



Universität für Bodenkultur Wien
Department für Wald- und Boden-
wissenschaften

Wolbachia pipientis:

ein kleiner Endosymbiont mit großer Wirkung

Wolfgang Arthofer



Wolbachia - was ist das?

- **α - Proteobakterium**
 - obligat intrazellulär
 - nicht kultivierbar
 - 0.5 - 1.8 μm Durchmesser
 - 1 – 1.5 Mbp Genomgröße (*E. coli*: 4.7 Mbp)
 - ‚Rickettsiae‘ und Ur-Mitochondrien
- **Besiedelt vorzugweise die Keimbahn**
- **Wird maternal und selten horizontal weitergegeben**
- **Wirte: viele Arthropoden**



Ein historischer Überblick

- 1924 Hertzig & Wolbach: Nachweis intrazellulärer Bakterien im Moskito *Culex pipientis*
- 1950er Ghelelovitch, Laven: Kreuzungsinkompatibilität bei *Culex*
- 1970er Yen & Barr: *Wolbachia* durch Antibiotikatherapie eliminiert und als Ursache der Inkompatibilität erkannt
- 1990er DNA-Analyse erlaubt neue Wege zum Nachweis und zur phylogenetischen Analyse



Auswirkungen auf die Fortpflanzung der Wirte

- **Reduzierte Fitness**
- **Thelytoke Parthenogenese**
- **Feminisierung**
- **Male Killing**
- **Cytoplasmische Inkompatibilität (CI)**



Thelytoke Parthenogenese

- Tritt nur bei Hymenopteren auf
- Arrhenotokie bei Hymenopteren:
 - befruchtete Eier = diploide Zellen = ♀
 - unbefruchtete Eier = haploide Zellen = ♂
- *Wolbachia* führt zum Abbruch der ersten mitotischen Teilung in der Anaphase
- Es entsteht ein diploider Kern (♀) bei unbefruchteten Eiern
- Keine Wirkung auf befruchtete Eier
- ♂ werden für die Reproduktion nicht mehr benötigt



Feminisierung

- Zumeist bei Isopoden (*Armadillidium vulgare*) beobachtet
- Hormon der androgenen Drüse für Maskulinisierung verantwortlich
- Ohne Drüsenwirkung entstehen ♀
- Bildung der Drüse wird bei infizierten Embryonen verhindert
- Intersexuelle Phänotypen bei künstlicher Infektion adulter ♂
- Ähnliche Effekte bei manchen Protisten-Infektionen



Male killing

- Bei mehr als 20 Insektenarten beschrieben
- Von verschiedenen Bakterienstämmen verursacht (*Spiroplasma*, *Flavobacteria* etc.)
- ♂ Embryonen sterben während der frühen Entwicklung ab
- Mechanismus weitgehend ungeklärt
- 2 Modellorganismen:
Adalia bipunctata
Acraea encedon



Cytoplasmische Inkompatibilität (CI)

- Häufigster Phänotyp von *Wolbachia*
- Führt zu einem typischen Fortpflanzungsmuster:

	♂	♂
♀	○	X
♀	●	●

♂ ♀ nicht infiziert
♂ ♀ infiziert

CI: der Mechanismus

- In jedem Fall normale Befruchtung der Eizelle
- Paternale Chromosomen infizierter ♂ zeigen nach der Befruchtung ein abnormales Verhalten (keine Kondensation)
- Dadurch stirbt Embryo bei diploiden Organismen zumeist schon während der ersten mitotischen Teilung ab
- Haplodiploide Organismen (z. B. *Nasonia*) entwickeln sich zu ♂
- Spermien enthalten – im Gegensatz zu Eiern – selbst keine *Wolbachia*-Zellen



CI: der Mechanismus

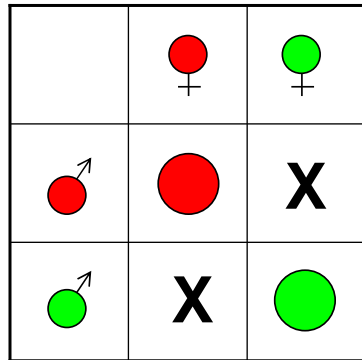
- ‚Modifikation‘ der reifen Spermien vermutlich auf Protein-Ebene
- ‚Rettung‘ dieser Spermien durch die infizierte Eizelle
- **mod – resc – Mechanismus**

mod+ resc+	Verursachen CI
mod- resc-	Verursachen keine CI
mod- resc+	Verursachen selbst keine CI, können aber modifizierte Spermien retten
mod+ resc-	nicht möglich

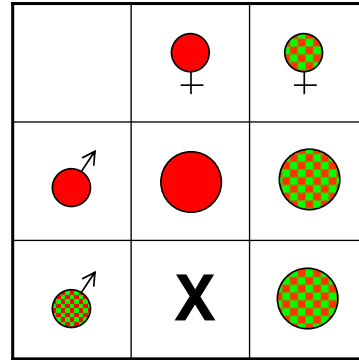


CI und Doppel- / Mehrfachinfektionen

bidirektional



unidirektional



CI und Infektionsdynamik I

- Infizierte Eier haben einen Fertilisationsvorteil gegenüber nicht infizierten
- Tatsächlicher Vorteil wird bestimmt durch
 - Fitness der infizierten Individuen
 - Transmission von infiziertem ♀ auf Eizellen
 - Expressionsstärke der CI
- Niedrige Infektionsraten – geringe Eintrittswahrscheinlichkeit von CI-Effekten
- Rasche Ausbreitung und Fixierung über Grenzwert

CI und Infektionsdynamik II

- Koevolution *Wolbachia* – Wirt
 - Starke CI und schwache Transmission bei frisch infizierten Populationen
 - Schwache CI und starke Transmission nach langem Kontakt
- Verlust des Endosymbionten durch
 - Auftreten von mod- resc+ Mutanten
 - Verdrängung durch neue, unidirektional inkompatible Stämme
- Bidirektionale CI – Motor der Artenbildung ?
 - Keine Co-Cladogenese: Dauer eines Infektionszyklus deutlich geringer als Dauer einer Artbildung

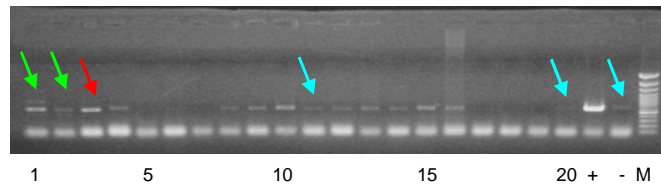


Wolbachia - Diagnostik

- Auftreten ungewöhnlicher Geschlechtsverteilungen in Populationen
- Klassische PCR: Nachweis in 16 – 22 % aller Insektenarten
- long PCR: 76 % von 63 untersuchten Arthropodenarten sind infiziert
- *in situ* Hybridisierung mit DNA-Sonden zum Ausschluss von infizierten Endoparasiten
- Immunostaining



Test auf *Wolbachia* mittels long PCR



- Amplifizierung des Oberflächenproteingens *wsp*
- Mehrfachbanden →
- Abweichende Produktgrößen →
- Sehr schwache Banden →

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



wsp in situ Hybridisierung



negativ



positiv

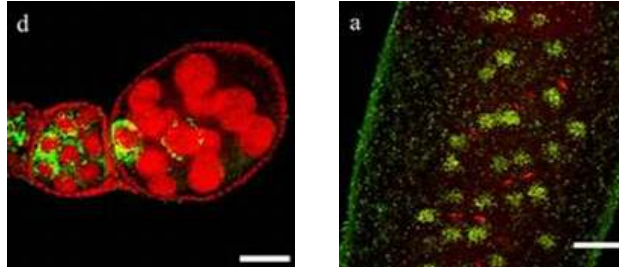
Drosophila simulans

- Präparation von frischem ovarialen Gewebe
- DIG-markierte *wsp* spezifische Sonde, Färbung mittels NBT/BCIP

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



Immunostaining



Oogenese
Rhagoletis cerasi

Embryo
Foto: M. Riegler, PNAS 2004

- Färbung mit spezifischen Antikörpern
- Zellkerne = rot, *Wolbachia* = grün

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



Wolbachia und Insekten-Phylogenetik

- mtDNA einer der beliebtesten genetischen Marker
- Mitochondrien wie *Wolbachia* maternal weitergegeben
- Phylogenetische Rekonstruktion problematisch wenn ♂ und ♀ Geschichte einer Spezies unterschiedlich sind
- In frisch infizierter Population setzt sich die mtDNA der ersten *Wolbachia* tragenden ♀ durch: ‚Hitchhiking‘

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



Phylogenetische Interpretation der mtDNA

Diversität	klassische Interpretation	alternative Interpretation
niedrig innerhalb Population	bottleneck	rezente <i>Wolbachia</i> -Ausbreitung
hoch innerhalb Population	große, alte Population	mehrere Stämme verhindern Durchmischung
niedrig zwischen Populationen	kontinuierlicher genetischer Austausch	Homogenisierung durch gleichzeitige Infektion
hoch zwischen Populationen	lange Isolation	Isolation der mtDNA durch CI bei nuklearem Genfluss

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



Sind mtDNA-Phylogenien falsch ?

- *Wolbachia* war zu jeder Zeit in min. 20 % aller Insektenpopulationen vorhanden
- Ähnliche Effekte wie von *Wolbachia* werden auch von anderen Endosymbionten verursacht
- Nachweis der Abwesenheit von Endosymbionten schwierig
- Aktuelle Abwesenheit des Endosymbionten sagt nichts über vergangene Infektionszyklen aus

mtDNA als alleiniger genetischer Marker ist jedenfalls mit äusserster Vorsicht zu behandeln!

Wolbachia pipientis | 24. November 2006 | Wolfgang Arthofer



Anwendungspotentiale

- Alternative zur SIT (sterile insect technique)
- Ersatz schädlicher Insektenpopulationen durch weniger problematische mittels bidirektionaler Inkompatibilität
- Einbringung neuer Eigenschaften in eine Insektenpopulation durch Coinfektion der selektierten Tiere mit *Wolbachia*



Weiterführende Literatur

- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., and Hurst G.D.D. (1999) *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annual Reviews in Microbiology* 53, 71-102.
- Werren J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Reviews in Entomology* 42, 587-609.
- Jiggins F.M., Bentley J.K., Majerus M.E.N., and Hurst G.D.D. (2001) How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 268, 1123-1126.
- Jiggins F.M. (2003) Male-Killing *Wolbachia* and Mitochondrial DNA: Selective Sweeps, Hybrid Introgression and Parasite Population Dynamics. *Genetics* 164, 5-12.
- Werren J.H. and Windsor D.M. (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London, B* 267, 1277-1285.
- Jeyaprakash A., and Hoy M.A. (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9, 393-405.
- Hurst G.D.D., and Jiggins F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effect of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 272, 1525-1534.
- Riegler M., Charlat S., Stauffer C., and Mercot H. (2004) *Wolbachia* Transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: Investigating the Outcomes of Host-Symbiont Coevolution. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 273-279.





Universität für Bodenkultur Wien

Department für Wald und Bodenwissenschaften

Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz



Universität für Bodenkultur Wien
Department für Wald- und Boden-
wissenschaften

Wolfgang Arthofer

<http://www.peerart.at/aw>

Hasenauerstraße 38, A-1190 Wien
wolfgang.arthofer@boku.ac.at

