

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Max-Planck Institut für chemische Ökologie
Abteilung für Bioorganische Chemie



seit 1558

**Der Einfluss einer Salicin-haltigen Nahrung auf das
Darmmikrobiom von *Spodoptera littoralis***

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science
vorgelegt von
Christian Seiffert
aus Kirchen / Sieg
Jena, März 2016

Gutachter:

Prof. Dr. Wilhelm Boland

Prof. Dr. Erika Kothe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Insektendarm als mikrobielles Ökosystem.....	1
1.2 Das Darmmikrobiom von <i>Spodoptera littoralis</i>	3
1.3 Salicin – das Basismolekül der phenolischen Glykoside.....	3
1.4 Zielstellung.....	4
2. Material.....	5
3. Methoden	6
3.1 Fütterungsexperimente mit <i>Spodoptera littoralis</i>	6
3.1.1 Artificial Diet	6
3.1.2 Messung der Gewichts- und Größenentwicklung.....	7
3.1.3 Antibiotika-behandelte <i>Artificial Diet</i>	7
3.1.4 Fütterungs-Experiment für Mitteldarm-Sequenzierung.....	7
3.2 Massenspektroskopische Untersuchungen	8
3.2.1 Probenvorbereitung	8
3.2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie (HPLC-MS/ESI).....	8
3.2.3 HPLC-Hochauflösungs-Massenspektroskopie (HRMS)	8
3.3 Beimpfung eines LB-Mediums mit einem Mitteldarm.....	9
3.4 Analyse des Darmmikrobioms.....	9
3.4.1 Darmsektion	9
3.4.2 DNA-Extraktion.....	9
3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	10
3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	11
3.4.5 Sequenzierung	11
3.5 Isolierung und Sequenzierung eines Salicin-verwertenden Darmbakterienstammes	12

3.5.1	X-Gal-Assay	12
3.5.2	Isolierung.....	12
3.5.3	DNA-Extraktion.....	12
3.5.4	Sequenzierung des unbekanntes Bakterienstamms	12
4.	Ergebnisse	13
4.1	Der Effekt von Salicin auf die Fitness von <i>Spodoptera littoralis</i>	13
4.2	Massenspektroskopische Untersuchung der Salicin-Derivate	14
4.2.1	Identifizierung der Salicin-Derivate	14
4.2.2	Überprüfung der bakteriellen Beteiligung des Salicin-Metabolismus mittels Antibiotika-behandelter Nahrung	21
4.2.3	Beimpfung eines Salicin-haltigen Mediums mit einem Mitteldarm	22
4.3	Isolierung eines Salicin verwertenden Darmbakterienstammes.....	24
4.3.1	X-Gal Assay	24
4.3.2	LC-MS Analyse der Salicin-Verwertung des unbekanntes Bakterienstamms	25
4.3.3	Identifizierung des isolierten Bakterienstamms	27
4.3.3	Sequenzierung des Darmmikrobiom.....	28
5	Diskussion	31
5.1	Salicin hat einen negativen Effekt auf die Fitness von <i>Spodoptera littoralis</i> ..	31
5.2	Die identifizierten Metaboliten Salicins	31
5.3	Ein Salicin-verwertender <i>Enterococcus</i> -Stamm.....	33
5.4	Darmmikrobiom.....	35
6	Fazit	36
7	Ausblick.....	37
	Literaturverzeichnis.....	38
	Danksagung	42

Eigenständigkeitserklärung..... 43

1. Einleitung

1.1 Der Insektendarm als mikrobielles Ökosystem

Insekten sind wahrscheinlich die artenreichste Klade der Metazoa (Basset *et al.*, 2012). Einer der Hauptgründe dafür, scheinen die zahlreichen mutualistischen Interaktionen mit Mikroorganismen zu sein. Diese dienen in vielerlei Hinsicht als Helfer für den Wirt, indem sie z.B. unerschließbare Nahrung verdaulich machen, sich an der intra- und interspezifischen Kommunikation beteiligen oder den Wirt vor Parasiten oder Pathogenen schützen. Die größte mutualistische Bedeutung wird der mikrobiellen Gemeinschaft des Verdauungstraktes nachgesagt. Das dort herrschende Ökosystem gilt als einer der Hauptmediatoren für die enorme Diversität an Lebensweisen von Insekten (Engel & Moran, 2013). Die mutualistische Beziehung zwischen Wirt und einigen Darmbakterien ist so stark ausgeprägt, dass sich das Genom des Bakteriums stark reduziert und das Genspektrum an die spezifischen metabolischen Prozesse des Wirts anpasst (Wernegreen, 2002). Die Basisstruktur des Darms ist bei den vielen Insektenspezies ähnlich. Sie besteht aus den drei primären Einheiten Vorderdarm, Mitteldarm und Enddarm (Chapman, 1998) (siehe Abbildung 1). Der Mitteldarm ist der primäre Ort der Verdauung und der Nährstoffaufnahme (Terra, 1990; Terra & Ferreira, 1994). Er entsteht, im Gegensatz zu Vorder- und Enddarm, aus Zellen endodermalen Ursprungs (Engel & Moran, 2013). Die Epithelzellen des Mitteldarms sezernieren eine Schleimschicht, die als peritrophische Matrix, bzw. Membran, bezeichnet wird und den Mitteldarm in einen endo- bzw. ektoperitrophischen Raum aufteilt. Kleine Poren erlauben die Diffusion von Enzymen und kleinen Molekülen von verdauter Nahrung. Gleichzeitig schützt die Membran die Epithelzellen vor mechanischen Schäden durch grobe Nahrungspartikel, gegen toxische Substanzen oder gegen eine Invasion von Mikroben (Shao *et al.*, 2001). Die Darmbakterien befinden sich dementsprechend auf der ektoperitrophischen Seite und haben somit keinen direkten Kontakt mit den Darmepithelzellen. Jedoch produzieren einige Spezies der *Coleoptera* oder Ameisen keine peritrophische Matrix und weisen endosymbiotische Bakterien auf (Cook & Davidson, 2006; Nardi & Bee, 2012).

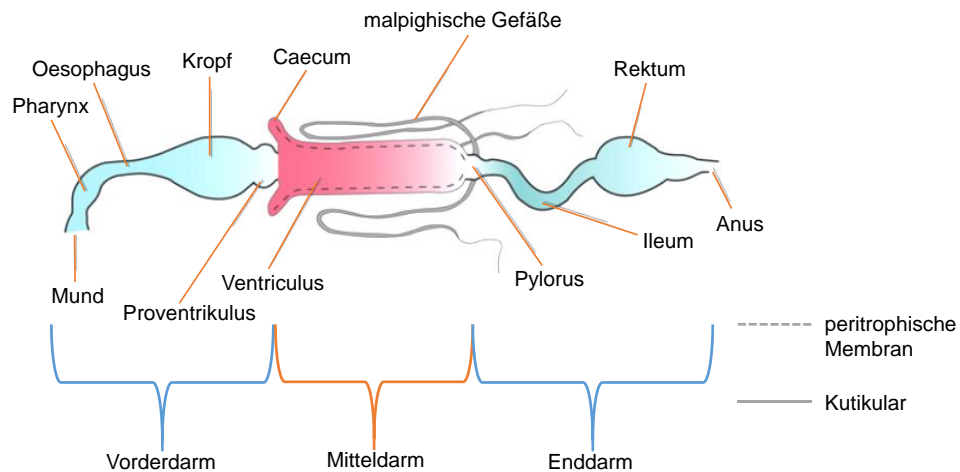


Abbildung 1: Verallgemeinerte Struktur eines typischen Verdauungstrakts von Insekten (verändert nach Engel & Moran, 2013).

Der Verdauungstrakt stellt v.a. bei holometabolen Insekten ein instabiles Habitat für Bakterien dar. So wird der Vorder- und Hinterdarm bei jeder Häutung und damit auch die jeweilige Mikrobengemeinschaft erneuert, während im Mitteldarm der regelmäßige Ab- und Aufbau der peritrophischen Matrix für eine rasche Änderung der mikrobiellen Gemeinschaft sorgt. Adulte holometabole Insekten weisen unmittelbar nach dem Puppenstadium, infolge der Auflösung und Neubildung der inneren Organe, keine Bakterien in ihrem Verdauungstrakt auf (Moll *et al.*, 2001). Aufgrund des Ausbleibens von Häutungen, bieten der Vorder- und Enddarm ab dem Adult-Stadium stabile Bedingungen, um eine beständige Darmgemeinschaft zu entwickeln.

Ein weiterer Faktor in der Besiedlung des Darms, sind die dort herrschenden physikochemischen Bedingungen. Mitteldärme von Lepidopteren weisen eine extreme Alkalinität auf (pH = 11-12) (Appel & Martin, 1990; Harrison, 2001). Diese extremen Bedingungen werden als eine Adaption interpretiert, um aufgenommene Proteine leichter von gebundenen Tanninen zu spalten (Berenbaum, 1980) bzw. um Hemicellulose leichter aus pflanzlichen Zellwänden zu extrahieren (Terra, 1988). Jedoch sind sie auch ein Ausschlusskriterium für eine Vielzahl von Mikroben (Engel & Moran, 2013). Komposition, Ausmaß, Lokalisation und Funktion variieren immens zwischen den Insektenspezies. So befinden sich im Darmtrakt einer Honigbiene ca.

10^9 Bakterien (Martinson *et al.*, 2012), während im Darmtrakt einer adulten *Drosophila melanogaster* ca. 10^5 Bakterien vorkommen (Ren *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2010).

1.2 Das Darmmikrobiom von *Spodoptera littoralis*

Der Afrikanische Baumwollfalter *Spodoptera littoralis* ist ein polyphager Pflanzenfresser. Als Schädling ist er jährlich Auslöser von hohen Landwirtschaftlichen Schäden (El-Minshawy & Zeid, 1972). Die Untersuchungen von Tang *et al.* (2012) zeigten, dass *S. littoralis* eine sog. Kerngemeinschaft an Darmbakterien aufweist, die aus Enterokokken, Clostridien und Lactobacilli besteht. Im ersten Larvalstadium finden sich im Verdauungstrakt ausschließlich *E. faecalis* und *E. casseliflavus*. Mit der Larvalentwicklung steigt die Diversität und *E. mundtii* wird zur dominanten Spezies. Mit der Vergrößerung des Darmdurchmessers in der Larvalentwicklung, entstehen größere anaerobe Bereiche, in denen sich Clostridien nach 6 Tagen ansiedeln. Tang schlussfolgerte aus seinen Untersuchungen, dass die entdeckte Kerngemeinschaft von Darmbakterien wichtig für die Physiologie von *S. littoralis* ist.

1.3 Salicin – das Basismolekül der phenolischen Glykoside

Salicin gehört zu der Stoffgruppe der phenolischen Glykoside, die über 20 weitere Moleküle umfassen. Sie kommen natürlich in den Weidengewächsen (*Saliaceae*) vor, zu denen die Gattungen der Pappeln (*Populus*) und der Weiden (*Salix*), sowie die auf Nordostasien begrenzten Gattungen *Chosenia* und *Toisusu* zählen (Egloff, 1982). Die phenolischen Glykoside genießen seit weit mehr als 100 Jahre, aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung, große Aufmerksamkeit. Salicin wurde, als erstes phenolisches Glykosid, bereits 1828 aus der Weidenrinde extrahiert (Buchner, 1828). Die Behandlung von Schmerzen und Fieber mit Weidenrindeextrakten reichen sogar bis zu Hippokrates (460-377 v. Chr.) zurück (Wagner *et al.*, 2003). Die Grundstruktur der phenolischen Glykoside besteht aus einer β -D-Glucopyranosid-Gruppe, die über das anomere C-Atom an Salicylalkohol geknüpft ist. Salicin ist das einfachste phenolische Glykosid und besteht aus dieser Grundstruktur (Boeckler *et al.*, 2011).

Die phenolischen Glykoside liegen in den Pflanzengeweben als Ester vor. Durch den Angriff der Zellkompartimente, werden diese durch einen alkalischen pH oder durch

pflanzliche Enzyme abgebaut. Die unveresterten phenolischen Glykoside wirken abschreckend bis toxisch auf generalistische Insekten (Lindroth & Pajutee, 1987; Lindroth & Peterson, 1988; Ruuhola & Julkunen-Tiitto, 2003; Tahvanainen *et al.*, 1985).

1.4 Zielstellung

Die Untersuchung der Wirkung von natürlichen Insektiziden, wie den phenolischen Glykosiden, auf generalistische Schädlinge, wie *S. littoralis*, ist von wirtschaftlicher Bedeutung. Es ist wichtig zu verstehen, inwiefern diese Substanzen Insekten beeinträchtigen. Dies kann auf einer direkten toxischen Wirkung auf den Organismus, oder indirekt, durch die Beeinträchtigung von wichtigen Faktoren für die Physiologie, basieren.

Ein Großteil der bisherigen Studien über die Effekte phenolischer Glykoside, beschäftigen sich mit natürlich vorkommenden Kompositionen der *Salicaceae*, jedoch kaum mit den individuellen Effekten einzelner phenolischer Glykoside.

Die Bachelorarbeit soll aufzeigen, ob Salicin einen Effekt auf die *Performance S. littoralis* hat und worauf dieser beruht. Außerdem soll diese Arbeit einen ersten Überblick über den möglichen Metabolismus von Salicin in generalistischen Insekten geben und die Beteiligung von Mikroorganismen klären.

2. Material

1 kb DNA Ladder	New England BioLabs Inc.
10x PCR Rxn Buffer	Invitrogen
2-Hydroxybenzylalkohol	Fluka
2-Hydroxybezylalkohol	Fluka
4-Nitrophenyl- β -D -glucopyranosid	Roth
50 mM MgCl	Invitrogen
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D- galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ain Vitamine Mixture	MP Biomedicals LLC
Ampicillin-Natriumsalz	Calbiochem®
D (-)-Salicin	Alfa Aesar
dNTPs	Invitrogen
Gel Loading Dye Purple (6x), no SDS	New England BioLabs Inc.
Keimöl	Mazola
L-Ascorbinsäure	Sigmar-Aldrich
LB-Agar	Roth
LB-Medium (Lennox)	Roth
L-Leucin	Roth
Midori Green	Nippon Genetics Europe GmbH
phosphatgepufferte Salzlösung	Roth
Primer 1492R	Sigma-Aldrich
Primer 27F	Sigma-Aldrich
Salicylsäure	Sigma-Aldrich
Salicylursäure	Roth
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
Tetracyclinhydrochlorid	Roth
Todd Hewitt Bouillon	Roth

Vitamin E	Fluka
β --Glucosidase	Sigmar-Aldrich
β -Sitosterol	Sigma-Aldrich

3. Methoden

3.1 Fütterungsexperimente mit *Spodoptera littoralis*

Die *Spodoptera littoralis*-Eier wurden von der Syngenta Crop Protection Münchwilen AG (Schweiz) bezogen (Tang *et al.*, 2012) und in einer Box mit künstlicher Nahrung, zubereitet nach Spiteller (2000), bei 14 °C gelagert. Ab dem Erreichen des ersten Larval-Stadiums, wurden die Larven bei 23 – 25 °C gehalten (Tang *et al.*, 2012) bei einer Belichtungsphase von 16 Stunden und einer Dunkelphase von acht Stunden (Spiteller *et al.*, 2000). Die p-Werte wurden mit IBM SPSS Statistics mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Fehlerindikatoren entsprechen einem Konfidenzniveau von 95 %.

3.1.1 Artificial Diet

Die experimentell genutzte *Artificial Diet* wurde wie folgt hergestellt:

250 g Limabohnenmehl; 4,5 g Ascorbinsäure; 5 g Ain Vitamine Mixture; 0,5 g β -Sitosterol; 0,5 g L-Leucin; 5 g Vitamin E-Lösung (5 g Vitamin E/70 ml Mazola Öl); 400 ml Reinstwasser; ca. 2 Stunden Aufquellen des Gemischs; 7 g Agar-Agar; weitere 200 ml Reinstwasser

Die Limabohnen wurden von der Huber-Mühle (Ichenheimer Str. 2, 77749 Hohberg) gemahlen.

Die Salicin-haltige *Artificial Diet* enthält zusätzlich ca. 9,064 g Salicin (1,03 %). Dies entspricht der Salicin-Konzentration in maskulinen Blätter von *Salix fragilis* (Guvenc *et al.*, 2007), die bevorzugte Weide des Weiden- und Pappelblattkäfer *Chysomela populi* (Urban, 2006). Das Rezept wurde abgeändert nach Bergomaz und Boppre (1986) bzw. Spiteller (2000).

3.1.2 Messung der Gewichts- und Größenentwicklung

Um die Auswirkung von Salicin auf die Fitness von *Spodoptera littoralis* zu untersuchen, wurden jeweils 20 Larven pro Messreihe mit Salicin-haltiger *Artificial Diet* gefüttert (bzw. *Artificial Diet* ohne Salicin als Kontrolle). Zu Experimentbeginn befanden sich die Larven im zweiten Larval-Stadium. Die Larven wurden auf einer Feinwaage gewogen und mit einem Lineal vermessen bis sie das Puppenstadium erreichten. Es wurden drei Messreihen durchgeführt.

3.1.3 Antibiotika-behandelte *Artificial Diet*

100 mg Ampicillin und 15 mg Tetracyclin wurden in je 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Jeweils 5,75 µl der Ampicillin- und 9,6 µl der Tetracyclin-Lösung wurden gleichmäßig über 9 g Salicin-haltiger *Artificial Diet* pipettiert. Die Nahrung wurde entsprechend täglich frisch zubereitet.

3.1.4 Fütterungs-Experiment für Mitteldarm-Sequenzierung

Um den Einfluss von Salicin auf das Darmmikrobiom zu untersuchen, wurde einer Gruppe von Larven drei Tage *Artificial Diet* ohne Salicin und anschließend fünf Tage Salicin-haltige *Artificial Diet* zum Fraß gegeben. Zwischen dem Wechsel zur Salicin-haltigen Nahrung (T1.1 für *engl. Treatment1.1*) und nachdem die Larven fünf Tage Salicin-haltige Nahrung gefressen hatten (T1.2 für *engl. Treatment1.2*), wurden jeweils von fünf Mitteldärme entnommen. Bis zur DNA-Extraktion (siehe 3.4) wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle wurden Larven verwendet, die über den kompletten Zeitraum *Artificial Diet* ohne Salicin zum Fraß bekamen (C1.1 bzw. C1.2 für *engl. Control1.1 bzw. Control1.2*).

3.2 Massenspektroskopische Untersuchungen

3.2.1 Probenvorbereitung

Für die HPLC-MS- bzw. HPLC-HRMS-Messungen wurden jeweils ca. 50 mg Fäzes von Larven im 4.-5. Larvalstadium eingewogen und mit je 500 µl Methanol fünf Minuten in einem SPEX® SamplePrep 2010 Geno/Grinder® bei 1210 rpm homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben zehn Minuten lang bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden 200 µl Überstand zu 800 µl Methanol gegeben.

3.2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie (HPLC-MS/ESI)

Die vorbereiteten Fäzes-Proben wurden mit einem Agilent HP1100 HPLC-System, ausgestattet mit einer Hibar-Trennsäule (250 × 4 mm, Purospher STAR, RP-18 endcapped, 5 mm), gemessen. Die ersten fünf Minuten wurden 1 ml/min eines Gemisches bestehend aus 97 % Laufmittel A (0,1 % Methansäure, gelöst in Wasser) und 3 % Laufmittel B (0,1 % Methansäure, gelöst in Acetonitril) durch die Säule gepumpt. In den folgenden 30 Minuten wurde die Konzentration von Laufmittel B in einem Gradienten auf 60 % gesteigert. Anschließend wurde die Konzentration von Laufmittel B auf 100 % erhöht. Die Fraktionen wurden mittels programmierter Gradientenelution mit einem Thermo Finnigan LCQ mithilfe von Elektrospray-Ionisation im negativen Modus (ESI⁻) (Kapillartemperatur: 275 °C; Quellenstromstärke: -100 mA; Kapillarspannung: -44 V) massenspektroskopisch gemessen.

3.2.3 HPLC-Hochauflösungs-Massenspektroskopie (HRMS)

Die HPLC-HRMS-Analyse wurde mit einem Dionex UltiMate 3000 HPLC-System gekoppelt an einem Bruker Maxis Ultrahigh Resolution (UHR) qTOF-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) bedient im negativen Modus. Die chromatographische Trennung geschah mittels einer Hibar-Trennsäule (250 × 4 mm, Purospher STAR, RP-18 endcapped, 5 mm) bei einer Flussrate von 400 µl/min und einer Gradientenelution mit 3 % wässrigem

Acetonitril in den ersten 5 min gefolgt von einem linearen Gradienten bis 100 % Acetonitril innerhalb von 35 min mit 0,5 % Ethansäure als Zusatzmittel.

3.2.4 Synthese von 2-Hydroxybenzyl- β -D-Glucopyranosid (Isosalicin)

Es wurden 0,6 g 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid; 1,235 g Salicylalkohol und 24 mg β -Glucosidase in 20 ml Phosphatpuffer (pH 5) gelöst und 24 Stunden bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 5 min gekocht und anschließend für 1 h bei -80 °C inkubiert und im Anschluss gefriergetrocknet. Übrig blieben 5,22 g in CHCl_3 -unlösliche Kristalle, die auf einem Kieselgel chromatographiert wurden ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$) und farblos wurden (Kurashima *et al.*, 2004).

3.3 Beimpfung eines LB-Mediums mit einem Mitteldarm

Der Mitteldarm einer Larve im fünften Larvalstadium wurde in 10 ml sterilem LB-Medium mit einer Salicin-Konzentration von 0,5 mg/ml (mittels Rotilabo®-Spritzenfilter (Porengröße: 0,22 μm) sterilisiert) inkubiert und ca. 20 Stunden schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein gleiches LB-Medium unter selbigen Bedingungen ohne Mitteldarm inkubiert. 100 μl des Mediums wurden zu 500 μl Methanol pipettiert und im Anschluss bei 4 °C 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Davon wurden dann 200 μl des Überstands zu 800 μl Methanol pipettiert. Die HPLC-MS-Messung wurde wie in 3.2.2 beschrieben durchgeführt.

3.4 Analyse des Darmmikrobioms

3.4.1 Darmsektion

Nachdem die Raupen ca. 20 min auf Eis gekühlt wurden, wurden sie dreimal mit destilliertem Wasser und 70 % Ethanol gewaschen (Tang *et al.*, 2012). Es wurde nur der Mitteldarm sezirt. Jeweils fünf Mitteldärme pro Gruppe wurden gemeinsam in einem steilen Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) bei -80 °C bis zur DNA-Extraktion gelagert.

3.4.2 DNA-Extraktion

Die bakterielle DNA wurde mittels eines MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, nach Anweisung des Herstellers mit einigen Modifikationen, isoliert.

Zu den Proben C1.2/T1.2 wurden je 900 µl Tissue and Cell Lysis Solution und 3 µl Proteinkinase K hinzugefügt. Zu den Proben C1.1/T1.1 wurden je 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution und 1 µl Proteinkinase K gegeben. Anschließend wurden die Proben in einem SPEX® SamplePrep 2010 Geno/Grinder® bei 1210 rpm 1 min homogenisiert und folgend 3 min bei 500 rpm zentrifugiert. Je 300 µl des Überstands wurden anschließend 15 min bei 65 °C inkubiert, während sie in Abständen von fünf Minuten in einem Vortexmischer kurz geschüttelt wurden. Daraufhin wurden die Proben wenige Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurden jeweils 1 µl einer 5 µg/µl RNase A-Lösung hinzu pipettiert, woraufhin die Proben für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben 3-5 min auf Eis abgekühlt und folgend jeweils 150 µl des MPC Protein Precipitation Reagent hinzu pipettiert und gevortext. Daraufhin wurden die Proben zehn Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, zu dem Überstand wurden 500 µl Isopropanol pipettiert und ca. 30 – 40 Mal invertiert. Anschließend wurden die Überstände erneut zehn Minuten lang bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das gewaschene DNA-Pellet wurde dann in 35 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die DNA-Konzentration wurde mittels eines GE NanoVue Spectrophotometer bestimmt und auf ca. 20 ng/µl verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifizierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurde das Primer-Paar 27f (59-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-39) und 1492r (59-GGTTACCTTGTTACGACTT-39) verwendet (Tang *et al.*, 2012).

Für 2,5 µl Probe wurden 38 µl Reinstwasser, 5 µl 10x PCR Rxn Buffer, 1 µl dNTPs, 2 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl Primer 27f, 0,5 µl Primer 1492r und 0,5 µl Taq DNA Polymerase pipettiert. Als Positiv-Kontrolle wurde Zellmaterial von *E.coli* und als Negativ-Kontrolle 2,5 µl Reinstwasser verwendet. Die PCR wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt: 94 °C 3 min, gefolgt von 30 Zyklen von jeweils 45 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 1 min 72 °C. Die finale Elongation fand bei 72 °C für 8 min statt.

3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für ein 1 %iges Agarose-Gel wurde 0,5 g Agarose in 50 ml Laufpuffer (50x TAE-Puffer/dest. Wasser = 1:5) gelöst und 2 µl Midori-Green hinzu pipettiert.

Nach der Auspolymerisierung des Gels, wurde zu den Proben jeweils 10 µl Ladepuffer in die PCR-Tubes pipettiert und anschließend je 10 µl davon in die Geltaschen pipettiert. Für den Marker wurden je 4 µl 1 kb DNA Ladder, Gel Loading Dye Purple (6x) und Laufpuffer zusammen pipettiert und anschließend 10 µl in die entsprechende Geltasche pipettiert. Die amplifizierte DNA wurde 25 min bei 150 V und 120 mA elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung erfolgte in einer „Biometra BDR-5 BioDoc Analyse“-Dunkelkammer.

3.4.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden je 20 µl der Proben, mit einer DNA-Konzentration von 20 ng/µl, an MR DNA (Molecular Research LP) nach Shallowater, 79363 Texas geschickt. Dort wurden die Proben mithilfe eines HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) für die PCR vorbereitet. Für die anschließende PCR wurde das gleiche Primer-Paar wie in 3.4.3 beschrieben verwendet. Die PCR wurde mit folgenden Programm durchgeführt: 3 min 94 °C, gefolgt von 28 Zyklen von jeweils 30 sec 94 °C, 40 sec 53 °C und 1 min 72 °C, anschließend folgte ein finaler Elongations-Schritt bei 72 °C für 5 min. Nach der PCR wurden alle Amplifikationsprodukte der Proben auf die gleiche Konzentration verdünnt und mittels Agencourt Ampure Beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde mittels einer bakteriellen 16S-basierten *tag-encoded FLX amplicon*-Pyrosequenzierung (bTEFAP®) durchgeführt. Die Methode wurde u.a. von Dowd *et al.* (2008) beschrieben. Für die Sequenzierung wurde ein Roche 454 FLX Titanium-Sequencer verwendet. Die Sequenzierung geschah nach den Leitlinien des Herstellers. Es wurden ausschließlich 16s rRNA-Gene sequenziert. Die Sequenzierungsrohdaten wurden von Mr.DNA über eine firmeneigene Analyse-Pipeline prozessiert. Die Rohdaten-Analyse wird in ‚*Functional divergence in gastrointestinal microbiota in physically-separated genetically identical mice*‘ (Rogers *et al.*, 2014) beschrieben.

3.5 Isolierung und Sequenzierung eines Salicin-verwertenden Darmbakterienstammes

3.5.1 X-Gal-Assay

250 µl X-Gal wurden in 500 ml autoklaviertem Agar (0,5 mg/ml Salicin) gelöst. Anschließend wurden daraus 10 Platten gegossen, die für das folgende Experiment verwendet wurden.

3.5.2 Isolierung

Es wurde eine Bakteriensuspension aus einem Mitteldarm einer Larve im sechsten Larvalstadium hergestellt. Dafür wurde ein Mitteldarm in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelegt und mehrfach invertiert. 25 µl einer 1:100-Verdünnung der Suspension wurden auf einem LB-Medium (0,5 µl/ml X-Gal; 0,5 mg/ml Salicin) ausplattiert. Anschließend wurde das beimpfte Medium für zwei Tage bei 27 °C inkubiert. Mittels dreifachem Ausstrich mit einer Impföse wurde anschließend eine Bakterienkolonie isoliert, bei der die Farbreaktion des X-Gal-Essays positiv war. Zur Überprüfung der Salicin-Verwertung wurde etwas Zellmaterial in THB-Medium (0,5 mg/ml Salicin) über Nacht inkubiert und anschließend mittels HPLC-MS/ESI analysiert. Als Kontrolle diente ein entsprechendes unbeimpftes Medium bzw. ein beimpftes THB-Medium ohne Salicin. Die Messung wurde wie in 3.2.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.3 DNA-Extraktion

Für die PCR wurde Zellmaterial von der isolierten Reinkultur verwendet. Die PCR und die Gelelektrophorese wurden wie in 3.4.3 und 3.4.4 beschrieben durchgeführt. Die DNA wurde anschließend aus dem Agarose-Gel extrahiert. Dafür wurde ein Invisorb® Fragment CleanUp-Kit der Firma Stratec Molecular benutzt. Die Durchführung entsprach den Anweisungen des Herstellers.

3.5.4 Sequenzierung des unbekanntes Bakterienstammes

Die extrahierte DNA-Proben wurde zur Sequenzierung an *Eurofins Genomics* geschickt. Dort wurden die 16s rRNA-Gene mittels nach Sanger sequenziert. Die sequenzierte Sequenz wurde mittels BLAST® mit den Nukleotid-Datenbanken abgeglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Der Effekt von Salicin auf die Fitness von *Spodoptera littoralis*

Die Graphen der drei Messreihen der Gewichts- und Größenmessungen zeigen, dass die Zunahme des Körpergewichts und der Körpergröße der mit Salicin gefütterten Larve geringer ist. In der ersten und dritten Messreihe unterscheiden sich die Mittelwerte der Behandlungs- und Kontrollgruppe erst in der letzten Messung vor der Verpuppung signifikant voneinander, während die Larven in der zweiten Messreihe konstant signifikant größer und schwerer waren (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Drei Larven der Behandlungsgruppe (n = 60) und zwei Larven der Kontrollgruppe (n = 60) starben während der Messreihen. Damit stieg die Mortalität um 1,67 %.

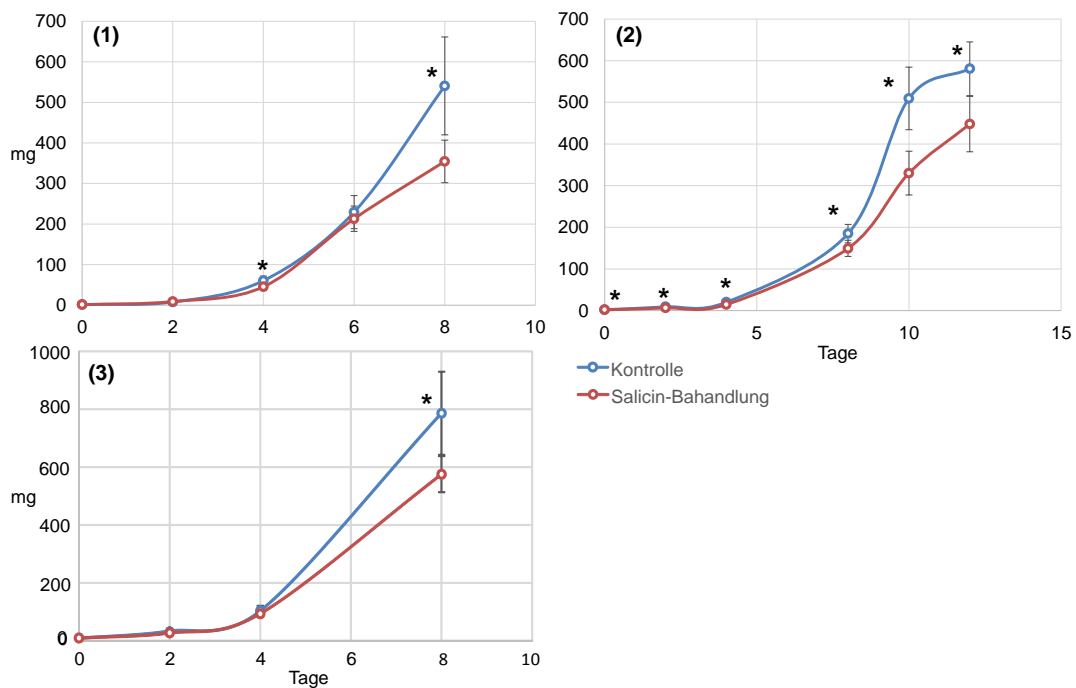


Abbildung 2: Die Gewichtszunahme der *Spodoptera littoralis*-Larven. Die Kontrollgruppe wird durch den blauen Graphen dargestellt, die Behandlungsgruppe durch einen roten Graphen. *: p-Wert < 0,05.

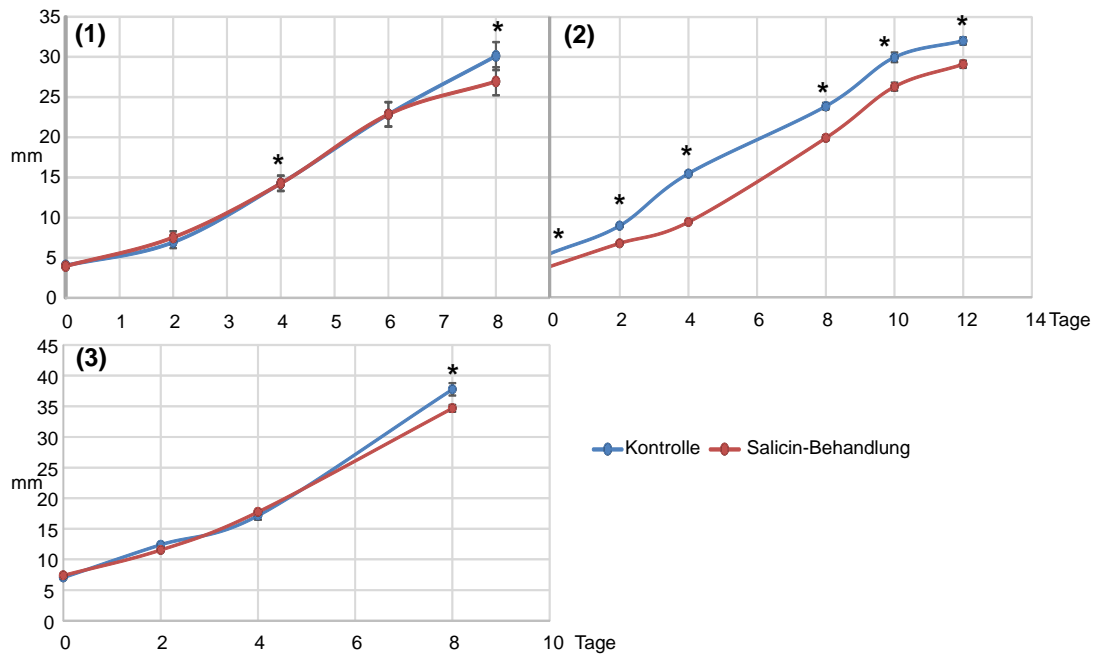


Abbildung 3: Größenzunahme der *Spodoptera littoralis*-Larven. Der rote Graph wurde mit der Experiment-Gruppe ermittelt, der blaue Graph mit der Kontroll-Gruppe. *= p-Wert < 0,05.

4.2 Massenspektroskopische Untersuchung der Salicin-Derivate

4.2.1 Identifizierung der Salicin-Derivate

Die Chromatogramme der Behandlungsgruppe wiesen beständig vier Peaks auf, die sich nach etwa 13,79; 15,29; 20,27 und 24,11 min aus der Trennsäule lösten. Die gemessene Retentionszeit (RT) des Salicin-Standards beträgt 13,95 Minuten (siehe Abbildung 4).

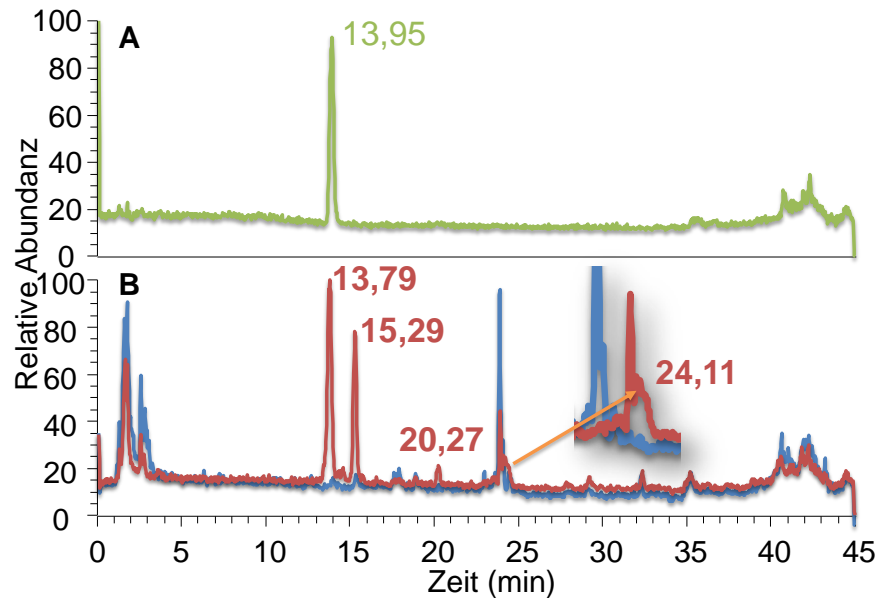


Abbildung 4: Die mittels HPLC ermittelte Chromatogramme des Salicin-Standards (A) bzw. der Fäzes-Proben (B) der EG (rot) und der KG (blau).

In dem Massenspektrum des Peaks nach 13,79 Minuten finden sich Pseudo-Molekülonen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 202,97; 331,01; 488,49 und 615,93 m/z. Bis auf die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse 202,97 und 488,49 m/z entsprechen die restlichen Werte denen des Salicin-Standards nach 13,95 min. Das Ion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 331,01 m/z entspricht einem deprotoniertem Konjugat aus Salicin (Molekulargewicht (MW) = 286,28 g/mol) und dem Laufmittel Methansäure (MW = 46 g/mol). Das Pseudo-Molekülon, mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 202,97 m/z, konnte mittels LC-MS/MS zu Produkt-Ionen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 123,01; 96,95 und 80,92 m/z fraktioniert werden (siehe Abbildung 5, F). Letzteres entspricht dem Molekulargewicht eines negativ geladenem Salicylalkoholmoleküls. Freier Salicylalkohol konnte nicht identifiziert werden. Das Pseudo-Molekülon mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 488,49 m/z entspricht einem möglichen Addukt aus deprotoniertem Salicin (MW: 286,28 – 1 g/mol) und dem Salicylalkohol-enthaltenen Pseudo-Molekülon (202,97 m/z).

Der zweite charakteristische Peak der Behandlungsgruppe nach einer RT von 15,29 min zeigte Pseudo-Molekülonen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 285,8; 330,8 und 570,66 m/z. Hier erscheinen ebenfalls zwei Pseudo-Molekülonen

mit ähnlichen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis wie die des Salicin-Standards, allerdings unterscheidet sich die Retentionszeit stark. Der dritte charakteristische Peak der Behandlungsgruppe weist Pseudo-Molekülonen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 193,98; 239,66 und 388,69 m/z auf (siehe Abbildung 5, D). Der letzte Peak weist Ionen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse von 136,97 und 182,75 m/z auf (siehe Abbildung 5, E).

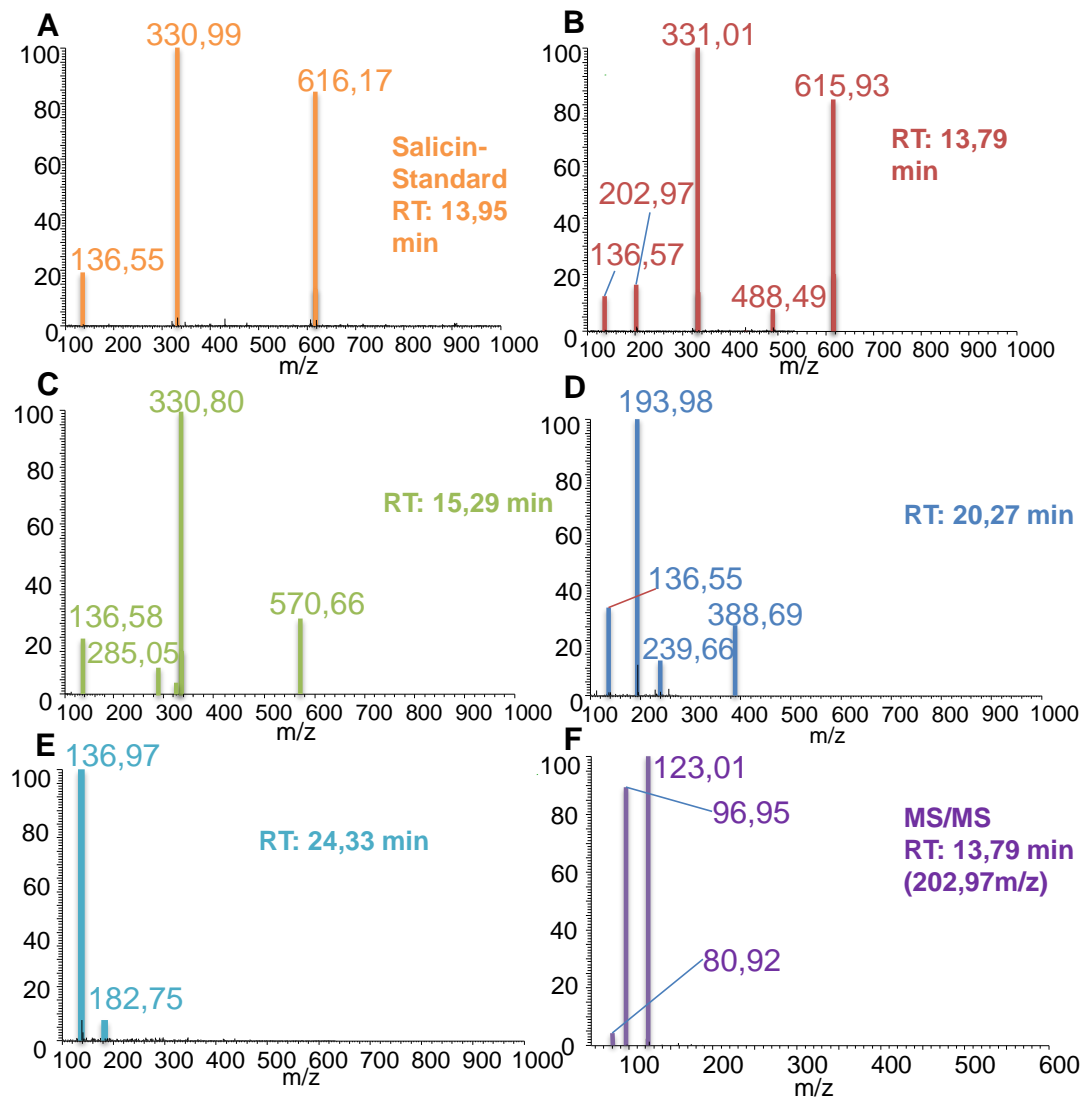


Abbildung 5: Die Massenspektren des Peaks nach 13,95 min des Salicin-Standards (100 µg/ml) (A) bzw. der charakteristischen Peaks der EG (B-D) bzw. die Fragmentierung des Molekülonen nach 13,79 min und 202,97 m/z mittels MS/MS (F). Die Masse/Ladungs-Verhältnisse wurden mittels ESI-ermittelt.

Anschließend wurden die Fäzes-Proben der Larven mittels einer hochauflösenden ESI-MS/MS (LC-HRMS/MS), gekoppelt an einem HPLC-System, analysiert. Die analogen Peaks, zu denen mit einer RT von 15,29 und 20,27 min in der HPLC haben bei dieser Methode eine RT von 8,7 und 12,9 min. Die ermittelten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Pseudo-Molekülonen betragen nach 8,7 min 179,05561; 285,09731; 444,18706 und 571,20162 m/z. Nach 12,9 Minuten wurden Ionen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 150,05650; 194,04542; 295,09331 und 389,09917 m/z detektiert (siehe Abbildung 6).

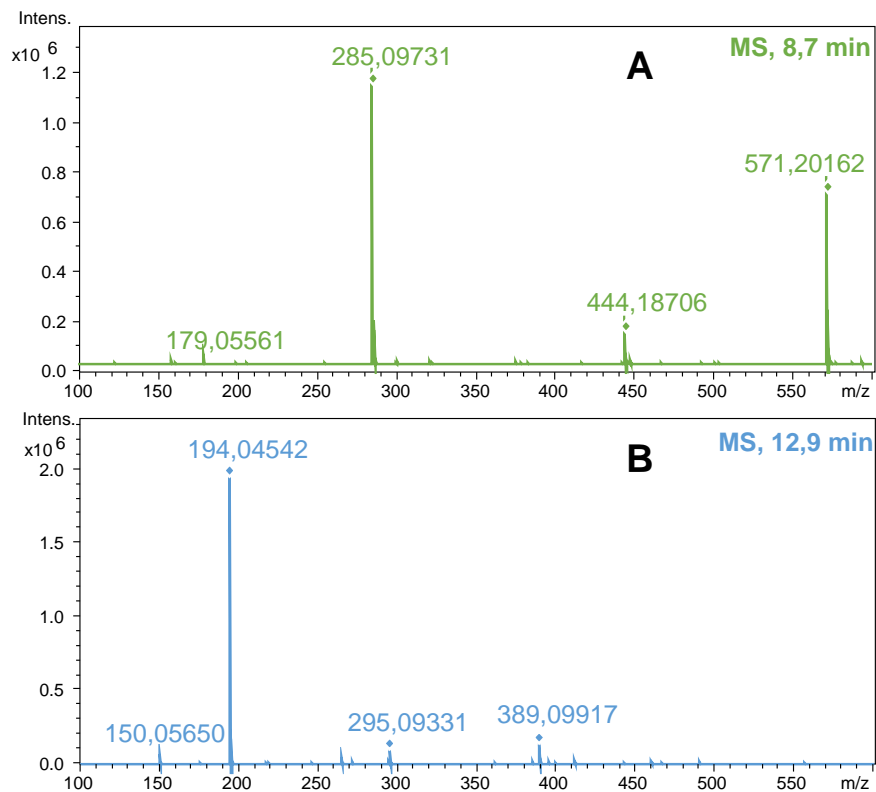


Abbildung 6: Die Massenspektren der Peaks, die mittels HRMS nach 8,7 (A) und 12,9 Minuten (B) ermittelt wurden. Sie sind analog zu den Peaks, die mit der HPLC nach 15,29 und 20,27 Minuten ermittelt wurden.

Die Fraktionierung mittels LC-HR-MS/MS des Precursor-Ions mit einer RT von 8,7 min und einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 571,20160 m/z ergab Produkt-Ionen mit Masse-zu-Ladung-Verhältnissen von 179,05628 und 285,09762 m/z. Das Pseudomolekül-Ion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 389,09918 m/z und einer RT von 12,9 min zerfiel zu Produkt-Ionen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 150,05655 und 194,04592 m/z. Eine erneute LC-HR-MS/MS-

Analyse fraktionierte letzteres Produkt-Ion zu einem Produkt-Ion zweiter Generation mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 150,05602 m/z bei einem Massenspektrum von 100-600 m/z (siehe Abbildung 7).

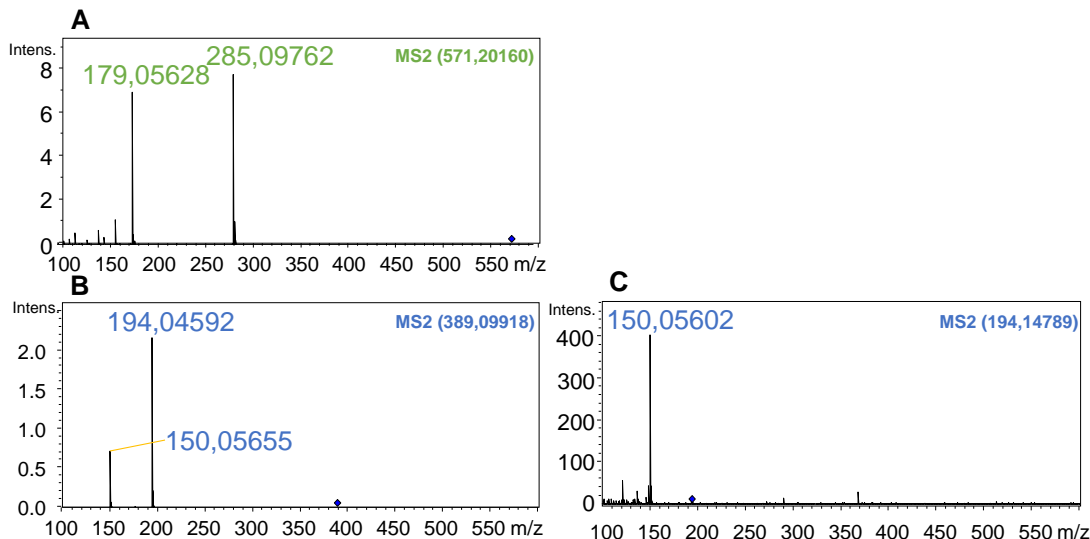


Abbildung 7: mittels LC-HRMS/MS ermittelte Massenspektren (A) des fraktionierten Pseudo-Molekülionen mit RT von 8,7 min und Masse/Ladungs-Verhältnis von 571,20160 m/z (siehe **Abbildung 6**), bzw. der fraktionierten Pseudo-Molekülionen mit einer RT von 12,9 min und einem Masse/Ladungs-Verhältnis von (B) 389,09918 bzw. (C) 194,14789 m/z.

Die mittels HRMS/MS kalkulierten Summenformeln der detektierten Pseudo-Molekülionen nach 8,7 min RT lauten $C_{26}H_{35}O_{14}$ ($m/z = 571,20162$), $C_{13}H_{17}O_7$ ($m/z = 285,09731$) und $C_6H_{11}O_6$ ($m/z = 179,0561$). Zweiteres entspricht einem deprotonierten Salicin-Molekülion. Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeit zum Salicin-Standard (siehe Abbildung 4), könnte es sich um eine Isoform von Salicin handeln. Das Ion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 571,02162 m/z entspricht einem Dimer zweier möglicher Isosalicin-Molekülen. Die geschätzte Summenformel des Produktions mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 179,05628 m/z entspricht deprotonierter Glucose (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Die mittels LC-HRMS/MS ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), sowie die entsprechenden ermittelten (deprotoniert) der Pseudo-Moleküllionen nach 15,29 min.

m/z	Ermittelte Summenformel	Delta (ppm)
571,20162 (M ₂ + H)	C ₂₆ H ₃₅ O ₁₄	2,81
285,09731 (M)	C ₁₃ H ₁₇ O ₇	2,33
179,05628	C ₆ H ₁₁ O ₆	-0,92

Die geschätzten Summenformeln des Massenspektrums des Peaks nach 12,9 min lauten C₁₈H₁₇N₂O₈ (m/z = 389,09917), C₉H₈NO₄ (m/z = 194,04542) und C₈H₈NO₂ (m/z = 150,0571). Die Summenformel C₉H₈NO₄ entspricht deprotonierter Salicylursäure, ein Konjugat aus Salicylsäure und Glycin. Die Summenformel des Pseudo-Moleküllions mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 389,09917 m/z entspricht einem Dimer zweier Salicylursäure-Moleküle. Die Summenformel des Pseudo-Moleküllions mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 150,0571 m/z entspricht decarboxylierter Salicylursäure (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Die mittels LC-HRMS/MS ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), sowie die entsprechenden ermittelten (deprotoniert) der Pseudo-Moleküllionen nach 20,27 min.

m/z	Ermittelte Summenformel	Delta (ppm)
389,09917 (M ₂ H)	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₈	-0,34
194,04542 (M – H)	C ₉ H ₈ NO ₄	2,35
150,0571	C ₈ H ₈ NO ₂	-7,02

Anschließend wurden die Retentionszeiten eines 2-Hydroxybenzyl-β-D-glucopyranosid-Standards (Isosalicin) und eines Salicylursäure-Standards mittels HPLC-MS/ESI ermittelt. Zusätzlich wurde eine Fäzes-Probe der EG gemessen (siehe Abbildung 8). Nach der Extraktion des Chromatogramms nach den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 285-286 und 330,5-331,5 m/z zeigt das Chromatogramm des Isosalicin-Standards einen Base-Peak nach 15,47 min RT an. In der Fäzes-Probe erscheint der Base-Peak nach 14,06 min und ein weiterer Peak, mit einer relativen Abundanz von ca. 60 % des Base-Peaks, nach 15,46 min RT. Letzterer entspricht der RT des Isosalicin-Standards.

Nach der Extraktion der Masse-zu-Ladungsverhältnisse im Bereich von 193,5-

194,5 m/z, zeigt sich in dem Salicylsäure-Standard ein deutlicher Peak nach 20,37 min und in der Fäzes-Probe ein Peak nach 20,40 min. Folglich entspricht die RT des letzten charakteristischen Peaks der RT von Salicylsäure (siehe Abbildung 8).

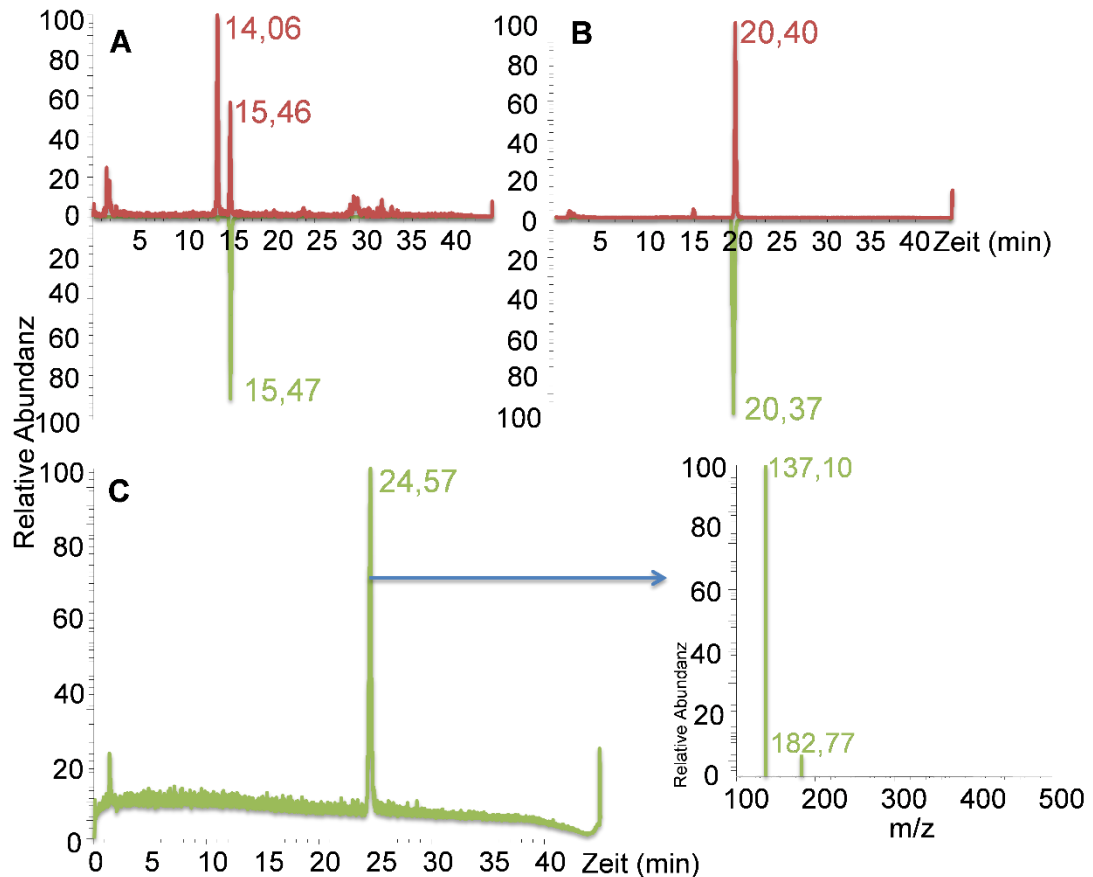


Abbildung 8: Chromatogramme des A Isosalicin-Standards (grün) und B Salicylsäure-Standards (grün) verglichen mit einer gemessenen Fäzes-Probe von *Spodoptera littoralis* und C das Chromatogramm des gemessenen Salicylsäure-Standards und das Massenspektrum des Peaks nach 24,57 min.

Den Base-Peak mit einer relativen Abundanz von 100 repräsentiert Salicin. Vergleicht man die relative Abundanz der drei identifizierten Metabolite und von Salicin miteinander, dann hat Salicin einen Anteil von 42,2 %, Isosalicin 32,5 %, Salicylsäure 14,3 % und Salicylsäure 11 % (siehe Abbildung 9).

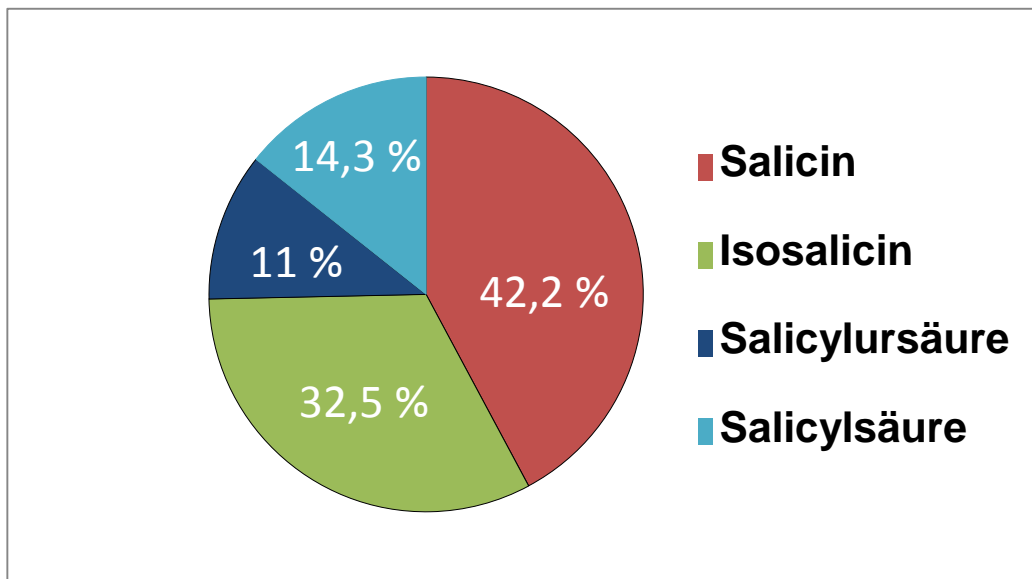


Abbildung 9: Die relativen Anteile der einzelnen gemessenen und identifizierten Peaks, die durch Salicin hervorgerufen werden.

4.2.2 Überprüfung der bakteriellen Beteiligung des Salicin-Metabolismus mittels Antibiotika-behandelter Nahrung

Um die bakterielle Unterstützung des Salicin-Metabolismus zu überprüfen, wurden *S. littoralis*-Larven mit einer Antibiotika-behandelten Salicin-haltigen *Artificial Diet* gefüttert (0,575 mg Ampicillin + 0,96 mg Tetracyclin pro 9 g *Artificial Diet*). Die Kontrollgruppe bekam unbehandelten, Salicin-haltige *Artificial Diet* als Nahrung. Anschließend wurden die Fäzes mittels HPLC-MS/ESI analysiert. Nach der Extraktion der Chromatogramme nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen im Bereich von 193,5-194,5; 285-286 und 330,5-331,5 m/z, erscheint ein Peak nach 13,78 min (Behandlungsgruppe) bzw. nach 13,82 min (Kontrollgruppe). Der zweite Peak zeigt sich nach 15,25 min bzw. nach 15,20 min, während der letzte Peak eine RT von 20,28 min bzw. 20,21 min hat (siehe Abbildung 10). Die Chromatogramme der Behandlungs- und der Kontrollgruppe weisen damit alle drei charakteristischen Peaks auf, die in den Fäze-Proben der mit Salicin gefütterten Larven gemessen werden konnten (vgl. Abbildung 4).

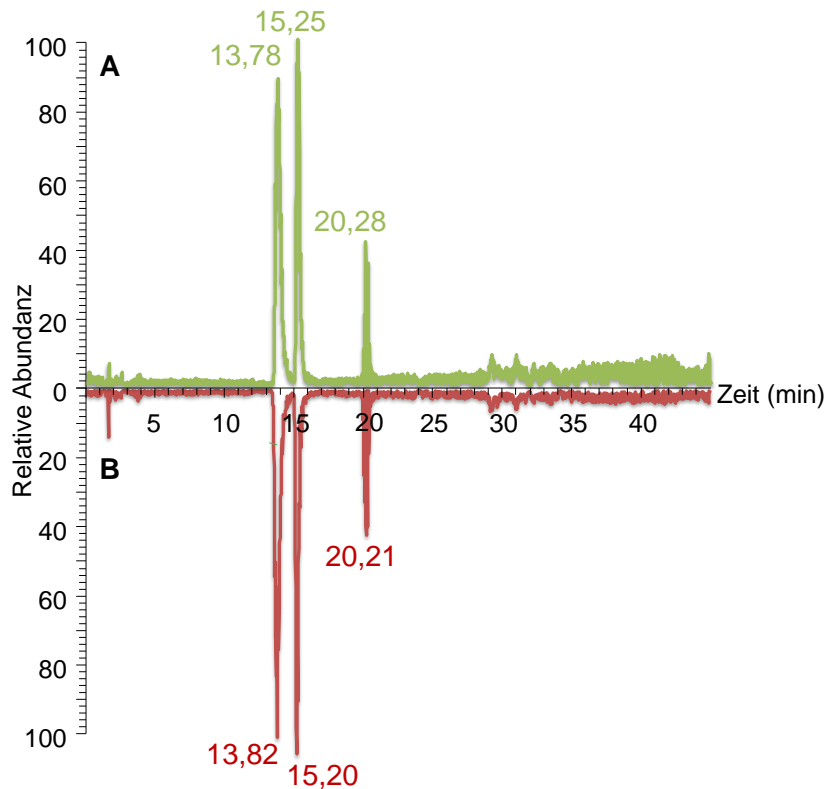


Abbildung 10: Die Chromatogramme der Fäzes-Probe einer (A) mit Antibiotika-behandelten Salicin-haltigen *Artificial Diet* gefütterten *S. littoralis*-Larve, bzw. (B) einer Larve, die mit unbehandeltem, Salicin-haltiger *Artificial Diet* gefüttert wurde.

4.2.3 Beimpfung eines Salicin-haltigen Mediums mit einem Mitteldarm

Um erneut zu überprüfen, ob Darmbakterien des Mitteldarm von *S. littoralis* an dem untersuchten Salicin-Metabolismus beteiligt sind, wurde ein Mitteldarm 20 Stunden lang in LB-Medium, mit 0,5 mg/ml Salicin bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein zweites LB-Medium mit der gleichen Salicin-Konzentration unter denselben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden Proben der LB-Medien mittels HPLC-MS/ESI untersucht. Nach der Extraktion der Chromatogramme nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen im Bereich von 330,5-331,5 m/z, erscheint in dem Chromatogramm der Probe ein Peak mit einer RT von 15,51 min. Die Kontrollprobe und der gemessenen Salicin-Standard weisen Peaks nach 14,19 min bzw. 14,13 min auf (siehe Abbildung 11).

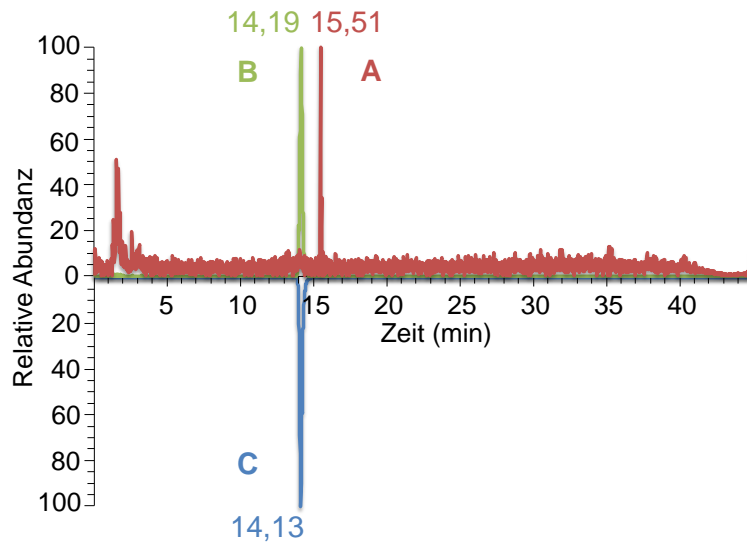


Abbildung 11: Die mittels LC-MS ermittelten Chromatogramme des mit einem Mitteldarm beimpften LB-Medium (0,5 mg/ml Salicin) (A), des Kontrollmediums (B) und des gemessenen Salicin-Standards (100 µg/ml) (C).

Im Salicin-Standard und in der Kontrollprobe wurden Ionen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 331,02 m/z, bzw. 331,05 m/z ermittelt, welche dem Salicin-Methansäure-Konjugat entsprechen. In der beimpften Probe findet sich ein Pseudo-Molekülion mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 331,48 m/z. Die Abweichung zu dem erwarteten Salicin-Methansäure-Konjugat ist zu groß. Entsprechend konnte weder Salicin noch Isosalicin in der beimpften Probe gefunden werden (siehe Abbildung 12).

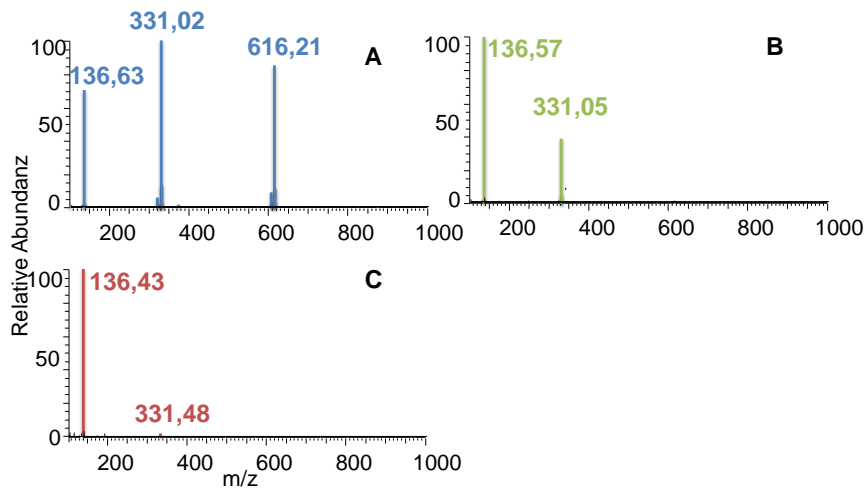


Abbildung 12: Die Massenspektren der Peaks des Salicin-Standards nach 14,13 min (A), bzw. der Kontrollprobe nach 14,19 min (B), bzw. der Experimentgruppe nach 15,51 min (C).

4.3 Isolierung eines Salicin verwertenden Darmbakterienstammes

4.3.1 X-Gal Assay

Der Mitteldarm einer Larve wurde in PBS gelöst und anschließend wurde eine 1:100-Verdünnung der Suspension auf einem LB-Agar-Medium mit X-Gal (0,5 µl/ml) und 0,5 mg/ml Salicin ausplattiert. Dieses wurde zwei Tage lang bei 27 °C inkubiert. Zusätzlich wurde ein unbeimpftes und ein weiteres Medium mit *Escherichia coli* beimpft unter denselben Bedingungen inkubiert.

Die isolierten Bakterienkolonien der verdünnten Suspension lösten eine positive Farbreaktion des X-Gal-Assays aus (siehe Abbildung 13, C). Folglich exprimieren die isolierten Darmbakterien entsprechende Gene, um β-glykosidische Bindungen zu spalten. Anschließend wurde eine Reinkolonie mittels Drei-Strich-Ausstrich gewonnen (siehe Abbildung 13, C) und für die folgenden Experimente verwendet.

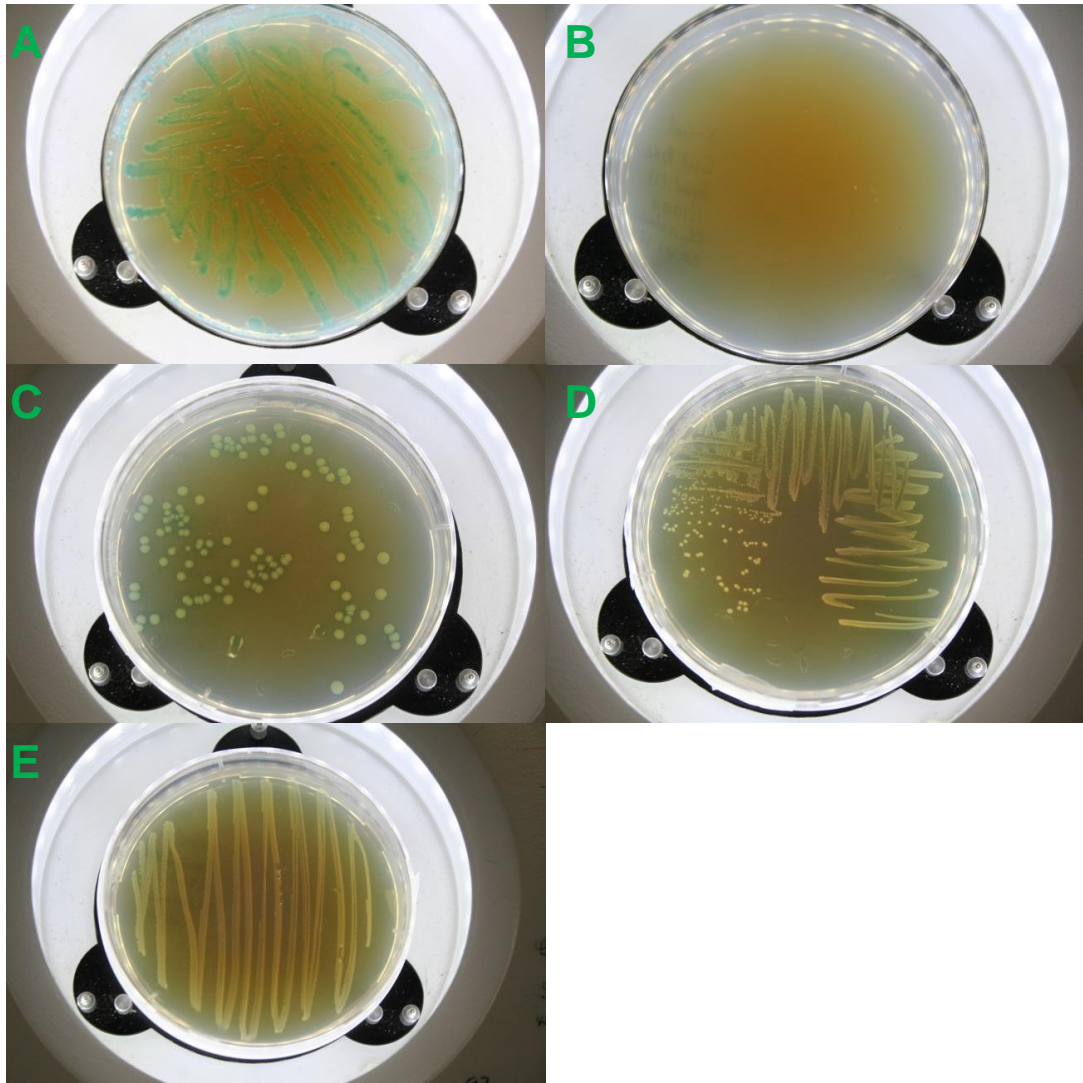


Abbildung 13: A zeigt ein X-Gal-Assay beimpft mit *Escherichia coli* als positiver Referenzorganismus, B zeigt ein unbeimpftes X-Gal-Medium, C zeigt die aus der Darmbakterien-Suspension gewachsenen Bakterienkolonien, D zeigt ein THB-Medium, auf dem mittels dreifachem Ausstrich einzelne Bakterienkolonien aus C isoliert wurden und E zeigt die Ausplattierung der isolierten Bakterienkolonie.

4.3.2 LC-MS Analyse der Salicin-Verwertung des unbekanntes Bakterienstamms

Zellmaterial der isolierten Darmbakterien-Kolonie (siehe Abbildung 13, E) wurde über Nacht in THB-Medium mit 0,5 mg/ml Salicin inkubiert und mittels LC-MS untersucht. Als Kontrolle wurde eine Probe eines unbeimpftes Medium mit der gleichen Salicin-Konzentration, welches unter denselben Bedingungen inkubiert wurde, gemessen.

Nachdem die Chromatogramme nach den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 193,5-194,5 m/z; 285-286 m/z und 330,5-331,5 m/z extrahiert wurden, erscheint in dem beimpften Medium ein Peak nach 15,42 min, in dem Kontrollmedium und dem Salicin-Standard erscheint ein Peak nach 14,14 min bzw. 14,15 min (siehe Abbildung 14). Folglich hat der isolierte Darmbakterienstamm das im Medium enthaltene Salicin verstoffwechselt. In dem Peak nach 15,42 min wurden Pseudo-Molekülonen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von 286,21 m/z und 331,73 m/z detektiert. Der Base-Peak hat ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 569,29 m/z (siehe Abbildung 14).

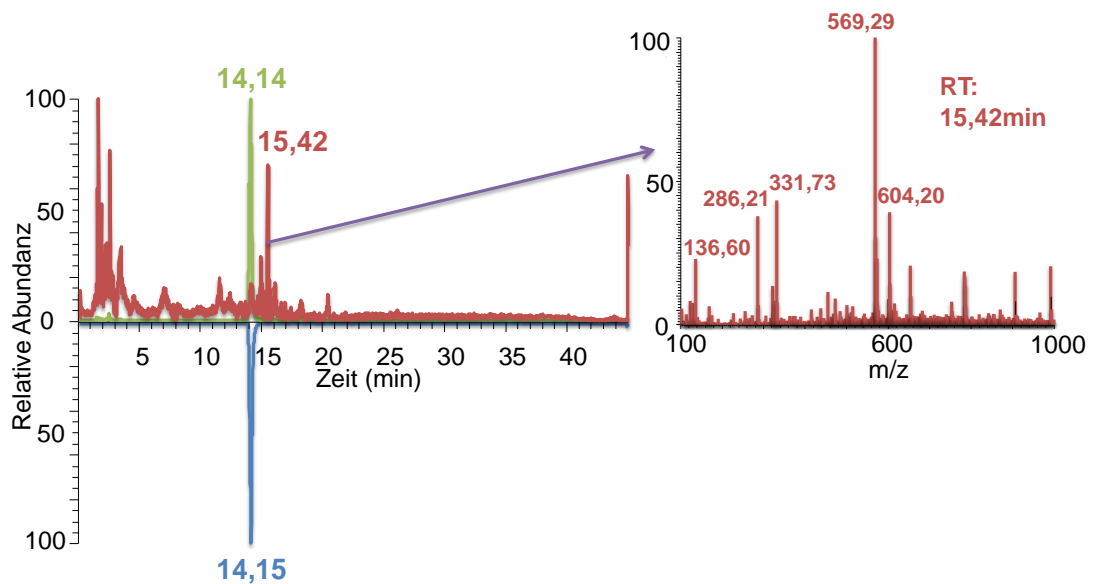


Abbildung 14: Die Chromatogramme des mit dem Darmbakterienstamm beimpften LB-Mediums (rot), bzw. des Kontrollmediums (grün) bzw. des Salicin-Standards (100 µg/ml) (blau) und das Massenspektrum des Peaks nach 15,42 min.

Im Anschluss wurde die Messung wiederholt. Diesmal wurde zusätzlich ein beimpftes THB-Medium ohne Salicin gemessen. Die ermittelten Chromatogramme sind, bis auf einen Peak nach 20,54 min, nahezu identisch (siehe Abbildung 15). Entsprechend handelt es sich bei dem Peak nach 15,43 min um einen Metabolit des THB-Mediums.

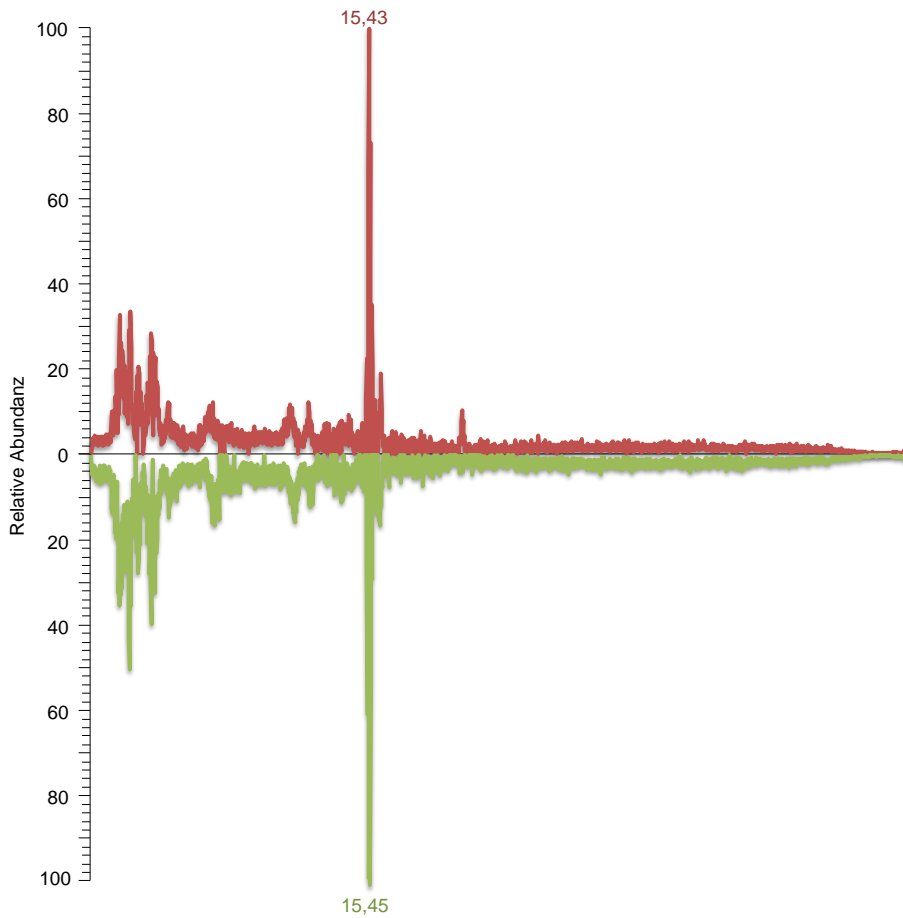


Abbildung 15: Die Chromatogramme des Salicin-haltigen, beimpften THB-Mediums (rot) und der Kontrollprobe ohne Salicin (grün).

4.3.3 Identifizierung des isolierten Bakterienstamms

Die mittels 16S rRNA Sequenzierung ermittelte 1441 Nukleotid lange Sequenz erzielte bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz-Datenbanken mittels BLAST die höchste Identität mit einer Teilsequenz einer unbekanntes *Enterococcus*-Spezies (99,72 %). Eine weitere Sequenz einer nicht-charakterisierten, unkultivierten *Enterococcus*-Spezies ist zu 99,58 % identisch. Desweiteren hatte eine Sequenzen einer weiteren nicht-charakterisierten *Enterococcus*-Spezies und je zwei Sequenzen von *Enterococcus haemoperoxidus* (Stamm NBRC 1000709 und SS1690) und *Enterococcus termitis* (Stamm SS1793 und LMG 8895) eine Identität von 99,24 % (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Gezeigt sind die Ergebnisse des Abgleichs der ermittelten Sequenz mit den Nukleotid-Datenbanken mittels BLAST. Es werden der Übersicht halber nur Ergebnisse gezeigt, die eine Sequenzidentität von mindestens 99,2 % haben.

Beschreibung	E-Wert	Identität	Accession-Nr.
<i>Enterococcus</i> sp. AGB-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1437/1441 (99,72 %)	KC243406.1
Uncultured <i>Enterococcus</i> sp. clone SL26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1435/1441 (99,58 %)	HQ264086.1
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1431/1442 (99,24 %)	NR_113936.1
<i>Enterococcus</i> sp. Cd23 gene for 16S rRNA, partial sequence	0,00	1430/1441 (99,24 %)	AB673465.1
<i>Enterococcus termitis</i> strain SS1793 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1430/1441 (99,24 %)	GQ337037.1
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> strain SS1690 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,00	1431/1442 (99,24 %)	GQ337027.1
<i>Enterococcus termitis</i> strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,00	1430/1441 (99,24 %)	NR_042406.1

4.3.3 Sequenzierung des Darmmikrobiom

In der ermittelten OTU-Tabelle konnten die Sequenzen bis zu der entsprechenden Bakterienfamilie identifiziert werden. Nach der bioinformatischen Verarbeitung der Rohdaten, wurden in der Probe T1.1 9551 Sequenzen und in der Probe C1.1 9709 Sequenzen zu jeweils 24 OTUs zugeordnet. Die Klassifizierung reicht bis zum Rang der Familien. Folgende konnten in den Proben ermittelt werden: *Enterobacter* sp (T1.1: 49,94 %/C1.1: 8,51 %), *Kosakonia cowanii* (12 %/2 %), *Enterobacter* spp (10,43 %/1,11 %), *Enterobacter asburiae* (7,81 %/2,21 %), *Klebsiella* spp (7,43 %/46,58 %), *Escherichia fergusonii* (6,21 %/17,51 %), *Kosakonia Enterobacter cowanii* (3,08 %/6,32 %), *Enterobacter cloacae* (0,96%/5,26 %), *Escherichia coli* (0,16 %/0,59 %), *Leclercia adecarboxylata* (0,59 %/4,46 %), *Salmonella* serovar (0,15 %/0,99 %), *Klebsiella oxytoca* (0,16 %/0,78 %), *Enterococcus faecium* (0,04 %/0,70 %), *Enterococcus faecalis* (0,03 %/0,25 %), *Enterococcus* sp. (0,04 %/0,19 %), *Pantoea ananatis* (0,01 %/0,16 %), *Raoultella planticola* (0,09 /0,01 %), *Enterobacter aerogens* (0,08 %/0,01 %), *Enterococcus mundtii*

(0,01 %/0,08 %) und *Pseudomonas veronii* (0,01 %/0,02 %). Außerdem wurden in der Probe T1.1 Sequenzen den Arten *Serratia plymuthica* (0,65 %), *Leuconostoc spp.* (0,03 %), *Pantoea spp.* (0,03 %), *Sulfurimonas autotrophica* (0,01 %) und in der Probe C1.2 *Enterococcus casseliflavus* (2,02%), *Enterococcus gallinarum* (0,09 %), *Clostridium sp.* (0,06 %) und *Enterococcus flavescens* (0,01 %) gefunden.

Entsprechend gehören 99,82 % der Bakterien, die in T1.1 identifiziert werden konnten, zu den *Enterobacteriaceae*. Der Rest teilt sich in *Enterococcaceae* (0,13 %), *Leuconostocaceae* (0,03 %), *Pseudomonadaceae* (0,01 %) und *Helicobacteraceae* (0,01 %) auf. Auch in der Probe C1.1 sind die *Enterobacteriaceae* mit 96,58 % die dominanteste Familie. Ebenfalls vorhanden sind *Pseudomonadaceae* (0,02 %). Zusätzlich konnten Clostridiaceae (*Clostridium sp.*, 0,06 %) ermittelt werden (siehe Tabelle 4).

In der Probe T1.2 konnten 11920 Sequenzen 6 OTUs zugeordnet werden, während in der Probe C1.2 11709 Sequenzen 12 OTUs zugeordnet wurden. In den Proben T1.2 und C1.2 befinden sich *Enterococcus casseliflavus* (T1.2: 89,33%/C1.2: 54,37%), *Enterococcus flavescens* (0,88%/0,52%), *Enterococcus gallinarum* (5,51%/3,77%), *Enterococcus sp.* (3,98%/0,09%) und *Pseudomonas veronii* (0,02%/0,02%). In der Kontrollprobe C1.2 konnten zusätzlich Sequenzen ermittelt werden, die *Clostridium spp.* (41,05%), *Enterobacter sp.* (0,03%), *Escherichia fergusonii* (0,03%), *Kosakonia enterobacter cowanii* (0,03%), *Nautilia profundicola* (0,06%), *Parabacteroides gordonii* (0,03%) und *Sulfurimonas autotrophica* (0,03%) zugeordnet wurden. In T1.2 wurde zusätzlich *Enterococcus mundtii* (0,28%) ermittelt. Somit gehören 99,98 % der Sequenzen zu den Enterococcaceae, während die restlichen 0,2 % den Pseudomonadaceae zugeordnet wurde (siehe Tabelle 4). In der Probe C1.2 wurden 58,78 % den Enterococcaceae zugeordnet, während auch die Clostridiaceae mit 41,07 % reichlich vertreten sind. Die restlichen Sequenzen gehörten zu den Enterobacteriaceae (0,08 %), Bacteroidaceae (0,03 %), Pseudomonadaceae (0,02 %) sowie den Heliobacteraceae (0,03 %) (siehe Abbildung 16).

Tabelle 4: Die mittels 454-Sequenzierung ermittelten Bakterienfamilien in den Proben T1.1, T1.2, C1.1 und C1.2. Die T-Proben stellen die Behandlungsproben dar, während die C-Proben die Kontrolle sind, also entsprechend kein Kontakt mit Salicin hatten. Die jeweils erste Probe enthält die bakteriellen Sequenzen von Larven aus dem 2.-3. Larvalstadium. Die jeweils zweite Probe enthält Mitteldärme im 5.-6. Larvalstadium.

Bakterienfamilie	T1.1	T1.2	C1.1	C1.2
<i>Enterococcaceae</i>	0,13%	99,98%	3,34%	58,78%
<i>Enterobacteriaceae</i>	99,82%	0,00%	96,58%	0,08%
<i>Clostridiaceae</i>	0,00%	0,00%	0,06%	41,07%
<i>Leuconostocaceae</i>	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteroidaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Pseudomonadaceae</i>	0,01%	0,02%	0,02%	0,02%
<i>Helicobacteraceae</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,03%

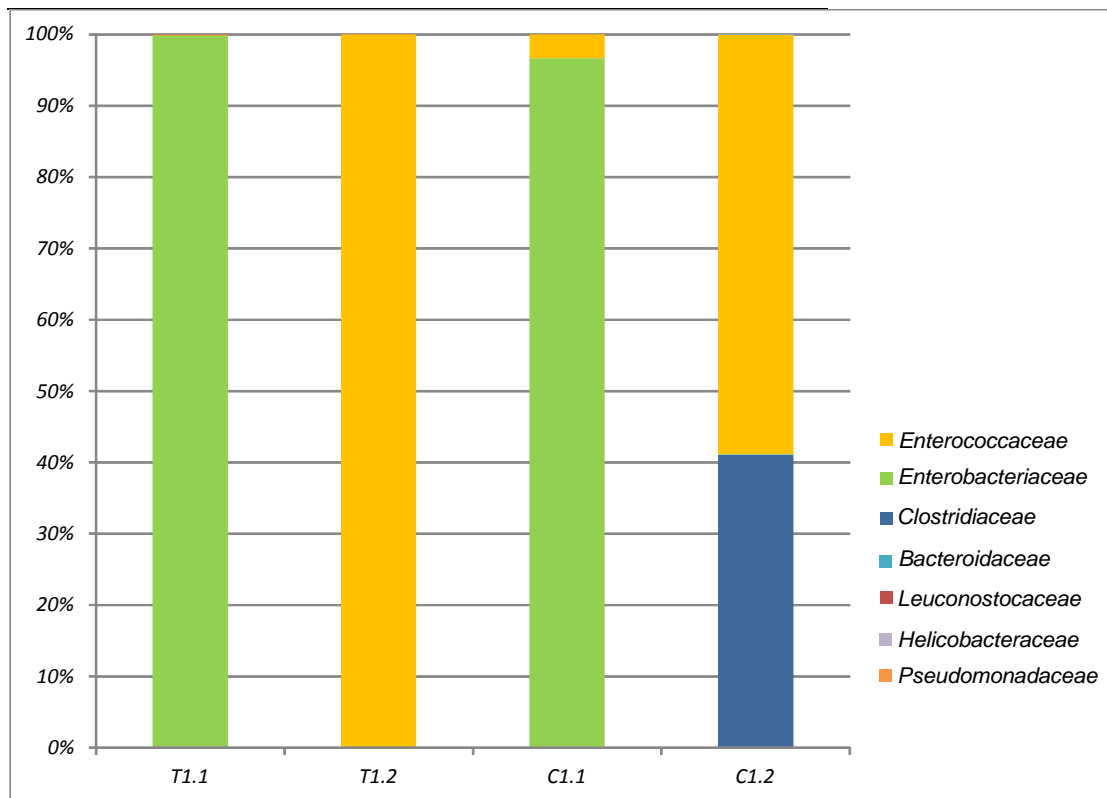


Abbildung 16: Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms der Proben T1.1, T1.2, C1.1 und C1.2. Die T-Proben stellen die Behandlungsproben dar, während die C-Proben die Kontrolle sind, also entsprechend kein Kontakt mit Salicin hatten. Die jeweils erste Probe enthält die bakteriellen Sequenzen von Larven aus dem 2.-3. Larvalstadium. Die jeweils zweite Probe enthält Mitteldärme im 5.-6. Larvalstadium

5 Diskussion

5.1 Salicin hat einen negativen Effekt auf die Fitness von *Spodoptera littoralis*

Die Ergebnisse der Gewichts- und Größenmessungen von *S. littoralis* zeigen eine Verminderung der Wachstumsrate der Larve, während die Mortalität nicht wesentlich erhöht wird (1,67 %).

Ein Großteil der Studien über die gesamtheitliche Wirkung von phenolischen Glykosiden in Blätter (v.a. *Poplar*- und *Salix*-Spezies) deuten auf eine toxische und abschreckende Wirkung auf generalistische Insekten (Lindroth & Peterson, 1988; Matsuki & MacLean Jr, 1994; Osier *et al.*, 2000; Tahvanainen *et al.*, 1985) und eine neutrale bis positive Wirkung auf spezialisierte Insekten hin (Matsuki & MacLean Jr, 1994). Salicin hingegen zeigt individuell keinen Effekt auf den Generalisten *S. eridania* während Salicortin und Tremulacin die Wachstumsrate verringern (Lindroth & Peterson, 1988). Einfache phenolische Glykoside wie Salicin weisen verglichen mit komplexeren Vertretern, wie Salicortin und Tremulacin, eine geringe biologische Aktivität auf Insekten auf (Boeckler *et al.*, 2011).

Entsprechend sind die Ergebnisse etwas deutlicher als erwartet. Im Gegensatz zu *S. eridania* hat Salicin einen negativen Effekt auf die Fitness von *S. littoralis*. Dieser Effekt könnte aus einer direkten inhibierenden Wirkung des Wachstums oder aus einer verminderten Nahrungsaufnahme *S. littoralis* resultieren.

5.2 Die identifizierten Metabolite Salicins

Es konnten mittels LC-MS und HRMS/MS in den Fäzes der Larven, neben Salicin selbst, Isosalicin, Salicylsäure und Salicylursäure identifiziert werden (siehe 4.2.1). Die Differenz der Retentionszeiten des Salicin-Standards und des Salicin-zugewiesenen Peaks ist zu groß, jedoch konnten in beiden Peaks Pseudo-Molekülonen mit nahezu identischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen detektiert werden. Resultieren könnte diese Differenz aus Verunreinigungen der Probe bzw. des Standards. Auch Salicylsäure konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die Qualität der Referenzprobe, die zur LC-MS-Messung des Salicylsäure-Standards verwendet wurde, mangelhaft war. Die ermittelten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse des Salicylsäure-Standards und des entsprechenden Peaks in der Fäzes-Probe sind

nahezu identisch (siehe Abbildung 8). Des Weiteren ist Salicylsäure, neben Glycin, eines der Precursor-Moleküle von Salicylursäure, die nachgewiesen werden konnte. Weder die Fütterung der Larven mit Antibiotika behandelter *Artificial Diet*, noch die Beimpfung eines Salicin-haltigen Mediums mit einem Mitteldarm einer Larve konnten die Beteiligung von Darmmikroben an dem Metabolismus Salicins nachweisen. Allerdings ist es nicht ausgeschlossen, dass die gesuchten Bakterien entweder resistent oder unkultivierbar sind.

Einige spezialisierte Insekten, wie z.B. *Phratora vitellinae*, *Chrysomela tremulae* oder *Limnitis archippus* verwerten pflanzliches Salicin, indem sie es zu Glucose und Salicylalkohol spalten und Letzteres anschließend zu Salicylaldehyd oxidieren, welches sie in ihren Verteidigungsdrüsen als Abwehrstoff speichern (Pasteels *et al.*, 1983; Prudic *et al.*, 2007; Rowell-Rahier & Pasteels, 1990). Trotz zahlreicher Studien über die Effekte phenolischer Glykosiden auf Insekten, ist bisher wenig über die metabolischen Prozesse in generalistischen Insekten bekannt (Boeckler *et al.*, 2011).

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Großteil des Salicins (42,2 %) den Darmtrakt *S. littoralis* unversehrt passiert. Die peritrophische Matrix dient als Barriere gegen Toxine (Shao *et al.*, 2001) und könnte dementsprechend auch für Salicin impermeabel sein.

Das häufigste Salicin-Derivat ist Isosalicin mit 32,5 %. Im Gegensatz zu Salicin ist bei Isosalicin der Glucose-Rest über die Hydroxymethylgruppe statt über die Hydroxylgruppe an dem Aglycon gebunden. Folglich wird angenommen, dass die Glucose durch ein bisher unbekanntes Enzym umverlagert wurde oder Salicylalkohol glykosyliert wurde. Eine entsprechende Detoxifikationsreaktion ist nicht bekannt. Salicylsäure macht einen Anteil von 14,3 % der Salicin-Derivate aus. Salicin kann mittels schwacher Säuren chemisch zu Glucose und Salicylalkohol gespalten werden (Pinto & Diogo, 2008), allerdings weist der Mitteldarm von Lepidoptera-Larven ein alkalisches Milieu auf (House, 1974). Zudem deuten frühere Untersuchungen darauf hin, dass ein saurer pH nicht zur Spaltung Salicins genügt (Steinegger & Hövel, 1972) Entsprechend wird angenommen, dass ein Teil des Salicins durch β -Glucosidasen zu Glucose und Salicylalkohol gespalten wird (Boeckler *et al.*, 2011). Die beiden Produkte konnten mittels LC-MS in den Fäzes nicht identifiziert werden.

Glucose wird wahrscheinlich unmittelbar nach seiner Freisetzung in den Primärmetabolismus eines Darmmikroben oder von *S. littoralis* eingespeist. Darm-Epithelzellen von Lepidoptera-Larven weisen extrazelluläre, membrangebundene P450-Cytochrome mit Oxidase-Aktivität auf (Feyereisen, 1999). Entsprechend könnte Salicylalkohol, im Gegensatz zu Salicin, die peritrophische Membran aktiv oder passiv überwinden und an der Membran der Epithelzellen zu Salicylsäure oxidieren. Ein Teil der Salicylsäure wird wieder in das Darmlumen abgegeben. Der Rest könnte, neben Glycin, als Precursor-Molekül der identifizierten Salicylursäure (11 % der Salicin-Derivate) dienen. Kürzlich wurde festgestellt, dass *S. littoralis* an die toxische 3-Nitropropan-Säure (3-NPA) in den Epithelzellen des Mitteldarms kurzekettige Aminosäuren, u.a. Glycin, anlagert und sie anschließend als ungiftiges Aminosäure-Konjugat ausscheidet (Novoselov *et al.*, 2015). Entsprechend könnte der restliche Anteil der durch P450 oxidierten Salicylsäure in Darm-Epithelzellen transportiert werden und enzymatisch mit Glycin zu Salicylursäure reagieren, die anschließend als ungiftiges Aminosäure-Konjugat ausgeschieden wird. Um zu verstehen, inwieweit die identifizierten Metabolite der Detoxifikation dienen, müssen die individuellen Toxizitäten auf *S. littoralis* untersucht werden.

5.3 Ein Salicin-verwertender *Enterococcus*-Stamm

Die Isolierung und Reinkulturgewinnung eines Salicin-verwertenden Darmbakterienstammes war erfolgreich. Mittels des X-Gal-Assays konnte nachgewiesen werden, dass der Bakterienstamm zwar glykosidische Bindungen spalten kann, jedoch nicht, ob er spezifisch die glykosidische Bindungen des Salicins spalten kann. Mittels LC-MS konnte nachgewiesen werden, dass der isolierte Bakterienstamm Salicin verwertet. Dabei konnte keines der vorher identifizierten Salicin-Derivate identifiziert werden.

Der Abgleich der Nukleotid-Datenbanken mittels BLAST mit der durch Sanger-Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz der isolierten Reinkultur zeigt eine hohe Übereinstimmung mit Teilsequenzen eines *Enterococcus haemoperoxidus*- bzw. *Enterococcus termitis*-Stammes. Die beiden *Enterococcus*-Arten werden in der Literatur als positiv in der Bildung von Säuren aus Salicin und als β -Galactosidase-negativ beschrieben (Svec *et al.*, 2001; Švec *et al.*, 2006). Letzteres Kriterium

entspricht nicht unseren Ergebnissen. Folglich erfüllt der isolierte Stamm nicht dieses Kriterium. Untersuchungen des Darmmikrobioms von *S. littoralis* zeigten eine Abundanz von *E. termitis* (Tang et al., 2012), jedoch nicht von *E. haemoperoxidus*. Entsprechend wird angenommen, dass es sich bei der Salicin-verwertenden Bakterienkultur um *Enterococcus termitis* handelt.

Da die Verwertung von Salicin durch den Bakterienstamm nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass Salicin mittels β -Glucosidasen zu Glucose und Salicylalkohol gespalten wird. Jedoch kann dies nicht bestätigt werden, weil die verwendete Methode für die LC-MS-Messungen nicht geeignet ist, um Salicylalkohol zu detektieren. Die freigesetzte Glucose wird entweder über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, Entner-Doudoroff-Weg oder über den Pentosephosphat-Weg verwertet (Gilmore et al., 2014). Entsprechend wird angenommen, dass der isolierte Enterococcus-Stamm Salicylalkohol produziert.

Es wird angenommen, dass ein Teil des Salicins im Darmlumen von Bakterien oder von Epithelzellen sezernierten β -Glucosidasen gespalten wird, um die freigesetzte Glucose zu verwerten. *Malacosoma disstria* und *Lymantria dispar* zeigen eine verminderte β -Glucosidase-Aktivität, wenn sie mit PGs gefüttert werden (Lindroth & Hemming, 1990; Lindroth & Bloomer, 1991). Desweiteren zeigt der an *Populus tremula*-adaptierte Ritterfalter *P. g. canadensis* eine Hemmung der β -Glucosidase-Aktivität im Mitteldarm durch die Präsenz von Salicin, bzw. Salicortin, während die Enzym-Aktivität bei dem nicht-adaptieren, nahe Verwandten *P. g. glaucus* stimuliert wird (Lindroth et al., 1988). Folglich könnte Salicylalkohol, oder ein spontanes Produkt, eine toxische Wirkung haben (Boeckler et al., 2011).

Salicylalkohol konnte nicht detektiert werden, obwohl es ein direktes Abbauprodukt von Salicin darstellt. Folglich wurde der Großteil des entstandenen Salicylalkohols modifiziert, weshalb angenommen wird, dass Salicylalkohol eine toxische Wirkung haben könnte. Allerdings war die verwendete Methode bei der LC-MS offensichtlich nicht optimal um Salicylalkohol zu detektieren, da nach mehreren Messungen eines Salicylalkohol-Standards kein eindeutiger Peak ermittelt werden konnte.

Die Fitnessparameter deuten auf eine leichte Toxizität. Allerdings ist nicht klar, ob sie von Salicin selbst oder Salicylalkohol ausgeht. Es wird angenommen, dass Isosalicin und Salicylursäure, aufgrund ihres Vorkommens und ihrer Spezifität,

Entgiftungsprodukte sind. Von Salicylsäure finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine toxische Wirkung auf Insekten.

5.4 Darmmikrobiom

Die Sequenzierung von bakterieller DNA des Mitteldarms zeigt, dass das Darmmikrobiom der Larven, die mit der Salicin-haltigen Artificial Diet gefüttert wurden, keine Clostridien aufweist, während sie in der Kontrolle eine relative Abundanz von ca. 41,07 % haben. Desweiteren wurden in den Proben C1.1 und T1.1 jeweils 24 OTUs ermittelt, während die Probe C1.2 12 OTUs und die Probe T1.2 nur 6 OTUs aufweist. Folglich sinkt die Diversität des Darmmikrobioms bedingt durch eine fortschreitende Larvalentwicklung, sowie bedingt durch die Präsenz Salicins.

Auch die Proben, die vor der Fütterung mit Salicin-haltiger Nahrung entnommen wurden (T1.1 bzw. C1.1), weisen Unterschiede auf. Die Behandlungsprobe enthält wesentlich weniger Enterococcaceae, was scheinbar durch Enterobacteriaceae kompensiert wird. Außerdem befinden sich im Gegensatz zur Behandlungsprobe in der Kontrollprobe Clostridien (0,06 %). Die Proben sollten aufgrund der gleichen Behandlung nahezu identisch sein. Grund für die Abweichungen können geringe Ungleichheiten des durchschnittlichen Entwicklungsstadiums der jeweils fünf Larven sein.

Die entsprechenden Ergebnisse von vorherigen Darmmikrobiom-Analysen von Tang et al. (2012) unterscheiden sich vor allem bei den Proben T1.1/C1.1. Statt *Enterobacteriaceae* wurden hier vor allem *Enterococcaceae* (hauptsächlich *E. mundtii*) identifiziert. Die Ergebnisse der Kontrollprobe C1.2 hingegen gleichen dem Ergebnis Tangs. Dieser schlussfolgert, dass *S. littoralis* über ein sog. 'core set of microbial community' verfüge, welches wichtig für die Wirts-Physiologie sein könne und v.a. aus Clostridien und Enterokokken bestehe. Jedoch scheint es, als habe Salicin, bzw. einer der Metabolite, eine selektierende Wirkung auf Clostridien, aber ohne letale Folgen für den Wirt. Entsprechend scheinen Clostridien keine essenzielle Rolle in der Physiologie des *S. littoralis* zu spielen. Frühere Studien zeigen, dass kommensale, Darm-bewohnende Clostridien Salicin fermentativ verwerten können (Nishida et al., 1969). Folglich wird angenommen, dass kommensale Enterococcus-Stämme, wie z.B. der isolierte Enterococcus-Stamm, Salicin effizienter als

Clostridien verwerten können, wodurch es den Clostridien verwehrt bleibt, sich zu etablieren.

6 Fazit

Etwas mehr als die Hälfte des Salicins wird wahrscheinlich im Darmlumen von β -Glucosidasen zu Salicylalkohol und Glucose gespalten, während ca. 42 % den Darm unversehrt passiert. Ein Teil des Salicylalkohols könnte anschließend die peritrophische Membran passieren und an P450 zu Salicylsäure oxidieren. Ein weiterer Teil wird zu Isosalicin glykosyliert. Die Salicylsäure wird zum einen direkt wieder ins Darmlumen sekretiert, während ein Rest der Salicylsäure in Darmepithelzellen zu Salicylursäure modifiziert wird, die anschließend ebenfalls in das Darmlumen ausgeschieden wird (siehe Abbildung 17). Alternativ könnte Isosalicin auch durch einen Transfer der Glucose des Salicins von der Hydroxyl- an die Hydroxymethylgruppe generiert werden.

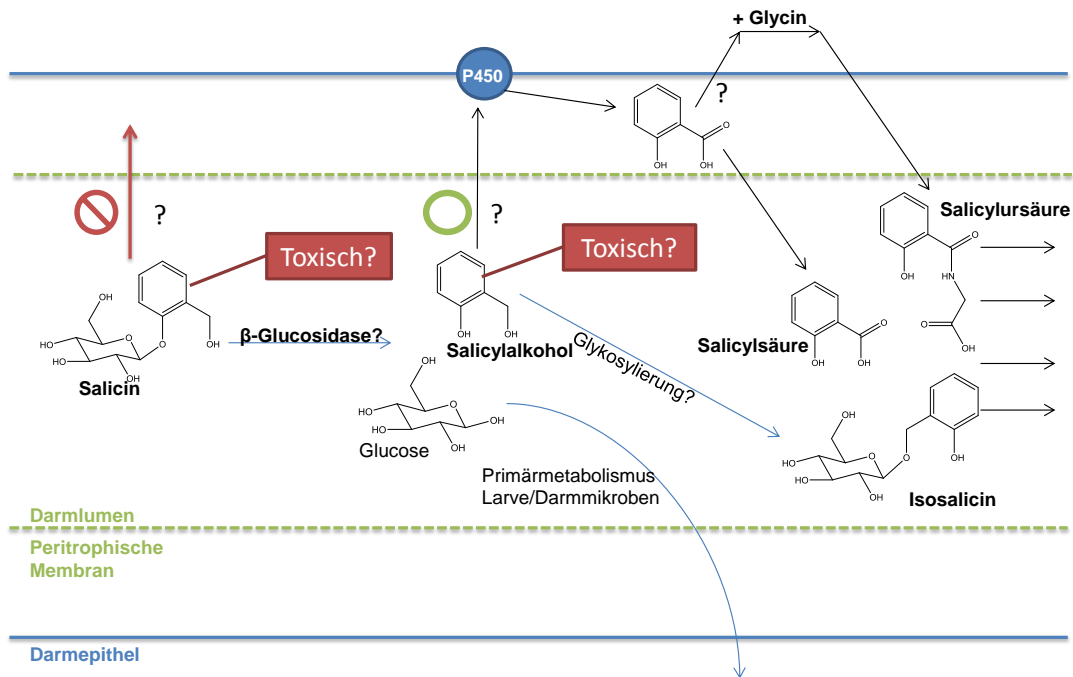


Abbildung 17: Dargestellt ist das Darmlumen, begrenzt durch die peritrophische Membran (grün gestrichelt) und den Darmepithelzellen (blaue Linie) und der mögliche metabolische *Pathway* Salicins in *S. littoralis*.

Darmbakterien scheinen, bis auf der Spaltung Salicins, nicht an der direkten Synthese der Metabolite beteiligt zu sein.

Salicin, bzw. einer der Metaboliten, schränkt die Diversität des Darmmikrobioms ein, was die Ursache für den Fitnessseinbruch sein könnte. Entsprechend Tangs Annahme, sollte v.a. der Ausfall der Clostridien schwer wiegen. Etwas unwahrscheinlicher, jedoch nicht unmöglich, scheint die Annahme, dass die Beeinträchtigung der Fitness auf die Toxizität bzw. abschreckende Wirkung Salicins, bzw. der Derivate, zurückzuführen ist. Die beiden möglichen Ursachen müssen allerdings nicht isoliert betrachtet werden. So könnte Salicin, bzw. eines seiner Derivate, und das undiversere Darmmikrobiom jeweils seinen Beitrag leisten.

7 Ausblick

Die Ergebnisse geben einen groben Überblick über den Metabolismus von Salicin durch ein generalistisches Insekt, repräsentiert durch *S. littoralis*. Jedoch erfordert es an wesentlich mehr Informationen, um aus Vermutungen Fakten zu schaffen. Um die Detoxifikationsprozesse bzw. die Toxizität von Salicin oder von den Metaboliten zu verstehen, sollten die individuellen Effekte aufgeklärt werden.

Die Annahme verhärtet sich, dass die Darmmikroben eine wichtige Rolle für die Physiologie des Wirts spielen. Allerdings ist der aktuelle Forschungsstand nicht ausreichend, um die Variabilität und die genauen Muster, denen die Darmgemeinschaft folgt, zu verstehen. Entsprechend werden mehr Daten über das Darmmikrobiom von *S. littoralis* benötigt, um die Bedeutung der sog. mikrobiellen Kerngemeinschaft zu verstehen. Möglicherweise werden die bedeutensten kommensalen Bakterienspezies mit heutigen Sequenzierungsmethoden wie 454 noch nicht erfasst, da sie in einer zu geringen Abundanz vorkommen.

Alles in allem steckt die Darmmikrobiom-Forschung noch in den Kinderschuhen und es wird noch einige Zeit dauern, bis man die Komplexität der mikrobiellen Darmgemeinschaften und die Bedeutung für den Wirt genau versteht.

Literaturverzeichnis

- Appel, H. M. & Martin, M. M. (1990).** Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 3277-3290.
- Basset, Y., Cizek, L., Cuénoud, P. & other authors (2012).** Arthropod diversity in a tropical forest. *Science* **338**, 1481-1484.
- Berenbaum, M. (1980).** Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *The American Naturalist* **115**, 138-146.
- Bergomaz, R. & Boppré, M. (1986).** A simple instant diet for rearing Arctiidae and other moths. *J Lepid Soc* **40**, 131-137.
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J. & Unsicker, S. B. (2011).** Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* **72**, 1497-1509.
- Buchner, A. (1828).** Ueber das Rigatellische Fiebermittel und über eine in der Weidenrinde entdeckte alcaloidische Substanz. *Repertorium für die Pharmacie* **29**, 405-420.
- Chapman, R. F. (1998).** *The insects: structure and function*: Cambridge university press.
- Cook, S. C. & Davidson, D. W. (2006).** Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **118**, 1-10.
- Dowd, S. E., Sun, Y., Wolcott, R. D., Domingo, A. & Carroll, J. A. (2008).** Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne pathogens and disease* **5**, 459-472.
- Egloff, C. P. (1982).** Phenolglykoside einheimischer Salix-Arten: Diss. Naturwiss. ETH Zürich, Nr. 7138, 0000. Ref.: Sticher, O.; Korref.: Eugster, CH.
- El-Minshawy, A. & Zeid, M. (1972).** Rearing the Larvae of the Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) on Semi-Artificial Diet. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **70**, 101-104.
- Engel, P. & Moran, N. A. (2013).** The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 699-735.
- Feyereisen, R. (1999).** Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology* **44**, 507-533.
- Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y. & Shankar, N. (2014).** Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.

Guvenc, A., Arihan, O., Altun, M. L., Dinc, E. & Baleanu, D. (2007). Determination of salicin content of some *Salix L.* species by HPLC method. *Revista De Chimie* **58**, 8-12.

Harrison, J. F. (2001). Insect acid-base physiology. *Annual review of entomology* **46**, 221-250.

House, H. (1974). Digestion in the Physiology of Insecta. In *The physiology of insecta*, pp. 63-117: Academic Press New York.

Kurashima, K., Fujii, M., Ida, Y. & Akita, H. (2004). Simple Synthesis of. BETA.-D-Glycopyranosides Using. BETA.-Glycosidase from Almonds. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **52**, 270-275.

Lindroth, R. & Pajutee, M. (1987). Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts. *Oecologia* **74**, 144-148.

Lindroth, R. & Peterson, S. (1988). Effects of plant phenols of performance of southern armyworm larvae. *Oecologia* **75**, 185-189.

Lindroth, R. L., Scriber, J. M. & Hsia, M. S. (1988). Chemical ecology of the tiger swallowtail: mediation of host use by phenolic glycosides. *Ecology*, 814-822.

Lindroth, R. L. & Hemming, J. D. (1990). Responses of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) to tremulacin, an aspen phenolic glycoside. *Environmental Entomology* **19**, 842-847.

Lindroth, R. L. & Bloomer, M. S. (1991). Biochemical ecology of the forest tent caterpillar: responses to dietary protein and phenolic glycosides. *Oecologia* **86**, 408-413.

Martinson, V. G., Moy, J. & Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology* **78**, 2830-2840.

Matsuki, M. & MacLean Jr, S. F. (1994). Effects of different leaf traits on growth rates of insect herbivores on willows. *Oecologia* **100**, 141-152.

Moll, R. M., Romoser, W. S., Modrakowski, M. C., Moncayo, A. C. & Lerdthusnee, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of medical entomology* **38**, 29-32.

Nardi, J. B. & Bee, C. M. (2012). Regenerative cells and the architecture of beetle midgut epithelia. *Journal of morphology* **273**, 1010-1020.

Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M. (1969). Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. *Applied microbiology* **17**, 303-309.

- Novoselov, A., Becker, T., Pauls, G., von Reuss, S. H. & Boland, W. (2015).** Spodoptera littoralis detoxifies neurotoxic 3-nitropropanoic acid by conjugation with amino acids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **63**, 97-103.
- Osier, T. L., Hwang, S. Y. & Lindroth, R. L. (2000).** Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecological Entomology* **25**, 197-207.
- Pasteels, J. M., ROWELL-RAHIER, M., Braekman, J. C. & Dupont, A. (1983).** Salicin from host plant as precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of chrysoline larvae. *Physiological Entomology* **8**, 307-314.
- Pinto, S. S. & Diogo, H. P. (2008).** Calorimetric studies on the phenolic glycoside D (□)-salicin. *Journal of pharmaceutical sciences* **97**, 5354-5362.
- Prudic, K. L., Khera, S., Sólyom, A. & Timmermann, B. N. (2007).** Isolation, identification, and quantification of potential defensive compounds in the Viceroy butterfly and its larval host-plant, Carolina willow. *Journal of chemical ecology* **33**, 1149-1159.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S. E. & Tower, J. (2007).** Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell metabolism* **6**, 144-152.
- Rogers, G., Kozłowska, J., Keeble, J., Metcalfe, K., Fao, M., Dowd, S., Mason, A., McGuckin, M. & Bruce, K. (2014).** Functional divergence in gastrointestinal microbiota in physically-separated genetically identical mice. *Scientific reports* **4**.
- Rowell-Rahier, M. & Pasteels, J. M. (1990).** Phenolglucosides and interactions at three trophic levels: salicaceae-herbivores-predators. In *Insect-plant interactions*, pp. 75-94: Taylor & Francis (CRC Press).
- Ruuhola, T. & Julkunen-Tiitto, R. (2003).** Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix pentandra*. *Journal of chemical ecology* **29**, 1565-1588.
- Ryu, J.-H., Ha, E.-M. & Lee, W.-J. (2010).** Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology* **34**, 369-376.
- Shao, L., Devenport, M. & Jacobs-Lorena, M. (2001).** The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of insect biochemistry and physiology* **47**, 119-125.
- Spiteller, D., Dettner, K. & Boland, W. (2000).** Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: Microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biological Chemistry* **381**, 755-762.

Steinegger, E. & Hövel, H. (1972). Analytische und biologische Untersuchungen an Saliceen-Wirkstoffen, insbesondere an Salicin: I. Identifizierungs-, Isolierungs- und Bestimmungsmethoden. *Pharm Acta Helv* **47**, 133-141.

Svec, P., Devriese, L. A., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J. & Doskar, J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**, 1567-1574.

Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. & Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 577-581.

Tahvanainen, J., Julkunen-Tiitto, R. & Kettunen, J. (1985). Phenolic glycosides govern the food selection pattern of willow feeding leaf beetles. *Oecologia* **67**, 52-56.

Tang, X. S., Freitag, D., Vogel, H. & other authors (2012). Complexity and Variability of Gut Commensal Microbiota in Polyphagous Lepidopteran Larvae. *Plos One* **7**.

Terra, W. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica[et al]* **21**, 675.

Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual review of entomology* **35**, 181-200.

Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **109**, 1-62.

Urban, J. (2006). Occurrence, bionomics and harmfulness of *Chrysomela populi* L. (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Forest Science-UZPI (Czech Republic)*.

Wagner, I., Biegert, C. & Heide, L. (2003). phytoanalgetika: Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharmazeutische Zeitung* **148**, 21-32.

Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* **3**, 850-861.

Danksagung

Zu aller Erst, bedanke ich mich bei Prof. Dr. Boland, der mir dieses interessante Thema vorgeschlagen und ermöglicht hat. Es war eine Bereicherung und eine wahrliche Weiterbildung in seiner Abteilung arbeiten zu dürfen. Desweiteren bin ich überaus dankbar, einen so couragierten Betreuer wie Alexey Novoselev an meiner Seite gehabt zu haben, der keine Mühen gescheut hat, mich mit Leib und Seele bei diesem Thema zu unterstützen. Vielen Dank!

Außerdem gilt ein großes Dankeschön an Stephan von Reuss für die Hilfe bei den HRMS-Messungen und –Analysen und an Kerstin Ploß, für die Geduld bei der Einweisung an der HPLC.

Auch bei Angelika Berg und Anja David möchte ich mich für ihre Mühen in der Abteilung bedanken, womit sie zu meiner Bachelorarbeit beigetragen haben.

Und zu aller Letzt, bedanke ich mich natürlich besonders bei meiner Familie, ohne die das ganze überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Und ein besonders dickes Dankeschön an die beste Schwester, die verhindert hat, dass ich diese Arbeit mit Einhunderttausendzwölf Rechtschreib- und Grammatikfehlern abgebe.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Seiffert, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe. Textstellen und Abbildungen, welche anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quellen als Entlehnungen kenntlich gemacht.

Jena, März 2016

Christian Seiffert