bakterien auch ein intaktes (links unten). Vergleichbare Ergebnisse erhält man mit dem Diamin Cadaverin (Abb. 4-33 und 4-34).

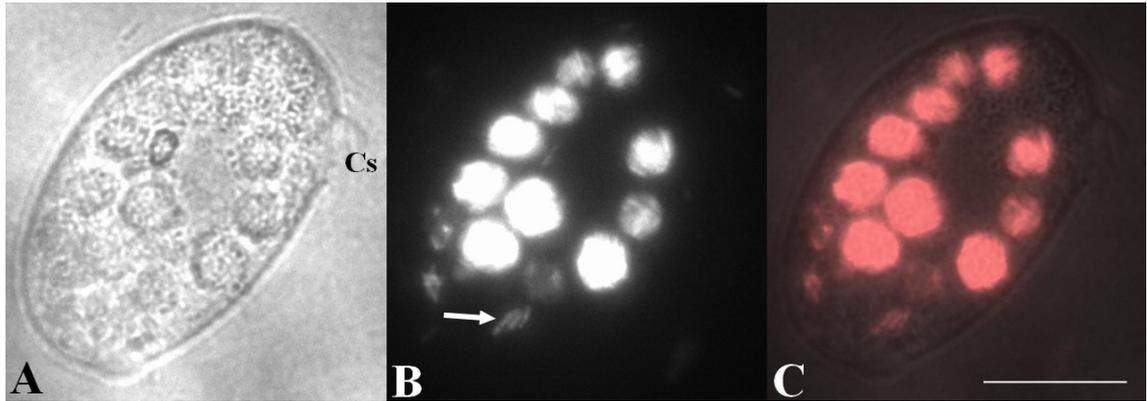


Abb. 4-33: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Cadaverin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Der weiße Pfeil markiert intakte Bakterien in einer älteren Nahrungsvakuole. Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Auch das Diamin Cadaverin beeinträchtigt die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis*, wenn es an die Oberfläche von *Escherichia coli* gebunden wird. In Nahrungsvakuolen in einem späten Verdauungsstadium, vermutlich kurz vor der Egestion, befinden sich drei intakte Bakterien. Transmissionselektronenmikroskopisch konnten auch Bakterien außerhalb von Nahrungsvakuolen gefunden werden (Abb. 4-34).

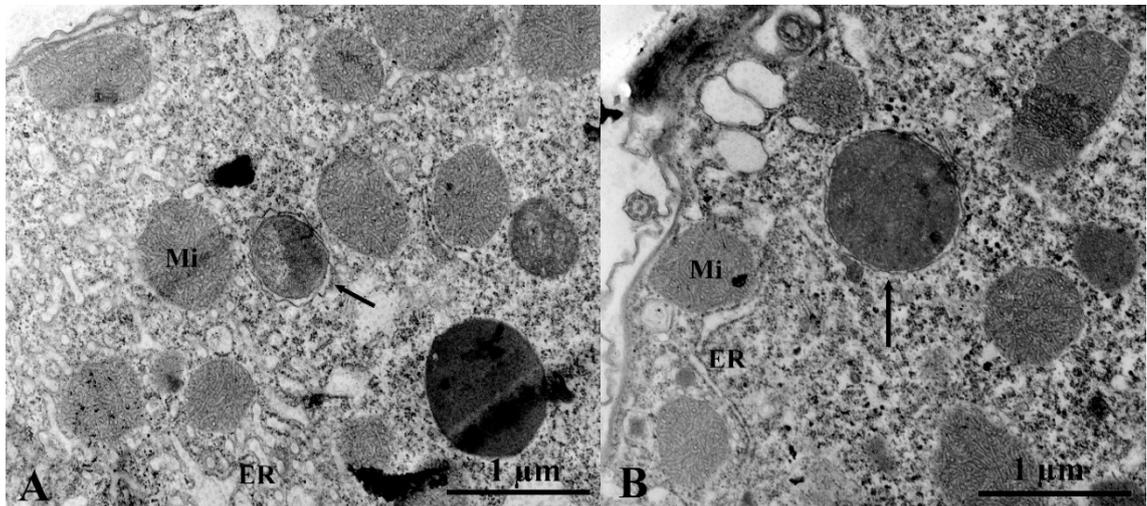


Abb. 4-34: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit cadaverinbehandelten Zellen von *Escherichia coli*. Die Pfeile markieren einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Mi: Mitochondrium.

Die Aufnahmen zeigen Bereiche in unmittelbarer Nähe zum Cortex und in beiden Fällen sind keine Nahrungsvakuolen in direkter Nähe zu finden. Das Bakterium in Abbildung 4-34 A hat einen Durchmesser von etwa 0,6 μm , was dem Durchmesser von *Escherichia coli* entspricht, und ist von zwei Membranen umgeben, die sehr dicht beieinander liegen und sich in ihrer Morphologie voneinander unterscheiden. Das Gleiche trifft auf das andere markierte Bakterium (Abb. 4-34 B) zu, das mit einem Durchmesser von etwa 0,9 μm größer ist. Auch in diesem Fall liegen die Bakterienmembran und die von *Tetrahymena pyriformis* eng aneinander. Zudem findet sich in unmittelbarer Nähe Endoplasmatisches Reticulum. In beiden Fällen enthält das Zellinnere der Bakterien osmiophiles Material, vergleichbar mit extern vorliegenden Bakterien (siehe Abb. 4-3), sodass diese wahrscheinlich intakt und nicht lysiert sind.

Neben den Diaminen wurden auch Polyamine verwendet, um die Oberfläche von *Escherichia coli* zu modifizieren. Diese tragen zusätzlich zu zwei Aminogruppen eine (Spermidin) oder zwei (Spermin) Iminogruppen, sollten also nach der Kopplung noch stärker basisch reagieren und folglich die Verdauung noch effektiver behindern. In der Tat findet man sowohl intrazelluläre Bakterien als auch unverdaute Bakterien in Nahrungsvakuolen, wenn diese zuvor mit Spermidin modifiziert wurden (Abb. 4-35 und 4-36).

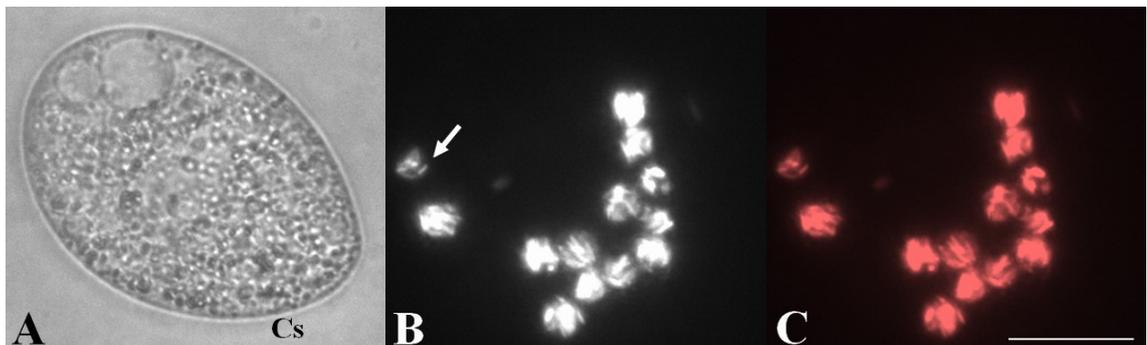


Abb. 4-35: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Spermidin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Kolorierte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme konnten aufgrund der Motilität des Individuums nicht übereinander gelegt werden. In älteren Nahrungsvakuolen finden sich intakte Bakterien (weißer Pfeil). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Auch nach der Kopplung mit dem Polyamin Spermidin ist die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* beeinträchtigt, wie die intakten, fluoreszierenden Bakterien in einer in einem späten Verdauungsstadium befindlichen Nahrungsvakuole zeigen. Auch in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen sich neben einzeln im Cytoplasma vorliegenden Bakterien viele intakte, also nicht verdaute *Escherichia coli* in späten Nahrungsvakuolen (Abb. 4-36).

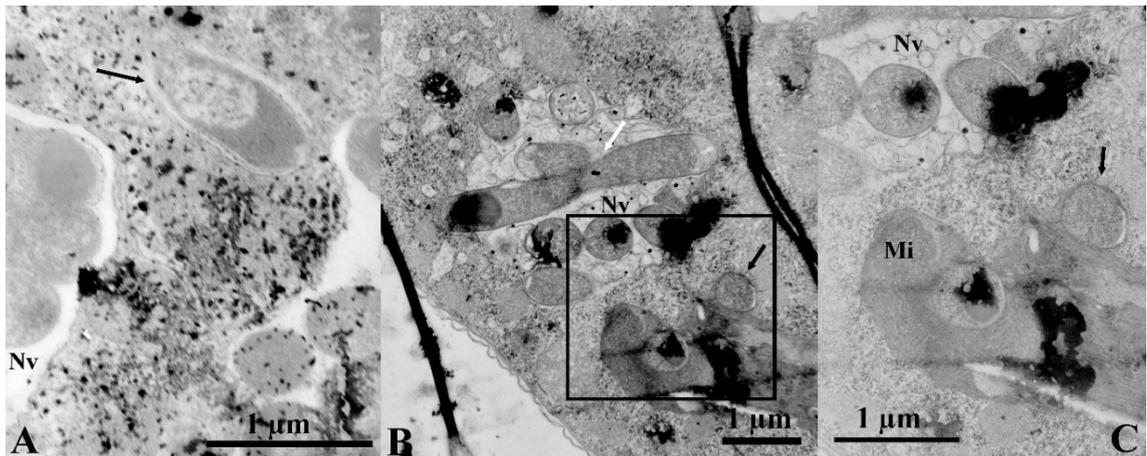


Abb. 4-36: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit spermidinbehandelten *Escherichia coli*. Abb. C zeigt den mit dem schwarzen Rechteck markierten Bereich aus B bei höherer Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile markieren einzeln im Cytoplasma liegende Bakterien, der weiße Pfeil deutet auf ein sich teilendes Bakterium innerhalb einer Nahrungsvakuole. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Das Bakterium in Abbildung 4-36 A ist von einer Doppelmembran umgeben und etwa 1,2 µm lang. Die beiden morphologisch verschiedenen Membranen liegen vor allem posterior sehr eng aneinander. Das Zellinnere des Bakteriums weist zwei unterschiedlich elektronendichte Bereiche auf, der hellere könnte dem Nucleoid des Bakteriums entsprechen. Neben einzeln vorliegenden Bakterien im Cytoplasma wurden in diesen Proben ebenso unverdaute Futterbakterien gefunden (Abb. 4-36 B und C). Anhand der vesikelartigen Strukturen innerhalb der Vakuole lässt sich diese als in einem recht späten Verdauungsstadium befindliche definieren (Nilsson, 1987). Zusätzlich ist ein Bakterium innerhalb der Nahrungsvakuole erkennbar, das zum Zeitpunkt der Einbettung vermutlich im Stadium kurz vor der Zellteilung war. Abseits der Nahrungsvakuole ist ein einzelnes Bakterium sichtbar (Durchmesser 0,6 µm), das von zwei sehr eng aneinander liegenden Membranen umgeben ist und nicht mit einer Nahrungsvakuole assoziiert ist.

Während der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung eines Individuums von *Tetrahymena pyriformis*, das mit *Escherichia coli* mit an die Zelloberfläche gebundenem Spermin gefüttert wurde, konnte ein Bakterium beim Entkommen aus der Nahrungsvakuole beobachtet werden (Abb. 4-37).

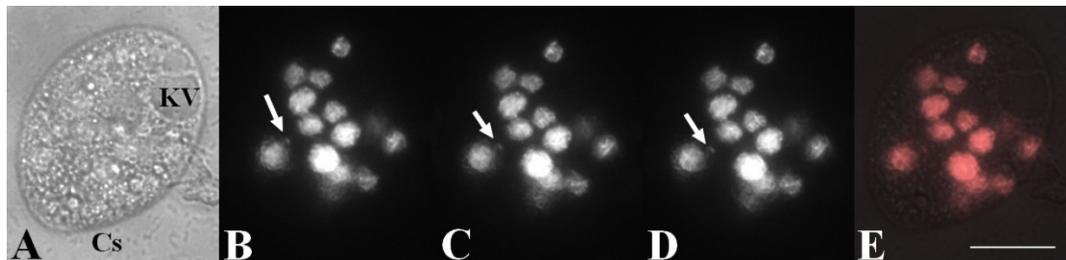


Abb. 4-37: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Spermin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B bis D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). E: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Der weiße Pfeil markiert ein aus der Nahrungsvakuole entkommendes Bakterium. Cs: Cytostom. KV: kontraktile Vakuole. Maßstab: 20 μm .

Neben intakten, unverdauten Bakterien in älteren Nahrungsvakuolen konnte ein Bakterium beobachtet werden, während es aus der Nahrungsvakuole von *Tetrahymena pyriformis* entkommt. Auch transmissionselektronenmikroskopisch konnten einzelne, im Cytoplasma persistierende Bakterien gefunden werden (Abb. 4-38).

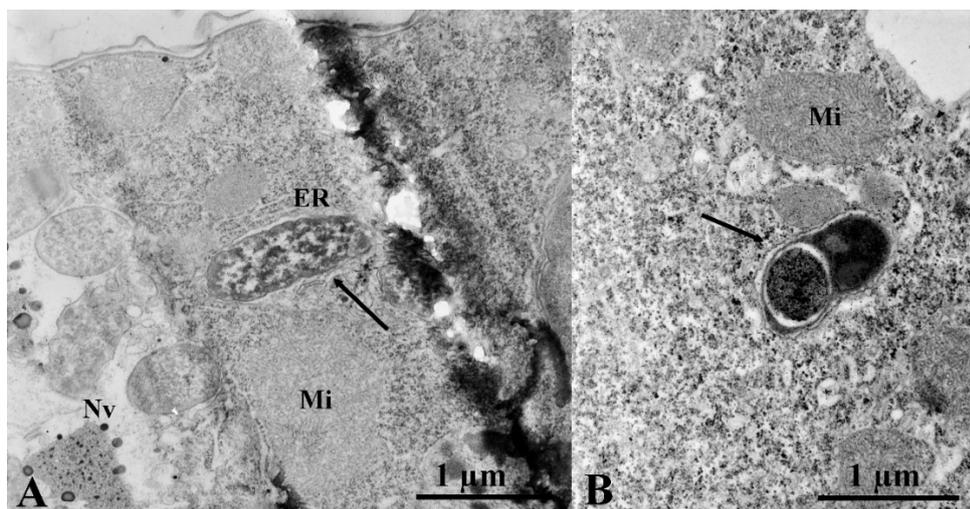


Abb. 4-38: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit gekoppeltem Spermin. Die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Bakterien liegen außerhalb von Nahrungsvakuolen. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Das in Abb. 4-38 A abgebildete Bakterium (1,1 µm Länge) ist von zwei morphologisch verschiedenen Membranen umgeben und mit Endoplasmatischem Reticulum assoziiert. Auch wenn das Innere des Bakteriums weniger elektronendichtes Material enthält, ist es vermutlich intakt, da einerseits auch externe Bakterien weniger osmiophile Bereiche zeigen (siehe Abb. 4-3), andererseits die Membran des Bakteriums vollständig ist. Zur Nahrungsvakuole links im Bild scheint es nicht zu gehören, da sich darin überwiegend vollständig lysierte Bakterien und Reste befinden. Das andere Bakterium ist mit 1,0 µm Länge etwas kürzer, zeigt aber interessanterweise einen Zelleinschluss (Abb. 4-38 B), was für *Escherichia coli* nicht ungewöhnlich ist. Auch in diesem Fall liegen beide umgebenden Membranen sehr dicht aneinander, dabei scheint die des Bakteriums etwas dicker zu sein als die von *Tetrahymena pyriformis*.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass *Escherichia coli* Zellen mit kovalent an die Zelloberfläche gebundenen Di- und Polyaminen häufiger der Verdauung entgehen und aus Nahrungsvakuolen entkommen können. Ursächlich dafür ist eventuell das Potential dieser Stoffe, als Base zu reagieren, sodass folglich das Ansäuern der Nahrungsvakuolen teilweise verhindert oder doch deutlich reduziert wird. Ob damit auch die Lysosomfusion unterdrückt wird, für die ein saurer pH innerhalb der Nahrungsvakuolen Voraussetzung ist (Nilsson, 1977), oder ob nur suboptimale Bedingungen für Verdauungsenzyme vorliegen, bleibt unklar. Um festzustellen, ob die gebundenen Di- und Polyamine tatsächlich das Ansäuern von Nahrungsvakuolen hemmen, wurde *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit dem pH-Indikatorfarbstoff Neutralrot gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 4-39).

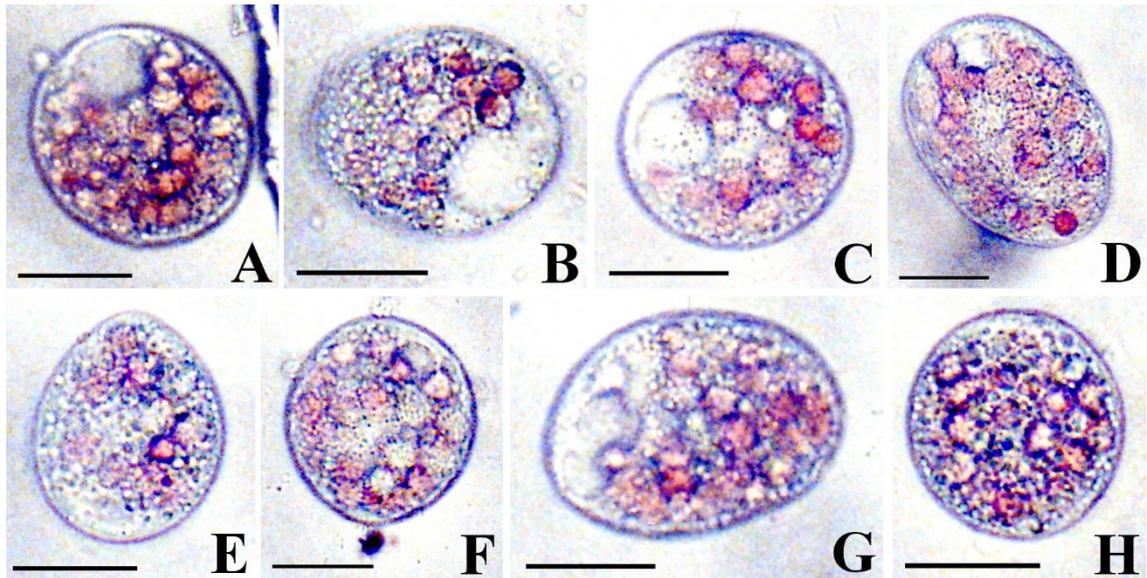


Abb. 4-39: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit unterschiedlich modifizierten Bakterien und anschließender Neutralrotfärbung. A: unbehandelte Übernachtkultur. B: Kontrolle. C: Ethylendiamin. D: Diaminopropan. E: Putrescin. F: Cadaverin. G: Spermidin. H: Spermin. Neutralrot wird im sauren Milieu dunkelrot; je dunkler der Farbton, desto saurer ist also der pH-Wert. In den Kontrollen zeigt sich dieser Farbumschlag, während bei den mit Di- und Polyaminen gekoppelten Bakterien gefütterten Ciliaten die Nahrungsvakuolen hellrot bis blassrosafarben sind. Dies indiziert die Hemmung der vollständigen Ansäuerung des Nahrungsvakuoleninhalts. Maßstab: 20 µm (aus Siegmund *et al.*, eingereicht beim Journal of Eukaryotic Microbiology).

Um die Ergebnisse der Neutralrotfärbung vergleichen zu können, wurden neben den modifizierten Bakterien auch eine unbehandelte Übernachtkultur sowie die Kontrolle an *Tetrahymena pyriformis* verfüttert. In beiden Fällen zeigt sich der Farbumschlag nach dunkelrot (Abb. 4-39 A und B), ein Indiz dafür, dass der maximal saure pH von 3,5 bis 4,0 erreicht wird. Nahrungsvakuolen mit Bakterien mit Ethylendiamin an der Zelloberfläche zeigen bereits einen weniger starken Farbumschlag nach Dunkelrot, verglichen mit beiden Kontrollen (Abb. 4-39 C), sind jedoch dunkler als die übrigen modifizierten Bakterien. Mit steigender Kettenlänge der Diamine werden auch die mit ihnen gefüllten Nahrungsvakuolen immer heller (Abb. 4-39 D bis F). Ebenso sind die Nahrungsvakuolen bei den mit den polyaminmodifizierten Bakterien gefütterten Individuen von *Tetrahymena pyriformis* blassrosa. Die Neutralrotfärbung zeigt also, dass an die Bakterienoberfläche kovalent gebundene Di- und Polyamine tatsächlich dazu führen, dass die Nahrungsvakuolen nicht mehr vollständig angesäuert werden können. Dadurch ist folglich die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* beeinträchtigt,

Escherichia coli wird nicht mehr vollständig verdaut und hat so die Möglichkeit, häufiger aus Nahrungsvakuolen zu entkommen.

Interessante Effekte traten auf, wenn *Tetrahymena pyriformis* mit *Escherichia coli* gefüttert wurde, an deren Oberfläche Monoamine mit steigender Kohlenstoff-Kettenlänge gekoppelt wurden. Die Aminogruppe wird zur Bildung der kovalenten Peptidbindung genutzt, sodass nur der unpolare Rest des Moleküls übrig bleibt. Folglich wird mit steigender Kettenlänge die Zelloberfläche zunehmend hydrophober. Die kürzeste Kettenlänge der getesteten Substanzen hat Ethanolamin, das zusätzlich noch eine alkoholische Gruppe besitzt (Abb. 4-40).

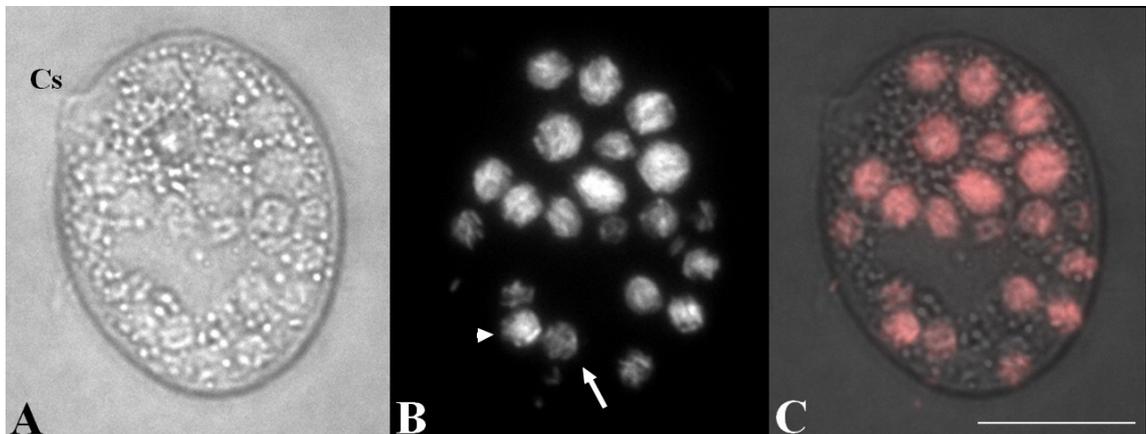


Abb. 4-40: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Ethanolamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Im Regelfall werden die Bakterien normal verdaut, wie die verringerte Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigt (weißer Pfeil), es finden sich aber auch noch intakte Bakterien (Pfeilkopf). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit Ethanolamin-gekoppelten *Escherichia coli* Zellen geht hervor, dass die Bakterien im Normalfall komplett verdaut werden. Dennoch finden sich auch intakte Bakterien in Nahrungsvakuolen in späteren Verdauungsstadien, was vielleicht durch die zusätzliche Alkoholgruppe zu begründen ist. Propylamin ist um eine Methylgruppe länger als Ethanolamin und trägt nur eine Aminogruppe als funktionelle Gruppe (Abb. 4-41).

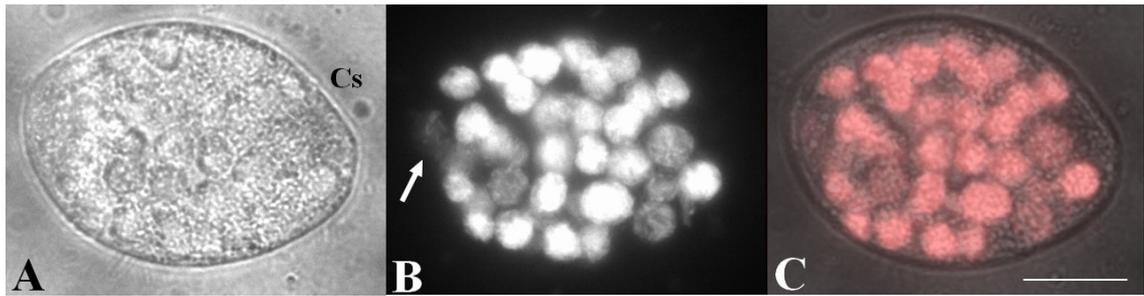


Abb. 4-41: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Propylamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Im Regelfall werden die Bakterien normal verdaut, wie die schwächere Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigt (weißer Pfeil). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Bakterien, die mit Propylamin behandelt wurden, wurden im Regelfall von *Tetrahymena pyriformis* verdaut, wie sowohl kleinere Nahrungsvakuolendurchmesser und verminderte Fluoreszenz anzeigen. Dies ist nicht unerwartet, da die Hydrophobie der Oberfläche mit diesem Molekül aufgrund der recht kurzen Kohlenstoffkette noch nicht deutlich erhöht ist. Butylamin, das nach der Kopplung eine unpolare, viergliedrige Kohlenstoffkette an der Bakterienoberfläche hinterlässt, erhöht die Hydrophobie der Zelloberfläche schon eher (Abb. 4-42).

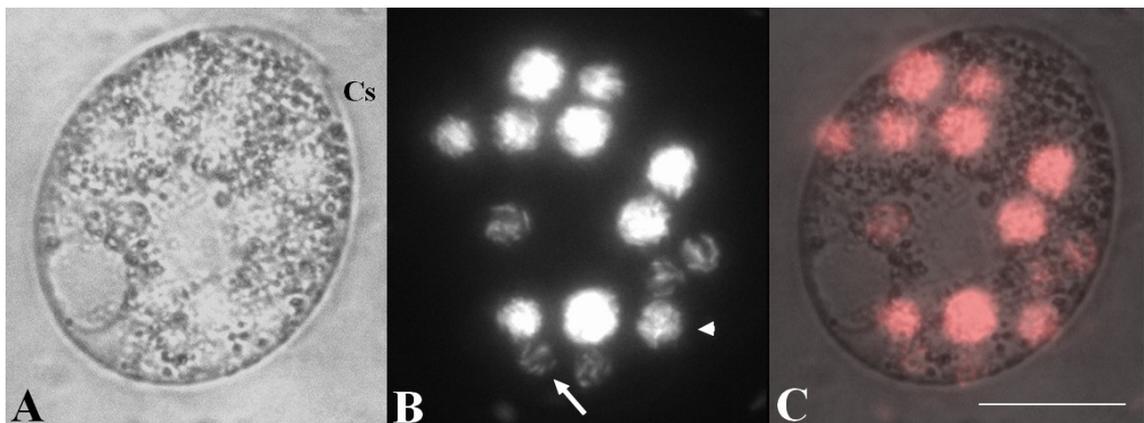


Abb. 4-42: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Butylamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Einige Bakterien werden normal verdaut, wie die schwächere Fluoreszenzintensität in älteren Nahrungsvakuolen zeigt (weißer Pfeil), dennoch finden sich auch intakte, stark fluoreszierende Bakterien (Pfeilkopf). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Nach der kovalenten Bindung von Butylamin an die Oberfläche von *Escherichia coli* wird ersichtlich, dass die Verdauung der Bakterien durch *Tetrahymena pyriformis* bereits beeinträchtigt ist. Neben verdauten Bakterien, angezeigt durch schwächere Fluoreszenz, finden sich in Nahrungsvakuolen in späten Verdauungsstadien zusätzlich Bakterien, die noch immer intakt sind und stark fluoreszieren. Dieser Effekt wird noch stärker, wenn Pentylamin an die Bakterienoberfläche gekoppelt ist (Abb. 4-43).

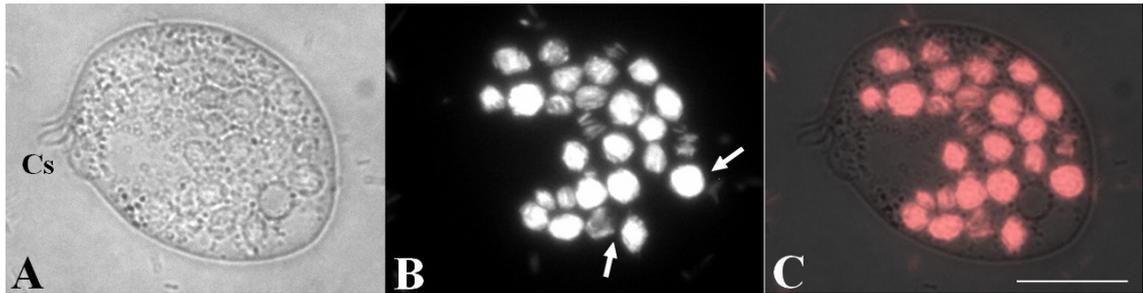


Abb. 4-43: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Pentylamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Nahrungsvakuolen in späten Verdauungsstadien zeigen nicht nur starke Fluoreszenz, sondern enthalten auch intakte Bakterien (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Die Nahrungsvakuolen in späten Verdauungsstadien zeigen nach der Fütterung von *Escherichia coli* mit an die Oberfläche gebundenem Pentylamin teilweise eine sehr starke Fluoreszenz, ein Indikator für beeinträchtigte und unvollständige Verdauung von *Tetrahymena pyriformis*. Zudem finden sich auch noch intakte, anhand ihrer Form erkennbare Bakterien. Noch deutlicher wird dieser Hydrophobie-Effekt nach der Kopplung von Hexylamin, das sich bereits stark an der Grenze zur Löslichkeit in Wasser befindet (Abb. 4-44).

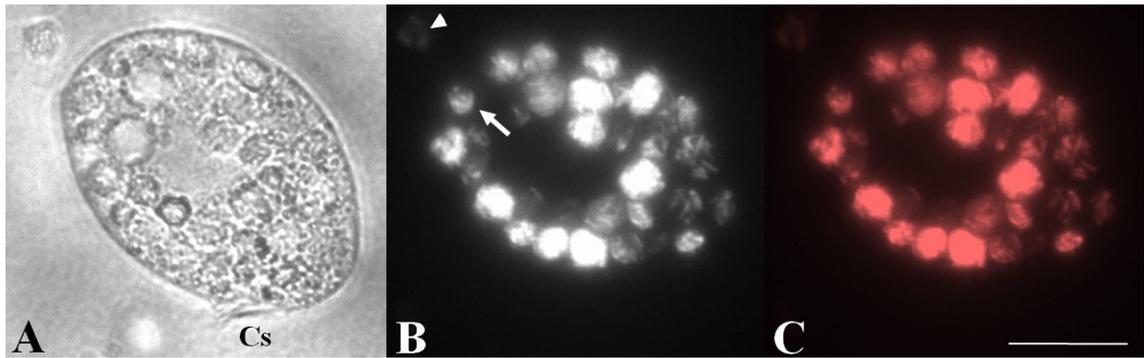


Abb. 4-44: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Hexylamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Kolorierte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme konnten aufgrund der Motilität des Individuums nicht übereinander gelegt werden. In älteren Nahrungsvakuolen finden sich intakte, fluoreszierende Bakterien (weißer Pfeil). Zudem hat das Individuum ein Fäkalpellet ausgeschieden, in dem sich fluoreszierende Bakterien finden, die die Verdauung vermutlich überlebt haben. Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Wegen der kovalenten Bindung von Hexylamin an *Escherichia coli* wird die Zelloberfläche stark hydrophob. Dies resultiert in unvollständiger Verdauung. Neben intakten Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen in einem späten Verdauungsstadium fanden sich auch fluoreszierende Bakterien in einem von *Tetrahymena pyriformis* ausgeschiedenen Fäkalpellet. Möglicherweise aggregieren die Bakterien aufgrund der Hydrophobie oder legen sich näher an die Nahrungsvakuolenmembran und sind so besser vor den hydrolytischen Bedingungen innerhalb der Vakuolen geschützt. Eine enge Assoziation mit den Nahrungsvakuolenmembranen könnte zudem das Entkommen aus Nahrungsvakuolen bewirken. Transmissionselektronenmikroskopisch konnten einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien gefunden werden (Abb. 4-45).

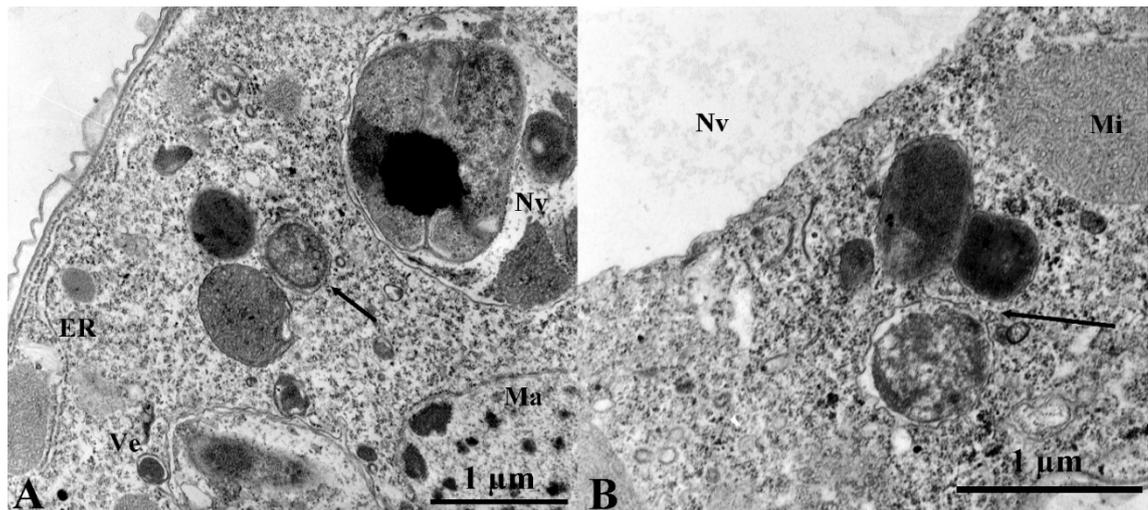


Abb. 4-45: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Hexylamin. Die mit Pfeilen markierten Bakterien liegen einzeln im Cytoplasma. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen. Ve: Vesikel.

Das markierte Bakterium in Abbildung 4-45 A hat einen Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ und ist von zwei zum Teil dicht beieinander liegenden und morphologisch verschiedenen Membranen umgeben. Im Zwischenraum findet sich elektronendichtes Material. Zudem zeigt die Nahrungsvakuole oben im Bild drei vermutlich intakte, eng aneinander liegende Bakterien. Die Nahrungsvakuole befindet sich in einem mittleren Verdauungsstadium, gut zu erkennen am *Halo*, der die Bakterien umgibt (Nilsson, 1987) Normalerweise sind in diesem Stadium die meisten Bakterien, die randständig in Nahrungsvakuolen liegen, lysiert und eher mittig liegende sind intakt. In Abbildung 4-45 B sind gleich drei von zwei Membranen umgebene Strukturen in Bakteriengröße ($0,8 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$ und $0,7 \mu\text{m}$ von oben nach unten) zu sehen. Auch in diesen Fällen unterscheiden sich die innere, etwas dickere Bakterienmembran und die äußere von *Tetrahymena pyriformis*, die zudem etwas anders aussieht als die Nahrungsvakuolenmembran. Die zwei Membranen der oberen Bakterien liegen sehr eng aneinander, während beim unteren ein etwas größerer Abstand dazwischen liegt. Alle drei Bakterien wirken intakt und zeigen neben ihrer sie vollständig umgebenden Membran osmiophiles Material im Zellinneren.

Das hydrophobste Monoamin in dieser Testreihe ist Octylamin. Nach der Kopplung mit dieser Substanz finden sich ebenfalls unverdaute sowie einzeln im Cytoplasma liegende Bakterien (Abb. 4-46).

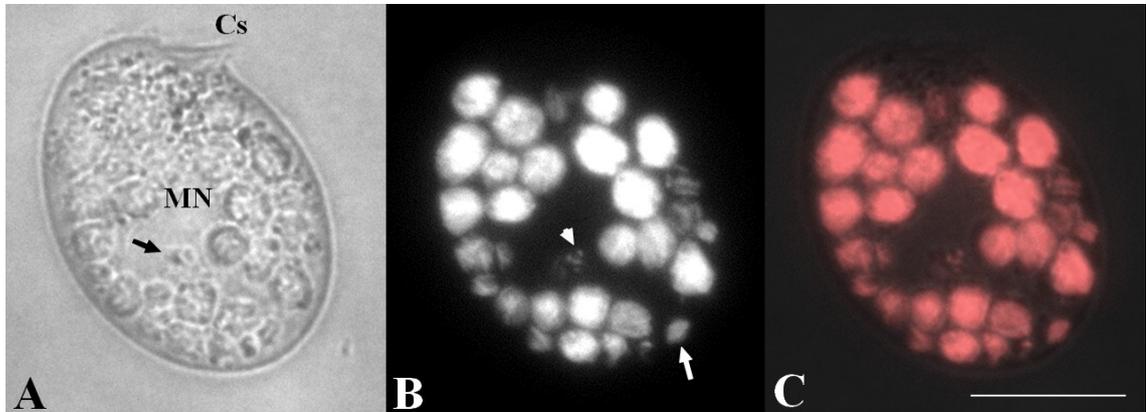


Abb. 4-46: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Octylamin. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Nahrungsvakuolen in späten Verdauungsstadien zeigen fluoreszierende, intakte Bakterien (weißer Pfeil). Zudem befinden sich im Bereich des Macronucleus einzelne, fluoreszierende Bakterien, die nicht mit einer Nahrungsvakuole assoziiert (Pfeilkopf) und auch im lichtmikroskopischen Bild erkennbar sind (schwarzer Pfeil). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 μm .

Auch die Fütterung von *Escherichia coli* mit oberflächlich gebundenem Octylamin beeinträchtigt die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis*. Es finden sich nicht nur unverdaute Bakterien in Nahrungsvakuolen, sondern auch einzeln im Cytoplasma liegende Bakterien. Diese Beobachtung wurde transmissionselektronenmikroskopisch bestätigt (Abb. 4-47).

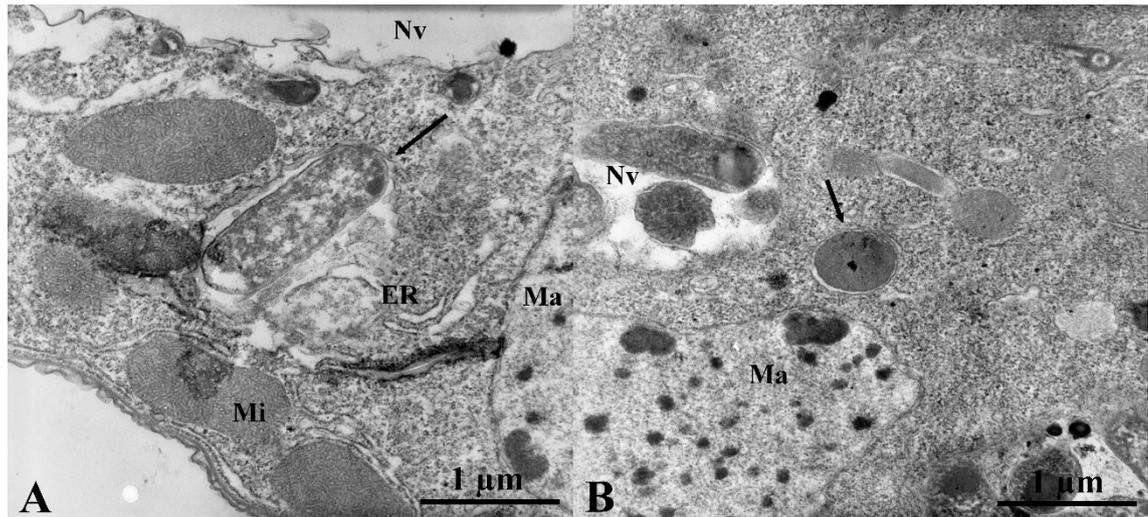


Abb. 4-47: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit octylaminbehandelten Zellen von *Escherichia coli*. Die schwarzen Pfeile markieren einzelne Bakterien. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Nach der Fütterung mit octylaminbehandelten *Escherichia coli* Zellen finden sich einzelne, vermutlich im Cytoplasma liegende Bakterien. Das Bakterium in Abbildung 4-47 A liegt wahrscheinlich innerhalb einer Nahrungsvakuole, scheint aber noch nicht verdaut zu sein. Auffällig ist der teilweise enge Kontakt zwischen Bakterien- und Vakuolenmembran. Das Endoplasmatische Reticulum ist im unteren Bereich direkt mit der Nahrungsvakuole verbunden. Das andere markierte Bakterium (Abb. 4-47 B) liegt hingegen einzeln im Cytoplasma. Es ist von zwei dicht aneinander liegenden Membranen umgeben, die sich ultrastrukturell voneinander unterscheiden. Auch in diesem Fall handelt es sich bei der inneren Membran um die des Bakteriums, während die äußere von *Tetrahymena pyriformis* stammt. Das Bakterium hat einen Durchmesser von 0,6 µm. Im Gegensatz zu den Bakterien in der nahe befindlichen Nahrungsvakuole ist es intakt und weist osmiophiles Material im Zellinneren auf, ähnlich wie bei extern gefundenen Bakterien.

Die steigende Hydrophobie der Bakterienoberfläche bewirkt eine zunehmend unvollständige Verdauung von *Escherichia coli* sowie eine erhöhte Häufigkeit des Entkommens aus Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis*.

Ähnliche Effekte lassen sich beobachten, wenn das amphiphile Oligopeptid Endo-Porter in verschiedenen Konzentrationen an die Zelloberfläche von *Escherichia coli* gebunden wird. Es wurde ursprünglich dazu konstruiert, den Transmembrantransport verschiedener Substanzen durch Endocytose zu vermitteln (Summerton, 2005). Die höchste, eingesetzte Konzentration an Endo-Porter betrug 10 μM und führte zu einer drastischen Reduktion an ingestierten Bakterien, aber andererseits auch zu stark gesteigerter Häufigkeit des Entkommens aus Nahrungsvakuolen (Abb. 4-48).

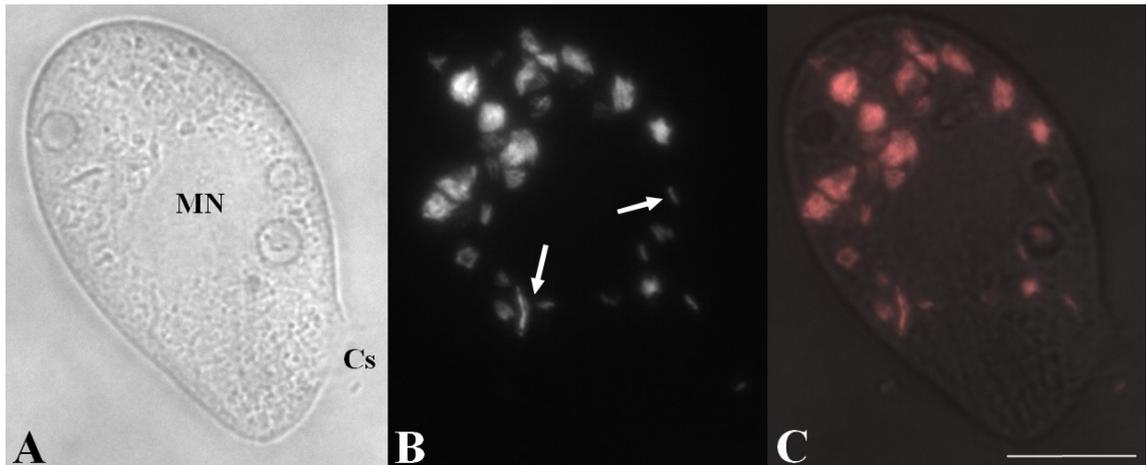


Abb. 4-48: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit 10 μM Endo-Porter. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Quantität ingestierter Bakterien ist im Vergleich zu anderen modifizierten Proben reduziert. Es finden sich allerdings vermehrt einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μm .

Bakterien, die mit der höchsten Konzentration von Endo-Porter behandelt wurden, werden von *Tetrahymena pyriformis* weniger stark ingestiert. Dennoch finden sich recht häufig aus Nahrungsvakuolen entkommene, einzelne Bakterien im Cytoplasma. Auch transmissionselektronenmikroskopisch bestätigten sich diese Beobachtungen (Abb. 4-49). Die Probe mit 10 μM Endo-Porter war die einzige, bei der externe, nicht ingestierte Bakterien gefunden wurden (siehe Abb. 4-3).

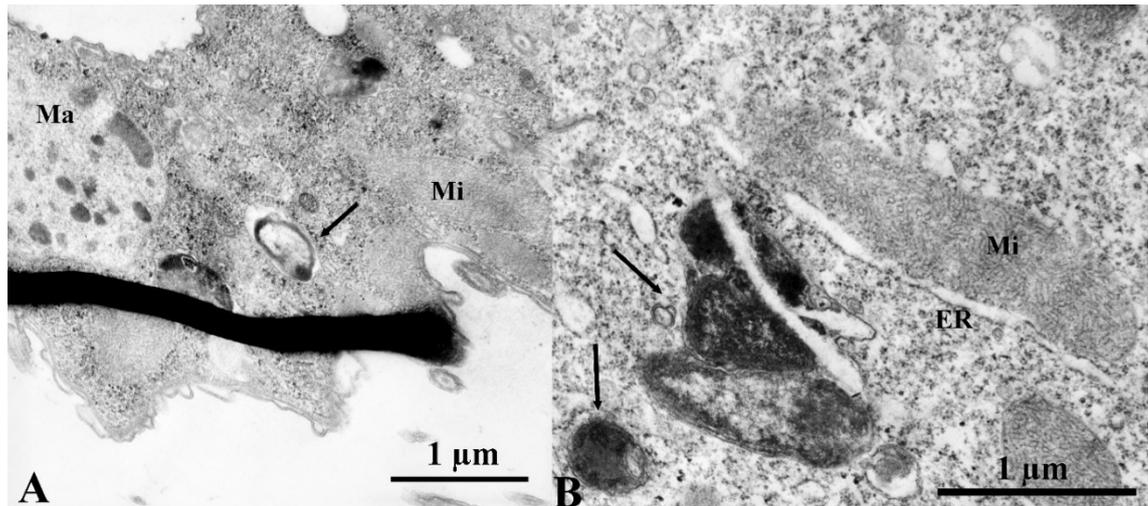


Abb. 4-49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* Bakterien, behandelt mit 10 µM Endo-Porter. Die schwarzen Pfeile markieren auffällige Bakterien. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium.

Das Bakterium in Abb. 4-49 A ist etwa 0,6 µm lang und von zwei verschiedenen Membranen umgeben. Allerdings ist der Abstand zwischen beiden teilweise recht groß. Das Innere des Bakteriums enthält nur wenig elektronendichtes Material. Neben dem einzeln im Cytoplasma vorliegenden, von zwei Membranen umgebenen Bakterium (Durchmesser 0,5 µm) findet sich auch ein Cluster aus drei Bakterien, das nicht so aussieht als läge es innerhalb einer Nahrungsvakuole (Abb. 4-49 B). Die Membran sieht nicht nach einer typischen Nahrungsvakuolenmembran aus und liegt sehr dicht an den Bakterien. Es gibt keine umgebende Matrix, wie es typisch für Nahrungsvakuolen ist. Die Bakterien sind intakt und enthalten ähnlich wie externe Bakterien osmiophiles Material.

Senkt man die Konzentration an Endo-Porter auf 5 µM, werden mehr Bakterien ingestiert, doch es treten noch immer vergleichbare Effekte auf die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* auf (Abb. 4-50).

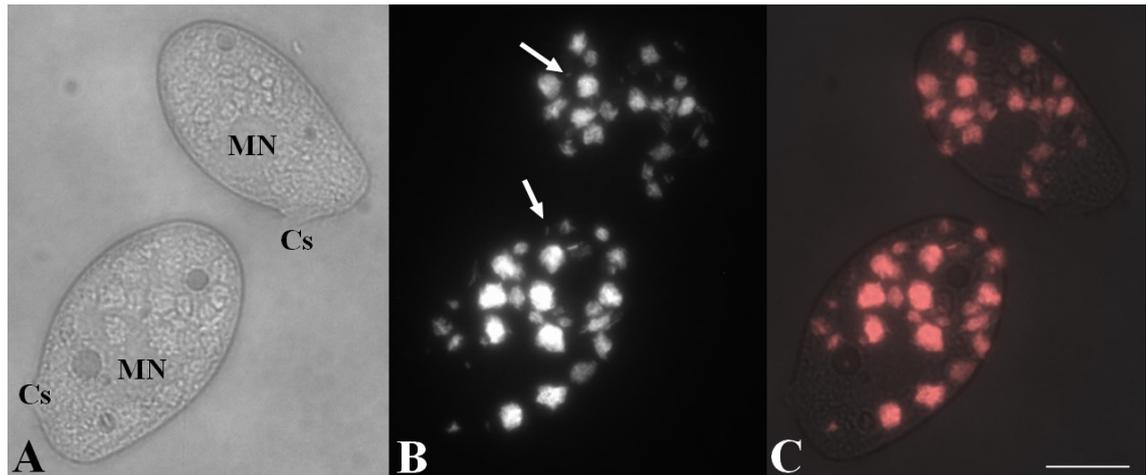


Abb. 4-50: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach Kopplung mit 5 μM Endo-Porter. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Bakterien werden im Vergleich zur höheren Konzentration in größerer Anzahl ingestiert. Es finden sich einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μm .

Die Reduktion der Konzentration an eingesetztem Endo-Porter bewirkt eine gesteigerte Ingestion von *Escherichia coli*. Dennoch bleiben die Effekte auf die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* erhalten, da sich neben unvollständig verdauten Bakterien in älteren Nahrungsvakuolen zudem auch einzeln im Cytoplasma liegende Bakterien finden.

Man kann die Konzentration an Endo-Porter noch weiter auf 1 μM absenken, ohne dass der Einfluss auf die Verdauung und das Entkommen aus Nahrungsvakuolen verloren geht (Abb. 4-51).

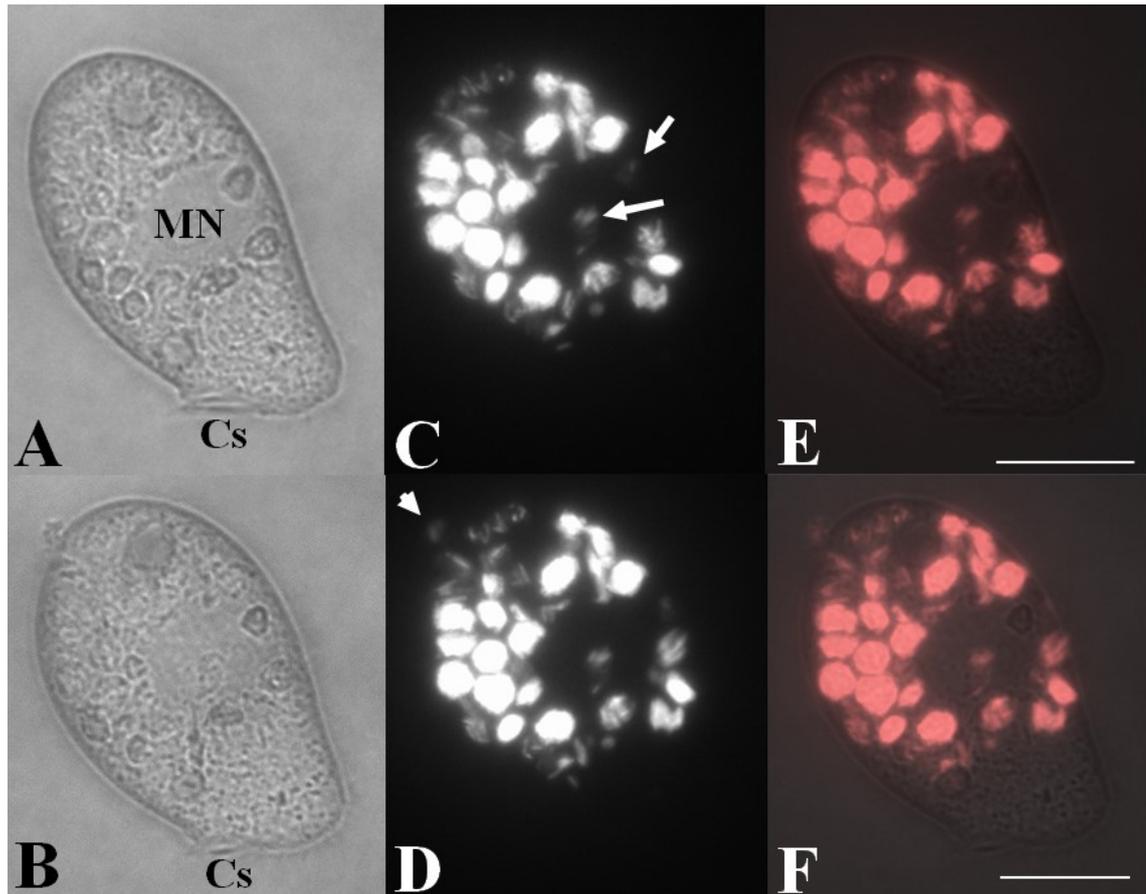


Abb. 4-51: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach Kopplung mit 1 μ M Endo-Porter. A und B: Lichtmikroskopische Aufnahmen. C und D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Emission DsRed). E und F: Kolorierte Mischbilder aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Die Bakterien werden im Vergleich zur höheren Konzentration in größerer Anzahl ingestiert. Es finden sich einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien (weiße Pfeile), zudem wurde das Individuum dabei beobachtet, wie es ein Fäkalpellet mit intakten Bakterien egestierte (Pfeilkopf). Cs: Cytostom. MN: Macronucleus. Maßstab: 20 μ m.

Trotz der sehr geringen eingesetzten Konzentration an Endo-Porter wurde die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* so stark beeinträchtigt, dass unvollständig verdaute Bakterien ausgeschieden wurden, wie sich anhand des fluoreszierenden Fäkalpellets zeigt. Zudem sind auch hier einzelne, nicht in Nahrungsvakuolen assoziierte *Escherichia coli* Zellen sichtbar, wie auch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (Abb. 4-52).

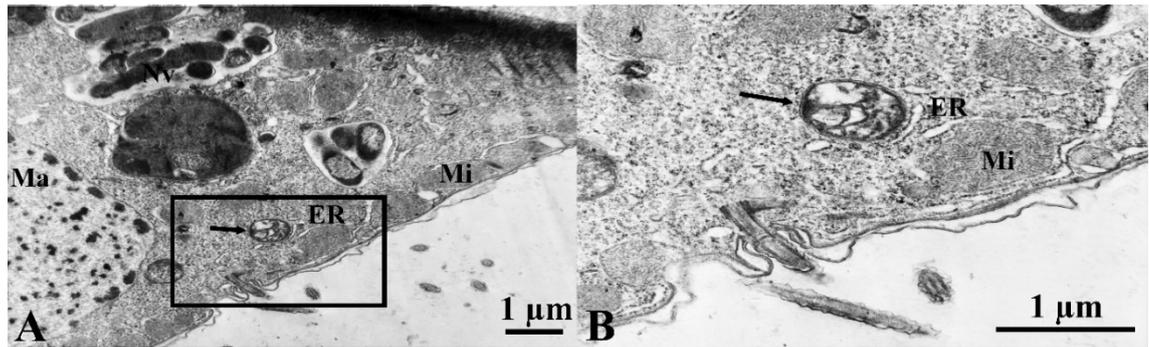


Abb. 4-52: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli*, gekoppelt mit 1 µM Endo-Porter. B zeigt den mit dem schwarzen Rechteck markierten Bereich aus A bei höherer Vergrößerung. Der schwarze Pfeil markiert ein einzelnes, im Cytoplasma liegendes Bakterium. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Ma: Macronucleus. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Das einzelne Bakterium ist etwa 0,8 µm lang und von zwei ultrastrukturell verschiedenen, sehr dicht beieinander liegenden Membranen umschlossen. Zudem ist es mit Endoplasmatischem Reticulum assoziiert. Das Zellinnere des Bakteriums enthält unterschiedlich elektronendichtes Material.

Endo-Porter funktioniert auch ohne kovalente Bindung an die Oberfläche von *Escherichia coli*. Auch in diesen Proben konnten einzelne Bakterien außerhalb von Nahrungsvakuolen und nicht verdaute Bakterien in Nahrungsvakuolen gefunden werden (Abb. 4-53).

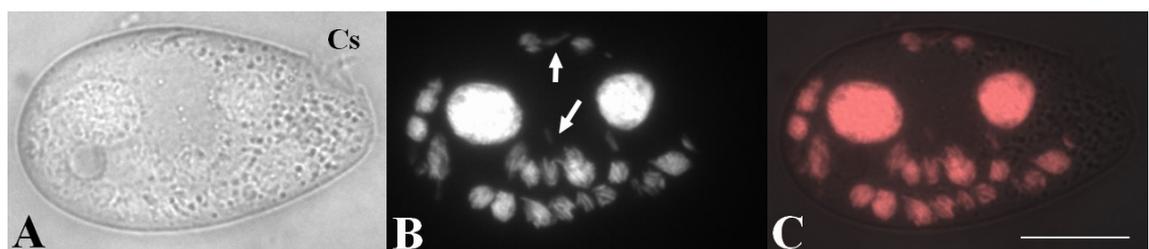


Abb. 4-53: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach Behandlung mit 5 µM Endo-Porter ohne Zugabe von EDAC. A: Lichtmikroskopische Aufnahme. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Emission DsRed). C: Koloriertes Mischbild aus licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme. Es finden sich einzelne, im Cytoplasma liegende Bakterien (weiße Pfeile). Cs: Cytostom. Maßstab: 20 µm.

Endo-Porter integriert sich vermutlich auch ohne Zugabe des Kopplungsreagenz EDAC in die bakterielle Membran, da auch hier die bisher beobachteten Effekte, wie

unvollständige Verdauung von *Escherichia coli* und einzeln im Cytoplasma von *Tetrahymena pyriformis* liegende Bakterien, ersichtlich wurden. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen dies (Abb. 4-54).

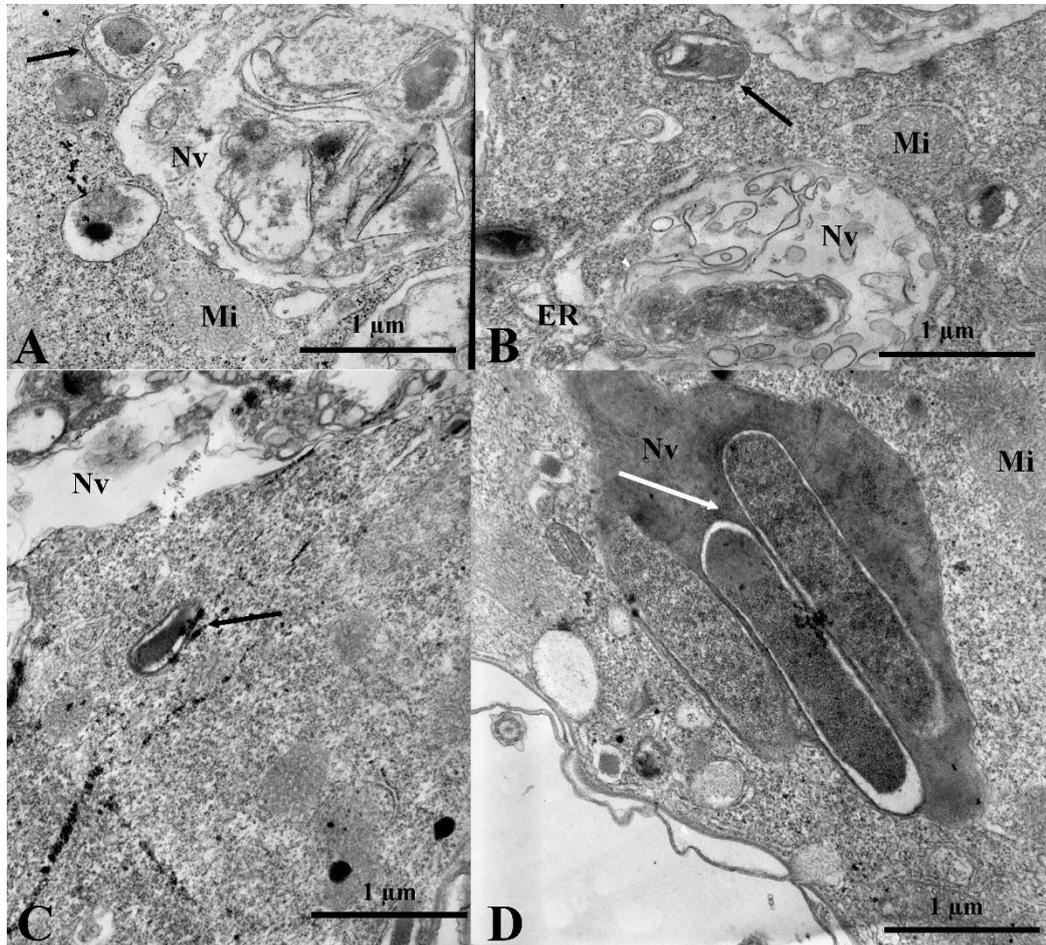


Abb. 4-54: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* Bakterien, behandelt mit 5 µM Endo-Porter ohne EDAC. Die schwarzen Pfeile markieren einzelne Bakterien, die vermutlich außerhalb von Nahrungsvakuolen liegen. Der weiße Pfeil deutet auf intakte, unverdaute Bakterien innerhalb einer Nahrungsvakuole. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Mi: Mitochondrium. Nv: Nahrungsvakuolen.

Die markierte Struktur in Abbildung 4-54 A ist von zwei morphologisch ähnlichen Membranen umgeben und hat einen Durchmesser von etwa 0,5 µm. Auch wenn das Zellinnere zum Teil nur wenig elektronendichtes Material enthält, handelt es sich vermutlich um ein Bakterium. Mit der benachbarten Nahrungsvakuole ist es nicht assoziiert, da diese ausschließlich Verdauungsreste und keine intakten Bakterien mehr enthält. Das Bakterium in Abbildung 4-54 B ist etwa 0,6 µm lang und von zwei sehr

eng aneinander liegenden, ultrastrukturell verschiedenen Membranen umgeben und enthält osmiophiles Material. Ähnliches gilt für das dritte markierte Bakterium (Abb. 4-54 C), das ebenfalls etwa 0,6 µm lang ist. Die letzte Aufnahme in der Aufstellung (Abb. 4-54 D) zeigt intakte Bakterien innerhalb einer Nahrungsvakuole. Dies bestätigt zusätzlich die Beobachtungen mit der Fluoreszenzmikroskopie, die zeigen, dass *Escherichia coli* nicht immer vollständig verdaut wurde.

Die beobachteten Effekte verschiedener Oberflächenmodifikationen von *Escherichia coli* auf die Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* wurden zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert, indem zufällig ausgewählte Individuen dokumentiert und später im Hinblick auf Bakterien enthaltende Vakuolen, unvollständig verdaute sowie aus den Nahrungsvakuolen entkommene Bakterien untersucht wurden.

Der Einfluss unterschiedlicher gebundener Substanzen auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli* auf die Ingestion von *Tetrahymena pyriformis* ist weniger ausgeprägt als bei Mikropartikeln (Abb. 4-55).

4 Ergebnisse und Auswertung

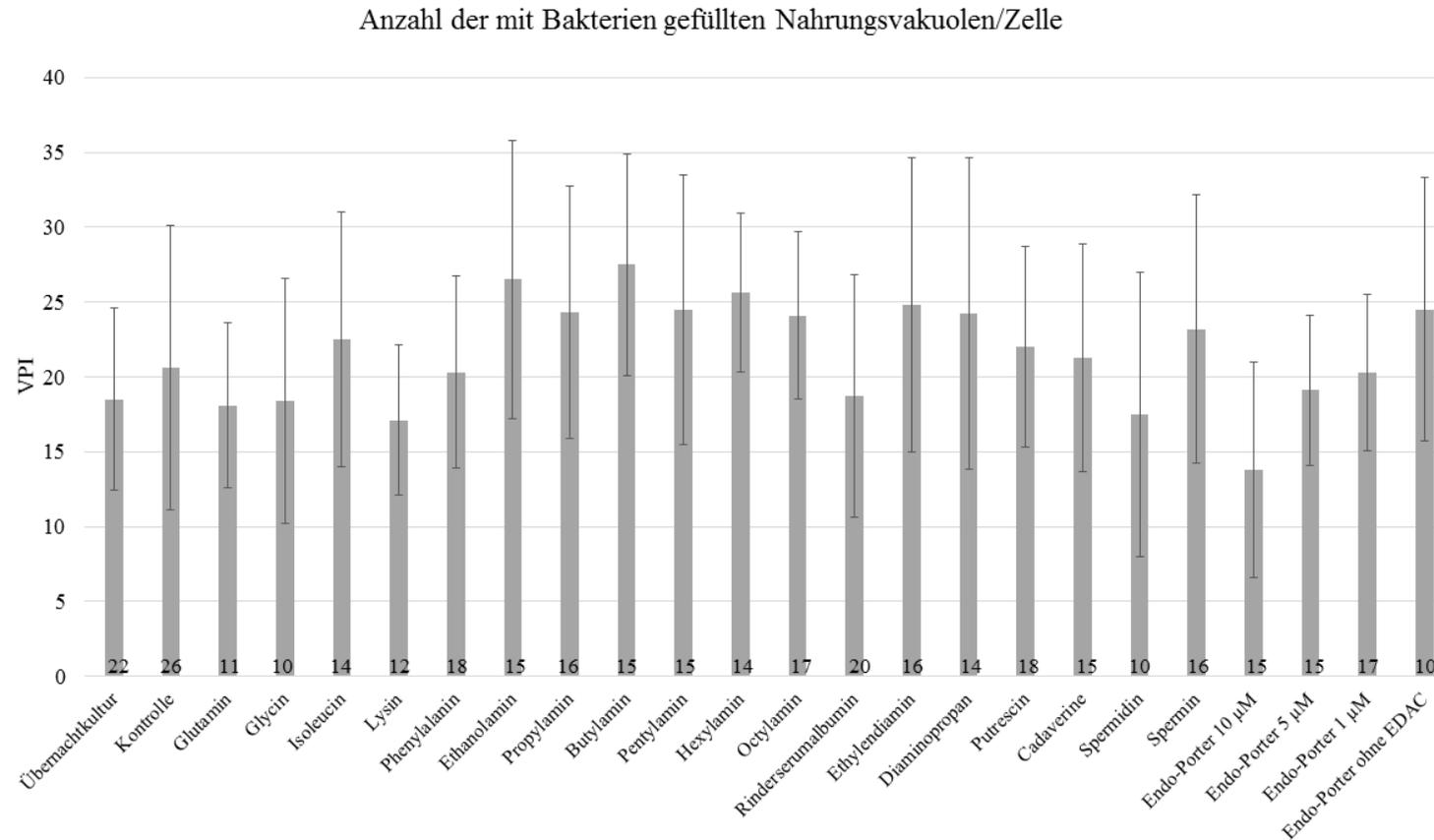


Abb. 4-55: Balkendiagramm der mit Bakterien gefüllten Nahrungsvakuolen pro Zelle (VPI) in Abhängigkeit der verfütterten Bakterien. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Zahlen am unteren Ende der Balken entsprechen der jeweiligen Stichprobengröße. Die Unterschiede der Ingestionsrate sind weniger stark im Vergleich zu den Werten mit Mikropartikeln.

Als Vergleichswert für normale Ingestionsraten wurden eine frische, unbehandelte Übernachtkultur von *Escherichia coli* sowie die Kontrolle ohne Ligandenbindung an *Tetrahymena pyriformis* verfüttert. *Tetrahymena pyriformis* enthielt durchschnittlich 18,5 bzw. 20,6 VPI nach der Fütterung mit diesen Bakterien. Insgesamt finden sich mehr Nahrungsvakuolen verglichen mit der Fütterung von synthetischen Mikropartikeln, was wahrscheinlich in deren Größe zu begründen ist. Außerdem sind auch die Unterschiede zwischen verschiedenen, an die Bakterienoberfläche gebundenen Substanzen weniger stark ausgeprägt als bei den Mikropartikeln. Vermutlich werden viele Bakterien auch passiv eingestrudelt, weil sie deutlich kleiner als die angebotenen Mikropartikel sind. Mit Ausnahme von Phenylalanin (20,3 VPI) und Isoleucin (22,5 VPI) wurden mit Aminosäuren gekoppelte Bakterien geringfügig schlechter aufgenommen, der Wert liegt zwischen 17,1 und 18 VPI. Dies entspricht auch der Beobachtung mit Mikropartikeln, wenngleich die Unterschiede weniger deutlich sind. Bakterien, die mit Rinderserumalbumin dekoriert waren, wurden nicht mit höheren Raten aufgenommen, sondern bewegen sich im Rahmen der normalen Aufnahmerate. *Tetrahymena pyriformis* enthielt hier im Mittel 18,7 VPI. Mikropartikel mit zusätzlichem Rinderserumalbumin wurden hingegen bevorzugt aufgenommen, wenn man die Werte mit unbehandelten Mikropartikeln vergleicht. An die Bakterienoberfläche gebundene Monoamine führen zu einer gesteigerten Ingestionsrate von *Tetrahymena pyriformis*. Im Mittel enthielt eine Zelle 24,1 bis 27,5 Vakuolen. Di- und Polyamine bewirken ebenfalls eine leichte Erhöhung der Aufnahmerate, die Zahl an VPI lag zwischen 21,3 bis 24,8. Ein interessanter Effekt war nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Endo-Porter zu beobachten. In Abhängigkeit der genutzten Konzentration änderte sich das Ingestionsverhalten von *Tetrahymena pyriformis* verglichen mit den anderen Substanzen doch erheblich. Bei der höchsten Konzentration wurden am wenigsten Bakterien aufgenommen. Durchschnittlich enthielt *Tetrahymena pyriformis* nur 13,8 VPI, wenn die Bakterien mit 10 μ M Endo-Porter behandelt wurden. Oft fanden sich auch nur einzelne Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen (siehe Abb. 4-48). Mit sinkender Konzentration an Endo-Porter stieg die Aufnahmerate stetig an, von 19,1 VPI (5 μ M) über 20,3 VPI (1 μ M) auf 24,5 VPI, wenn 5 μ M Endo-Porter ohne den Einsatz von EDAC an *Escherichia coli* gebunden wurde. Im Folgenden sind die Effekte auf die Verdauung dargestellt (Abb. 4-56 und 4-57).

4 Ergebnisse und Auswertung

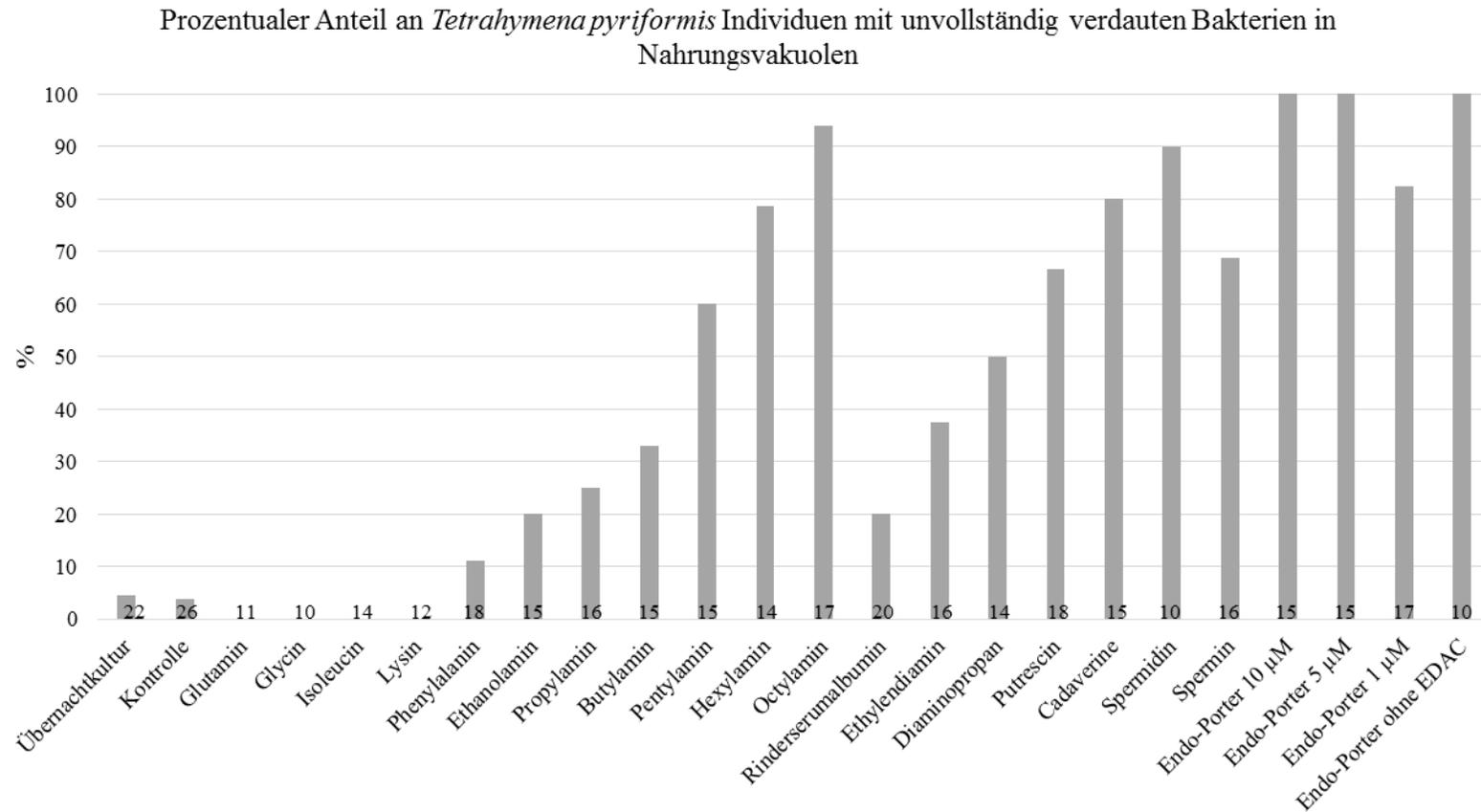


Abb. 4-56: Balkendiagramm des prozentualen Anteils an Individuen von *Tetrahymena pyriformis* mit unvollständig verdauten Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen in Abhängigkeit der gebundenen Substanz. Zum Vergleich wurden unbehandelte bzw. ungekoppelte Bakterien verfüttert. Sowohl basische Substanzen als auch ansteigende Hydrophobie erhöhen die Resistenz gegenüber der Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* (modifiziert aus Siegmund *et al.*, eingereicht beim Journal of Eukaryotic Microbiology).

4 Ergebnisse und Auswertung

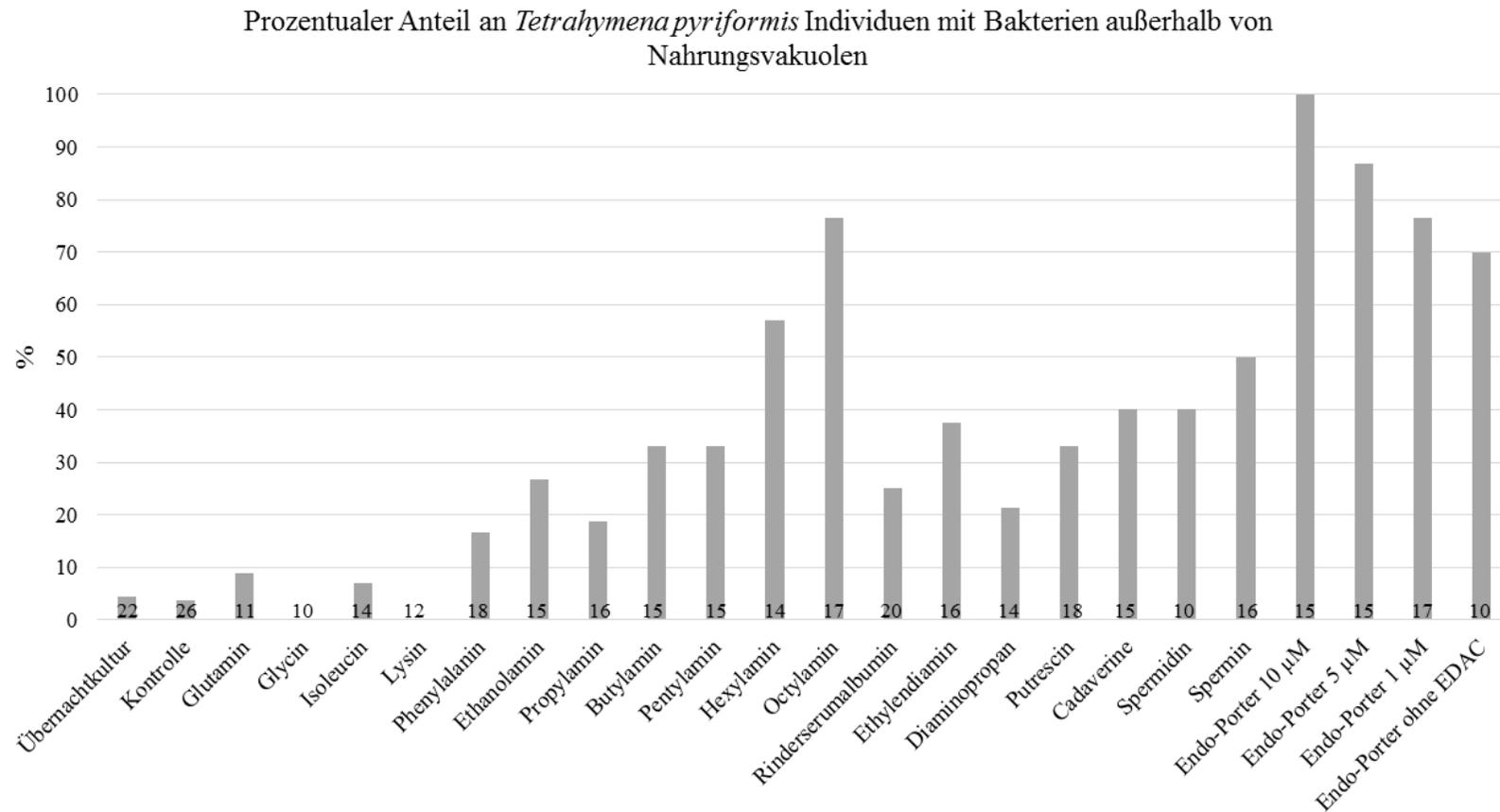


Abb. 4-57: Balkendiagramm des prozentualen Anteils an Individuen von *Tetrahymena pyriformis* mit entkommenen Bakterien außerhalb von Nahrungsvakuolen in Abhängigkeit der gebundenen Substanz. Zum Vergleich wurden unbehandelte bzw. ungekoppelte Bakterien verfüttert. Sowohl basische Substanzen als auch steigende Hydrophobie erhöhen die Chance der Bakterien, aus den Phagosomen von *Tetrahymena pyriformis* zu entkommen (modifiziert aus Siegmund *et al.*, eingereicht beim Journal of Eukaryotic Microbiology).

Die Zahlen mit der unbehandelten Übernachtskultur und der Kontrolle aus *Escherichia coli* ohne Ligandenbindung zeigt, dass es eine natürliche Chance von 3,8 bis 4,5 % gibt, der Verdauung durch *Tetrahymena pyriformis* zu entgehen. In 4 bis 5 % der Fälle konnten diese Bakterien aus den Nahrungsvakuolen entkommen, was auch die eingänglichen Beobachtungen zu Beginn der Arbeit bestätigt. Mit der Ausnahme von Phenylalanin konnte *Tetrahymena pyriformis* Bakterien mit gebundenen Aminosäuren vollständig verdauen. Phenylalanin ist aromatisch, unpolar und folglich hydrophob. Etwa 11 % der gezählten Individuen konnten Bakterien mit dieser Substanz nicht komplett verdauen, zudem wurden in 17 % der betrachteten Fälle Bakterien außerhalb von Nahrungsvakuolen gefunden. Der prozentuale Anteil an *Tetrahymena pyriformis* mit entkommenen Bakterien, die mit Glutamin oder Isoleucin behandelt wurden, liegt in etwa im Rahmen der natürlich auftretenden Entkommensrate (7 bis 9 %). Ein Fünftel der betrachteten Individuen konnte Bakterien, die mit dem leicht hydrophoben Protein Rinderserumalbumin gekoppelt waren, nicht vollständig verdauen. In einem Viertel der Fälle konnten diese Bakterien aus den Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* entkommen.

Ein starker Zusammenhang von Oberflächenhydrophobie und unvollständiger Verdauung und Entkommen aus Nahrungsvakuolen wird anhand der Monoamine mit steigender Kettenlänge deutlich. Während Monoamine mit kürzerer Kettenlänge, Ethanolamin und Propylamin, in etwa 20 bis 25 % der Fälle zu unvollständiger Verdauung führten, steigt dieser Wert mit wachsender Kettenlänge weiter an. Mit Butylamin werden in etwa einem Drittel der beobachteten Individuen unvollständig verdaute Bakterien gefunden, mit Pentylamin sind es bereits 60 % aller observierten Ciliaten. Der Anteil steigt mit Hexyl- und Octylamin nochmals auf 79 bzw. 94 % an. Diese Werte reflektieren sich auch in der Chance der modifizierten Bakterien, die Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* zu verlassen. Mit Ethanolamin und Propylamin gekoppelte Bakterien wurden in einem Viertel bzw. einem Fünftel der Fälle außerhalb von Nahrungsvakuolen gefunden. Dieser Wert steigt bei Butyl- und Pentylamin auf etwa 33 %, bis hin zu 58 % mit Hexylamin und 77 % mit Octylamin. Die Ergebnisse mit Endo-Porter unterstreichen den Einfluss der

Oberflächenhydrophobie zusätzlich. Mit Ausnahme der niedrigsten eingesetzten Konzentration (1 μM ; 82 %) konnte kein beobachtetes Individuum die mit Endo-Porter behandelten Bakterien vollständig verdauen. Allerdings sinkt mit der eingesetzten Konzentration auch die Chance der Bakterien, aus Nahrungsvakuolen zu entkommen. So liegt sie bei der höchsten Konzentration (10 μM) noch bei erstaunlichen 100 % der betrachteten Fälle, sinkt aber über 87 % (5 μM), 77 % (1 μM) auf 70 % bei 5 μM Endo-Porter ohne kovalente Bindung ab.

Aus den Daten mit den Di- und Polyaminen zeigt sich ebenso ein Zusammenhang zwischen dem Potential, das Ansäuern der Nahrungsvakuolen zu hemmen, und dem Entgehen der Verdauung bzw. dem Entkommen aus Nahrungsvakuolen, wengleich auch die Häufigkeit des Entkommens nicht so stark gesteigert ist, wie mit hydrophoben Bakterienoberflächen. So steigt der Anteil an Individuen von *Tetrahymena pyriformis* mit unvollständig verdauten Bakterien mit steigender Kettenlänge der Diamine von 38 % (Ethylendiamin) über 50 % (Diaminopropan) auf bis zu 80 % im Fall von Cadaverin an. Der größte Anteil an Individuen mit unvollständig verdauten Bakterien fand sich in dieser Versuchsreihe beim Polyamin Spermidin (90 %), mit Spermin behandelte Bakterien konnten nur in 69 % der Fälle der Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* entgehen. Die Häufigkeit des Entkommens von *Escherichia coli* ist mit Di- und Polyaminen weniger stark erhöht, als mit langkettigen Monoaminen oder Endo-Porter. Sie rangiert zwischen etwa einem Viertel aller betrachteten Fälle (Diaminopropan) und der Hälfte (Spermin).

Zusammenfassend zeigt sich zum einen eine starke Korrelation zwischen ineffizienter Verdauung von Futterbakterien und deren Entkommen aus den Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis*. Je ineffizienter *Escherichia coli* verdaut wurde, desto häufiger entkamen die Bakterien aus den Nahrungsvakuolen. Zum andern wird ein Zusammenhang mit Oberflächeneigenschaften von Bakterien und dem Entkommen aus Nahrungsvakuolen deutlich. Vor allem hydrophobe Oberflächen erhöhen die Frequenz des Verlassens von Nahrungsvakuolen sehr deutlich.

5 Diskussion

5.1 Die Internalisierung von *Escherichia coli* in *Tetrahymena pyriformis*

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu zeigen, dass *Escherichia coli* in der Lage ist, die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* zu umgehen und außerdem aus den Nahrungsvakuolen zu entkommen, weil dies der erste logische und nötige Schritt zur Etablierung endosymbiontischer Assoziationen ist. Mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Techniken wurde deutlich, dass diese Voraussetzung für ein Modellsystem zum Studium intrazellulärer Vergesellschaftungen in der Interaktion zwischen *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* erfüllt ist. Fluoreszenzmikroskopisch wurde beobachtet, wie *Escherichia coli* ohne zusätzliche Manipulation aus der Nahrungsvakuole entkommt. Die Chance für das Verlassen der Nahrungsvakuolen lag bei 5 %, wenn unbehandelte Übernachtskulturen an *Tetrahymena pyriformis* verfüttert wurden. Was diesen Prozess ermöglicht, ist bis dato unklar. Mechanistische Studien dazu gibt es nicht. Für manche pathogenen Mikroorganismen wurde gezeigt, dass sie die Nahrungsvakuolen von Amöben verlassen können und sich beispielsweise mit dem Endoplasmatischen Reticulum assoziieren, allerdings bleibt unklar, was sie dazu befähigt (Barker und Brown, 1994). Studien, die sich mit dem Überleben von *Escherichia coli* innerhalb von *Tetrahymena* befassen, beschränken sich ausschließlich auf das Überleben der Verdauung in Nahrungsvakuolen (Schlimme *et al.*, 1995) oder stellen die Überlebensfähigkeit nur über indirekte Messung fest, in diesem Fall über Biolumineszenz (Nelson *et al.*, 2005). Zudem beschränkte sich der Beobachtungszeitraum auf nur eine Stunde, sodass unklar bleibt, ob *Escherichia coli* in diesen Fällen nicht später noch vollständig verdaut wird. Auch für andere, pathogene Organismen bezieht sich die Feststellung ihrer Überlebensfähigkeit ausschließlich auf Nahrungsvakuolen und Fäkalpellets (z. B. Manasherob *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2012). Für manche Organismen wurde zwar festgestellt, dass sie sich innerhalb von *Tetrahymena pyriformis* vermehren können, jedoch wird nicht ersichtlich, in welchem Kompartiment sie dies tun (z. B. Steele und McLennan, 1996; Strahl *et al.*, 2001). Somit ist die Erkenntnis, dass *Escherichia coli* ohne zusätzliche Manipulation die

Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* verlassen kann, völlig neu. Mit möglichen Voraussetzungen, die das Bakterium dazu befähigen, insbesondere mit dem Einfluss verschiedener bakterieller Oberflächen, befasst sich der experimentelle Teil dieser Arbeit näher.

Eine unmittelbare Folge des Verlassens der Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* ist die Persistenz von *Escherichia coli* im Cytoplasma des Ciliaten. Sowohl fluoreszenz- als auch transmissionselektronenmikroskopisch, aber ebenso über die Detektion bakterieller DNA, wurde nachgewiesen, dass das Bakterium bzw. dessen DNA bis zu zwei Wochen innerhalb des Protozoons auffindbar ist, selbst wenn keine externen Bakterien mehr aufgenommen werden können, da sie als Folge der Applikation des Antibiotikums Paromomycin lysiert und somit aus dem umgebenden Medium entfernt wurden. Die Färbung mit Nilrot und DAPI zeigt an, dass *Escherichia coli* bis zu drei Tage nach der Zugabe von Paromomycin innerhalb von *Tetrahymena pyriformis* persistiert und mit diesen Farbstoffen sichtbar gemacht werden kann. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Cokulturen mit und ohne Antibiotikumbehandlung zeigen zudem Strukturen, die im Regelfall von zwei Membranen umgeben sind. Da bei extern vorliegenden Bakterien zumeist nur eine umgebende Membran sichtbar war, obwohl *Escherichia coli* als Gram-negatives Bakterium eigentlich zwei aufweisen müsste, bedeutet dies, dass *Tetrahymena pyriformis* internalisierte Bakterien in den meisten Fällen mit einer zusätzlichen Membran ausstattet. Der Verlust der äußeren Bakterienmembran, entweder in Teilen oder vollständig, ist bei Genetiker-Stämmen von *Escherichia coli* nicht ungewöhnlich. Ein weiteres Indiz dafür, dass die zweite, äußere Membran nicht bakteriellen Ursprungs ist, ist die ultrastrukturelle Verschiedenheit beider Membranen. Dabei ist die innere, bakterielle Membran in den meisten Fällen dicker und gleichmäßiger als die äußere, von *Tetrahymena* stammende Membran. Die gefundenen Strukturen sind meist kleiner als extern vorliegende Bakterien. Da *Escherichia coli* allerdings auch unter den üblichen Kulturbedingungen eine ausgeprägte Pleiomorphie aufweist, spricht diese Beobachtung nicht gegen die Identifikation der gefundenen Strukturen als Bakterien, die aus Nahrungsvakuolen entkommen sind. Zudem ist auch nicht klar, inwiefern

physiologische Änderungen, bedingt durch die intrazelluläre Lebensweise der Bakterien, deren Größe beeinflussen. Auch wenn in einigen Fällen das Zellinnere der gefundenen Bakterien nur wenig elektronendichtes Material zeigte, schließt dies die Integrität der Bakterien nicht aus, da naturgemäß unterschiedlich dichte Bereiche innerhalb einer Zelle auftreten können und nicht jedes Material eine starke Osmiophilie aufweist. Da anhand eines einzelnen Schnittes nicht klar ist, in welchem Bereich das Bakterium getroffen wurde, kann man daher keine vollständig gesicherte Aussage über deren Status treffen. Dazu wären vollständige Schnittserien von Nöten, die jedoch in Anbetracht der Dauer der Aufenthalte in Stuttgart und der hohen Zahl verschiedener Proben nicht möglich waren.

Ein weiteres Indiz für die Persistenz von *Escherichia coli* im Cytoplasma von *Tetrahymena pyriformis* ist der Nachweis bakterieller DNA bis zu 14 Tage nach der Zugabe von Paromomycin und der daraus resultierenden schnellen Lyse aller im Medium befindlichen Bakterien. Dies bedeutet, dass die intrazellulären Bakterien, die mit der PCR nachgewiesen wurden, bereits vor Zugabe des Antibiotikums internalisiert waren. Über die Behandlung mit DNase I, den Transfer in frisches, paromomycinhaltiges Medium nach wenigen Tagen sowie der Trennung von Kulturüberstand und Zelniederschlag mit Zentrifugation ist zudem sichergestellt, dass die erhaltenen PCR-Signale ausschließlich aus dem Zellinneren stammen und nicht etwa von freier DNA lysierter Zellen im Kulturüberstand. Der Fakt, dass bakterielle DNA innerhalb von *Tetrahymena pyriformis* 14 Tage nach dem Entfernen aller extern vorliegenden Bakterien nachgewiesen werden kann, deutet stark darauf hin, dass *Escherichia coli* sich auch intrazellulär teilen kann, da es andernfalls nach der langen Inkubation durch anhaltende Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis* nicht mehr nachweisbar wäre.

Die Lebens- und Teilungsfähigkeit der intrazellulären Bakterien sollte mit dem Ausplattieren auf LB und der Bestimmung koloniebildender Einheiten überprüft werden. Durch die Zugabe von Paromomycin ist dabei sichergestellt, dass alle erhaltenen Kolonien ausschließlich von internalisierten Bakterien stammen, da das Antibiotikum zuverlässig und schnell zur Lyse von *Escherichia coli* im Medium führt.

Da nur in 30 % der Versuchsdurchläufe koloniebildende Bakterien gefunden wurden, sind die Ergebnisse nicht leicht zu interpretieren. Die verschiedenen mikroskopischen Techniken sowie die PCR-Ergebnisse belegen, dass *Escherichia coli* intrazellulär bis zu 14 Tage in *Tetrahymena pyriformis* persistiert. Auch wenn sie nur noch bedingt extrazellulär auf festen Nährmedien kultivierbar sind, sagt dies nichts über deren intrazelluläre Integrität und Teilungsfähigkeit aus. Möglicherweise beeinträchtigten lysierende Zellen von *Tetrahymena pyriformis* die Teilung der intrazellulären Bakterien nach dem Ausplattieren auf das Nährmedium. Eine weitere Begründung für die beeinträchtigte Kultivierbarkeit stellen physiologische Änderungen dar, die internalisierte Bakterien erfahren und die folglich dazu führen, dass *Escherichia coli* nicht mehr oder nur noch erschwert auf festem Nährmedium wachsen kann. Ein Indiz dafür stellt die Beobachtung dar, dass die maximale Anzahl koloniebildender Einheiten erst nach zwei bis drei Tagen der Inkubation bestimmt werden konnte. Dies ist für *Escherichia coli* äußerst ungewöhnlich, da üblicherweise bereits nach einer Nacht Bebrütung unter denselben Bedingungen alle koloniebildenden Zellen sichtbar sind. Zudem ist bekannt, dass manche pathogenen Mikroorganismen nach der Internalisierung ebenfalls physiologische Änderungen erfahren. Diese resultieren beispielsweise in gesteigerter Virulenz nach der Internalisierung (z. B. Cirillo *et al.*, 1997) oder in erhöhter Resistenz gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln (King *et al.*, 1988; Brandl *et al.*, 2005; Snelling *et al.*, 2005). Diese Studien beziehen sich allerdings ausschließlich auf Überlebende aus Nahrungsvakuolen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass *Escherichia coli* in unseren Experimenten ähnliche Änderungen erfährt. Zumindest vor dem Übertritt in das Cytoplasma von *Tetrahymena pyriformis* müssen die Bakterien die Verdauung überstehen. Eine mögliche Folge wären veränderte Zelloberflächen der Bakterien. Diese würden, im Falle der zitierten Studien, erklären, weshalb internalisierte und wieder ausgeschiedene Pathogene resistenter gegenüber Desinfektionsmitteln sind, da diese durch veränderte Oberflächen weniger angreifen oder nur noch erschwert aufgenommen werden. Für *Escherichia coli* ist dies nicht auszuschließen. Veränderte Oberflächeneigenschaften, bis hin zu osmotischer Labilität, würden sich während der intrazellulären Lebensweise wenig auswirken, können allerdings die Kultivierung auf festem Medium in Petrischalen erheblich

beeinträchtigen. Untersuchungen mit *Mycobacterium smegmatis* zeigten, dass eine Reduktion der Permeabilität der Zellwand dazu führte, dass diese Bakterien resistenter gegenüber der Verdauung durch *Acanthamoeba castellanii* und Macrophagen wurden (Sharbati-Tehrani *et al.*, 2005). Sollte das Überstehen der Verdauung sowie die intrazelluläre Lebensweise von *Escherichia coli* dazu führen, dass die Zellwand weniger permeabel wird, wäre die Nährstoffaufnahme auf festen Nährmedien erschwert und führte zu beeinträchtigter Kultivierbarkeit. Man könnte auch annehmen, dass besonders solche Bakterien die Verdauung überstehen und Nahrungsvakuolen verlassen, die bereits vorher über eine weniger permeable Zelloberfläche verfügten. Zudem können zusätzliche physiologische Adaptionen an die intrazelluläre Lebensweise, wie z.B. eine Anpassung an den pH-Wert innerhalb der Zellen und des Stoffwechsels der Bakterien an das Nährstoffangebot, eine Ursache für schlechte Kultivierbarkeit darstellen. So stellt ein drastischer Wechsel des umgebenden Mediums beim Ausplattieren, von intrazellulär auf festes Nährmedium, *Escherichia coli* eventuell vor größere Probleme beim Einstellen auf den raschen Bedingungswechsel. Solche Probleme treten innerhalb der Bakteriologie sogar beim Wechsel zwischen verschiedenen Nährmedien auf. Es ist also durchaus möglich und vorstellbar, dass *Escherichia coli* in unseren Experimenten ein ähnliches Schicksal erfährt wie andere Endosymbionten und als Folge der intrazellulären Lebensweise nicht mehr, zumindest aber nur noch eingeschränkt außerhalb von *Tetrahymena pyriformis* kultiviert werden kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Interaktion von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* durchaus als Modell zum Studium von Endosymbiosen fungieren kann. Die initiale Voraussetzung dafür, nämlich die Umgehung der Verdauung und das Entkommen aus Nahrungsvakuolen, ist erfüllt. Zudem lassen sich die beiden Organismen durch die Wahl selektiver Bedingungen, in diesem Fall die Applikation des Antibiotikums Paromomycin, in eine längerfristige, endosymbiontische Interaktion zwingen. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen zu Konsequenzen für beide Partner, die diese Lebensweise mit sich bringt.

5.2 Einfluss verschiedener Cokulturen auf die Paromomycinsensitivität

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Cokulturen mit transformierten Bakterien, die das Neomycinresistenzgen tragen, einen positiven Effekt auf das Überleben von *Tetrahymena pyriformis* in Gegenwart von Paromomycin haben, verglichen mit Cokulturen mit nicht transformierten Bakterien oder axenischen Kulturen. Dabei war es unerheblich, ob die Bakterien zur Bildung von Sex-Pili befähigt sind. Auch die Dauer der Cokultivierung spielt nur eine untergeordnete Rolle, da die Langzeitcokulturen nicht wesentlich besser mit den toxischen Bedingungen zurechtkamen. Auch die Promotoren, die das Resistenzgen in den verschiedenen Konstrukten kontrollieren, haben keinen messbaren Einfluss. Im Fall von pBS-neoTet steht das Resistenzgen unter gar keiner direkten Promotorkontrolle. Im Falle von pNeo4 und dem darauf basierenden pNeo4-DsRed liegt ein für *Tetrahymena thermophila* optimierter Promotor vor dem Neomycinresistenzgen, sodass *Escherichia coli* damit weniger operieren kann, während bei pEGFP-Neo der bakterielle *lac*-Promotor vorgeschaltet ist. Die Zugabe der verschiedenen Promotorinduktoren hatte zudem keine nennenswerte Steigerung der Resistenz zur Folge. Somit bleibt unklar, wodurch die gesteigerte Resistenz von *Tetrahymena pyriformis* verursacht wird. Auch der Mechanismus der Inaktivierung ist nicht zweifelsfrei zu klären. Eine Möglichkeit wäre die Sekretion der Aminoglykosid-Phosphotransferase. Wahrscheinlicher ist aber die Aufnahme des Antibiotikums durch *Escherichia coli* und, daraus resultierend, der intrazelluläre Abbau des Paromomycins. Sollte *Escherichia coli* die Aminoglykosid-Phosphotransferase exprimieren und so für die gesteigerte Resistenz verantwortlich sein, könnte man annehmen, dass in den Konstrukten ohne bakterielle Promotoren eine konstitutive Transkription der mRNA erfolgt, die von den Promotoren anderer auf dem Plasmid liegender Gene ausgeht. Ohne starke Terminatoren der Transkription vor dem betrachteten Gen, die hier jedoch nicht vorliegen, sind solche Effekte durchaus keine Ausnahme. Dennoch wären dann im Falle der Inaktivierung des Antibiotikums durch *Escherichia coli* mit bakteriellem Promotor gesteigerte Resistenzeffekte zu erwarten, vor allem nach Zugabe von IPTG als Promotorinduktor. Andererseits ist auch unklar, in welchen Mengen diese die intrazellulären Bakterien erreichen. Ein Transfer der Plasmid-DNA und folglich die

Expression des Neomycinresistenzgens durch *Tetrahymena pyriformis* ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da in diesem Fall einerseits die Internalisierung der Bakterien überflüssig wäre, andererseits ebenso die Zugabe von CdCl_2 als Promotorinduktor einen stärkeren Effekt haben müsste. So lässt sich abschließend noch keine eindeutige Aussage darüber treffen, was die gesteigerte Resistenz durch Cokultivierung mit den transformierten Bakterien verursacht. Die wahrscheinlichste Erklärung ist die konstitutive Expression des Neomycinresistenzgens in *Escherichia coli*, das dann die Inaktivierung über Phosphorylierung intrazellulär vornimmt.

5.3 Die Eignung synthetischer Mikropartikel als künstliche Futterpartikel

Der Einsatz synthetisch hergestellter Mikropartikel erlaubt die gezielte Beeinflussung biochemischer und biophysikalischer Oberflächeneigenschaften über chemische Modifikationsprozesse bei gleichzeitiger Standardisierung des dargebotenen Materials. Um als Modell zum Studium der Effekte verschiedener Oberflächeneigenschaften auf Ingestion und Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* fungieren zu können, muss sichergestellt sein, dass die angebotenen synthetischen Partikel dem natürlichen Prozess der Nahrungsaufnahme und -Verwertung so nahe wie möglich kommen. Dafür wurde einerseits die Ingestionsrate nicht modifizierter Mikropartikel bestimmt und mit bisher in der Literatur beschriebenen Werten verglichen, andererseits wurde mit verschiedenen Mitteln geprüft, ob die Partikel von *Tetrahymena pyriformis* verdaut und verwertet wurden.

Bis etwa 40 Minuten nach der Fütterung mit den synthetischen Mikropartikeln bildet *Tetrahymena pyriformis* alle vier Minuten eine neue Nahrungsvakuole, danach sinkt die Aufnahmerate leicht ab auf eine Vakuole alle zehn Minuten (Dürichen *et al.*, 2016). In der Literatur finden sich für die Vakuolenbildungsraten unterschiedliche Angaben und reichen von einer Vakuole alle 2,5 Minuten (Chapman-Andresen und Nilsson, 1968; Ricketts, 1971a), über 3 Minuten (Rasmussen, 1976) bzw. 3,3 Minuten (Nilsson, 1972) bis hin zu 2,5 bis 3,7 Minuten (Hoffmann *et al.*, 1974). Die Vakuolenbildungsrate mit den hier dargebotenen Partikeln liegt also etwas unter diesen Angaben. Dies hat zwei mögliche Ursachen: Einerseits wurde die Aufnahmerate in anorganischem

Phosphatpuffer gemessen, der keinen zusätzlichen Ingestionsstimulus darstellt, während in anderen Studien PPY-Medium verwendet wurde, das zusätzlich ingestionsfördernd wirkt (Seaman, 1961). Andererseits wurden die Versuche bei 22 bis 24 °C durchgeführt. Die anderen Studien gaben eine Temperatur von etwa 28 °C an. Niedrigere Temperaturen senken die Stoffwechselrate und ebenso die Vakuolenbildungsrate (Nilsson, 1977). Dass diese nach einiger Beobachtungszeit nachlässt, ist nicht ungewöhnlich, wie vergleichbare Ergebnisse von Nilsson (1972) und Ricketts (1971b) zeigen. Somit kann angenommen werden, dass die synthetischen Mikropartikel wie natürliche Nahrungspartikel ingestiert werden. Der Umstand, dass Hungerkulturen von *Tetrahymena pyriformis* die angebotenen Partikel aufnehmen, spricht ebenfalls dafür, weil Untersuchungen mit Latexpartikeln, Farbpigmenten, Bakterien und Hefen zeigten, dass Hungerkulturen nur nützliche Partikel einstrudeln. Die abiotischen Partikel wurden nur passiv aufgenommen, wenn den Hungerkulturen zusätzlich PPY zugesetzt wurde (Ricketts, 1971a). Vergleichbare Ergebnisse erhielt man mit kolloidalem Gold und Trypanblau-Partikeln (Seaman, 1961; Elliot und Clemmons, 1966). In Doppelfütterungsexperimenten mit *Escherichia coli* wurde zudem eine Präferenz für Futterbakterien ausgeschlossen (Dürichen *et al.*, 2016).

Neben der Ingestion ist es auch von Bedeutung, ob *Tetrahymena pyriformis* die dargebotenen Partikel tatsächlich verdaut. Dabei beginnt der Verdauungsprozess nicht bereits mit der Ingestion, sondern wird nur dann gestartet, wenn sich verdaubares Material in den Nahrungsvakuolen befindet, wie Ricketts (1971a) mit der Messung der Aktivität saurer Phosphatase zeigte. Ein gutes Indiz für induzierte Verdauung stellt das Ansäuern des Nahrungsvakuoleninhalts dar, da dies eine wichtige Voraussetzung für die Lysosomfusion ist (Nilsson, 1977) und zudem optimale Bedingungen für Verdauungsenzyme schafft. Die Neutralrotfärbung zeigte, dass Nahrungsvakuolen mit den synthetischen Mikropartikeln angesäuert wurden. Zusätzlich verkleinerte sich der Vakuolendurchmesser während des Verdauungsprozesses, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass die Partikel verdaut werden (Müller *et al.*, 1965; Nilsson, 1977). Außerdem war *Tetrahymena pyriformis* in der Lage, sich auf Basis der synthetischen Mikropartikel als einzige Nahrungsquelle zu teilen, wenngleich die Generationszeiten

sehr hoch waren. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der *de novo* Synthese benötigter Stoffe, da Supplementierung mit den essentiellen Substanzen keine merkliche Erhöhung der Teilungsrate bewirkte.

Da die dargebotenen synthetischen Mikropartikel von *Tetrahymena pyriformis* sowohl ingestiert, als auch verdaut und verwertet werden, eignen sie sich als künstlicher Nahrungspartikelersatz zum Studium der Effekte verschiedener Oberflächeneigenschaften auf die Ingestion und Verdauung.

5.4 Einfluss definierter Oberflächeneigenschaften auf die Ingestion

Anhand der Zählung von Nahrungsvakuolen in *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit modifizierten Mikropartikeln und Bakterien zeigte sich, dass unterschiedliche gebundene Substanzen die Ingestionsrate beeinflussen. Dabei war der Effekt mit den Mikropartikeln deutlich stärker ausgeprägt. Dies dürfte vor allem mit dem erheblichen Größenunterschied von Partikeln und *Escherichia coli* zu begründen sein. Zum einen sind letztere so klein, dass sie unter Umständen auch passiv ingestiert werden, zum anderen ist der Effekt von Oberflächeneigenschaften bei größeren Oberflächen sicherlich stärker ausgeprägt als bei kleineren aufgrund des erhöhten Erkennungsareals. Dennoch lassen sich einige Gemeinsamkeiten festhalten. Mikropartikel mit den kovalent gebundenen Aminosäuren Lysin (positiv geladen) und Isoleucin (unpolar) wurden von *Tetrahymena pyriformis* kaum aufgenommen (2,2 bis 2,3 VPI), nur Partikel mit Phenylalanin wurden zu etwas höherer Anzahl ingestiert (4,95 VPI). Auch mit Aminosäuren gekoppelte Bakterien wurden im Vergleich zu den Kontrollfütterungen mit etwas geringeren Raten aufgenommen. Eine Ausnahme bilden hier ebenso Phenylalanin, aber auch Isoleucin. Die getesteten Aminosäuren sind für *Tetrahymena pyriformis* essentiell (Holz, 1973). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten besteht darin, dass neben dem proteolytischen Erschließen essentieller Aminosäuren in Nahrungsvakuolen ebenso nachgewiesen wurde, dass *Tetrahymena pyriformis* im Medium gelöste Aminosäuren über aktiven, Carrier-vermittelten Membrantransport aufnehmen kann (Stephens und Kerr, 1962; Orias und Rasmussen,

1979). Eventuell wird der letztgenannte Prozess zur Akquisition essentieller Aminosäuren bevorzugt.

An die Oberfläche von Mikropartikeln gebundene Proteine, vor allem aber zusätzliches Rinderserumalbumin und Glucoronidase, erhöhten die Aufnahmerate von *Tetrahymena pyriformis* im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln. Auf bakterielle Oberflächen gebundenes Rinderserumalbumin bewirkte diesen Effekt nicht. Im Gegensatz dazu förderten an die Bakterien gebundene Mono-, Di- und Polyamine die Ingestion. Interessanterweise ist der Effekt von Endo-Porter konzentrationsabhängig. Mit steigender Konzentration sinkt die Ingestion. Eine mögliche Ursache stellt die starke Hydrophobie dar, die die Bakterien weniger einfach zugänglich macht.

Die Ergebnisse, sowohl mit modifizierten Bakterien als auch Mikropartikeln, deuten stark darauf hin, dass ein Erkennungssystem für Nährstoffe und Futterpartikel vor der Ingestion aktiv ist. Auch ältere Studien legen dies nahe. Während zugesetzte Proteine, Oligopeptide und RNA die Aufnahmerate steigerten, bewirkten freie Aminosäuren, Polysaccharide und Glucose dies nicht (Ricketts, 1972). Dabei spielte die Nettoladung der angebotenen Stoffe nur eine untergeordnete Rolle (Rasmussen und Modeweg-Hansen, 1973). Anhand der Vielzahl und Unterschiedlichkeit der angebotenen Substanzen und Partikel könnte man schließen, dass dieses Erkennungssystem einigermaßen komplex ist. Wie genau dies bei *Tetrahymena pyriformis* aussieht, ist bis dato unklar. Für andere Protozoen sind mehrere Möglichkeiten der Nahrungspertzeption beschrieben. Beim Dinoflagellaten *Oxyrrhis marina* (Wootton *et al.*, 2007) sowie der Amöbe *Vermamoeba vermiformis* (Venkataraman *et al.*, 1997) sind Lectine an der Erkennung und Bindung von Nahrung beteiligt. Ein Mannosebindeprotein ist bei *Acanthamoeba castellanii* an der Aufnahme von Hefezellen beteiligt (Allen und Dawidowicz, 1990). Eine Studie mit *Euplotes mutabilis* zeigte mehrere, verschiedene Lectinbindungsstellen am Cytostom sowie an der Ingestion beteiligten Strukturen, die vermutlich für die selektive Nahrungsaufnahme verantwortlich sind (Wilks und Sleight, 2004).

In vivo Lectinbindung mit Concanavalin A und Weizenkeimagglutinin konnte in *Tetrahymena pyriformis* keine Bindungsstellen im Bereich des Cytostoms markieren (Dürichen *et al.*, 2016). Möglicherweise sind diese Bindungsstellen allerdings von einem aus den Mucocysten stammenden Schleim maskiert (Nilsson, 1972).

5.5 Einfluss modifizierter Bakterienoberflächen auf die Verdauung und das Entkommen aus Nahrungsvakuolen

5.5.1 Beteiligung der Sex-Pili am Entkommen aus Nahrungsvakuolen

Anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nach DAPI-Färbung wird ersichtlich, dass *Escherichia coli* Stämme mit F-Plasmid, unabhängig davon, ob es reinfiziert wurde oder vorher vorhanden war, eher in der Lage sind, Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* zu verlassen. Der angewandte Temperaturschock diente vor allem dazu, die Frequenz dieser Ereignisse soweit zu erhöhen, dass dieser Effekt deutlich wird. Das F-Plasmid befähigt die Bakterien zur Bildung von Sex-Pili, die die bakterielle Konjugation ermöglichen; alle dafür notwendigen Gene sind in der *tra*-Region des F-Plasmids enthalten (Audette *et al.*, 2004). Diese Stämme (F⁺) werden als Donatoren bezeichnet, Stämme ohne F-Plasmid als Rezipienten (F⁻; Lederberg *et al.*, 1952). Die Pili werden über das Typ IV Sekretionssystem gebildet (Lawley *et al.*, 2003), dessen Derivate oft in die Sekretion makromolekularer Substanzen pathogener Mikroorganismen involviert sind (Christie, 2001). Der Pilus selbst dient der Kontaktaufnahme mit Rezipienten. Der Durchmesser der Pili beträgt etwa 8 nm, der des Lumens 2 nm, und er setzt sich aus Pilin zusammen (Lawley *et al.*, 2003). Dabei dient er ausschließlich der Kontaktaufnahme mit einem potentiellen Rezipienten; der Transfer der DNA erfolgt nach Retraktion des Pilus über das Typ IV Sekretionssystem. Es ist durchaus vorstellbar, dass *Escherichia coli* in unseren Experimenten Konjugationsbrücken zur Nahrungsvakuolenmembran aufbaut, da gezeigt wurde, dass *Escherichia coli* in der Lage ist, DNA-Transfer zu völlig fremden Organismen über die Konjugationsbrücken zu mobilisieren, in diesem Fall mit *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemann und Sprague, 1989). Zudem erhöht die Assoziation in Nahrungsvakuolen die Konjugationsfrequenz von *Escherichia coli* (Matsuo *et al.*, 2010), vermutlich über

die Aktivierung des *quorum sensing* Systems (Oguri *et al.*, 2015). Möglicherweise bildet *Escherichia coli* innerhalb der Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis* Pili aus, die an die Membran binden können. Über Lectinbindung wurde gezeigt, dass diese glycosylierte Strukturen tragen (Dürichen *et al.*, 2016). Dabei markiert das Lectin Concanavalin A die gesamte Nahrungsvakuole und zudem auch alle Nahrungsvakuolen. Concanavalin A bindet an interne und terminale, nicht reduzierende Mannopyranosyl- und Glucopyranosylreste, die hauptsächlich in N-glycosidisch verknüpften Produkten zu finden sind (Goldstein *et al.*, 1974). Da sie ubiquitär auftreten, ist anzunehmen, dass diese glycosylierten Proteine vor allem am Schutz vor der Selbstverdauung beteiligt sind (Dürichen *et al.*, 2016). Weizenkeimagglutinin markierte hingegen nur spezifische Teile der Vakuolenmembran in jüngeren Nahrungsvakuolen (Dürichen *et al.*, 2016). Weizenkeimagglutinin bindet hauptsächlich an terminales, nicht reduzierendes N-Acetylglucosamin und Sialinsäure (Wright, 1984). Da die markierten Strukturen während des Verdauungsprozesses entweder ausgeschnitten oder maskiert werden und somit nicht mehr anfärbbar sind, dienen sie vielleicht als Signalsequenzen für Lysosomfusion oder sind an der Erkennung verdaulichen Materials beteiligt (Dürichen *et al.*, 2016). Die glycosylierten Proteine der Nahrungsvakuolenmembran könnten ebenso als Bindestelle für die Pili oder das Typ IV Sekretionssystem nach Pilus-Reaktion dienen. Durch die enge Bindung an die Membran könnten die Bakterien in der Konsequenz aus den Nahrungsvakuolen entkommen. Dies unterstützen ebenso die Ergebnisse früherer Experimente, da diese ausschließlich mit dem F⁺-Phänotyp gemacht wurden. Dies spricht für Protein-Protein-Interaktionen, die am Entkommen von *Escherichia coli* aus den Nahrungsvakuolen beteiligt sind. Protein-Protein-Interaktionen sind vermutlich auch bei *Holospira* am Infektionsprozess beteiligt (Wiemann und Görtz, 1991; Fujishima *et al.*, 1997; Ehram und Görtz, 1999; Iwatani *et al.*, 2005), auch wenn diese mechanistisch anders sind.

Welche Komponenten des Konjugationssystems genau die erhaltenen Effekte verursachen, also ob es die Pili selbst sind oder das ihnen zugrunde liegende Sekretionssystem, ist allein durch die Entfernung des F-Plasmids nicht zu sagen, da dies alle benötigten Komponenten kodiert. Dafür wären Konstrukte nötig, die gezielt einzelne Komponenten der *tra*-Region ausschalten.

5.5.2 Einfluss chemisch modifizierter Bakterienoberflächen

Die chemische Oberflächenmodifikation von *Escherichia coli* hat gezeigt, dass definierte Eigenschaften die Verdauung von *Tetrahymena pyriformis* beeinträchtigen und als Konsequenz die Frequenz des Entkommens aus Nahrungsvakuolen erhöhen. Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen unvollständiger Verdauung und dem Verlassen von Nahrungsvakuolen. Dabei haben sich zwei entscheidende Faktoren herausgestellt: Oberflächenhydrophobie und -Alkalinität.

Wie die Färbung mit Neutralrot zeigte, werden Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis*, die Bakterien mit an die Oberfläche gebundenen Di- und Polyaminen enthielten, nicht vollständig angesäuert. Die Ansäuerung ist einerseits eine wichtige Voraussetzung für die Lysosomfusion (Nilsson, 1977), schafft andererseits aber auch optimale Bedingungen für Verdauungsenzyme. Ob die Lysosomfusion selbst unterdrückt ist oder nur die Verdauungsbedingungen suboptimal sind, konnte nicht festgestellt werden. In jedem Falle war die Verdauung so stark beeinträchtigt, dass sogar eine sich teilende Zelle von *Escherichia coli* transmissionselektronenmikroskopisch innerhalb einer Vakuole gefunden wurde. Zudem wurden mit beiden mikroskopischen Techniken ins Cytoplasma übergetretene Bakterien gefunden. Weshalb die unvollständige Ansäuerung der Nahrungsvakuolen die Entkommensrate beeinflusst, bleibt unklar. Vermutlich hat *Escherichia coli* wegen der Ineffizienz der Verdauung mehr Zeit zum Entkommen, da die Bakterien länger lebensfähig bleiben. Zudem wurden auch diese Experimente mit dem F⁺-Stamm durchgeführt. Die Inhibition des Ansäuerns von Nahrungsvakuolen könnte eine mögliche Strategie für potentielle Endosymbionten oder Pathogene sein, die Verdauung des Wirts zu überstehen. Eine Möglichkeit wäre die Inaktivierung der Protonenpumpen, die zumindest bei *Paramecium* sicher am Ansäuern der Nahrungsvakuolen beteiligt sind (Ishida *et al.*, 1997). Über die Proteomanalyse des Phagosoms von *Tetrahymena thermophila* wurden drei Untereinheiten einer V-ATPase identifiziert, die vermutlich zum Ansäuern der Nahrungsvakuolen beitragen (Jacobs *et al.*, 2006). Eine weitere Möglichkeit bildet die Sekretion protonenbindender Substanzen. Darüber ist bis dato aber nichts bekannt. Für *Mycobacterium avium* wurde gezeigt, dass es die Verdauung durch *Acanthamoeba*

castellanii übersteht, indem die Lysosomfusion mit der Nahrungsvakuole über einen noch unbekanntem Mechanismus verhindert wird (Cirillo *et al.*, 1997). Eine mögliche Begründung wäre in diesem Fall die Inhibition des Ansäuerns der Nahrungsvakuolen.

Erhöhte Oberflächenhydrophobie, einerseits über die Bindung von Monoaminen mit steigender Kettenlänge, andererseits über Endo-Porter, führte ebenfalls zu unvollständiger Verdauung von *Escherichia coli* und zu erhöhter Frequenz des Entkommens aus den Nahrungsvakuolen von *Tetrahymena pyriformis*, wie sowohl Fluoreszenz- als auch Transmissionselektronenmikroskopie zeigten. Zwei mögliche Folgen der starken Oberflächenhydrophobie wären die Bildung von Zellaggregaten, die zum Schutz vor lytischen Enzymen führen, oder die enge Assoziation mit der Nahrungsvakuolenmembran. Beide Phänomene wurden transmissionselektronenmikroskopisch beobachtet. Vor allem ein enger Kontakt mit der Nahrungsvakuolenmembran könnte über eine graduelle Umhüllung der Bakterien mit der Nahrungsvakuolenmembran und abschließend einer Art Knospung zum Ausschleusen der Bakterien führen. Daraus resultiert eine erhöhte Frequenz des Entkommens. Gerade bei Bakterien, die mit Endo-Porter behandelt wurden, scheint dieser Mechanismus logisch zu sein, da dieses Peptid speziell für den Transmembrantransport über Endocytose entwickelt wurde (Summerton, 2005). Verglichen mit den basischen Substanzen ist die erhöhte Oberflächenhydrophobie noch effektiver im Hinblick auf die Umgehung der Verdauung und des Entkommens aus Nahrungsvakuolen.

Insgesamt gesehen spielen bakterielle Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle beim Entkommen aus Nahrungsvakuolen, wie die chemische Modifikation einerseits und die Entfernung des F-Plasmids andererseits belegen. Dass Oberflächenerkennungen generell einen Einfluss auf endosymbiontische Interaktionen haben, zeigen diverse Reinfektionsexperimente, wie z. B. mit *Chlorella* in *Paramecium bursaria* (Kodama und Fujishima, 2012; Germond und Nakajima, 2016). Pathogenitätsfaktoren, etwa Listeriolysin O, sind ebenso am Umgehen der Verdauung mancher Pathogene beteiligt (Dramsı und Cossart, 2002; Pushkareva und Ermolaeva, 2010). Da unser Stamm ein K12-Derivat und folglich nicht pathogen ist, kommen Bakteriolyse und andere

Pathogenitätsfaktoren als Ursache nicht in Frage. Vielmehr scheint im Falle unbehandelter Bakterien tatsächlich die Fähigkeit zur Bildung von F-Pili involviert zu sein. Ebenso deuten die Ergebnisse mit modifizierten Bakterienoberflächen auf mehrere Strategien zur Umgehung der Verdauung des Wirts und das Entkommen aus dessen Nahrungsvakuolen an. Die für diese Arbeit entwickelte Prozedur zur Modifikation der Oberfläche von *Escherichia coli* ist zudem ein wertvolles, generell verwendbares Hilfsmittel, um weitere Oberflächenfaktoren zu identifizieren, die an den vorher genannten Prozessen beteiligt sind, da prinzipiell alle Substanzen mit Amino- und Carboxylgruppen gebunden werden können, so z. B. auch isolierte Oberflächenproteine. Somit könnte mit diesem experimentellen System ebenfalls geklärt werden, welche Faktoren am ersten Schritt der Entstehung von Endosymbiosen beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

Abamo, F., Dohra, H. und Fujishima, M. 2008. Fate of the 63-kDa periplasmic protein of the infectious form of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* during the infection process. FEMS Microbio. Lett. 280, 21 – 27.

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. und Taylor, M. F. J. R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J. Eukaryot. Microbiol. 52, 399 – 451.

Allen, P.G. und Dawidowicz, E.A., 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba*. 1. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J. Cell Physiol. 145, 508–513.

Amann, R., Springer, N., Ludwig, W. Görtz, H.-D. und Schleifer, K.-H. 1991. Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. Nature 351, 161 – 164.

Audette, G. F., Holland, S. J., Elton, T. C., Manchak, J., Hayakawa, K., Frost, L. S. und Hazes, B. 2004. Crystallization and preliminary diffraction studies of TraF, a component of the *Escherichia coli* type IV secretory system. Acta Cryst. D60, 2025 – 2027.

Baird, G. S., Zacharias, D. A. und Tsien, R. Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11984 – 11989.

Barker, J. und Brown, M. R. W. 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology 140, 1253 – 1259.

- Beale, G. H., Jurand, A. und Preer, J. R. Jr. 1969. The classes of endosymbiont of *Paramecium aurelia*. J. Cell Sci. 5, 65 – 91.
- Beale, G. H. und Preer, J. R. Jr. 2008. *Paramecium*: Genetics and epigenetics. CRC Press New York.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. und Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19, 327 – 336.
- Behnsen, J., Narang, P., Hasenberg, M., Gunzer, F., Bilitewski, U., Klippel, N., Rohde, M., Brock, M., Brakhage, A.A., Gunzer, M., 2007. Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. PLoS Pathogens 3, e13. doi:10.1371/journal.ppat.0030013
- Beier, C. L., Horn, M., Michel, R., Schweikert, M., Görtz, H.-D. und Wagner, M. 2002. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales (*Alphaproteobacteria*) and to *Francisella tularensis* (*Gammaproteobacteria*). Appl. Environ. Microbiol. 68, 6043 – 6050.
- Bella, C., Koehler, L., Grosser, K., Berendonk, T. U., Petroni, G. und Schrällhammer, M. 2016. Fitness impact of obligate intranuclear bacterial symbionts depends on host growth phase. Front. Microbiol. 7:2084. doi: 10.3389/fmicb.2016.02084
- Benghezal, M., Adam, E., Lucas, A., Burn, C., Orchard, M. G., Deuschel, C., Valentino, E., Braillard, S., Paccaud, J.-P. und Cosson, P. 2007. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. Cell. Microbiol. 9, 1336 – 1342.
- Biebl, H. und Pfennig, N., 1978. Growth yield of green sulphur bacteria in mixed cultures with sulphur and sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol. 117, 9–16.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513 – 1523.

- Boenigk, J. und Novarino, G., 2004. Effect of suspended clay on the feeding and growth of bacterivorous flagellates and ciliates. *Aquat. Microb. Ecol.* 34, 181–192.
- Boscaro, V., Felletti, M., Vannini, C., Ackerman, M. S., Chain, P. S. G., Malfatti, S., Vergez, L. M., Shin, M., Doak, T. G., Lynch, M. und Petroni, G. 2013a. *Polynucleobacter necessarius*, a model for genome reduction in both free-living and symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 18590 – 18595.
- Boscaro, V., Fokin, S. I., Schrällhammer, M., Schweikert, M. und Petroni, G. 2013b. Revised systematics of *Holospora*-like bacteria and characterization of “*Candidatus Gortzia infectiva*”, a novel macronuclear symbiont of *Paramecium jenningsi*. *Microb. Ecol.* 65, 255 – 267.
- Bosch, T. C. G. und Miller, D. J. 2016. The holobiont imperative. Perspectives from early emerging animals. Springer-Verlag. Wien.
- Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F. und Berk, S. G. 2005. Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1562 – 1569.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-377.
- Cameron I. L. und Jeter J. R. Jr., 1970. Synchronization of the cell cycle of *Tetrahymena* by starvation and refeeding. *J. Protozool.* 17, 429 – 431.
- Chapman-Andresen C., Nilsson J.R., 1968. On vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 36, 405 – 432.
- Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40, 294 – 305.

- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. und Bermudez, L. E. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoeba enhances virulence. *Infect. Immun.* 65, 3759 – 3767.
- Clewell, D. B. und Helinski D. R. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62,1159-11664.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. und Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2010-2014.
- Corliss, J. O. 1973. History, taxonomy, ecology, and evolution of species of *Tetrahymena*. In: Elliott, M. A. (Hrsg.). *Biology of Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, 1 – 55.
- Csaba, G. und Pállinger, E. 2008. Is there a hormonal network in *Tetrahymena*? A systematic investigation of hormonal effects on the hormone content. *Cell Biochem. Funct.* 26, 303 – 308.
- Csaba, G., Lajkó, E. und Pállinger, E. 2011. Effect of different concentrations of serotonin, histamine and insulin on the hormone (serotonin and ACTH) production of *Tetrahymena* in nutrient-free physiological milieu. *Exp. Parasitol.* 129, 179 – 182.
- Curds C. R. und Cockburn A. 1968. Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoxenic culture. *J. Gen. Microbiol.* 54, 343 – 358.
- Dilts, J. A. und Quackenbush, R. L. 1986. A mutation in the R Body-coding sequence destroys expression of the killer trait in *P. tetraurelia*. *Science* 232, 641 – 643.
- Drabick J.J., Bhattacharjee A.K., Hoover D.L., Siber G.E., Morales V.E., Young L.D., Brown S.L. und Cross A.S., 1998. Covalent polymyxin B conjugate with human immunoglobulin G as an antiendotoxin reagent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 583 – 588.

- Dramsi, S. und Cossart, P. 2002. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *JCB* 156, 943 – 946.
- Duncan, A. B., Fellous, S., Accot, R., Alart, M., Sobandi, K. C., Cosiaux, A. und Kaltz, O. 2010. Parasite-mediated protection against osmotic stress for *Paramecium caudatum* infected by *Holospira undulata* is host genotype specific. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 353 – 360.
- Dürichen, H., Siegmund, L., Burmester, A., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. 2016. Ingestion and digestion studies in *Tetrahymena pyriformis* based on chemically modified microparticles. *Eur. J. Protistol.* 52, 45 – 57.
- Ehrsam, E. und Görtz, H.-D. 1999. Surface proteins of the Gram-negative bacterium *Holospira obtusa* bind to macronuclear proteins of its host *Paramecium caudatum*. *Eur. J. Protistol.* 35, 304 – 308.
- Elliott, A. M. und Clemmons G. L., 1966. An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.* 13, 311 – 323.
- Elliot, A. M. und Kennedy, J. R. 1973. Morphology of *Tetrahymena*. In: Elliott, A. M. (Hrsg.). *Biology of Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, 57 – 87.
- Fokin, S. I. 2004. Bacterial endocytobionts of ciliophora and their interactions with the host cell. *Int. Rev. Cytol.* 236, 181 – 249.
- Fokin, S. I., Brigge, T., Brenner, J. und Görtz, H.-D. 1996. *Holospira* species infecting the nuclei of *Paramecium* appear to belong into two groups of bacteria. *Eur. J. Protistol.* 32, 19 – 24.
- Fokin, S. I. und Sabaneyeva, E. 1997. Release of endonucleobiotic bacteria *Holospira bacillata* and *Holospira curvata* from the macronucleus of their host cells *Paramecium woodruffi* and *Paramecium calkinsi*.

- Fokin, S. I., Schweikert, M., Brümmer, F. und Görtz, H.-D. 2005a. *Spirostomum* spp. (Ciliophora, Protista), a suitable system for endocytobiosis research. *Protoplasma* 225, 93 – 102.
- Fokin, S. I., Schweikert, M. und Fujishima, M. 2005b. Recovery of the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* following bacterial infection with *Holospora obtusa*. *Eur. J. Protistol.* 41, 129 – 138.
- Fokin, S. I. und Skovorodkin, I. N. 1997. Experimental analysis of the resistance of *Paramecium caudatum* (Ciliophora) against infection by bacterium *Holospora undulata*. *Eur. J. Protistol.* 33, 214 – 218.
- Fujishima, M. 2009. Infection and maintenance of *Holospora* species in *Paramecium caudatum*. In: Fujishima, M. (Hrsg.). *Endosymbionts in Paramecium*. Microbiology Monographs, Vol. 12,. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 201 – 225.
- Fujishima, M., Dohra, H. und Kawai, M. 1997. Quantitative changes in periplasmic Proteins of the macronucleus-specific bacterium *Holospora obtusa* in the infection process of the ciliate *Paramecium caudatum*. *J. Euk. Microbiol.* 44, 636 – 642.
- Fujishima, M. und Fujita, M. 1985. Infection and maintenance of *Holospora obtusa*, a macronucleus-specific bacterium of the ciliate *Paramecium caudatum*.
- Fujishima, M. und Kawai, M. 2004. Endonuclear symbiotic bacteria *Holospora* species distinguish the host nuclear envelopes. *Endocyt. Cell Res.* 15, 71 – 76.
- Fujishima, M., Sawabe, H. und Iwatsuki, K. 1990. Scanning electron microscopic observation of differentiation from the reproductive short form to the infectious long form of *Holospora obtusa*. *J. Protozool.* 37, 123 – 128.
- Frankel, J. 1967. Studies on the maintenance of oral development in *Tetrahymena pyriformis* GL-C. II. The relationship of protein synthesis to cell division and oral organelle development. *J. Cell Biol.* 34, 841 – 858.

Geoffroy, C., Gaillard, J.-L., Alouf, J. E. und Berche, P. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55, 1641 – 1646.

Germond, A., Hata, H., Fujikawa, Y. und Nakajima, T. 2013a. The phylogenetic position and phenotypic changes of a *Chlorella*-like alga during 5-year microcosm culture. *Eur. J. Phycol.* 48, 485 – 496.

Germond, A., Kunihiro, T., Inouhe, M. und Nakajima, T. 2013b. Physiological changes of a green alga (*Micractinium* sp.) involved in an early-stage of association with *Tetrahymena thermophila* during 5-year microcosm culture. *BioSystems* 114, 164 – 171.

Germond, A. und Nakajima, T. 2016. Symbiotic associations in ciliates: Ecological and evolutionary perspectives. In: Witzany, G. und Nowacki, M. (Hrsg.). *Biocommunication of ciliates*. Springer International Publishing, Switzerland, 253 – 275.

Glaser P., Sharpe M.E., Raether B., Perego M., Ohlsen K. und Errington J., 1997. Dynamic, mitotic-like behaviour of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev.* 11, 1160 – 1168.

Goff, L. J. 1982. Symbiosis and parasitism: Another viewpoint. *BioScience* 32, 255 – 256.

Goldstein, I. J., Reichert, C. M. und Misaki, A. 1974. Interaction of con-canavalin A with model substrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 234, 283 – 296.

Görtz, H.-D., 2010. Microbial infections in free-living protozoa. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 95 – 106.

Görtz, H.-D., Ahlers, N. und Robenek, H. 1989. Ultrastructure of the infectious and reproductive forms of *Holospora obtusa*, a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 3079 – 3085.

Görtz, H.-D., Lellig, S., Miosga, O. und Wiemann, M. 1990. Changes in fine structure and polypeptide pattern during development of *Holospora obtusa*, a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*. J. Bacteriol. 172, 5664 – 5669.

Görtz, H.-D. und Wiemann, M. 1989. Route of infection of the bacteria *Holospora elegans* and *Holospora obtusa* into the nuclei of *Paramecium caudatum*. Eur. J. Protistol. 24, 101 – 109.

Gu, F., Chen, L., Ni, B. und Zhang, X. 2002. A comparative study on the electron microscopic enzyme-cytochemistry of *Paramecium bursaria* from light and dark cultures. Eur. J. Protistol. 38, 267 – 278.

Hahn, M. W., Lang, E., Brandt, U., Wu, Q. L. und Scheuerl, T. 2009. Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *Polynucleobacter necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subsp. *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2002 – 2009.

Hahn, M. W., Schmidt, J., Pitt, A., Taipale, S. J. und Lang, E. 2016. Reclassification of four *Polynucleobacter necessarius* strains as representatives of *Polynucleobacter asymbioticus* comb. nov., *Polynucleobacter duraquae* sp. nov., *Polynucleobacter yangtzensis* sp. nov. and *Polynucleobacter sinensis* sp. nov., and emended description of *Polynucleobacter necessarius*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 2883 – 2892.

Harrison, D. N., Dorsey, C. H. und Finley, H. E. 1976a. Studies on a macronuclear endosymbiont of *Spirostomum ambiguum* I. Isolation of the microorganism from the macronucleus. Trans. Amer. Microsc. Soc. 95, 560 – 564.

Harrison, D. N., Dorsey, C. H. und Finley, H. E. 1976b. Studies on a macronuclear endosymbiont of *Spirostomum ambiguum* II. Ultrastructural comparison of the in situ and the cultivated endosymbiont. Trans. Amer. Microsc. Soc. 95, 565 – 568.

Heckmann, K. 1975. Omikron, ein essentieller Endosymbiont von *Euplotes aediculatus*. J. Protozool. 22, 97 – 104.

- Heckmann, K. und Schmidt, H. J. 1987. *Polynucleobacter necessarius* gen. nov. sp. nov. an obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 456 – 457.
- Heckmann, K., ten Hagen, R. und Görtz, H.-D. 1983. Freshwater *Euplotes* species with a 9 type 1 cirrus pattern depend upon endosymbionts. J. Protozool. 30, 284 – 289.
- Heinemann, J. A. und Sprague, G. F. 1989. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. Nature 340, 205-209.
- Henry, T. J. und Pratt, D. 1969. The proteins of bacteriophage M13. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 800 – 807.
- Hewitt, W. und Vincent, S. 1989. Theory and application of microbiological Assay. Academic Press, Inc., San Diego. 38 – 79.
- Hirota, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating-type factors in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 57 – 64.
- Hoffmann, E.K., Rasmussen, L. und Zeuthen, E. 1974. Cytochalasin B: aspects of phagocytosis in nutrient uptake in *Tetrahymena*. J. Cell Sci. 15, 403 – 406.
- Holz, G. G. Jr. 1960. Structural and functional changes in a generation in *Tetrahymena*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole 118, 84 – 95.
- Holz, G. G. Jr. 1973. The nutrition of *Tetrahymena*: Essential nutrients, feeding, and digestion. In: Elliott, M. A. (Hrsg.). Biology of Tetrahymena. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, 89 – 98.
- Hoppert M., 2003. Microscopic techniques in biotechnology. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Hori, M., Fujii, K und Fujishima, M. 2008. Micronucleus-specific bacterium *Holospora elegans* irreversibly enhances stress gene expression of the host *Paramecium caudatum*. J. Eukaryot. Microbiol. 55, 515 – 521.

- Hori, M. und Fujishima, M. 2003. The endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* enhances heat-shock gene expression of the host *Paramecium caudatum*. J. Eukaryot. Microbiol. 50, 293 – 298.
- Hutner, S. H., Baker, H., Frank, O. und Cox, D. 1972. Nutrition and metabolism in Protozoa. In: Fiennes, R. N. (Hrsg.). Biology of Nutrition. Pergamon Press, New York, 85 – 177.
- Ishida M., Aihara M.S., Allen R.D. und Fok A.K., 1997. Acidification of the young phagosomes of *Paramecium* is mediated by proton pumps derived from acidosomes. Protoplasma 196, 12 – 20.
- Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B. F., Burger, G., Hori, M. und Fujishima, M. 2005. Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospora* infection. Biochem. Biophys. Res. Comm. 337, 1198 – 1205.
- Jacobs, M.E., DeSouza, L.V., Samaranyake, H., Pearlman, R.E., Siu, K.W. und Klobutcher, L.A., 2006 The *Tetrahymena thermophila* phagosome proteome. Euk. Cell 5, 1990 – 2000.
- Jeon, K. W. 1972. Development of cellular dependence on infective organisms: micrurgical studies in amoebas. Science 176, 1122 – 1223.
- Jeon, K. W. 1987. Change of cellular “pathogens” into required cell components. Ann. N. Y. Acad. Sci. 503, 359 – 371.
- Jeon, K. W. 1995. Bacterial endosymbiosis in amoebae. Trends Cell Biol. 5, 137 – 140.
- Jeon, K. W. 2006. Prokaryotic symbionts of amoeba and flagellates. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. und Stackebrandt, E. (Hrsg.), The Prokaryotes, Vol. 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass. 3rd Edition. Springer, New York, 1028 – 1037.
- Jeon, K. W. und Hah, J. C. 1977. Effect of chloramphenicol on bacterial endosymbiotes in a strain of *Amoeba proteus*. J. Protozool. 24, 289 – 293.

Jeon, K. W. und Jeon, M. S. 1976. Endosymbiosis in amoebae: recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J. Cell Physiol.* 89, 337 – 344.

Jeon, K. W. und Lorch, I. J. 1967. Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp. Cell Res.* 48, 236 – 240.

Kim, H. B. und Jeon, K. W. 1986. Protein synthesis by bacterial endocytobionts in amoebas. *Endocyt. Cell Res.* 3, 299 – 309.

Kim, H. B. und Jeon, K. W. 1987. A monoclonal antibody against a symbiont-synthesized protein in the cytosol of symbiont-dependent amoebae. *J. Protozool.* 34, 393 – 397.

King, C. H., Shotts, E. B. Jr., Wooley, R. E. und Porter, K. G. 1988. Surviving of coliforms and pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3023 – 3033.

Kodama, Y. und Fujishima, M. 2009a. Localization of perialgal vacuoles beneath the host cell surface is not a prerequisite phenomenon for protection from the host's lysosomal fusion in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 160, 319 – 329.

Kodama, Y. und Fujishima, M. 2009b. Timing of perialgal vacuole membrane differentiation from digestive vacuole membrane in infection of symbiotic Algae *Chlorella vulgaris* of the Ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 160, 65 – 74.

Kodama, Y. und Fujishima, M. 2012. Characteristics of the digestive vacuole membrane of the alga-bearing ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 163, 658 – 670.

Kodama, Y. und Fujishima, M. 2014. Symbiotic *Chlorella variabilis* incubated under constant dark conditions for 24 hours loses the ability to avoid digestion by host lysosomal enzymes in digestive vacuoles of host ciliate *Paramecium bursaria*.

Kodama, Y. und Fujishima, M. 2016. *Paramecium* as a model organism for studies on primary and secondary endosymbioses. In: Witzany, G. und Nowacki, M. (Hrsg.).

Biocommunication of ciliates. Springer International Publishing, Switzerland, 277 – 304.

Kusch, J., Stremmel, M. Breiner, H.-W., Adams, V., Schweikert, M. und Schmidt, H. J. 2000. The toxic symbiont *Caedibacter caryophila* in the cytoplasm of *Paramecium novaurelia*. Microb. Ecol. 40, 330 – 335.

Landis, W. G. 1981. The ecology, role of the killer trait, and interactions of five species of the *Paramecium aurelia* complex inhabiting the littoral zone. Can. J. Zool. 59, 1734 – 1743.

Lang, B. F., Brinkmann, H., Koski, L. B., Fujishimia, M., Görtz, H.-D. und Burger, G. 2005. On the origin of mitochondria and *Rickettsia*-related eukaryotic endosymbionts. Jpn. J. Protozool. 38, 171 – 183.

Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J. und Frost, L. S. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. FEMS Microbiol. Lett. 224, 1 – 15.

Lederberg, J., Cavalli, L. L. und Lederberg, E. M. 1952. Sex compatibility in *Escherichia coli*. Genetics 37, 720 – 730.

Lorch, I. J. und Jeon, K. W. 1980. Resuscitation of amoebae deprived of essential symbiotes: Micrurgical studies. J. Protozool. 27, 423 – 426.

Lorch, I. J. und Jeon, K. W. 1981. Rapid induction of cellular strain specificity by newly acquired cytoplasmic components in Amoebas. Science 211, 949 – 951.

Lorch, I. J. und Jeon, K. W. 1982. Nuclear lethal effect and nucleocytoplasmic incompatibility induced by endosymbionts in *Amoeba proteus*. J. Protozool. 29, 468 – 470.

Ly, T. M. C. und Müller, H. E. 1990. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. J. Med. Microbiol. 33, 51 – 54.

- Manasherob, R., Ben-Dov, E., Zaritsky, A. und Barak, Z. 1998. Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1750 – 1758.
- Martindale, D. W., Allis, C. D. und Bruns, P. J. 1982. Conjugation in *Tetrahymena thermophila*: A temporal analysis of cytological stages. Exp. Cell Res. 140, 227 – 236.
- Matsuo, J., Oguri, S., Nakamura, S., Hanawa, T., Fukumoto, T., Hayashi, Y., Kawaguchi, K., Mizutani, Y., Yao, T., Akizawa, K., Suzuki, H., Simizu, C., Matsuno, K., Kamiya, S. und Yamaguchi, H. 2010. Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. Res. Microbiol. 161, 711 – 719.
- Meincke, L., Copeland, A., Lapidus, A., Lucas, S., Berry, K. W., Del Rio, T. G., Hammon, N., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Richardson, P., Bruce, D., Goodwin, L., Han, C., Tapia, R., Detter, J. C., Schmutz, J., Brettin, T., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N. C., Ivanova, N., Göker, M., Woyke, T., Wu, Q. L., Pöckl, M., Hahn, M. W. und Klenk, H.-P. 2012. Complete genome sequence of *Polynucleobacter necessarius* subsp. *asymbioticus* type strain (QLW-P1DMWA-1^T). Stand. Genomic Sci. 6, 74 – 83.
- Miller, J. H 1977. Experiments in molecular genetics. 3. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory 1977, New York.
- Mochizuki, K. 2008. High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. Gene 425, 79 – 83.
- Mohr, J.L., 1981. Methods for protozoa. In: Clark, G. (Ed.), Staining Procedures, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Mueller, J. A. 1963. Separation of kappa particles with infective activity from those with killing activity and identification of the infective particles in *Paramecium aurelia*. Exp. Cell Res. 30, 492 – 508.

- Müller, M., Röhlich, P. und Törö, I. 1965. Studies on feeding and digestion in protozoa. VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its easy effect on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 12, 27 – 34.
- Nakajima, T., Fujikawa, Y., Matsubara, T., Karita, M. und Sano, A. 2015. Differentiation of a free-living alga into forms with ecto- and endosymbiotic associations with heterotrophic organisms in a 5-year microcosm culture. BioSystems 131, 9 – 21.
- Nakajima, T., Matsubara, T., Ohta, Y. und Miyake, D. 2013. Exploitation or cooperation? Evolution of a host (ciliate)-benefiting alga in a long-term experimental microcosm culture. BioSystems 113, 127 – 139.
- Nakajima, T., Sano, A. und Matsuoka, H. 2009. Auto-/heterotrophic endosymbiosis evolves in a mature stage of ecosystem development in a microcosm composed of an alga, a bacterium and a ciliate. BioSystems 96, 127 – 135.
- Nelson, S. M., Cooper, A. A. A., Taylor, E. L. und Salisbury, V. C. 2003. Use of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 to study intra-protozoan survival of bacteria within *Tetrahymena pyriformis*. FEMS Microbiol. Lett. 223, 95 – 99.
- Nilsson J. R., 1972. Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. C. R. Trav. Lab. Carlsberg 39, 83 – 110.
- Nilsson, J. R. 1977. On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Protozool. 24, 502 – 507.
- Nilsson, J. R. 1987. Structural aspects of digestion of *Escherichia coli* in *Tetrahymena*. J. Protozool. 34, 1 – 6.
- Nilsson J.R., van Deurs B., 1983. Coated pits and pinocytosis in *Tetrahymena*. J. Cell Sci. 63, 209 – 222.

- Nozawa, Y. und Kasai, R. 1978. Mechanism of thermal adaptation of membrane lipids in *Tetrahymena pyriformis* NT-1 – possible evidence for temperature-mediated induction of palmitoyl-CoA desaturase. *Biochim. Biophys. Acta* 529, 54 – 66.
- Oguri, S., Hanawa, T., Matsuo, J., Ishida, K., Yamazaki, T., Nakamura, S., Okubo, T., Fukumoto, T., Akizawa, K., Shimizu, C., Kamiya, S. und Yamaguchi, H. 2015. Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61, 203 – 210.
- Orias, E. und Rasmussen, L. 1979. Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena* V. Utilization of amino acids and proteins. *J. Cell Sci.* 36, 343 – 353.
- Pak, J. W. und Jeon, K. W. 1997. A symbiont-produced protein and bacterial symbiosis in *Amoeba proteus*. *J. Euk. Microbiol.* 44, 614 – 619.
- Pond, F. R., Gibson, I., Lalucat, J. und Quackenbush, R. L. 1989. R-body-producing bacteria. *Microbiol. Rev.* 53, 25 – 67.
- Preer, J. R. Jr. und Preer, L. B. 1982. Revival of names of protozoan endosymbionts and proposal of *Holospora caryophila* nom. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 140 – 141.
- Preer, J. R. Jr., Preer, L. B. und Jurand, A. 1974. Kappa and other endosymbionts in *Paramecium aurelia*. *Bact. Rev.* 31, 113 – 163.
- Preer, L. B., Jurand, A., Preer, J. R. Jr. und Rudman, B. M. 1972. The classes of Kappa in *Paramecium aurelia*. *J. Cell Sci.* 11, 581 – 600.
- Pushkareva, V. I. und Ermolaeva, S. A. 2010. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol.* 10:26. doi:10.1186/1471-2180-10-26
- Quackenbush, R. L. 1982. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 8. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 266 – 268.

- Rasmussen, L. 1976. Nutrient uptake in *Tetrahymena pyriformis*. Carlsberg Res. Commun. 41, 144 – 167.
- Rasmussen, L. und Kludt, T. A. 1970. Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena* cultures. Exp. Cell Res. 59, 457 – 463.
- Rasmussen, L. und Modeweg-Hansen, L. 1973. Cell multiplication in *Tetrahymena* cultures after addition of particulate material. J. Cell Sci. 12, 275-286.
- Ricketts T. R., 1971a. Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*: The selectivity of uptake of particles and the adaptive increase in cellular acid phosphatase activity. Exptl. Cell Res. 66, 49 – 58.
- Ricketts T.R., 1971b. Periodicity of Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. Protoplasma 73, 387 – 396.
- Ricketts T.R., 1972. The induction of endocytosis on starved *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 19, 373 – 375.
- Salivar, W. O., Tzagoloff, H. und Pratt, D. 1964. Some physical-chemical and biological properties of the rod-shaped coliphage M13. Virology 24, 359 – 371.
- Sano, A., Watanabe, M. und Nakajima, T. 2009. Adaptive characteristics of a ciliate *Tetrahymena thermophila* in endosymbiotic association with a green alga *Chlorella vulgaris* derived in a long-term microcosm culture. Symbiosis 47, 151 – 160.
- Sauvant, M. P., Pepin, D. und Piccinni, E. 1999. *Tetrahymena pyriformis*: A tool for toxicological studies. A review. Chemosphere 38, 1631 – 1669.
- Scherbaum O., Zeuthen E., 1954. Induction of synchronous cell division in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*. Exptl. Cell Res. 6, 221-226
- Schlimme, W., Baur, B., Hanselmann, K. und Jenni, B. 1995. An agarose slide method to follow the fate of bacteria within digestive vacuoles of protozoa. FEMS Microbiol. Lett. 133, 169 – 173.

Schmidt, H. J., Görtz, H.-D., Pond, F. R. und 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. *Exp. Cell Res.* 174, 49 – 57.

Schmidt, H. J., Görtz, H.-D. und Quackenbush, R. L., 1987. *Caedibacter caryophila* sp. nov. a killer symbiont inhabiting the macronucleus of *Paramecium caudatum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 459 – 462.

Schrallhammer, M., Galati, S., Altenbuchner, J., Schweikert, M., Görtz, H.-D. und Petroni, G. 2012. Tracing the role of R-bodies in the killer trait: Absence of toxicity of R-body producing recombinant *E. coli* on paramecia. *Eur. J. Protistol.* 48, 290 – 296.

Schrallhammer, M. und Schweikert, M. 2009. The killer effect of *Paramecium* and its causative agents. In: Fujishima, M. (Hrsg.). *Endosymbionts in Paramecium*. Microbiology Monographs, Vol. 12. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 227 – 246.

Schrallhammer, M., Schweikert, M., Vallesi, A., Verni, F. und Petroni, G. 2011. Detection of a novel subspecies of *Francisella noatunensis* as endosymbiont of the Ciliate *Euplotes raikovi*. *Microb. Ecol.* 61, 455 – 464.

Schweikert, M., Fujishima, M., und Görtz, H.-D. 2013. Symbiotic associations between ciliates and prokaryotes. In: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. und Thompson, F. (Hrsg.). *The prokaryotes: prokaryotic biology and symbiotic associations*. 4th Edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 427 – 463.

Seaman G.R., 1961. Some aspects of phagotrophy in *Tetrahymena*. *J. Protozool.* 8, 204 – 212.

Seljelid R., Gao Q., Berge A. und Ugelstad J., 1997. Biological effects of the immunomodulator β 1-3D polyglucose are strongly potentiated by conjugation to biodegradable microbeads. *Scand. J. Immunol.* 45, 683 – 687.

- Sharbati-Tehrani, S., Stephan, J., Holland, G., Appel, B., Niederweis, M. und Lewin, A. 2005. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 151, 2403 – 2410.
- Siegmund, L., Burmester, A., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. 2013. A model for endosymbiosis: Interaction between *Tetrahymena pyriformis* and *Escherichia coli*. *Eur. J. Protistol.* 49, 552 – 563.
- Siegmund, L., Schweikert, M., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. Bacterial surface traits influence the digestion of *Tetrahymena pyriformis* and alter the chances to escape from food vacuoles. Eingereicht beim *Journal of Eukaryotic Microbiology*, in Revision.
- Siegmund, L. und Wöstemeyer, J. 2016. Understanding bacterial uptake by protozoa: A versatile technique for surface modification of bacteria. *Endocyt. Cell Res.* 27, 17 – 21.
- Skovorodkin, I. N., Fokin, S. I. und Fujishima, M. 2001. Fates of the endonuclear symbiotic bacteria *Holospora obtusa* and *Holospora undulata* injected into the macronucleus of *Paramecium caudatum*.
- Sleigh, M. 1973. *The biology of protozoa*. Edward Arnold, London.
- Smith, C. D., Berk, S. G., Brandl, M. T. und Riley, L. W. 2012. Survival characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Helicobacter pylori* during passage through the free-living ciliate, *Tetrahymena* sp.. *FEMS Microbiol. Ecol.* doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01428.x
- Smith-Sonneborn, J. E. und Van Wagtendonk, W. J. 1964. Purification and chemical characterization of kappa of stock 51, *Paramecium aurelia*. *Exp. Cell Res.* 33, 50 – 59.
- Snelling, W. J., McKenna, J. P., Lecky, D. M. und Dooley, J. S. G. 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5560 – 5571.
- Soldo, A. T., Musil, G. und Brickson, S. A. 1993. The invasive nature of an infectious bacterial symbiont. *J. Euk. Microbiol.* 40, 33 – 36.

Sonneborn, T. M. 1943a. Gene and cytoplasm: I. The determination and inheritance of the killer character in variety 4 of *Paramecium aurelia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 29, 329 – 338.

Sonneborn, T. M. 1943b. Gene and cytoplasm: II. The bearing of the determination and inheritance of characters in *Paramecium aurelia* on the problems of cytoplasmic inheritance, pneumococcus transformations, mutations and development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 29, 338 – 343.

Sonneborn, T. M. 1950. The cytoplasm in heredity. Heredity 4, 11 – 36.

Springer, N., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. und Schmidt, H. 1996. *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the β -subclass of Proteobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 135, 333 – 336.

Springer, N., Ludwig, W., Amann, R., Schmidt, H. J., Görtz, H.-D. und Schleifer, K.-H. 1993. Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9892 – 9895.

Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrstruct. Res. 26, 31 – 43.

Steele, T. W. und McLennan, A. M. 1996. Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1081 – 1083.

Stephens, G. C. und Kerr, N. S. 1962. Uptake of phenylalanine by *Tetrahymena pyriformis*. Nature 194, 1094 – 1095.

Strahl, E. D., Gillaspay, G. E. und Falkingham III, J. O. 2001. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4432 – 4439.

- Summerton, J. E. 2005. Endo-Porter - A novel reagent for safe, effective delivery of substances into cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1058, 62 – 75.
- Thurman, J. Drinkall, J. und Parry, J. D. 2010. Digestion of bacteria by the freshwater ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Aquat. Microb. Ecol.* 60, 163 – 174.
- van Hoek, A. H. A. M., van Alen, T. A., Sprakel, V. S. I., Leunissen, J. A. M., Brigge, T., Vogels, G. D. und Hackstein, J. H. P. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Mol. Biol. Evol.* 17, 251 – 258.
- Vannini, C., Ferrantini, F., Ristori, A., Verni, F. und Petroni, G. 2012. Betaproteobacterial symbionts of the ciliate *Euplotes*: origin and tangled evolutionary path of an obligate microbial association. *Environ. Microbiol.* 14, 2553 – 2563.
- Venable, J. H. und Coggeshall, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25, 407 – 408.
- Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S. und AbuKwaik, Y. 1997. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.* 186, 537 – 547.
- Wiemann, M. und Görtz, H.-D. 1991. Identification and localization of major stage-specific polypeptides of infectious *Holospira obtusa* with monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.* 173, 4842 – 4850.
- Wilks, S. A. und Sleigh, M. A. 2004. Lectin binding sites on *Euplotes mutabilis* (Tuffrau, 1960) and the implications for food particle selection. *Eur. J. Protistol.* 40, 153 – 162.
- Wootton, E.C., Zubkov, M.V., Jones, D.H., Martel, C.M., Thornton, C.A. und Roberts, E.C., 2007. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. *Environ. Microbiol.* 9, 216 – 222.

Wright, C. S. 1984. Structural comparison of the two distinct sugarbinding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J. Mol. Biol.* 178, 91 – 104.

Wunderlich, F., Speth, V., Batz, W. und Kleinig, H. 1973. Membranes of *Tetrahymena* III. the effect of temperature on membrane core structures and fatty acid composition of *Tetrahymena* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 39 – 49.

Zhang, G. H., Gurtu, V. und Kain, S. R. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 702 – 711.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMCA	7-Amino-4-methyl-3-cumarinylacetat
Amp	Ampicillin
cfu	Koloniebildende Einheiten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-Dihydrochlorid
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Flouresceinisothiocyanat
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
LB	Luria-Bertani-Medium
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPY	Proteose-Pepton-Hefeextrakt-Medium
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VPI	Vakuolen pro Individuum

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Schematische Darstellung von <i>Tetrahymena pyriformis</i>	-9-
Abb. 2-2: Lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich kultivierter Individuen von <i>Tetrahymena pyriformis</i>	-10-
Abb. 2-3: Mikroskopische Aufnahmen eines axenisch kultivierten Individuums von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Färbung mit dem fluoreszierenden DNA Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).....	-11-
Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Zellteilung von <i>Tetrahymena pyriformis</i>	-11-
Abb. 2-5: Schematische Darstellung der Nahrungsvakuolenbildung bei <i>Tetrahymena pyriformis</i>	-14-
Abb. 2-6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Nahrungsvakuolen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> in verschiedenen Verdauungsstadien nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i>	-16-
Abb. 3-1: Plasmidkarte von pBS-neoTet.....	-43-
Abb. 3-2: Plasmid-Karte von pNeo4.....	-44-
Abb. 3-3: Plasmid-Karte von pNeo4-DsRed.....	-45-
Abb. 3-4: Plasmid-Karte von pEGFPNeo.....	-46-
Abb. 3-5: Semilogarithmische Darstellung der Lebendzellzahl von <i>Escherichia coli</i> gegen die Zeit.....	-56-
Abb. 3-6: Größenverteilung der kb-Leiter unter Angabe der prozentualen und absoluten Anteile der Banden im Gesamtgemisch.....	-65-
Abb. 4-1: Mikroskopische Aufnahmen eines Individuum von <i>Tetrahymena pyriformis</i> fünf Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i>	-66-
Abb. 4-2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer axenischen <i>Tetrahymena pyriformis</i> Kultur.....	-68-
Abb. 4-3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Escherichia coli</i>	-69-
Abb. 4-4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus einer Kurzzeitkokultur mit <i>Escherichia coli</i>	-70-

Abb. 4-5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus einer Langzeitkokultur mit <i>Escherichia coli</i> nach Paromomycinbehandlung.....	-72-
Abb. 4-6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus einer Langzeitkokultur mit <i>Escherichia coli</i>	-73-
Abb. 4-7: Graphische Darstellung des Hemmhofradius abzüglich des Lochradius gegen die Paromomycinkonzentration am Beispiel von <i>Escherichia coli</i> pNeo4 mit Promotorinduktor im Medium.....	-74-
Abb. 4-8: Graphische Darstellung der Entwicklung der Zellzahl/ml von <i>Tetrahymena pyriformis</i> über die Zeit nach Überführung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin.....	-76-
Abb. 4-9: Graphische Darstellung der überlebender Zellen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> (in Abhängigkeit vom Vortag) über die Zeit nach Überführung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin.....	-77-
Abb. 4-10: Mikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus verschiedenen Kulturen nach der Färbung mit dem Membranfarbstoff Nilrot.....	-80-
Abb. 4-11: Mikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus verschiedenen Kulturen nach der Färbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI.....	-81-
Abb. 4-12: Dokumentation der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben aus Zellniederschlag (A) und Kulturüberstand (B) nach DNase I Behandlung am Beispiel der Kokultur aus <i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> pNeo4 zwei Tage nach Applikation von 500 µg/ml Paromomycin.....	-82-
Abb. 4-13: Dokumentation der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Proben am Beispiel der Kokultur aus <i>Tetrahymena pyriformis</i> und <i>Escherichia coli</i> pNeo4 14 Tage nach Kultivierung in Medium mit 500 µg/ml Paromomycin.....	-83-
Abb. 4-14: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung mit FITC-gefärbten Mikropartikeln.....	-85-

Abb. 4-15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit neutralrotgefärbten Mikropartikeln (a und b) bzw. gefärbt mit Neutralrot nach der Fütterung mit Mikropartikeln (c und d).....	-86-
Abb. 4-16: Darstellung der Messpunkte mehrerer Wachstumskurven von <i>Tetrahymena pyriformis</i> unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.....	-88-
Abb. 4 -17: Semilogarithmische Darstellung der Wachstumskurven von <i>Tetrahymena pyriformis</i> unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.....	-89-
Abb. 4-18: Semilogarithmische Darstellung der Entwicklung des Titers von <i>Tetrahymena pyriformis</i> aus verschiedenen Kulturen über die Zeit.....	-91-
Abb. 4-19: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit unterschiedlich modifizierten Mikropartikeln.....	-93-
Abb. 4-20: Anzahl der mit Partikeln gefüllten Nahrungsvakuolen pro Individuum (VPI) von <i>Tetrahymena pyriformis</i>	-94-
Abb. 4-21: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I).-	97-
Abb. 4-22: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> während der Inkubation bei 10 °C nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I).....	-98-
Abb. 4-23: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> mit F-Plasmid (A bis C), ohne F-Plasmid (E bis F) und nach Reinfektion mit dem F-Plasmid (G bis I).....	-99-
Abb. 4-24: Aufnahmen von <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMCA.....	-100-
Abb. 4-25: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit einer unbehandelten Übernachtskultur von <i>Escherichia coli</i>	-101-

- Abb. 4-26: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit der Kontrollkultur von *Escherichia coli*...-102-
- Abb. 4-27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* 3 Stunden nach der Fütterung mit *Escherichia coli* (Kontrolle)...-103-
- Abb. 4-28: Lichtmikroskopische Aufnahmen und Mischbilder aus licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Emission: DsRed) von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* mit kovalent gebundenen Aminosäuren und Rinderserumalbumin.....-104-
- Abb. 4-29: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Ethylendiamin.....-105-
- Abb. 4-30: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Diaminopropan.....-106-
- Abb. 4-31: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Putrescin.....-106-
- Abb. 4-32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit putrescinbehandelten *Escherichiacoli*.....-107-
- Abb. 4-33: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Cadaverin.....-108-
- Abb. 4-34: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* drei Stunden nach der Fütterung mit cadaverinbehandelten Zellen von *Escherichia coli*.....-108-
- Abb. 4-35: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tetrahymena pyriformis* nach der Fütterung mit *Escherichia coli* nach der Kopplung mit Spermidin.....-109-

Abb. 4-36: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit spermidinbehandelten <i>Escherichia coli</i>	-110-
Abb. 4-37: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Spermin.....	-111-
Abb. 4-38: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> mit gekoppeltem Spermin.....	-111-
Abb. 4-39: Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit unterschiedlich modifizierten Bakterien und anschließender Neutralrotfärbung.....	-113-
Abb. 4-40: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Ethanolamin.....	-114-
Abb. 4-41: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Propylamin.....	-115-
Abb. 4-42: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Butylamin.....	-115-
Abb. 4-43: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Pentylamin.....	-116-
Abb. 4-44: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Hexylamin.....	-117-
Abb. 4-45: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Hexylamin.....	-118-

Abb. 4-46: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit Octylamin.....	-119-
Abb. 4-47: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit octylaminbehandelten Zellen von <i>Escherichia coli</i>	-120-
Abb. 4-48: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach der Kopplung mit 10 μ M Endo-Porter.....	-121-
Abb. 4-49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> Bakterien, behandelt mit 10 μ M Endo-Porter.....	-122-
Abb. 4-50: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach Kopplung mit 5 μ M Endo-Porter.....	-123-
Abb. 4-51: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach Kopplung mit 1 μ M Endo-Porter.....	-124-
Abb. 4-52: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> , gekoppelt mit 1 μ M Endo-Porter.....	-125-
Abb. 4-53: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> nach Behandlung mit 5 μ M Endo-Porter ohne Zugabe von EDAC.....	-125-
Abb. 4-54: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Tetrahymena pyriformis</i> drei Stunden nach der Fütterung mit <i>Escherichia coli</i> Bakterien, behandelt mit 5 μ M Endo-Porter ohne EDAC.....	-126-
Abb. 4-55: Balkendiagramm der mit Bakterien gefüllten Nahrungsvakuolen pro Zelle (VPI) in Abhängigkeit der verfütterten Bakterien.....	-128-

-
- Abb. 4-56: Balkendiagramm des prozentualen Anteils an Individuen von *Tetrahymena pyriformis* mit unvollständig verdauten Bakterien innerhalb von Nahrungsvakuolen in Abhängigkeit der gebundenen Substanz.....-130-
- Abb. 4-57: Balkendiagramm des prozentualen Anteils an Individuen von *Tetrahymena pyriformis* mit entkommenen Bakterien außerhalb von Nahrungsvakuolen in Abhängigkeit der gebundenen Substanz.....-131-

9 Anhang

9.1 Sequenzen für die Erstellung der Primer

9.1.1 Phosphoglyceratkinase-Gen

5`

1 gtggatttca atgtgccggt gaaggatggt caagtcaagg accctactcg tatctagga

61 tctatcccct ccattaagaa gatcttgaa tagaaccca agggctctcg tttgatgagt

121 cacttaggtc gtcccgatgg taacagagtc gaaaagcact ctatgaagcc tgctggtcct

181 aagctcgaat agttacttgg taccaaggta tagaatagct cataattcaa ttaaaaatta

241 ttaaaaatta tgatagcaag tacaatatct cgcgcgtttt caaataaaat aggttaaatt

301 cttgaatgac tgtgttggta aggatgtaga agaagctgtc aagtctagca gaaacggtga

361 aatcatttta cttgaaaact tgcgtttcca tgctgaagaa gaaggtaagt ccatcgacgc

421 tgctggtaac aaggtaataa atacaaatta aaactttttt ctaatagatt ctcctcccag

481 gattctcatt ttcatttgg tttatgaata actcaaatgt acatgaaatc catatagctt

541 aaatatgatg ttctaaaatt cactttgaaa aaatggattt ctaacagcac atcacttcac

601 ctccatgg agcaggggta tttaacacct atgtccaacg gagattcaga agaagtgatt

661 tcctgaacat gtttgtgagt attcaagaag tattctttta aaataaattc tcactttgaa

721 ctcatattta taagtacaat aaatctgctt gcctgatatg acaattatca acaatctagt

781 aaaagacaac aatttcatgt agaaataaaa tcaaataaag aaaacaaaca aggaatatac

841 tcgttgataa tattaatca ttattaatat catacttcta gctatgacac catacacata

901 gaaataaaat atctcatctc tcttagtata caataaagag aaggagtacc attacatatt

961 aatgatgcat gagcattcaa tacactattc atctcaccac ttaatattcc atttcttttt

1021 tacttcaatg agtatttcta cttaagctt aatactatga atcacctaac tattttgatg

1081 atagtttatt ggtatatttc ttctatcaat ttaagtgttt ttaggagcaa aaatttactt

9 Anhang

1141 aaatgatatg taaaagtata aattattaat tgaaatgaat tttagatag tgccaataga
1201 gttaaacata acaccaaaat aaagtagagt ctgttattaa tcgcactcac cattttaaac
1261 ctatagttaa taattgttta ctgttaattg ttaatagggt aaggctgacc ctaaggctgt
1321 taaggaattc agaaagtctt tgaccagttt gggtgacttg tacgttaacg atgctttcgg
1381 tactgctcat agagctcact cttccatggt tgggtgttgac cacaagatca gagctgctgg
1441 ttacctcttg aagaaggaat tagactactt tagcaaggct ttggaatctc ctaacagacc
1501 cttcttggtt gtcttgggtg gtgctaaggt caaggataaa atccaattga tcgaaagtat
1561 gattgacaag gttgatgaaa tgatcattgg tgggtggtatg gccttcacct tcttgaagag
1621 aattcacaat atggaaatcg gtaactctct tttcgatgaa gaaggttata agatcgttga
1681 ccaattactt gaaaaggcta aggctaaggg tgtcaagatc cacttgccctg tcgatttctt
1741 gtgcggcgat tccctcgaag ctaatgctaa cactcaaate cacgatttga tctctggtat
1801 ccctaagggt tggattggtt tggacgctgg tcccaagact atcgctttga atgctgatgc
1861 cgttgctcgt gccaacacta ttgtctggaa cggctctcaa ggtagattcg aagttgacaa
1921 gttcagataa ggttctgctg atttgctcaa gaggggttagc gctagaactg ctgctgggtgc
1981 tacctctatt attggtggtg gtgataccgt caacctcgtt caacaagaaa aggccactga
2041 taaggtcagc cacgtctcta ctgggtggagg agaa 3`

Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF001851.1#goto2109466_0, Zugriff am 15. 08. 2012, 15:35 Uhr.

Rot gefärbt und unterstrichen: Sequenz Primer 1

Blau gefärbt und unterstrichen: Template-Sequenz Primer 2.

9.1.2 Cytochrom-Oxidase Untereinheit I

```
5' 1 tacttttatt atttaaataa aataaaaaag ctatttactt atttaaacga ttttaagaaa
    61 catatattaa agaagtatgt ttatactatt aaccataaaa gaattgctat aaattattta
    121 tacttttagta tggtaacagg tttatcaggt gctgcactag caactatgat taggatggaa
    181 ttagcacacc ccggaagccc attttttaa ggagactcct taagatattt acaagtagtt
    241 acagcccacg gtttaattat ggtctttttt gttggtgttc ctattttatt tggtggtttt
    301 gcaaactttt taattccata tcatgtaggt tctaaagatg tagcataccc tagattaaat
    361 agtattgggtt tttgaataca accatgtggt tatattttat tagcaaaaat tggtttttta
    421 agacctcagt tttgaagata ttacgataaa acatcatttt cgttcccatt tttagaaaaa
    481 atgaaatata atcaatataa agaatataaa atgactattt tattttattt agatttttta
    541 aaaaaagaaa ttactgatga tcattctttt ttttgaaaag ctagaaaagt tattaaatta
    601 cctcaatatt cagttttttc cttcgtacca ttaaaattaa tgatgtgaaa aacaatgata
    661 aattaccctg aatctttttg atacgtgct agcagagttg tacaatcaag aagaaaaaaaa
    721 gtatttgtaa ctaaagtgtc tgctagaact ttaactacag ctggttgaac ttttataaca
    781 ccattcagtt caaatataaa atatacaggt gtaggttctc aagatatatt aattttatcc
    841 gtagtgtttg caggtattag tacaactata tcatttaca acttattaat tacaagaaga
    901 actttagcta tgccaggtat gagacataga agagttttaa tgcttttctg tactatatct
    961 atatttctaa cttaagaat gtttagctact attacaccag tattaggtgc agctgttatc
    1021 atgatggctt ttgatagaca ttgacaaact acattttttg aatacgetta cggagg 3'
```

Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU439228.1#goto291500335_0, Zugriff am 15. 08. 2012, 15:56 Uhr.

Rot gefärbt und unterstrichen: Sequenz des Primer 1

Blau gefärbt und unterstrichen: Template-Sequenz Primer 2.

9.1.3 Ampicillin-Resistenzgen

Ausschnitt aus der pBlueskript-Sequenz, die das Amp^R enthält:

```

5`
1921 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
1981 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct
2041 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg
2101 caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
2161 ccggaagggc cgagcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta
2221 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttgctg
2281 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg
2341 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct
2401 ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta
2461 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg
2521 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
2581 cggcgtaaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaagtg ctcatcattg
2641 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga
2701 tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg
2761 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaat
2821 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgct
2881 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca
2941 catttccccg aaaagtgcc c 3`

```

Quelle:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/58063?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=37&RID=VWA1GR1H013#goto58063_0](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/58063?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=37&RID=VWA1GR1H013#goto58063_0), Zugriff am 15. 08. 2012, 16:02 Uhr.

Rot gefärbt und unterstrichen: Sequenz des Primer 1

Blau gefärbt und unterstrichen: Template-Sequenz Primer 2.

9.1.4 Neomycinresistenzgen

Ausschnitt aus pNeo4:

```
5`  
3061 ttttttattc tttatataat ttaaaaaaat taaaaaaatt taataaagct ctaataaaat  
3121 aaataataat actaaactta aaataatgat tgaacaagat ggtttacacg ctggttctcc  
3181 cgccgcttgg gtcgaaagac ttttcggtta tgactgggct caacaaacca tcggttgctc  
3241 tgatgccgcc gtcttccgtc tttctgetca aggtcgtcct gttcttttcg tcaagaccga  
3301 ctttctcggc gcccttaatg aacttcaaga tgaagctgcc cgtctttctt ggcttgccac  
3361 caccggtggt ccttgcgctg ctgtccttga cgttgtcact gaagccggta gagactggct  
3421 tcttttaggt gaagtccccg gtcaagatct tctttcttct caccttgctc ctgccgaaaa  
3481 agtttctatc atggctgatg ctatgcgtcg tctcataacc cttgatcccc ctacctgccc  
3541 tttcgaccac caagccaaac atcgatcga acgtgctcgct actcgtatgg aagccggtct  
3601 tgtcgatcaa gatgatcttg acgaagaaca tcaaggtctt gccctgccc aacttttcgc  
3661 cagacttaag gcccgatgc ccgacggtga agatcttgct gtcacccatg gtgatgcctg  
3721 cttaccaaat atcatggttg aaaatggtcg ttttctcggc ttcacgact gtggtcgtct 3`
```

Quelle:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/188039076?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=10&RID=VWA1GR1H013#goto188039076_0](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/188039076?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=10&RID=VWA1GR1H013#goto188039076_0), Zugriff am 15. 08. 2012, 16:08 Uhr.

Rot gefärbt und unterstrichen: Sequenz Primer 1

Blau gefärbt und unterstrichen: Template-Sequenz Primer 2

10 Wissenschaftliche Publikationen und Beiträge

Die Dateien zu den wissenschaftlichen Publikationen finden sich auf der beigelegten DVD.

10.1 Publikationen mit korrespondierender Autorenschaft

Siegmund, L., Burmester, A., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. 2013. A model for endosymbiosis: Interaction between *Tetrahymena pyriformis* and *Escherichia coli*. Eur. J. Protistol. 49, 552 – 563.

Dürichen, H., Siegmund, L., Burmester, A., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. 2016. Ingestion and digestion studies in *Tetrahymena pyriformis* based on chemically modified microparticles. Eur. J. Protistol. 52, 45 – 57.

Siegmund, L. und Wöstemeyer, J. 2016. Understanding bacterial uptake by protozoa: A versatile technique for surface modification of bacteria. Endocyt. Cell Res. 27, 17 – 21.

Siegmund, L., Schweikert, M., Fischer, M. S. und Wöstemeyer, J. Bacterial surface traits influence the digestion of *Tetrahymena pyriformis* and alter the chances to escape from food vacuoles. Eingereicht beim Journal of Eukaryotic Microbiology, in Revision.

10.2 Publikationen mit Beteiligung

Wöstemeyer, J., Schimek, C., Wetzels, J., Burmester, A., Voigt, J., Schulz, E., Ellenberger, S. und Siegmund, L. 2016. Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycetes and Zygomycetes and in the Oophytes. In: Wendland, J. (Hrsg.). The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality, 3rd Edition. Springer International Publishing Switzerland, 203 – 234.

Ellenberger, S., Siegmund, L., Schuster, S. und Wöstemeyer J. 2016. Horizontal gene transfer between bacteria and protozoa: Gene-specific detection by combining different approaches in a new score-based algorithm. Endocyt. Cell Res. 27, 36 – 46.

Schulz, E., Siegmund, L., Voigt, J. und Wöstemeyer, J. 2016. Hyphal interactions: A simple technique for covalent modification of sexually committed aerial mycelia of the zygomycete *Zygorhynchus moelleri*. *Endocyt. Cell Res.* 27, 3 – 8.

Wöstemeyer, J., Siegmund, L. und Ellenberger, E. 2016. Understanding the establishment of endosymbionts in protozoa: Development of a laboratory model for *Tetrahymena pyriformis*. *Endocyt. Cell Res.* 27, 11 – 15.

Wöstemeyer, J., Ellenberger, S., Schulz, E., Siegmund, L., van Burgeler, A., Gerlitz, N., Burmester, A., Wetzel, J. und Voigt, J. 2016. Fusion parasitism between *Parasitella parasitica* and its host *Absidia glauca*: A system between sexuality and parasitism. *Endocyt. Cell Res.* 27, 24 – 32.

Schulz, E., Wetzel, J., Burmester, A., Ellenberger, S., Siegmund, L. und Wöstemeyer J. 2016. Sex loci of homothallic and heterothallic Mucorales. *Endocyt. Cell Res.* 27, 39 – 57.

10.3 Wissenschaftliche Beiträge auf Tagungen

Vorträge auf den Jahrestagungen der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie:

2013 (Zürich, Schweiz): *Tetrahymena pyriformis* and *Escherichia coli* in interaction: A model for endosymbiosis in ciliates

2015 (Magdeburg, Deutschland): Ingestion of bovine-serum-albumin-methacrylate microparticles in the ciliate *Tetrahymena pyriformis*

2016 (Saignelégier, Schweiz): The influence of surface modifications of *Escherichia coli* on ingestion and digestion of *Tetrahymena pyriformis*

2017 (Meißen, Deutschland): It's a surface matter – bacterial surface properties influence escape rates from food vacuoles of *Tetrahymena pyriformis*

Vorträge auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie 2016 (Jena, Deutschland):

- Surface modifications of *Escherichia coli* influence ingestion and digestion of the ciliate *Tetrahymena pyriformis*
- Microbe Slam: A novel model for endosymbiosis in Protozoa – oder: Wer macht was mit wem und wieso?

10.4 Bücher

Wöstemeyer, J. und Siegmund, L. Prüfungen erfolgreich bestehen im Fach Mikrobiologie. Erscheinung voraussichtlich im April 2017. UTB GmbH.

11 Curriculum vitae

Angaben zur Person

Name: Lisa Siegmund
Geburtsdatum und -ort: 17. April 1989, Gera
Adresse: Carolinenstr. 4
07747 Jena
E-Mail: Lisa-Siegmund@gmx.net,
Lisa.Siegmund@uni-jena.de
Telefon: 0151 155 020 44; 03641 5649511

Schulbildung: 1999 bis 2007 Friedrich-Schiller-Gymnasium
Eisenberg, Abschluss mit Abitur (Leistungskurse:
Deutsch, Biologie; Gesamtnote 1,4)
1995 bis 1999 Grundschule Heinrich Heine
Königshofen

Studium: 2007 bis 2012 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Immatrikulation im Wintersemester 2007/2008 im
Studiengang Biologie und Englisch, Lehramt
Gymnasium; Wintersemester 2008: Wechsel zum
Biologie-Diplomstudium mit Vertiefung in den
Fächern Spezielle Zoologie, Mikrobiologie und
Genetik;
Abschluss im Oktober 2012 mit der Diplomarbeit
zum Thema: „Die Interaktion zwischen
Tetrahymena pyriformis und *Escherichia coli* als
Modell für Endobiosen in Ciliaten.“ (Gesamtnote
1,2)

- Sprachkenntnisse:** Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend, 10 Jahre Schulunterricht, Cambridge Certificate in Advanced English)
Latein (Großes Latinum)
Italienisch (zwei Jahre als Arbeitsgemeinschaft am Gymnasium)
- Praktische Tätigkeiten:** 2004 bis 2009 Nachhilfelehrer beim Studienkreis Eisenberg für die Fächer Englisch, Latein und Mathematik
Wintersemester 2008, 2009 und 2010 Tutor für die Vorlesung Spezielle Zoologie an der FSU Jena
Wintersemester 2009 und 2010 Tutor für die Vorlesung Allg. Mikrobiologie an der FSU Jena
Sommersemester 2010 bis Sommersemester 2012 studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Allg. Mikrobiologie und Mikrobengenetik an der FSU Jena
- Berufserfahrung:** Seit Dezember 2012 angestellt als Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand am Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie und Mikrobengenetik an der FSU Jena.
- Lehrtätigkeit im Grundpraktikum Allgemeine Mikrobiologie (2 Semesterwochenstunden, jedes Semester)
 - Allgemeine Labortätigkeiten
 - Mikroskopische Untersuchung von Protozoen
 - Verfassen wiss. Publikationen

Datum und Unterschrift

12 Danksagung

Für die Unterstützung, die mir während der Arbeit an dieser Dissertation entgegengebracht wurde, möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieses Unterfangens beigetragen haben, in aller Herzlichkeit bedanken.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Johannes Wöstemeyer, der mir nicht nur ermöglicht hat, dieses doch etwas außergewöhnliche Thema zu bearbeiten, sondern konzeptionell und mit großer Unterstützung in allen erdenklichen Lebenslagen dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit einen Abschluss fand. Um es mit den Worten der Rot-Weiß-Essen-Ikone Willi „Ente“ Lippens zu sagen: Johannes, ich danke Sie!

Zudem danke ich meinem zweiten Betreuer Martin Fischer, der nicht nur mit konstruktiven Gesprächen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, sondern überhaupt die „Schuld“ daran trägt, dass aus mir doch ein Biologe und kein Lehrer wurde. Vielen Dank für Ihre Inspiration.

Außerdem gilt mein Dank Michael Schweikert, der mich nicht nur mit viel Geduld in die Geheimnisse der Transmissionselektronenmikroskopie einführte, sondern auch durch unendliche Mühen dafür sorgte, dass ich Stuttgarts Neckarbrücken nur von oben kennenlernen musste. Vielen Dank, Mike, ich hoffe, es klappt irgendwann mal wieder.

Mein weiterer Dank gilt Anke Burmester für die Konstruktion der Plasmide und die stets hilfreichen Ratschläge und konstruktiven Beiträge im allmontäglichen Zygoclub.

Ebenso danke ich meinen Mitstreitern Emilia Schulz und Sabrina Ellenberger. Sind wir mal ehrlich, der Wahnsinn erträgt sich leichter, wenn man ihn teilt. Ich danke euch.

Mein Dank gilt auch meiner ehemaligen Masterstudentin Hendrike Dürichen, die durch ihre herausragenden Leistungen maßgeblich zum Erfolg des Projekts beigetragen hat.

Viel Dank für die konspirativen Sitzungen im Diplomandenzimmer geht an Jana Wetzels, Nadja Gerlitz, Alexander van Burgeler und Jürgen Voigt.

Ein Dankeschön geht auch an Christina Ruhnke, Martin Breuer, Ulrike Wolf und Irene Wöstemeyer für die schönen freizeithlichen Ablenkungen, die im Rahmen eines solchen Unterfangens doch wahrhaft nötig sind.

Außerdem – in diesem Fall vermögen keine Worte die Dankbarkeit zum Ausdruck zu bringen – danke ich meinen Eltern Gerold und Marina sowie meiner Schwester Cindy für absolut alles, was sie für mich getan haben und vor allem dafür, dass sie mich zu dem machten, was ich bin.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist, dass die hier vorliegende Dissertation selbstständig von mir angefertigt wurde und dabei nur die von mir aufgelisteten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen verwendet wurden, dass in dieser Arbeit keine Textabschnitte oder Daten von Dritten ohne deren Kennzeichnung übernommen worden sind, dass mich folgende Personen bei der Auswertung und Auswahl des Materials unterstützt haben:

Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer

Prof. Dr. Martin S. Fischer

PD Dr. Michael Schweikert

PD Dr. Anke Burmester,

dass die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, erhalten haben, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, dass ich weder die gleiche, noch in wesentlichen Teilen identische Arbeit oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Datum und Unterschrift