

Gutachter:

PD Dr. Dieter Wicher

Prof. Dr. Wim Damen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Analyse-Software	16
2.1.2 Chemikalien	16
2.1.3 Größenmarker DNA	18
2.1.4 Enzyme, Kits, Plasmide	18
2.1.5 Geräte und Laborausstattung	20
2.1.6 Medien, Lösungen, Puffer	21
2.1.6.1 <i>In-Situ</i> -Hybridisierungs Puffer	22
2.1.7 Verbrauchsmaterial	23
2.1.8 Synthetische Oligonukleotide	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Versuchstiere	25
2.2.2 Isolation totaler RNA	26
2.2.3 cDNA Synthese	26
2.2.4 PCR	28
2.2.5 Agarose Gelelektrophorese	30

2.2.6 Gelextraktion	30
2.2.7 Restriktionsverdau	31
2.2.8 Ligation	31
2.2.9 Transformation	33
2.2.10 Selektion der transformierten <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	33
2.2.11 Plasmid Mini Preparation	33
2.2.12 DNA-Sequenzierung	34
2.2.13 Synthese der Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	34
2.2.14 Kryostat Histologie	35
2.2.15 Sondentest	36
2.2.16 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	36
2.2.17 Konfokal Mikroskop	39
2.2.18 Quantitative Real Time PCR	39
3. Ergebnisse	42
3.1 Charakterisierung putativer olfaktorischer Rezeptoren in <i>Manduca sexta</i>	42
3.2 Microarray	43
3.3 PCR der Oligonukleotide	46
3.4 Quantitative Real Time PCR (qPCR)	47
3.5 Lokalisation der räumlichen Expression von MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 in den Antennen	49
3.6 Sondentest	49
3.7 qPCR entlang der Antenne	50
3.8 Expression von MsexOR-7	51
3.9 Expression von MsexOR-10	54

3.10 Expression von MsexOR-41	57
4. Diskussion	59
5. Literaturverzeichnis	64
Danksagung	70
Eidesstattliche Erklärung	71

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Morphologie der Antenne von *Manduca sexta*
- Abbildung 2: Vektorkarte pCRII
- Abbildung 3: Dendrogramm von putativen OR Proteinsequenzen von *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* und *Bombyx mori*
- Abbildung 4: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-7 in *Manduca sexta* Microarray
- Abbildung 5: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-10 in *Manduca sexta* Microarray
- Abbildung 6: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-41 in *Manduca sexta* Microarray
- Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese mit Produkten aus einer PCR mit antennaler cDNA für MsexOR-7, MsexOR-10, MsexOR-41 und RL 31
- Abbildung 8: Digoxigenin Sondentest
- Abbildung 9: Quantifizierung von MsexOR-7 in weiblichen und männlichen Antennen von *Manduca sexta*
- Abbildung 10: Lokalisation von MsexOR-7 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer männlichen Antenne von *Manduca sexta*
- Abbildung 11: Lokalisation von MsexOR-7 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Weibchen von *Manduca sexta*
- Abbildung 12: Quantifizierung von MsexOR-7 entlang der Antennen in Weibchen von *Manduca sexta*
- Abbildung 13: Quantifizierung von MsexOR-7 entlang der Antennen in Männchen von *Manduca sexta*

- Abbildung 14: Quantifizierung von MsexOR-10 in weiblichen und männlichen *Manduca sexta*
- Abbildung 15: Quantifizierung von MsexOR-10 entlang der Antennen in Weibchen von *Manduca sexta*
- Abbildung 16: Quantifizierung von MsexOR-10 entlang der Antennen in Männchen von *Manduca sexta*
- Abbildung 17: Quantifizierung von MsexOR-41 in weiblichen und männlichen Antennen von *Manduca sexta*
- Abbildung 18: Lokalisation von MsexOR-41 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Weibchen von *Manduca sexta*
- Abbildung 19: Lokalisation von MsexOR-41 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Männchen von *Manduca sexta*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Pipettierschema für die cDNA-Amplifikation
Tabelle 2:	PCR-Programm für die Amplifikation der cDNA
Tabelle 3:	Pipettierschema für Amplifikation der DNA aus <i>E. coli</i>
Tabelle 4:	PCR-Programm für Amplifikation der PCR-Produkte aus <i>E. coli</i>
Tabelle 5:	Waschschritte der Gewebeschnitte
Tabelle 6:	Pipettierschema quantitative Real Time PCR
Tabelle 7:	PCR-Programm für die Expressionsprüfung

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
Art. Nr.	Artikelnummer
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw	Beziehungsweise
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
dNTP	Desoxiribonucleotid (5') Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al	und andere
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> -Hybridisierung
for	Vorwärtsorientierung
h	Stunde
Hz	Hertz
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Bertani

Lsg.	Lösung
M	Molar [mol/liter]
MA	Mastermix
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Boten- (<i>messenger</i> -)Ribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige RNA
ng	Nanogramm
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
rev	Rückwärtsorientierung
Rev. T	reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-Puffer	reverse Transkriptase Puffer
sek	Sekunde
SSC	Kochsalzlösung Natriumcitrat
SOC	super optimal broth, Nährmedium

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

Insekten verfügen über die Fähigkeit eine große Vielfalt an Duftstoffen zu unterscheiden. Der Geruchssinn erlaubt ihnen sich innerhalb ihrer Umwelt zu orientieren. Er spielt eine wesentliche Rolle z. B. im Überleben, für die Futtersuche und für das Auffinden geeigneter Eiablageplätze. Zudem ist er auch Basis intraspezifischer Kommunikation über Pheromone, beispielsweise zwischen prospektiven Fortpflanzungspartnern (Matsumoto und Hildebrandt, 1981). Seit der ersten erfolgreichen Isolierung und Identifizierung eines Pheromons im Seidenspinner *Bombyx mori* (Butenandt et al., 1959) sind die Lepidoptera zu einem Fokus olfaktorischer Forschung geworden. Zu den am besten untersuchten Schmetterlingsmodellen zählt der Tabakswärmer, *Manduca sexta*, vor allem auch aufgrund seiner Bedeutung in der Ökologie.

Das primäre olfaktorische Organ von Insekten ist die Antenne, diese besteht bei *M. sexta* aus zwei basalen Segmenten und einem Flagellum, welches in ca. 80 Untersegmente (Sanes und Hildebrandt, 1976a) unterteilt ist. Sie trägt zahlreiche Sinneshaare, sogenannte Sensillen, welche die Dendriten olfaktorischer Sinnesneurone enthalten. Die Zellkörper der Neurone sind von Hüllzellen (thekogene Zellen, tormogene Zellen und trichogene Zellen) umgeben. In der Membran befinden sich Rezeptorproteine der Dendriten olfaktorisch-sensorischer Neurone (OSN), sogenannte olfaktorische Rezeptoren (OR) (Abb. 1, Hallem et al., 2004). Beide Geschlechter des Tabakswärmers weisen verschiedene Sensillentypen auf: je zwei Typen Sensilla trichoidea, basiconica, chaetica und coeloconica (Lee und Strausfeld, 1990; Shields und Hildebrandt, 1999).

Die Antenne weist einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus auf (Abb. 1, Keil, 1989). Die Männchen besitzen lange Sinneshaare, die Sensilla trichoidea, welche in einer assymetrischen U-Form arrangiert sind. Die Sinneshaare (Sensilla trichoidea) von Weibchen sind dagegen wesentlich kürzer. Zusätzlich unterscheiden sich die Antennen zwischen Männchen und Weibchen im Querschnitt. Während die Männchenantenne schlüssellochförmig ist, mit langen Sensilla trichoidea auf deren Erweiterung, ist die Weibchenantenne kreisförmig (Abb. 1, Sanes und Hildebrandt, 1976a).

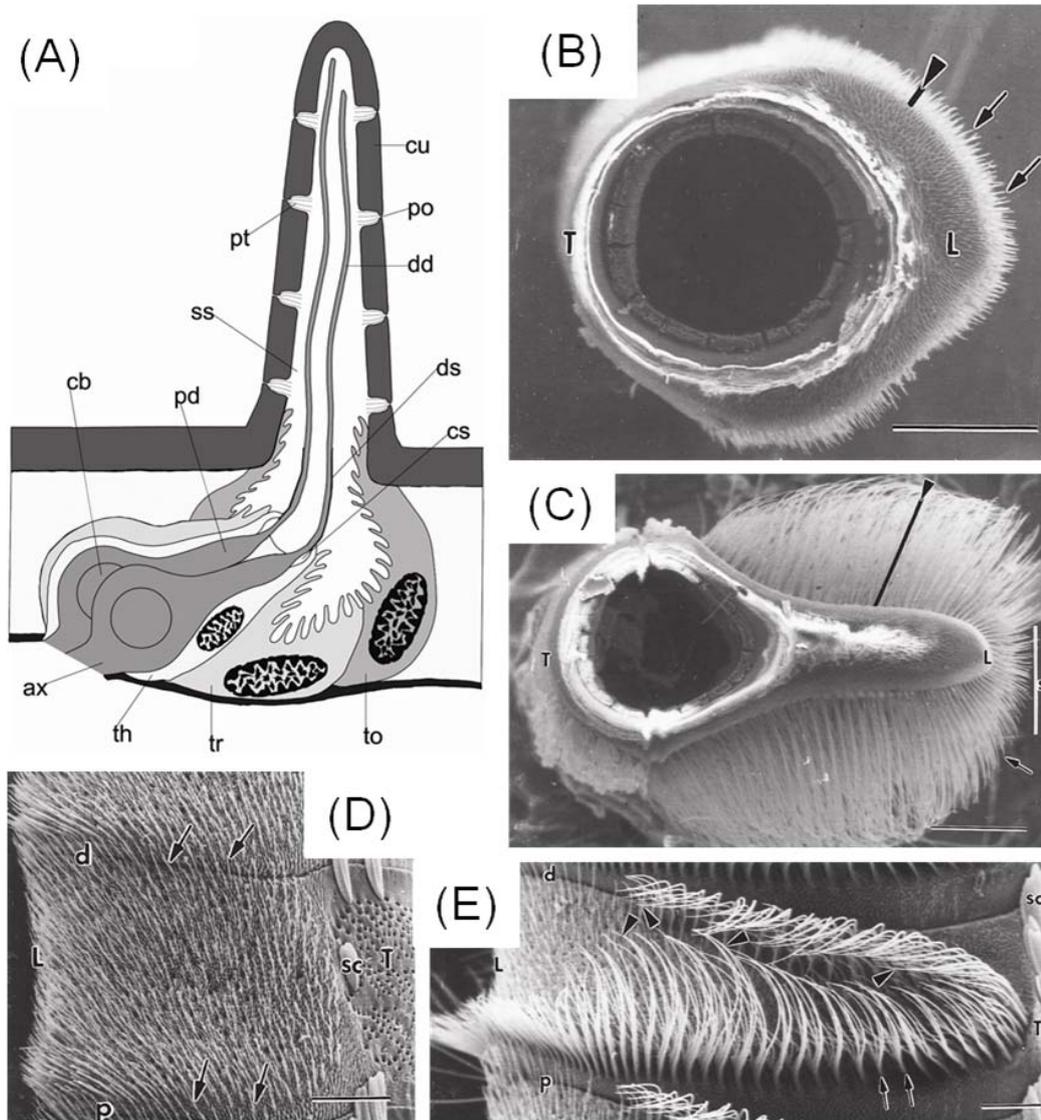


Abb. 1: Morphologie der Antenne von *Manduca sexta*.

A: Schematische Darstellung eines Typ A Sensillum trichodeum. ax, Axon; cb, Zellkörper; cs, Ziliar sinus; cu, Kutikula ds, dendritischer Mantel; dd, distaler Dendrit; ddb, distale dendritische Äste; po, Pore; pt, Porentubuls; pd, proximaler Dendrit; ss, sensillarer sinus; th, thekogene Zelle; to, tormogene Zelle; tr, trichogene Zelle. B – E: Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Antennen von Weibchen und Männchen. B: Querschnitt einer Weibchenantenne, dargestellt ist ihr ovales Profil. L, vordere Oberfläche; T, hintere Oberfläche; Maßstab 250 µm. C: Der Schlüsselloch-förmige Querschnitt einer Männchenantenne ist dargestellt. Auffallend sind sehr lange Sensilla trichodea Typ A (Pfeil). L, ventral; T, dorsal; Maßstab 250 µm. D: Ventralansicht eines weiblichen Flagellen-Annulus. Das Flagellum ist viel schmäler als beim Männchen. Typ A Sensilla trichodea (Pfeile) sind in großer Anzahl entlang der distalen (d) und proximalen (p) Grenzen des Annulus zu finden; Maßstab 100 µm. E: Die typische U-förmige Anordnung von Typ A Sensilla trichodea von Männchen ist gezeigt. Maßstab 100 µm; alle Bilder sind von Shields und Hildebrandt, 1999.

Wie oben erwähnt vermittelt der Geruchssinn verschiedene Verhaltensweisen der Insekten. Dabei treten geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Bei *M. sexta* ist z. B. das olfaktorische System von Männchen auf die Detektion von Sexpheromonen der Weibchen spezialisiert (J. G. Hildebrandt, 1995).

Bisher wurden zwölf von den Weibchen ausgesendete Pheromon-ähnliche Verbindungen identifiziert. Davon spielen acht Hexadecanale (16:Ald): drei isomerische Hexadecanale (Z9,E11,Z11), zwei isomerische Hexadecadienale (EE, EZ (Bombykal)) und zwei isomerische Hexadecatrienale (EEE, EEZ) eine Rolle bei der Anziehung von Männchen (A. N. Starrat et al., 1979; J. H. Tumlinson, 1989, 1994).

Bislang sind drei Pheromon-detektierende OSNs (A-C), beherbergt in den Sensilla trichoidea, in Männchen identifiziert. Diese antworten auf die Pheromonkomponenten Bombykal, EEZ und EEE (Tumlinson et al., 1989, Kaissling et al., 1989). Davon sind Bombykal und EEZ für die Stimulierung des männlichen Paarungsverhaltens (Anemotaxis, Annäherung der Pheromonquelle) notwendig (Tumlinson et al., 1989).

Der Geruchssinn von Weibchen ist mehr auf die Erkennung der Wirtspflanzen spezialisiert, welche zur Eiablage benutzt werden. Dabei reagieren sie besonders auf das in der Wirtspflanze enthaltene (+)-Linalool (Reisenman et al., 2004). In einer Studie von Kalberer et al. 2010 konnte gezeigt werden, dass männliche *M. sexta*, denen antennale Imaginalscheiben von Weibchen transplantiert wurden, genauso oft wie Weibchen auf Wirtspflanzen landeten. Für dieses Verhalten waren die im Antennallobus enthaltenen Weibchenspezifischen Glomeruli notwendig. Dies deutet daraufhin, dass die Glomeruli eine wesentliche Rolle im geschlechtsspezifischen Verhalten bei *M. sexta* spielen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass gepaarte Weibchen geruchsmoduliert direkt Tomatenpflanzen anfliegen (Mechaber et al., 2002). Zudem ist bei ihnen häufiger eine Abdomenbeugung beobachtet, als bei ungepaarten Weibchen unterschiedlichen Alters (Mechaber et al., 2002). Das Abdomen-beugen ist ein Verhalten, welches als Vorstufe zur Eiablage dient (Mechaber et al., 2002).

Weiterhin wurde in *Heliothis virescens* beobachtet, dass nach einem Schaden aufgrund von Raupenfraß oder anderen Pflanzenfressern flüchtige organische

Verbindungen freigesetzt werden und diese eine abstoßende Wirkung auf Ei ablegende Weibchen hatten (De Moraes et al., 2001).

Die ORs spielen also eine essentielle Rolle im geschlechtsspezifischen Verhalten. Die Geschlechtsspezifität spiegelt sich in der Anzahl der ORs (Große-Wilde et al., 2011), der differentiellen Expression und möglicherweise in ihren geschlechtsspezifischen Funktionen wider.

Dreidimensionale Rekonstruktionen der Antennallobus von *M. sexta* haben gezeigt, dass Männchen 68 Glomeruli und Weibchen 70 ± 1 Glomeruli haben (Große-Wilde et al., 2011). Ein OSN-Typ exprimiert genau einen Typ von OR. Die OSNs geben ihre sensorische Information an die Glomeruli weiter (Reisenman et al., 2011), dabei endet ein OSN-Typ in einem Glomerulus (Mombaerts, 2006). Daraus würde sich eine unterschiedliche Anzahl von ORs bei Männchen und Weibchen ableiten lassen.

Interessant sind daher folgende Fragen: Kann ein und der gleiche OR in beiden Geschlechtern vielleicht geschlechtsspezifisches Verhalten vermitteln? Diese Frage lässt sich für *M. sexta* bisher nicht beantworten, wobei eine Studie in *D. melanogaster* diese Möglichkeit zeigte. Der OR67d, welcher in OSNs exprimiert wird, antwortete auf das männchenspezifische Pheromon *cis*-vacceanyl Acetat (cVA). Eine Aktivierung von OR67d Neuronen durch cVA inhibierte das Brautwerben von anderen Männchen, wohingegen die Empfänglichkeit der Weibchen zu ihrem werbenden Männchen gefördert wurde (Datta et al., 2008). Nutzen auch Weibchen den Geruchssinn zur Partnerwahl? Können sie ihre Konkurrenten, z.B. bei der Brautwerbung riechen? Die letzten Fragen wurden in einer Studie in *H. virescens* untersucht (Hillier und Vickers, 2004). Da wurde gezeigt, dass die Männchen über ihre „Hairpencils“ Sexualpheromone produzieren. Diese haben mehrere Effekte, zum einen wählten Weibchen darüber ihre Geschlechtspartner, zum anderen wurden darüber Konkurrenten während der Brautwerbung abgewehrt. In *M. sexta* gibt es dafür bisher keine Beweise.

Bisherige Studien konzentrierten sich auf *D. melanogaster* als Modellorganismus der Molekularbiologie. Hier wurden die ersten Insekten ORs von Clyne et al. 1999, Gao und Chess 1999 in *D. melanogaster* beschrieben; die ersten ORs in Motten 2002 in *H. virescens* (Krieger et al., 2002). Derzeit

sind putative ORs von mehreren Mottenarten, wie *B. mori*, *Ostrina furnacalis*, *H. virescens* und *Helicoverpa zea* (Sakurai et al., 2004, Takanashi et al., 2006, Krieger et al., 2002, 2003, Cossé et al., 1998) beschrieben. Allerdings sind bis auf *B. mori* jeweils nur einige wenige Vertreter dieser Familie bekannt.

Die ORs haben sieben Transmembrandomänen und bilden Heteromultimere mit einem Corezeptor, genannt *Orco* (Vosshall und Hansson, 2011). Der erste *Orco* wurde in *D. melanogaster* als OR83b beschrieben (Elmore et al., 2003, Vosshall et al., 1999, 2000). Im Gegensatz zu den meisten anderen ORs weist *Orco* einen sehr hohen Konservierungsgrad auf (Krieger et al., 2003). Dieser hohe Grad an Konservierung ließ annehmen, dass er eine entscheidende Rolle in der Olfaktion besitzt. In einer Studie mit *D. melanogaster* wurde eine *Ocro* Null-Mutante erzeugt. Diese konnte nicht mehr auf Geruchsstimulation reagieren. Zudem wurde in *in situ* Hybridisierungen gezeigt, dass *Orco* in allen OR-exprimierenden Zellen anwesend ist. Aus weiteren Experimenten wurde geschlossen, dass *Orco* als Chaperon fungieren kann und so eine korrekte Membranintegrität der ORs unterstützt (Larsson et al., 2004).

Als Grundlage der Analyse olfaktorischer Rezeptoren von *M. sexta* galt eine Sequenzdatenbank antennaler Transkripte, welche vollständige und partielle Sequenzen von exprimierten Genen enthält. Die Funktion der meisten Transkripte ist bisher unbekannt (Große-Wilde et al., 2011).

Drei putative olfaktorische Rezeptoren, MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 besitzen Orthologe in anderen Spezies der Lepidoptera und zwei von ihnen (MsexOR-7, MsexOR-41) sind in einem ähnlichen Grade konserviert wie z.B. die Pheromonrezeptoren (Große-Wilde et al. 2011, Abb. 3).

Dies ist ungewöhnlich für ORs, welche generell als sehr divergent beschrieben werden (Robertson und Wanner, 2006) und macht diese drei Rezeptoren interessant. Bisher haben diese Rezeptoren unbekannte Funktionen, allerdings vermutet man, dass sie ähnlich wichtig der Funktion der Pheromonrezeptoren sind.

Das Ziel meiner Arbeit ist die Charakterisierung der putativen ORs MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41. Aufgrund der oben erwähnten Fakten sind meine Hypothesen, dass es sich bei diesen Rezeptoren um olfaktorische Rezeptoren handelt und diese geschlechtsspezifisch sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Analyse-Software

Software	Hersteller
LSM Image Browser	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Konfokal Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland, Art. Nr.: 840004
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: K029.2
1-Bromo-3-chloro-propan	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: B9673
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: A512.1
DEPC	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: K028.3
Dextransulfat	Calbiochem, EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA, Art. Nr.: 265152
Diethylpyrocarbonat	Roth Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: K028.3
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 7332.2

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: E9884
Ethanol	Roth Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 9065.1
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 6749.3
Glukose	Roth Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 997.2
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 9277.1
Heringssperma	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 74782
Kaliumdihydrogen-phosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 3904.1
2-Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: CP41.2
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: KK36.2
Maleinsäure	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: M0375
Natriumbicarbonat	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: S6014
Natriumcarbonat	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: S7795
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 9265.2
Trinatriumcitrat	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: S1804
Natriumphosphat dibasisch Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr.: 1039498
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.

	Nr.: 0335.2
PBS	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: P4417-100TAB
Pink Coprecipitant	Bioline, London, Großbritannien, Art. Nr.: BIO-37075
SOC Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 15544-034
TRI Reagent	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: T9424
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 5429.3
Triton X-100	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr.: T8532
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 8952.2
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr., P1379
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr.: 2315

2.1.3 Größenmarker DNA

Name	Hersteller
Quick Load DNA Ladder	New England BioLabs Inc., Inc., Ipswich, Art. Nr.: #B7021S
2-Log DNA Ladder	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, Art. Nr.: #N3200S

2.1.4 Enzyme, Kits, Plasmide

Enzym/Kit	Hersteller
Anti-Digoxigenin AP Fab fragments	Roche, Basel, Schweiz, Ref. Nr.: 11093274910, Lot. Nr.: 12486522

Biotin RNA labeling Kit	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11685597910
Chemisch kompetente Zellen <i>E. coli</i>	Invitrogen One shotTop10, Art. Nr.: C4040-10
Digoxigenin RNA labeling Kit	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 1127073910
Desoxyribonukleinsäure aus Fischsperma	Sigma Aldrich, St. Lois, MO, Art. Nr.:74782-10G
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, Art. Nr.: D2501-02
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, Art. Nr.: D6942-02
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA Art. Nr.: 31107706
HNPP Fluorescent Detection Set	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11758888001, Lot. Nr.: 13053100
NBT/BCIP Stock solution	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11681451001, Lot. Nr.: 13174121
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr.: 204074
Rox, passive Referenz	Eurogentec, Seraign, Belgien, Lot. Nr.: 5
SP6	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11487671001
SuperScript III First Strand System	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 11904-018
Taq Polymerase (5 U/ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr.: 201207
TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter (with pCRII-TOPO vector)	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 45- 0007LT, Lot. Nr.: 1029354
TSA TM Fluorescein System	Perkin Elmer, Waltham, MA, Art. Nr.: NEL701A001KT

T7	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 10881775001
----	---

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England BioLabs gekauft.

2.1.5 Geräte und Laborausstattung

Gerät/Anwendung	Typbezeichnung
Autoklav	MLS 3781 L, Sanyo (Moriguchi City, Japan)
Elektrophoresekammer	Mupid-One, Advance (Tokyo, Japan)
Heizblock	Thermomixer comfort 5355, Eppendorf
Hybridisierungssofen	Hybaid, Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler	AI82K, Infors (Bottmingen, Schweiz)
Kryostat	Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific
Konfokalmikroskop	LSM 510 Meta, Zeiss, Jena, Deutschland
NanoDrop	ND-1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Pipetman, Gilson (Middleton, WI)
Real Time Cyclor	Stratagene Mx3000P, Agilent Technologies, USA
Stahlkugel	4 mm Stahlkugel, Qiagen, Deutschland
Thermocycler	PCR System 9700, Applied Biosystems (Carlsbad, CA)
TissueLyser	TissueLyser LT, Qiagen, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY)

Wasserbad	SW22, Julabo (Seelbach, Germany)
Zentrifuge	Centrifuge 5819 R, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.6 Medien, Lösungen, Puffer

Lösung	Zusammensetzung
Ladepuffer	2,5 mg Bromphenolblau 30 % Glycerin 70 % destilliertes Wasser
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % Natriumchlorid pH 7,5
LB-Agar	200 ml LB-Medium 1,5 % Agar 400 µl Ampicillin (50mg/ml) 500 µl X-Gal
DEPC Wasser	0,1 % DEPC 1l dd Wasser 1 h 37 °C lösen
Natriumbicarbonat	0,1 M Natriumbicarbonat
Natriumcarbonat	0,1 M Natriumcarbonat
Natriumchlorid	2,5 M Natriumchlorid
Magnesiumchlorid	1 M Magnesiumchlorid Hexahydrat; pro l
MS1 - Lösung	0,1 M Maleinsäure 0,15 M Natriumchlorid 7 g Natriumhydroxid pH 7,5 pro 1 l
50 x TAE-Puffer	2 M Tris

	2 M Essigsäure, Art. Nr.: 10 148 261 035 50 mM EDTA pH 8,0
Tissue-Tek O.C.T.	40 % Glukose

2.1.6.1 *In-Situ-Hybridisierungs Puffer*

Lösung	Zusammensetzung
Blockierungs Lösung	20 ml Maleinsäure 2,0 g Blocking Reagent
Blockierungs Arbeitslösung	1 x TBS 1 % Blocking Lösung 0,03 % TritonX100
DAP - Puffer	0,1 M TRIS (aus 1 M) 0,1 M Natriumchlorid (aus 5 M) 0.05 M Magnesiumchlorid (aus 1 M); je l pH 8,0
Fixierlösung	0,1 M Natriumbicarbonat 4 % Paraformaldehyd mit Natriumbicarbonat auf 200 ml auffüllen; pH 9,5
50 % Formamid - 5 x SSC	50 % Formamid 5 x SSC (aus 20 x SSC)
Carbonatpuffer	80 mM Natriumbicarbonat 120 mM Natriumcarbonat pro 50 ml; pH 10,2

Hybridisierungspuffer	10 % Dextransulfat 2 x SSC (aus 20 x SSC) 0,2 mg/ml Heringssperma 50 % Formamid; pro 50 ml 20 mg/ml Yeast-t-RNA DNA; pro 200µl Aqua bidest
Maleinsäure	0.1 M Maleinsäure 0.15 M Natriumchlorid; pro l, pH 9,5
10 x PBS	0,85 % Natriumchlorid 8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 1,4 mM Natriumphosphat dibasisch Dihydrat ; pro l, pH 7,1
PBS - Glycerol (1:3)	1 x PBS Glycerin
1 x PBS - 1 % Triton	1 x PBS (aus 10 x PBS) 1 % TritonX100
20 x SSC	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat; je l, pH 7,1
TBS	100 mM TRIS 150 mM Natriumchlorid; je 5 l; pH 7,5
TBST	TBS 0.05 % Tween20

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Objektträger	Therma scientific, Menzel Gläser, Roth, Karlsruhe, D; VWR International Ltd., Polysine™, Leighton Buzzard, UK
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Die in der Diplomarbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG synthetisiert. Die Kalkulierung der Annealingtemperatur erfolgte mit Oligo Calc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html).

Primer	Sequenz	T _M in °C
Msex\Orco for	5`-CTC AAG GCC TGG TAT CCA TT-3`	58,4
Msex\Orco rev	5`-TGG ATC TGG CAC TTT CTC TG-3`	58,4
MsexOR-7 for	5`-ATG GCG CTT CAC TTC GAC GAC A-3`	57,3
MsexOR-7 rev	5`-CTA AGA CCT CAG CAA TGT AAA CAT GG-3`	57,3
MsexOR-41 for	5`-TTC CCT AAC ACA GTT GAA CAA ATG TAT-3`	58,9
MsexOR-41 rev	5`-AAA CCA GCA CGG CAC AAA TAT GAA A-3`	59,7
MsexOR-10 for	5`-CCT GTT CAT GGG TTT AGT-3`	57,3
MsexOR-10 rev	5`-CAG TTA ATT TGC ACG GCT-3`	53,2
RL31 for	5`-GGA GAG AGG AAA GGC AAA TC-3`	58,4
RL31 rev	5`-CGG AAG GGG ACA TTT CTG AC-3`	60,5

Snmp-1 for	5`-ATG CGG CTG GCA AGG GGA ATT AAG-3`	59,0
Snmp-1 rev	5`-TTA CAT GTT GAT TTT TGG AGG CTC ATG AC- 3`	57,0
M13 vorwärts (-20)	5`-TGA CCG GCA GCA AAA TG-3`	52,4
M13 rückwärts (-48)	5`-AGG ACA CAC TTT AAC AAT AGG CGA- 3`	62,0
T7	5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`	55,0

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

M. sexta (Lepidoptera, Sphingidae) wurde im Institut für chemischen Ökologie der Max-Planck-Gesellschaft gezüchtet. Die ausgewachsenen *M. sexta* konnten sich in einem Käfig paaren, in dem die Pflanze *Nicotiana attenuata* gehalten wird, welche zur Eiablage benutzt wurde. Die Eier wurden dreimal pro Woche abgeholt und in Plastikboxen in eine Klimakammer (Tag: 26 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 100 % Lichtintensität; Nacht: 22 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 8 h dunkel) übertragen. Geschlüpfte Larven wurden in neue Plastikboxen in der gleichen Klimakammer übertragen und mit künstlicher Ernährung versorgt (46 g Agar, 144 g Weizenkeime, 140 g Maismehl, 76 g Sojamehl, 75 g Kasein, 24 g Salz, 36 g Zucker, 5 g Cholesterin, 12 g Ascorbinsäure, 6 g Sorbinsäure, 3 g Methylparaben, 9 ml Leinöl, 60 ml 37 % iges Formalin, 30 mg Nikotinsäure, 15 mg Riboflavin, 7 mg Thiamin, Pyridoxin 7 mg, 7 mg Folsäure und 0,6 mg Biotin je 1,8 ml Wasser). Nach sechs Wochen, in denen die Larven regelmäßig in neue Boxen mit neuem Futter übertragen

wurden, wurden die Larven in eine andere Klimakammer (gleiche Bedingungen) für die Verpuppung platziert. Puppen für die Aufzucht wurden in Flugkäfig gebracht. Verbleibende Tiere schlüpfen, nach Geschlecht getrennt, in Papiertüten, oder Flugkäfige und wurden für Experimente verwendet.

2.2.2 Isolation totaler RNA

Aus den Antennen von *M. sexta* wurde RNA extrahiert.

Zur Isolierung der totalen RNA wurde Antennengewebe von *M. sexta* in 1 ml TRI Reagent mit einer Stahlkugel in einem TissueLyser für 15 min/s mit 50 Hz homogenisiert. Nach anschließender Zugabe von 120 µl 1-Bromo-3-chloro-propan und vortexen erfolgte eine Inkubation für 10 min bei RT. Nach erneutem vortexen erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 4 °C, für 15 min bei 13.000 rpm. Die RNA-haltige obere Phase wurde abgenommen, mit 420 µl Isopropanol versetzt und gevortext. Die Fällung erfolgte ü. N. bei - 20 °C. Am nächsten Tag wurde für 30 min bei 4 °C und 16.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem erhaltenen Pellet wurde 1 ml 80 % iger Ethanol zugegeben. Abschließend wurde für 30 min bei 4 °C und 16.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet und in 20 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten RNA-Proben wurde mit einem NanoDrop ND-1000 bestimmt. Die RNA-Konzentration wird über eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit A_{260} einer Konzentration von 40 µg/ml ssRNA. Daraus folgt:

$$c = A_{260} * F * K$$

c : Konzentration der Probe [µg/ml]

A_{260} : gemessene Absorption bei 260 nm

F : Verdünnungsfaktor

K : Konzentration bei $A_{260} = 1$ für RNA (40 µg/ml)

2.2.3 cDNA Synthese

Da RNA nicht direkt als Matrize in einer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden kann, muss sie mit Hilfe des Enzyms der reversen

Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Für die cDNA Synthese wurde das SuperScriptIII First Strand Kit verwendet.

Für das Schreiben der cDNA wurden RNA-Proben von Antennen der Männchen und Weibchen von *M. sexta* verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

dNTPs	1,0 µl
OligodT-Primer	1,0 µl
Total-RNA (ProbenRNA)	1,0 µg
Wasser (RNase frei) insgesamt	8,0 µl

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 65 °C und 1 min auf Eis.

Ansatz Punkt 1	10,0 µl
10XRT-Puffer	2,0 µl
MgCl	4,0 µl (25 mM)
DTT	2,0 µl (0,1 M)
RNAse out	1,0 µl (40 U/ µl)
SuperScriptIII Rev. T	1,0 µl (50 U/ µl)
<hr/>	
	20,0 µl

Die cDNA Synthese erfolgte durch eine Inkubation für 50 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C.

Für den RNA-Verdau wurden 1,0 µl RNase H (2 U/µl) zu dem Ansatz gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 PCR

Die PCR ermöglicht die Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente. Es erfolgt zunächst die Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Stranges. So kann sich ein komplementärer Primer an die entstehenden Einzelstränge anlagern. Eine thermostabile DNA-Polymerase füllt jeden Einzelstrang zu einem Doppelstrang auf. Aufgrund einer zyklischen Wiederholung der Vorgänge wird eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente erreicht. (Mullis et al., 1986).

Ein 25 µl PCR-Ansatz für die cDNA-Amplifikation wurde nach folgenden Pipettierschema angesetzt:

Tabelle 1: Pipettierschema für die cDNA-Amplifikation

Reagenz	Volumen [µl]	Konzentration
Nuklease freies Wasser	17,5 µl	
10 x CL-Puffer	2,5 µl	
dNTPs	1,0 µl	10 - 11 mM
RL31 for	1,0 µl	100 pmol/µl
RL31 rev	1,0 µl	100 pmol/µl
Taq-Polymerase	1,0 µl	5 U/ µl
Template	1,0 µl	
Gesamtansatz	25,0 µl	

Die cDNA-Amplifikation erfolgte ebenso mit den Oligonukleotiden OR7 for, OR7 rev; OR10 for, OR10 rev; OR41 for, OR41 rev.

Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifikation der cDNA

Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Reaktionszyklenzahl	PCR-Schritt
300	94	1	Initiale Denaturierung
30	94	35	Denaturierung
30	58		Annealing
45	72		Extension
420	72	1	Extension
∞	4		Kühlung

Für die Amplifikation der DNA aus *E. coli* wurde folgender Ansatz pipettiert:

Tabelle 3: Pipettierschema für Amplifikation der DNA aus *E. coli*

Reagenz	Volumen [µl]	Konzentration
Nuklease freies Wasser	4,5 µl	
5 x Green-GoTaqPuffer	2,0 µl	
dNTPs	0,2 µl	10 - 11 mM
M13 rev	0,5 µl	100 pmol/µl
T7	0,5 µl	100 pmol/µl
GoTaq-Polymerase	0,1 µl	5 U/µl
MgCl ₂	1,2 µl	25 mM
Gesamtansatz	9,0 µl	

sowie eine weiße Bakterienkolonie von einer Selektionsplatte.

Für die Amplifikation der PCR-Produkte aus *E. coli* wurden folgende Zyklen im PCR-Gerät durchlaufen:

Tabelle 4: PCR-Programm für Amplifikation der PCR-Produkte aus *E. coli*

Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Reaktionszyklenzahl	PCR-Schritt
120	94	1	Initiale Denaturierung
15	94	34	Denaturierung
30	53		Annealing
90	72		Extension
420	72	1	Extension
∞	4		Kühlung

Zur Überprüfung der PCR wurden die Produkte gelelektrophoretisch kontrolliert.

2.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Produkte der PCR erfolgte mit Hilfe einer Gelelektrophorese. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Die Produkte wurden auf ein Agarosegel geladen und im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Es wurde ein 1 % iges Agarosegel verwendet, welches aus 1,5 g Agarose und 150 ml TAE Puffer besteht. Durch die Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) konnten später unter UV-Licht Banden sichtbar gemacht werden. Die Auftrennung erfolgte bei 135 V für 25 min.

2.2.6 Gelextraktion

Nach der Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit einem Gelextraktionskit von E.Z.N.A. nach Herstellerprotokoll.

2.2.7 Restriktionsverdau

Der Verdau erfolgte bei 37 °C ü. N..

Nuklease freies Wasser	x µl
Plasmid (1 µg)	x µl
Puffer (NE Puffer 4)	2,0 µl
Enzym EcoRI HF (10.000U/ml)	1,0 µl
<hr/>	
Gesamtansatz	25,0 µl

2.2.8 Ligation

Mit Hilfe einer Ligase wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA-Segmente verbunden. Da das Insert MsexOR-10 in ein Plasmid mit nur einer Promotorstelle kloniert war, konnte keine erfolgreiche Klonierung erfolgen. Somit wurde das Insert des Plasmids MsexOR-10 mit Plasmid pCRII (Abb. 2) ligiert.

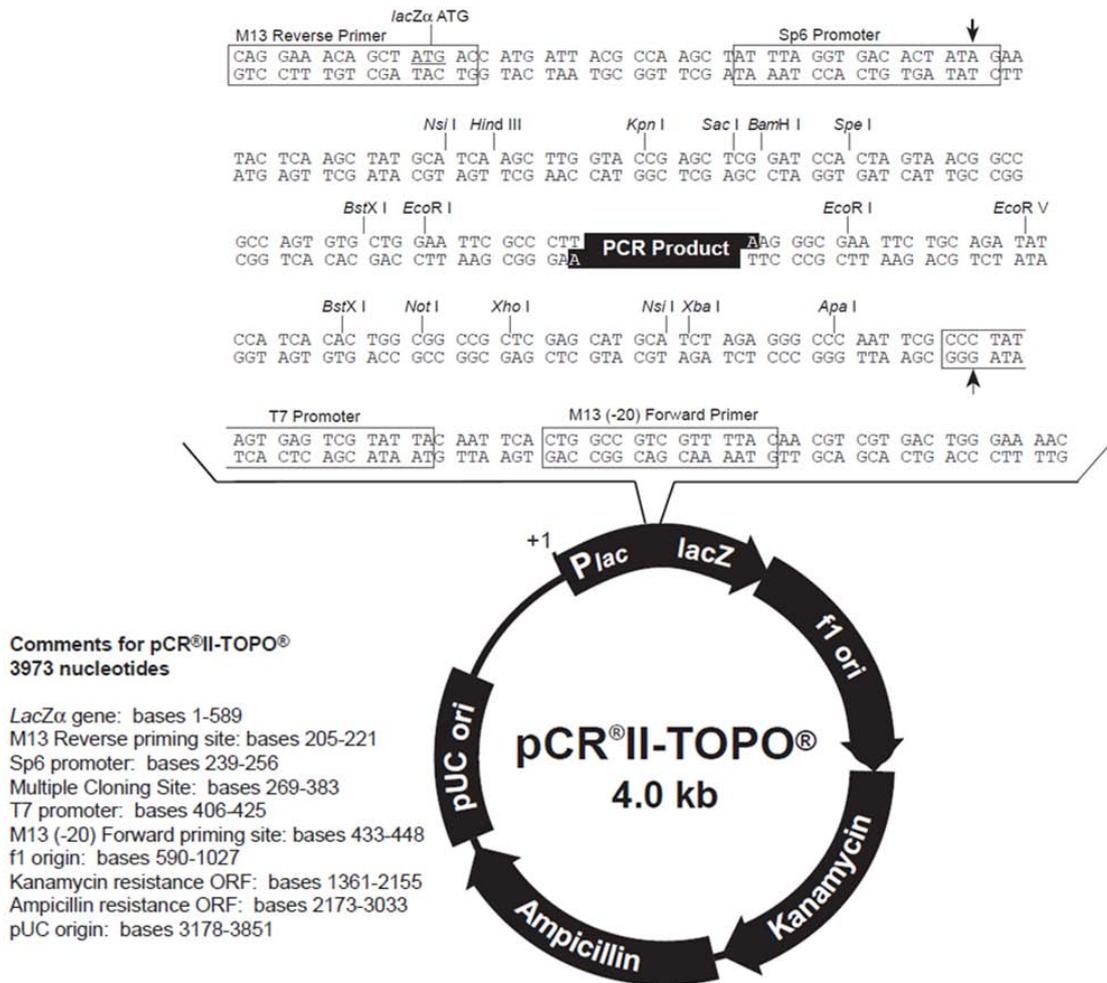


Abbildung 2: Vektorkarte pCRII.

Die beiden EcoRI-Schnittstellen flankieren das inserierte PCR-Produkt. (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K466040>).

Die Ligation erfolgte nach folgendem Ansatz bei 4 °C ü. N.:

Fragment	15,0 µl (1:7)
Vektor	2,0 µl (25 ng/µl)
Ligations Buffer	2,0 µl
T4 Ligase	1,0 µl (5 U/ µl)
Gesamtansatz	20,0 µl

2.2.9 Transformation

25 µl aufgetaute chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Tubes mit 2 µl Ligationsansatz pipettiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach einem Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C und darauffolgenden 2 min Inkubation auf Eis, wurden 150 µl SOC-Medium zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Agar gegossene Selektionsplatten ausplattiert und wuchsen über Nacht bei 37°C.

2.2.10 Selektion der transformierten *Escherichia coli*-Stämmen

Die Selektion auf erfolgreiche Transformation erfolgte bei dem verwendeten Vektor über eine Kanamycinresistenz Ampicillinresistenz. Die Selektionsplatten wurden dafür mit Ampicillin und X-Gal versehen. Der Vektor enthielt ebenso ein lacZ Gen, welches das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase kodiert. Durch eine α -Komplementation wird das Enzym β -Galactosidase gebildet. Das lacZ-Gen ermöglicht somit eine Blau-Weiß Selektion. Durch den Einbau eines DNA-Fragmentes in den Vektor wurde das lacZ-Gen zerstört und die Bakterienkolonien blieben weiß. Bakterienklone, die das DNA-Fragment nicht aufgenommen haben, wurden durch den Erhalt des lacZ-Gens blau.

Die weißen Bakterienkolonien wurden in 5 ml flüssigen LB-Medium mit 10 µl Ampicillin (50 mg/ml) bei 37°C ü. N. auf einem Schüttler zur Vermehrung inkubiert.

2.2.11 Plasmid Mini Preparation

Die über-Nacht Kultur wurde 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 250 µl Lösung I (inkl. RNase A) gelöst. Dazu wurden 250 µl Lösung II gegeben. Nach dem Invertieren erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei RT und die Zugabe von 350 µl der Lösung III. Anschließend wurde so lange invertiert, bis ein weißes Präzipitat ausfiel. Während einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurde die Säule mit 100 µl Equilibration Puffer equilibriert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach

der Zentrifugation wurde der Überstand auf die Säule gebracht und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl HB Puffer und eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Danach wurde mit 700 µl Waschpuffer gewaschen, indem für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Das Waschen wurde im nächsten Schritt wiederholt. Nach dem Trocknen des Pellets, 2 min bei 13 000 rpm, wurde in 80 µl Elutions Puffer für 1 min bei RT inkubiert. Nach dem Übersetzen der Säule auf ein neues Eppendorf Tube erfolgte die Eluation 1 min bei 13.000 rpm. Die Plasmid Mini Preparation erfolgte nach dem Protokoll und dem Kit von E.Z.N.A. Die Plasmidkonzentration wurde mit einem Photometer bestimmt.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung zur Abteilung für Entomologie (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) gegeben. Dafür wurden 140 ng Plasmid-DNA, sowie 0,5 µl Primer (M13 rev bzw. T7) eingesetzt und mit Nuklease freiem Wasser auf 6 µl aufgefüllt.

2.2.13 Synthese der Sonden für *in-situ*-Hybridisierung

Für die Durchführung einer *in-situ*-Hybridisierung wurden RNA-Sonden hergestellt, wobei mit zwei verschiedenen markierten Nukleotiden gearbeitet wurde. Um die Expression der zu untersuchenden Gene zu zeigen, wurden antisense RNA-Sonden hergestellt. Die Sequenzen von putativen Rezeptoren wurden durch Sequenzierung offenbart. Die PCR-Produkte wurden in den pCRII Vektor kloniert. Dieser Vektor besitzt zwei Promotorregionen für die RNA-Polymerasen SP6 und T7, die es ermöglichen sense RNA, bzw. antisense RNA zu schreiben. Der Vektor wurde mit einem entsprechenden Enzym geschnitten und das Produkt mit der entsprechenden Polymerase synthetisiert. Der Enzymverdau erfolgte nach dem Schema wie in 2.2.4 beschrieben mit Restriktionsenzymen. Anschließend wurden die Proben mit einem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Mit einer Gelextraktion erfolgte die Aufreinigung nach E.Z.N.A..

Danach wurden 150 ng von der gereinigten DNA eingesetzt und auf 14 µl mit Nuklease freiem Wasser aufgefüllt. Zum Schreiben der Sonde wurden 2 µl Transkriptionspuffer, 2 µl RNA-Labeling Mix (Digoxigenin bzw. Biotin) und 2 µl RNA Polymerase (SP6 bzw. T7) hinzugefügt. Nach einer anschließenden Inkubation von 3 h bei 37 °C, wurden 2,5 µl Pink Koprezipitant und 75 µl 99 % igen Ethanol dazu pipettiert und ü. N. bei - 20 °C gefällt.

Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 50 µl 70 % igen Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen. Danach folgte nochmals eine 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm bei der anschließend der Überstand verworfen wurde. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Die Fragmentation der Sonde erfolgte, indem 25 µl der Sonde mit 25 µl Fragmentationspuffer versetzt wurde. Nach einer Inkubation bei 60 °C für eine nach Angerer und Angerer kalkulierte Zeit wurde die Reaktion durch 10 % ige Essigsäure gestoppt und 250 µl Hybridisierungspuffer zugegeben.

MsexOR7, MsexOR10, MsexOR41 wurden auf 600 bp verkürzt. Eine Beispielrechnung:

Sonde	2000bp
Gekürzte Länge	600bp

Fragmentationszeit:

$$\begin{aligned} & (\text{Sonde} - \text{gekürzteLänge}) / (\text{Faktor} * \text{Sonde} * \text{gekürzte Länge}) \\ & = (2.0 - 0.6) / (0.11 * 2.0 * 0.6) \\ & = 10.60 \text{ min} = 10 \text{ min } 36 \text{ sek} \end{aligned}$$

2.2.14 Kryostat Histologie

Das Gewebe wurde zur Entfernung von Luftblasen in eine Triton X-100 Lösung und anschließend in Einbettungsmedium (Tissue-Tek OCT Compound) getaucht. Bei dem Gewebe handelte es sich um die Antennen von *M. sexta*, die an dem Scapulum entfernt wurden. Danach wurden die Gewebe mittels Einbettungsmedium auf die Halterung des Gefriermikrotoms aufgefroren. Dann wurde mit dem auf - 20 °C eingestellten Kryostaten Sagittalschnitte von 12 µm

bzw. 14 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und nach einer kurzen Trocknung bei Raumtemperatur bei - 80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.2.15 Sondentest

Um die Qualität der Digoxigenin Markierung der hergestellten RNA-Sonden zu ermitteln, wurde ein Sondentest durchgeführt. Für diesen wurden 1,0 µl RNA-Sonde mit 1,5 µl doppelt destilliertem Wasser und 2,5 µl 20 x SSC versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 65 °C erfolgte für 5 min eine Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Ansätze punktuell auf eine Hybonemembran aufgetragen und getrocknet. Danach erfolgte das Ausbacken für 2 h bei 80 °C zwischen Filterpapier. Nach dem Ausbacken wurden 20 ml MS1 Lösung über die Membran (zwischen Filterpapier) in eine Petrischale gegeben und für 10 min geschüttelt. Danach wurde für 60 min bei RT und unter Schütteln in 1 % iger Blockierungslösung geblockt. Anschließend erfolgte für 2 h bei 37 °C eine Inkubation mit einem Antikörper (Anti-Digoxigenin + 1% Blockierungslösung, 1:10000). Nach dieser Inkubation erfolgte mit der MS1 Lösung dreimaliges Waschen der Membran für 10 min auf einem Schüttler. Danach wurde mit NBT/BCIP ca. 10 min unter lichtgeschützten Bedingungen entwickelt.

2.2.16 *in-situ*-Hybridisierung

Die *in-situ*-Hybridisierung dient zum direkten Nachweis einer spezifischen mRNA. Die Markierung erfolgte über RNA-Sonden. Zum Nachweis wurden Digoxigenin bzw. Biotin markierte Sonden verwendet.

Vorbereitung Hybridisierungsmix

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden zunächst verschiedene Verdünnungen der Sonden angesetzt, um herauszufinden, in welcher Konzentration die Sonden die besten Signale geben. Die Sonden wurden 1:50, 1:100, 1:200 mit Hybridisierungspuffer verdünnt.

Anschließend wurden die Sonden für 10 min bei 65 °C in einem Heizblock inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation der Sonden für mindestens 5 min auf Eis.

Fixierung und Waschen der Gewebeschnitte

Zunächst wurden die Objektträger an Luft und bei RT getrocknet. Danach wurden sie für 30 min bei 4 °C in 200 ml Fixierlösung fixiert. Anschließend erfolgten, wie in der Tabelle 5 aufgelistet, die Waschschrirte bei RT.

Tabelle 5: Waschschrirte der Gewebeschnitte

Waschschrirte	Lösungen	Volumen	Zeit
1	1 x PBS	200 ml	1 min
2	0,6 % HCl	200 ml	10 min
3	1x PBS-1%Triton	200 ml	2 min
4	1 x PBS	200 ml	30 sek
4	1 x PBS	200 ml	30 sek

Nach dem Waschen erfolgte eine Inkubation der Schnitte in 50 % Formamid/5 x SSC für 10 min bei 4 °C.

Hybridisierung

Nach der Inkubation wurden die Schnitte bei RT und an Luft getrocknet. Anschließend wurden sie mit 100 µl Sonde (in Hybridisierungspuffer) versehen und mit einem Deckglas verschlossen. Dann wurden die Schnitte in eine Feuchtkammer mit 50 % Formamid (50 % A. bidest) sortiert und bei 55 °C in einem Hybridisierungssofen ü. N. inkubiert.

Waschen von Gewebeschnitten

Anschließend erfolgte nach dem Entfernen der Deckgläser zweimal Waschen der Schnitte mit 200 ml 0,1 x SSC für 30 min bei 60 °C im Wasserbad. Dann wurden die Schnitte kurz in 200 ml 1 x TBS (pH 7,5) gespült.

Blockierung

Die Schnitte wurden in einer Feuchtkammer (100 % A. bidest) mit 1 ml Blockierungspuffer versetzt und für 30 min bei RT inkubiert.

Inkubation mit Antikörpermix

Zunächst wurde der Blockierungspuffer entfernt. Anschließend wurden die Objektträger mit 100 µl Antikörpermix (Anti-Digoxigenin und Streptavidin, Mischung nach Herstellerangaben) versetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Danach wurden die Schnitte in eine Feuchtkammer mit A. bidest sortiert und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser durch Spülen in 200 ml TBST entfernt. Anschließend wurde 3 x in 200 ml TBST für 5 min bei RT auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Schnitte kurz in 200 ml DAP Puffer getaucht.

Digoxigeninfärbung

Nach der Inkubation in DAP wurde zu den Schnitten 100 µl Fast Red Lösung (HNPP Fluorescent Detection, Mischung nach Herstellerangaben) gegeben und anschließend mit einem Deckglas versehen. Die Objektträger wurden in einer Feuchtkammer (100 % A. bidest) für 30 min bei RT inkubiert. Das Entfernen der Deckgläser erfolgte durch Spülen in 200 ml TBST. Anschließend wurde dreimalig in 200 ml TBST für 5 min bei RT und lichtgeschützt auf dem Schüttler gewaschen.

Inkubation mit Tyramid

Nach der Digoxigeninfärbung wurden die Schnitte mit 100 µl Tyramid Lösung (Mischung nach Herstellerangaben) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer für 10 min bei RT inkubiert. Das Entfernen der Deckgläser erfolgt durch Spülen in 200 ml TBST. Danach erfolgte 3 x Waschen in 200 ml TBST für 5 min bei RT, sowie lichtgeschützt auf Schüttler. Anschließend wurden die Objektträger mit 200 ml A. bidest gespült.

Vorbereiten der Objektträger für die Mikroskopie

Abschließend wurden die Schnitte mit PBS/Glycerol eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas verschlossen und mit Nagellack versiegelt. Bis zum Scannen werden die Objektträger bei 4 °C gelagert.

2.2.17 Konfokal Mikroskopie

Das Scannen der hybridisierten Gewebeschnitte erfolgt an einem Konfokalmikroskop. Das Bearbeiten der behandelten Schnitte erfolgte mittels LSM510 Software.

2.2.18 Quantitative Real Time PCR

Die qPCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, die zudem die Quantifizierung der DNA nach jedem Zyklus ermöglicht.

In der Real Time PCR wurde SYBR Green als Detektionssystem verwendet. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert und die Wellenlänge seines emittierten Lichts ändert. Es erfolgt eine Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem PCR Zyklus; so wird der Anstieg des Produktes detektiert. Die Expressionsprüfung erfolgte über eine Schmelzkurvenanalyse. Zudem wurde zusätzlich die passive Referenz Rox verwendet. Rox wurde in jeder Reaktion in konstanter Konzentration zugesetzt. Dadurch wurde für jeden Zeitpunkt ein Quotient aus dem Signal des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes und dem Signal von Rox gebildet. Diese Normierung gleicht Fluoreszenzschwankungen von einem Reaktionsgefäß zum anderen aus, sowie die von einer 96-Well-Platte zur anderen.

Die Quantifizierung erfordert PCR-Läufe für die Gene von Interesse (MsexOR) und für ein Housekeeping Gen. In dieser Arbeit wurde dafür RL 31, ein unreguliertes und ribosomales Protein, benutzt. Diese Methode wird zur Bestimmung der Expressionsintensität der MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 zwischen Männchen und Weibchen angewandt. Des Weiteren zum quantitativen Nachweis in den einzelnen antennalen Abschnitten.

Für die quantitative Real Time PCR wurde das Stratagene Mx3000P Gerät und das PCR Kit von Qiagen verwendet.

Bei jedem Real Time PCR Lauf wurden vier Positivkontrollen, sowie eine Negativkontrolle mitgeführt, welche als Dreifachbestimmung angesetzt waren. In den Positivkontrollen wurde als Template DNA von *M. sexta* eingesetzt. Zur Herstellung des Standards und zur Negativkontrolle wurde Nuklease freies Wasser verwendet. Das Pipettierschema und das PCR-Programm für die qPCR sind in den Tabellen 6 und 7 dargestellt. Die Daten wurden mittels der Stratagene Mx3000p analysiert. Die Analysierung der kalkulierten Expressionslevels erfolgte in Bezug auf RL 31.

Tabelle 6: Pipettierschema quantitative Real Time PCR

Reagenz	Volumen [μ l]	Konzentration
Rox	1,0	
Wasser (Kit)	1,2	
RL31 for	0,4	100 pmol/ μ l
RL31 rev	0,4	100 pmol/ μ l
Template	7,0	1 μ g

Tabelle 7: PCR-Programm für die Expressionsprüfung

Zeit [sek]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Reaktionszyklenzahl
600	95	1
30	95	40
60	60	
60	95	1
30	55	
30	95	

Für die Ermittlung der relativen Quantifizierung in den Antennen von Weibchen und Männchen, sowie in den einzelnen Antennenabschnitten wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode verwendet. Ziel der relativen Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist es eine Aussage über das Verhältnis von Zielgen zu Housekeeping

Gen zu treffen und in einem Vergleich verschiedener Proben eine quantitative Angabe über die Unterschiede derer Verhältnisse zu machen. Dafür wurde ein Kontrollgen (RL 31) verwendet. In jedem Ansatz wurde das Kontrollgen mit entsprechender cDNA mit amplifiziert. Jede Probe steht somit im Bezug zu dem Kontrollgen. Bei der Analyse des Verhältnisses von Ziel- und Housekeeping Gen wird das Kontrollgen 1 gesetzt und dadurch auf das Verhältnis innerhalb des Kontrollgens normiert.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung putativer olfaktorischer Rezeptoren von *M. sexta*

Die Analyse olfaktorischer Rezeptoren von *M. sexta* wurde auf der Basis einer Sequenzdatenbank antennaler Transkripte durchgeführt, welche vollständige und partielle Sequenzen von exprimierten Genen enthält. Die Funktionen der meisten Transkripte ist bislang unbekannt (Große-Wilde et al., 2011). Dies gilt auch für die putativen olfaktorischen Rezeptoren MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41, welche Gegenstand der Untersuchung sind. Diese drei Rezeptoren besitzen Orthologe in anderen Spezies der Lepidoptera und sind in einem ähnlichen Grade konserviert wie die Pheromonrezeptoren (Abb. 3, Große-Wilde et al. 2011). Dies ist ungewöhnlich für ORs, welche generell als sehr divergent beschrieben werden (Robertson und Wanner, 2006). Daher vermuteten wir, dass ihre bisher unbekannte Funktion ähnlich wichtig der Funktion der Pheromonrezeptoren ist. Aufgrund ihrer hohen Konservierung, stellen wir die Hypothese auf, dass diese putativen ORs geschlechtsspezifisch sind. Dies deutet darauf hin, dass diese drei Rezeptoren wichtige Funktionen haben und das macht sie so interessant. Um Hinweise auf ihre Rolle bei der Olfaktion in Tabakswärmern zu bekommen, wurde die Expression der Rezeptoren im Hinblick auf ihre Geschlechtsspezifität, sowie ihrem räumlichen Muster innerhalb der Antenne charakterisiert.

(Große-Wilde et al, 2011). Eine Liste von 25.975 Contigs wurde auf eArray (Agilent technologies) geladen. Für die Microarray Hybridisierung wurde RNA von drei Tieren, sowie fünf Larven, mit vier biologischen Replikaten pro Geschlecht verwendet. Die amplifizierten cRNA Proben wurden für die Microarray Hybridisierung verwendet und mit Agilent Microarray Scanner gescannt. Mit dem Gene-Sifter Microarray Analyseprogramm wurden die Rohdaten analysiert. Die verwendeten Microarray Daten (Abb. 4-6) lieferten und Große-Wilde et al. in dem Jahr 2011.

MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 weisen in der Microarray-Analyse eine höhere Expression in Weibchen (Abb. 4-6) auf.

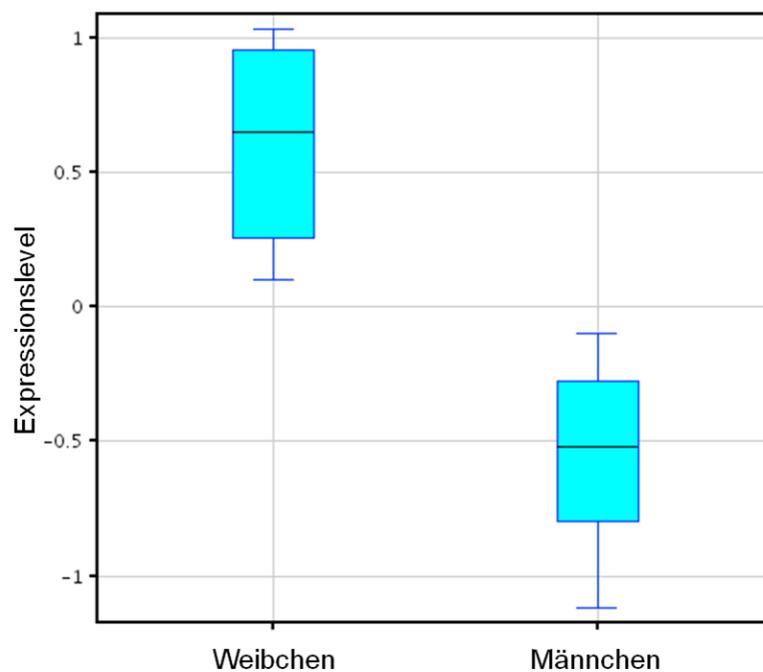


Abb. 4: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-7 in *M. sexta* Microarray. MsexOR-7 ist in Weibchen höher exprimiert als im Männchen.

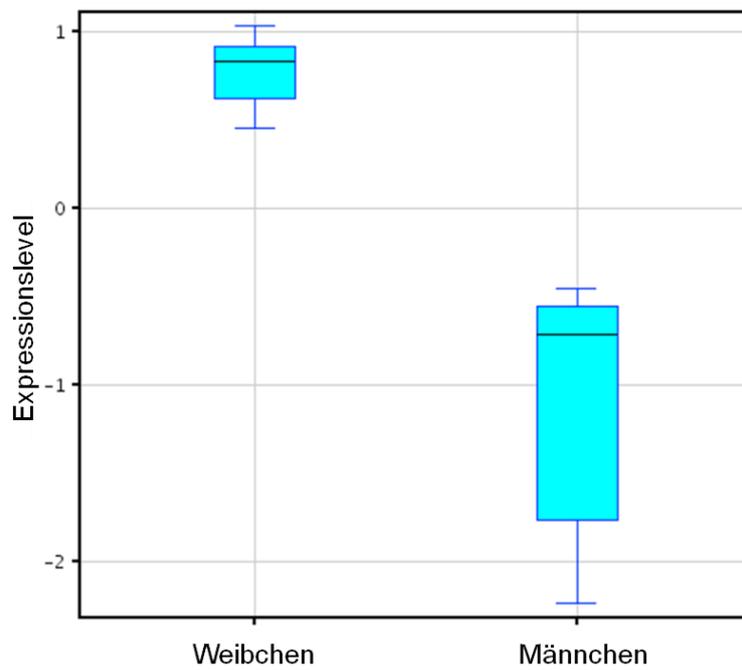


Abb. 5: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-10 in *Manduca sexta* Microarray.. Die Expression von MsexOR-10 ist im Weibchen höher als im Männchen.

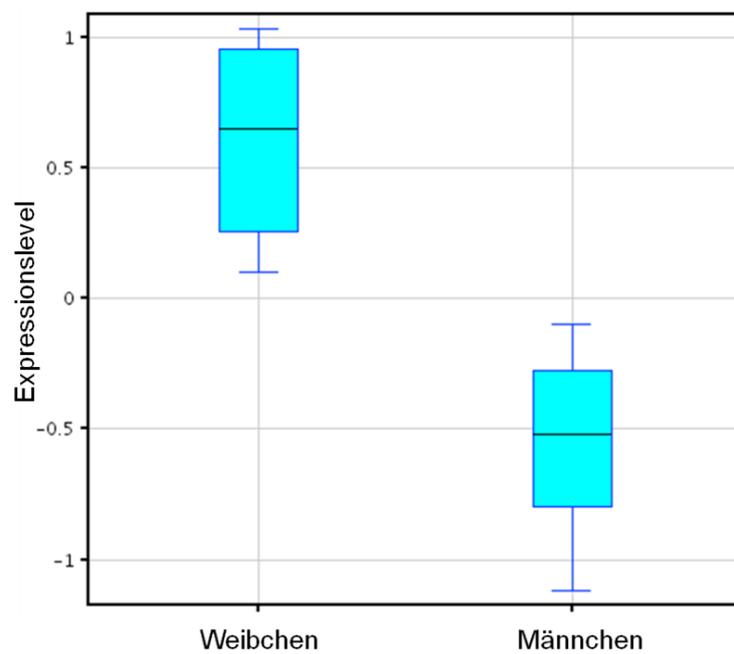


Abb. 6: Analyse der Geschlechtsspezifität von MsexOR-41 in *Manduca sexta* Microarray. MsexOR-41 ist in Weibchen höher exprimiert als im Männchen.

Die erhaltenen Microarray-Daten fordern aufgrund der hohen Anzahl parallel untersuchter Einzelproben (> 44.000 Sonden in unserem Fall) weitere Validierungsschritte. Deswegen erfolgte eine Überprüfung der geschlechtsspezifischen Expression mittels quantitativer PCR. Dafür wurde vorerst die Spezifität der verwendeten Primer getestet.

3.3 PCR der Oligonukleotide

Für die quantitative Expressionsanalyse wurden Primer synthetisiert, deren Spezifität in einer PCR überprüft wurde. Dafür wurde RNA aus Antennen isoliert und mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Template in der PCR. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen und mit anschließender Ethidiumbromidfärbung analysiert. Es wurden Primerpaare für MsexOR-7, MsexOR-10, MsexOR-41 und das Housekeeping Gen (RL 31, kodiert ribosomales Protein, nicht reguliert) erstellt.

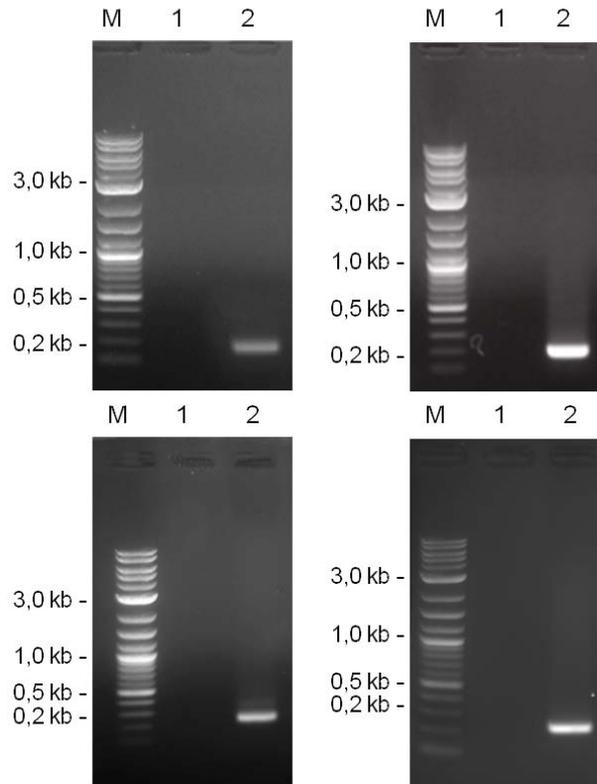


Abb. 7: Agarose-Gelelektrophorese mit Produkten aus einer PCR mit antennaler cDNA für MsexOR-7, MsexOR-10, MsexOR-41 und RL 31.

Die Produkte der RNA-Isolierung wurden in einem 1,5 % igen Agarosegel analysiert. Die Größen des DNA-Markers (M = Marker) sind im rechten Bildrand dargestellt. Die Spur 1 wurde freigelassen, die Spur 2 enthält eine Bande des jeweiligen PCR-Produktes (v. r.: MsexOR-7, MsexOR-10, MsexOR-41, RL 31).

Die PCR-Produkte (Abb. 7) weisen Banden in der erwartenden Größe auf. Die spezifischen Primerpaare konnten somit für die quantitative Expressionsanalyse von MsexOR-7, MsexOR-10, MsexOR-41 und RL 31 verwendet werden.

3.4 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Zur Untersuchung der Hypothese, dass MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 geschlechterspezifische Rezeptoren sind, sowie zur Überprüfung der Microarray-Daten wurde eine qPCR durchgeführt. Für die Quantifizierung wurden PCR-Läufe für das jeweils untersuchte Gen (MsexOR) und das Housekeeping Gen (RL 31) benötigt. Dabei diente RL 31 als Referenzgen, mit

dem Variationen in der Ausgangsmenge des eingesetzten Templates ausgeglichen wurden. In beiden Fällen wurde dabei dieselbe cDNA als Template eingesetzt. Als Analysemethode für die Expressionsanalyse wurde die relative Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode gewählt. Für diese wurde zunächst ΔC_T -Wert bestimmt. Dieser ist die Differenz der Zykluszahlen, in der das untersuchte Gen, sowie das Housekeeping Gen erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigen. So ist eine Aussage darüber möglich, ob das untersuchte Gen überhaupt exprimiert wurde. Dabei hatten die C_T -Werte einen inversen Bezug zu dem Amplikon in der Reaktion. Um die Genexpression zwischen zwei verschiedenen Proben zu vergleichen wurde anschließend der $\Delta\Delta C_T$ -Wert (durch das Subtrahieren der ΔC_T -Werte der Proben) bestimmt (Schmittgen und Livak, 2008). Die Bestimmung der n-fachen Veränderung der Genexpression wurde über $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ermittelt (Livak und Schmittgen, 2001).

Die Wirksamkeit der Aussage hing von der Übereinstimmung der PCR-Effizienzen der Gene ab. Je größer die Unterschiede der Effizienzen waren, umso größer war der Fehler der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Der Idealwert der Effizienz beträgt bei exponentieller Amplifikation 1 (100% Effizienz), was einer Verdopplung der Menge des PCR Produktes nach jedem PCR Zyklus entspricht (Bohbot und Vogt, 2005). Die PCR-Effizienzen der verwendeten Gene sollten im Idealfall ähnlich sein. Sie konnten durch verschiedenste Methoden bestimmt werden (Pfaffl, 2010). In dieser Arbeit verwendeten wir die Methode, welche die eigentliche PCR-Effizienz überschätzt (Effizienz 2,0 bis 2,2) und nicht auf probenindividuelle Mängel eingeht (Pfaffl, 2010). Das verwendete qPCR System Mx3000P ermittelte nur diese Variante der PCR-Effizienz. Die gewählte Methode legte einen Spielraum für eine Abweichung von 10 % in den PCR-Effizienzen fest (Schmittgen und Livak, 2008). Unter diesen Annahmen lautete die Formel zur Ermittlung der relativen Genexpression $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Die PCR-Effizienzen von RL31 (102 %), MsexOR-10 (111 %) und MsexOR-41 (113 %) lagen im Rahmen der 10 %. MsexOR-7 (123 %) hatte eine Differenz von 20 %. Die PCR-Bedingungen sollten dafür optimiert werden, z. B. mit einer Veränderung der Primersequenz und der $MgCl_2$ -Konzentration.

3.5 Lokalisation der räumlichen Expression von MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 in den Antennen

Auf den Antennen von *M. sexta* sitzen olfaktorische Sensillen, welche Dendriten der olfaktorischen sensorischen Neuronen beherbergen (Abb. 1, Shields und Hildebrandt, 1999). Die Zellkörper dieser Neuronen sind unterhalb der Sensillen lokalisiert. Wenn die untersuchten Gene ORs kodieren, müssen sie in solchen Zellen exprimiert sein. Um zu überprüfen, ob die rezeptorspezifische mRNA sich in diesen Zellen befindet, wurden Digoxigenin und Biotin markierte antisense RNA-Sonden hergestellt. Diese wurden in *in-situ*-Hybridisierungen mit sagittalen Kryoschnitten der Antenne verwendet.

Aufgrund der Lokalisation der ORs in der Antenne, lassen sich Rückschlüsse auf deren Funktion ziehen. Dafür sind elektrophysiologische Messungen notwendig, die derzeit unternommen werden.

3.6 Sondentest

Die Digoxigenin markierten hergestellten antisense RNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung wurden getestet (Abb. 8).

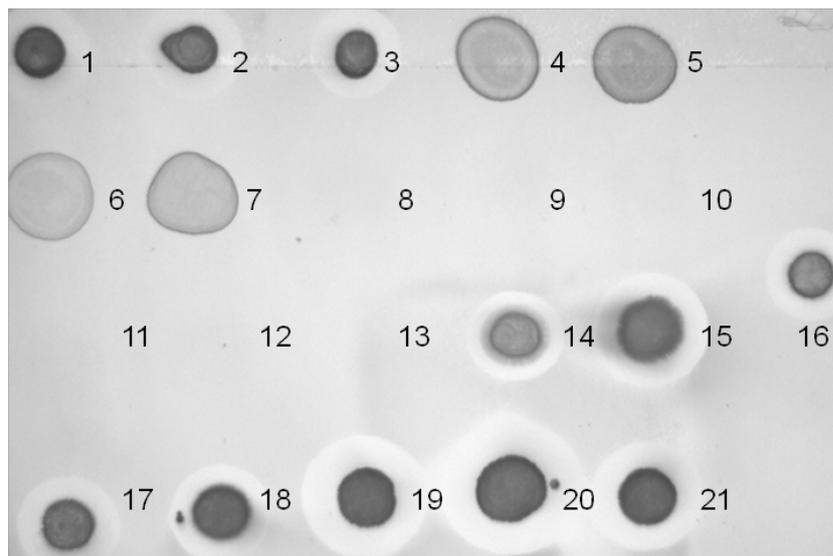


Abb. 8: Digoxigenin Sondentest.

4 bis 21 sind nicht Bestandteil dieser Arbeit; die Positivkontrolle (MsexOR-4) wurde mit einem + gekennzeichnet, 1: MsexOR-7, 2: MsexOR-10, 3: MsexOR-41.

Die antisense RNA-Sonden für MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 zeigten, dass die Digoxigenin-Markierung funktioniert hat. So konnte eine fehlende Markierung der Sonden ausgeschlossen werden.

3.7 qPCR entlang der Antenne

Über die Lokalisation der ORs innerhalb der Antenne kann man Rückschlüsse auf deren Funktionen ziehen. In einer Studie wurde dies elektrophysiologisch an *Spodoptera littoralis* (Binyameen et al., 2010) untersucht. Dafür wurde das 15. antennale Segment von der Basis und der Spitze ausgewählt. Elektrophysiologische Antworten von ORNs der beiden 15. antennalen Segmente bezogen sich auf Düfte, welche essentiell bei der Wirtswahl, sowie der Wahl des Eiablageplatzes sind.

Deshalb wurde eine weitere quantitative PCR durchgeführt. Diese erfordert, dass die Antennen in vier Stücke (ca. alle 20 Segmente) geschnitten wurden. Für die Analysemethode zur Ermittlung der relativen Quantifizierung wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode gewählt.

3.8 Expression von MsexOR-7

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Expression von MsexOR-7 in beiden Geschlechtern über qPCR, um eine Geschlechtsspezifität von MsexOR-7 zu untersuchen.

Die Expression von MsexOR-7 konnte sowohl in den Antennen von Männchen als auch in denen von Weibchen nachgewiesen (Abb. 9) werden.

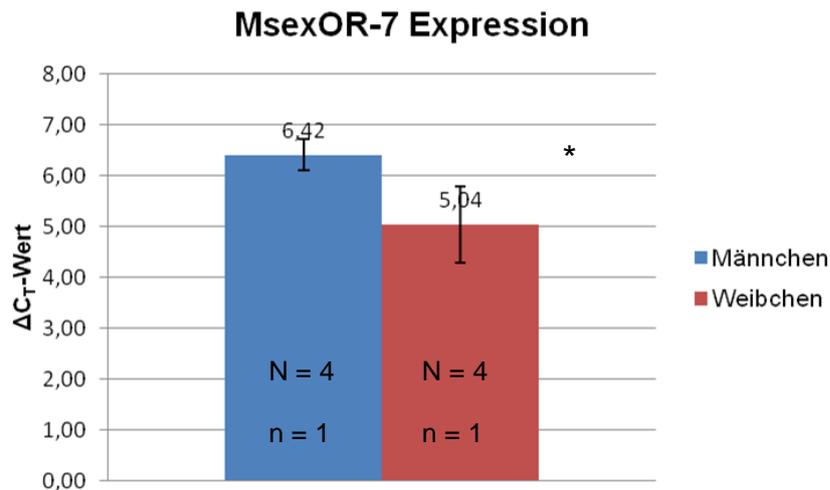


Abb. 9: Quantifizierung von MsexOR-7 in weiblichen und männlichen Antennen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression ist in Weibchen signifikant höher als in Männchen. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

MsexOR-7 ist in Weibchen, wie auch in Männchen exprimiert.

Die relative Expression von MsexOR-7 ist in Weibchen 3,3 mal so hoch wie in Männchen, der Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,02$).

Zur Untersuchung der räumlichen Expression wurde FISH mit einer Biotin-markierten antisense RNA-Sonde von MsexOR-7 (Abb. 10) durchgeführt. Signale konnten in Männchen unterhalb der Kutikula eines Antennomeres und nur in der Antennenspitze verzeichnet werden. In der Antenne der Weibchen konnten keine Signale von MsexOR-7 (Abb. 11) gefunden werden.

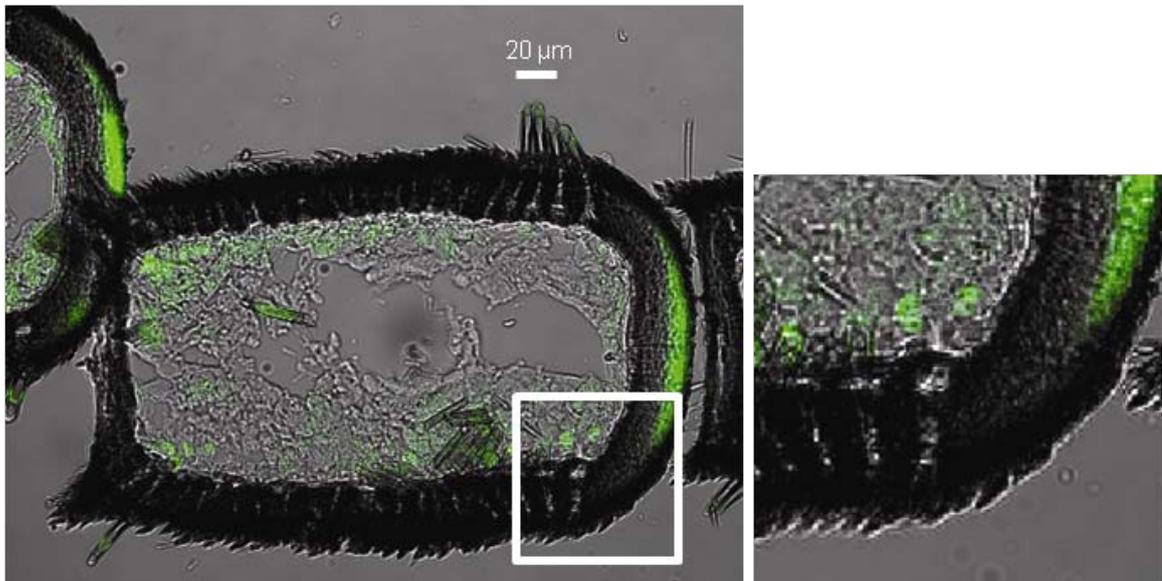


Abb. 10: Lokalisation von MsexOR-7 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer männlichen Antenne von *Manduca sexta*.

Die Abbildung zeigt Signale einer Biotin-markierten (grün) MsexOR-7 Sonde in einem vollständigen Antennensegment. Maßstab 20 μm .

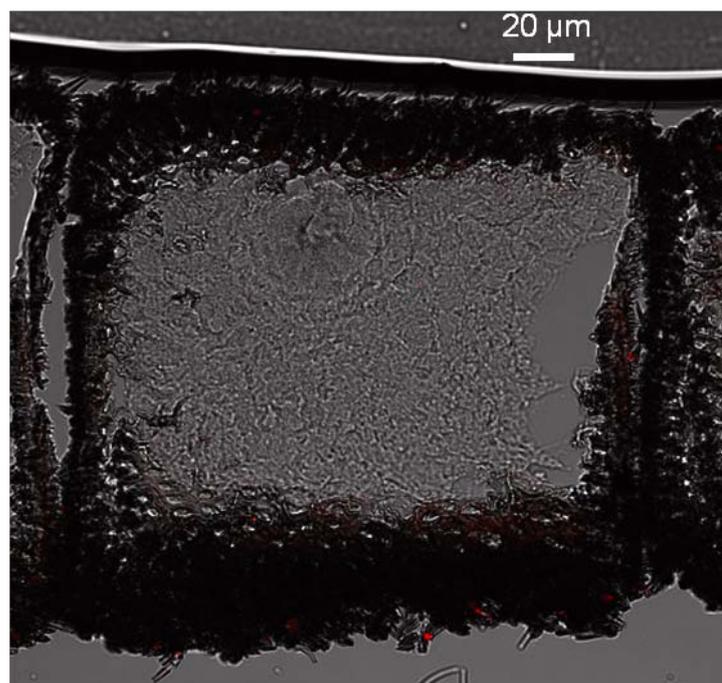


Abb. 11: Lokalisation von MsexOR-7 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Weibchen von *Manduca sexta*.

In der Abbildung sind keine Signale der Digoxigenin-markierten MsexOR-7 Sonde zu sehen. Maßstab 20 μm .

Aufgrund dessen, dass MsexOR-7 in der *in-situ*-Hybridisierung nur in der Spitze der Antenne lokalisiert werden konnte, erfolgte die Prüfung der Expression von MsexOR-7 mittels qPCR in einzelnen Antennenabschnitten.

Die Ergebnisse für MsexOR-7 zeigen eine signifikant höhere Expression in der Spitze (p-Wert 0,038) und in der mittleren Region (Segmente 21-40) (p-Wert 0,018) der Weibchenantennen in Bezug zum Ende (Abb. 12). MsexOR-7 ist in allen Segmenten der männlichen Antennen (Abb. 13) gleich exprimiert.

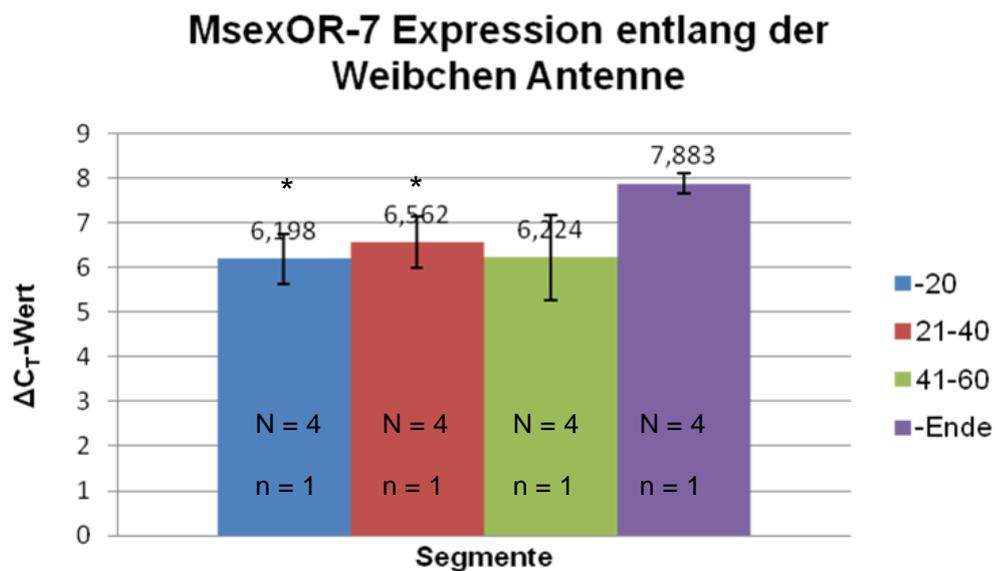


Abb. 12: Quantifizierung von MsexOR-7 entlang der Antennen in Weibchen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der absoluten Konzentration, wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-7 ist in der Spitze (1-20) und in der Mittel Region (21-40) signifikant verschieden zum Ende. Für die statistische Analyse wurde ein gepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

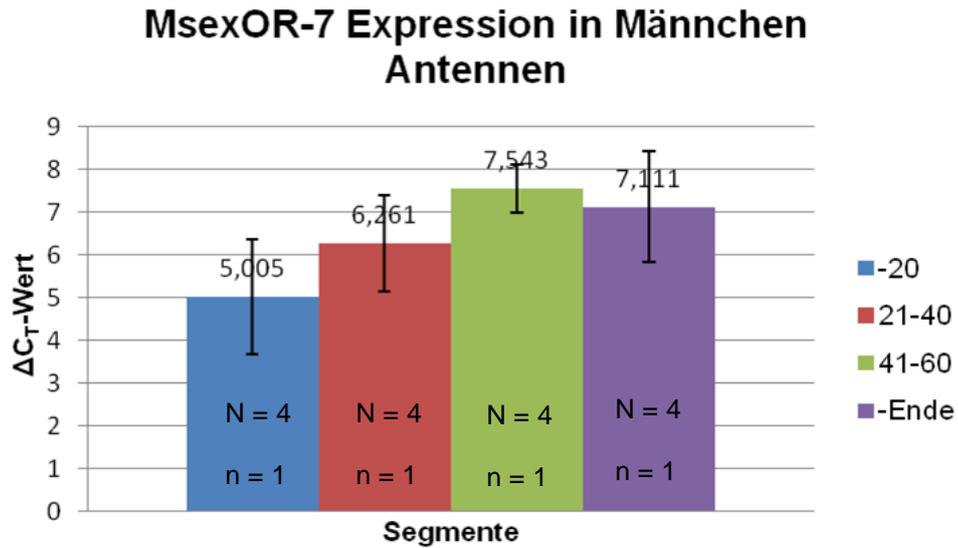


Abb. 13: Quantifizierung von MsexOR-7 entlang der Antennen in Männchen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der absoluten Konzentration, wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-7 sind in allen Segmenten gleich exprimiert. Für die statistische Analyse wurde ein gepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

3.9 Expression von MsexOR-10

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von MsexOR-10 in beiden Geschlechtern sind in der Abb. 14 dargestellt.

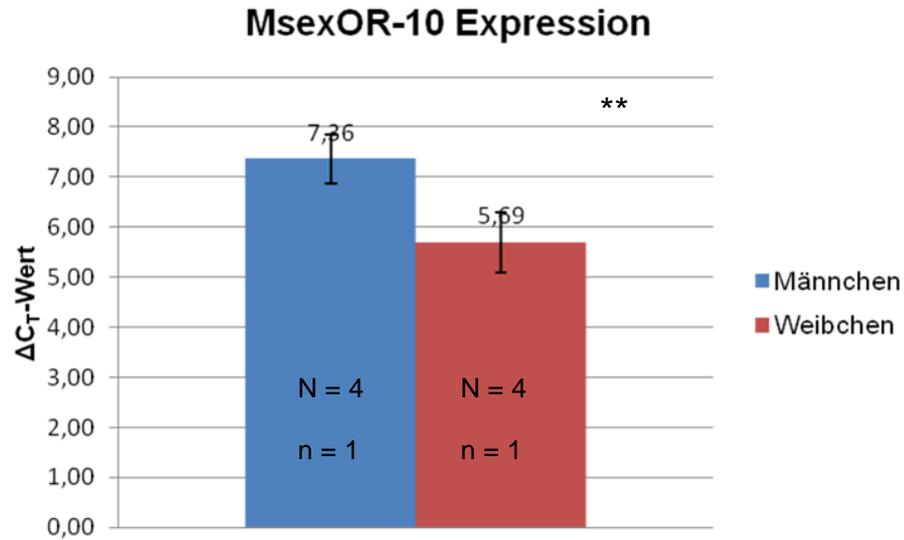


Abb. 14: Quantifizierung von MsexOR-10 in weiblichen und männlichen *Manduca sexta*.

Die absolute Konzentration wurde über RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-10 ist im Weibchen höher als im Männchen. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

MsexOR-10 ist in Männchen und in Weibchen exprimiert. Die Expression ist in Weibchen 3,7 mal so hoch und statistisch signifikant unterschiedlich (p-Wert = 0,005).

Aufgrund dieses Resultats erfolgte eine Prüfung der räumlichen Expressionsmuster von MsexOR-10 in den Antennen von Männchen und Weibchen. MsexOR-10 konnte mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung nicht lokalisiert werden, somit erfolgte eine gezielte Suche über eine qPCR entlang der Antenne.

MsexOR-10 ist signifikant (p-Wert 0,016) höher in der mittleren Region (Segmente 41-60) in Bezug zum Ende der Weibchenantennen (Abb. 15) exprimiert. In den Antennen der Männchen, war MsexOR-10 (Abb. 16) in allen Segmenten gleich stark exprimiert.

MsexOR-10 Expression entlang der Weibchen Antenne

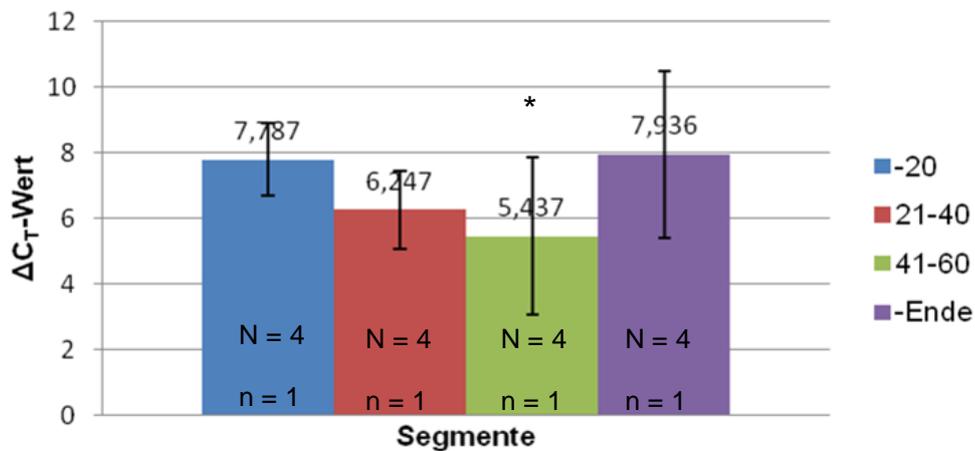


Abb. 15: Quantifizierung von MsexOR-10 entlang der Antennen in Weibchen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der absoluten Konzentration, wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-10 ist in der mittleren Region (41-60) signifikant verschieden zum Ende exprimiert. Für die statistische Analyse wurde ein gepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

MsexOR-10 Expression entlang der Männchen Antenne

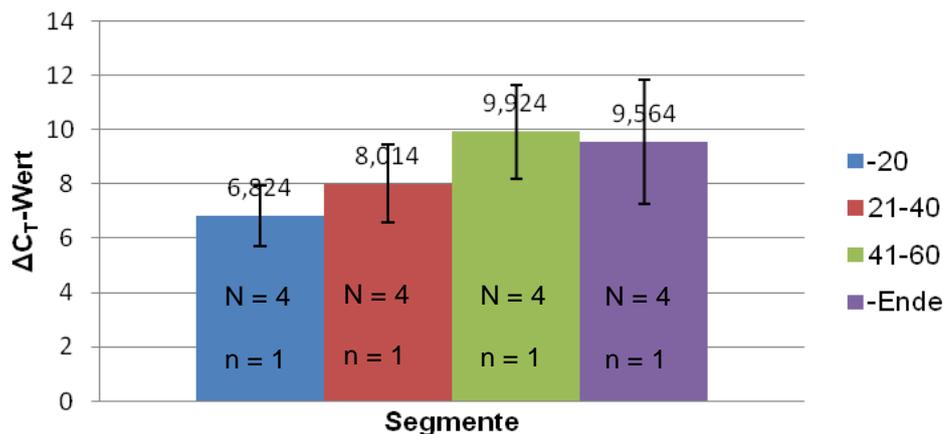


Abb. 16: Quantifizierung von MsexOR-10 entlang der Antennen in Männchen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der absoluten Konzentration, wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-10 sind in allen Segmenten gleich exprimiert. Für die statistische Analyse wurde ein gepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

3.10 Expression von MsexOR-41

Für MsexOR-41 wurde eine geschlechterspezifische Expression mittels qPCR durchgeführt. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt.

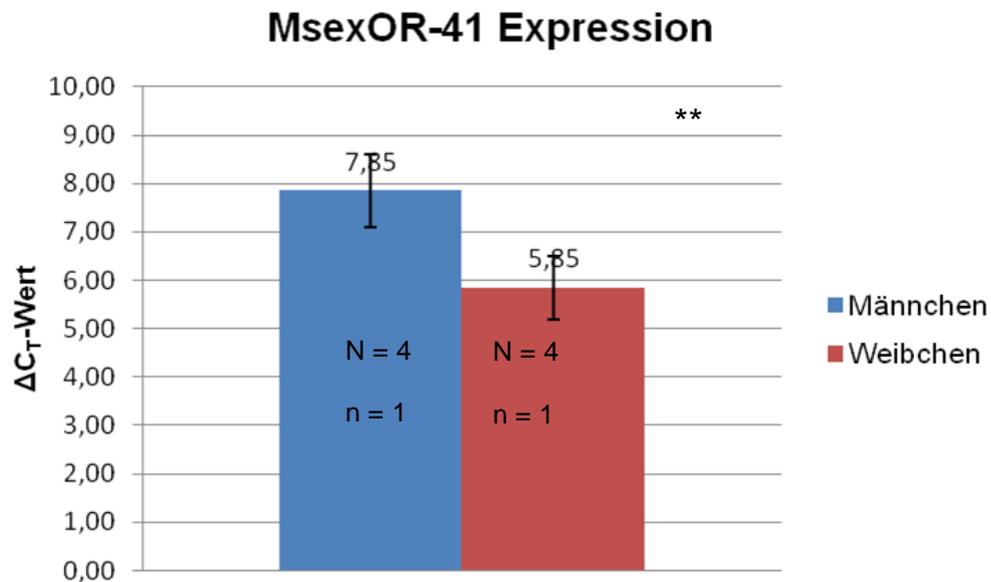


Abb. 17: Quantifizierung von MsexOR-41 in weiblichen und männlichen Antennen von *Manduca sexta*.

Die Ergebnisse der absoluten Konzentration, wurden mit RL 31 normalisiert. Die Expression von MsexOR-41 ist in Weibchen höher als im Männchen. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter T-Test (* p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$) verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass MsexOR-41 in den Weibchen und Männchen exprimiert ist. In den Weibchen ist MsexOR-41 5,1 mal höher exprimiert als im Männchen (p-Wert = 0,01).

Für die Lokalisation von MsexOR-41 in den Antennen, wurde eine Digoxigenin markierte Sonde verwendet (Abb. 18 und 19). Die Signale des MsexOR-41 befinden sich unterhalb der Kutikula in Antennen der Weibchen und Männchen. Da MsexOR-41 in mehreren antennalen Regionen lokalisiert wurde erfolgte keine qPCR entlang der Antenne.

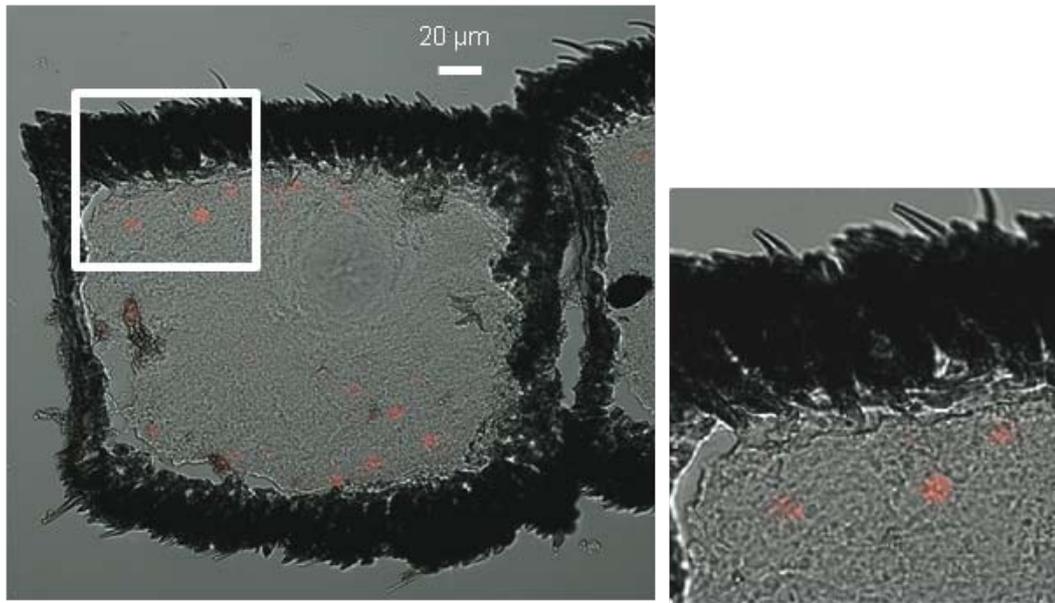


Abb. 18: Lokalisation von MsexOR-41 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Weibchen von *Manduca sexta*.

In der Abbildung sind Signale der Digoxigenin markierten (Rot) MsexOR-41 Sonde ersichtlich. Maßstab 20 µm.

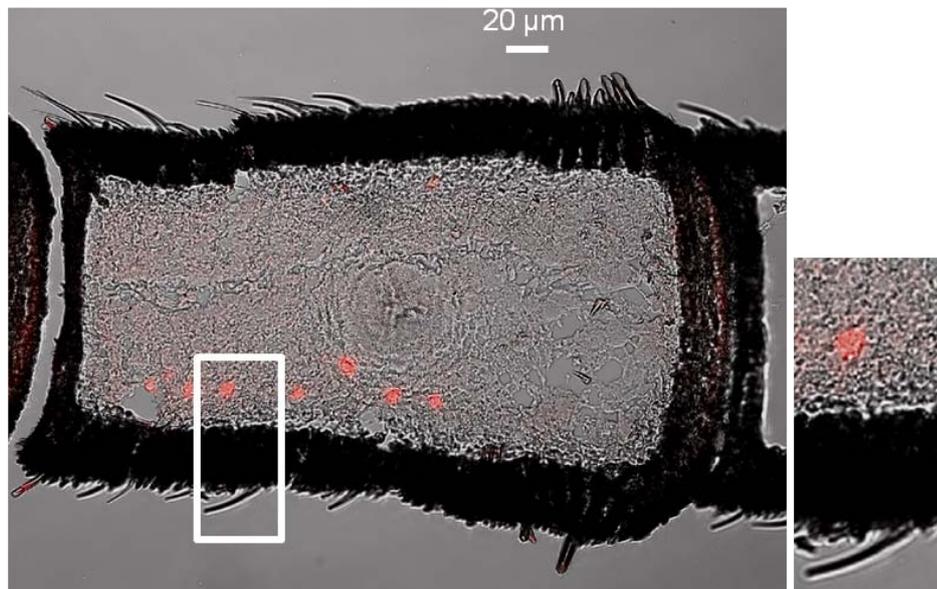


Abb. 19: Lokalisation von MsexOR-41 mittels *in-situ*-Hybridisierung in einer Antenne vom Männchen von *Manduca sexta*.

In der Abbildung sind Signale der Digoxigenin-markierten (Rot) MsexOR-41 Sonde ersichtlich. Maßstab 20 µm.

4. Diskussion

M. sexta ist ein Modellorganismus der olfaktorischen Forschung an Insekten. ORs sind von Zentraler Bedeutung für Insekten z. B. bei der Futtersuche und bei der intraspezifischen Kommunikation über Pheromone. Daher sind sie von besonderem Interesse. Für die Analyse der ORs von *M. sexta* verwendeten wir als Grundlage eine Sequenzdatenbank antennaler Transkripte, welche vollständige und partielle Sequenzen von exprimierten Genen enthält.

Die Familie der ORs ist generell außergewöhnlich wenig konserviert (Robertson und Wanner, 2006) und bilden Heteromultimere mit einem Corezeptor, genannt *Orco* (Vosshall und Hansson, 2011). Eine hohe Sequenzähnlichkeit, sowie eine ähnlich hohe Konservierung zu *Orco* in *D. melanogaster* besitzt unter anderem der *Orco*, AgOR7, von *Anopheles gambiae* (Hallem et al., 2006), wobei diese Gene Orthologe sind (Pitts et al., 2004). Die von uns untersuchten drei Kandidaten MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 besitzen anscheinend Orthologe in anderen Spezies der Lepidoptera (Große-Wilde et al. 2011), was im Vergleich zu anderen ORs bemerkenswert ist. Zwei von ihnen (MsexOR-7, MsexOR-41) sind in einem ähnlichen Grade konserviert wie z. B. die Pheromonrezeptoren. Dieser hohe Konservierungsgrad deutet daraufhin, dass die Gene eine Funktion, für die Individuen, innerhalb essentieller Verhaltensweisen haben. Viele wichtige Verhaltensweisen sind geschlechtsspezifisch, z. B. die Partnersuche. Bisher wurden zwei (MsexOR-1 und MsexOR-4) Pheromonrezeptoren in *M. sexta* identifiziert (Patch et al., 2009, Große-Wilde et al. 2010). MsexOR-1 weist hohe Sequenzähnlichkeiten mit dem Bombykal Rezeptor BmOR-3 und MsexOR-4 Homologe mit dem Bombykol Rezeptor BmOR-1 auf (Nakagawa et al. 2005, Große-Wilde et al., 2006). Eine geschlechtsspezifische Verhaltensweise ist die Erkennung der Wirtspflanzen für die Eiablage der Weibchen. Weibchen reagieren besonders auf das in der Pflanze enthaltene (+)-Linalool (Reisenman et al., 2004). Für *M. sexta* wurden die Weibchen-spezifischen MsexOR-5 und MsexOR-6 als putative (+)-Linalool detektierende ORs beschrieben (Große-Wilde et al., 2010, Große-Wilde et al., 2011), was bisher noch nicht erwiesen ist. Ebenso

detektieren sie flüchtige organische Verbindungen von Pflanzenschäden durch Raupen (De Moraes et al., 2001).

Aufgrund der hohen Konservierung unserer Kandidaten, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass diese ORs in wichtigen Verhaltensweisen eine Rolle spielen. Zwar wurde in Große-Wilde et al. (2011) die differentielle Genexpression zwischen den Geschlechtern mit Hilfe von Microarrays untersucht, jedoch ohne im Detail auf diese drei Kandidaten einzugehen. Aufgrund der Besonderheiten der drei Kandidaten haben wir uns in dieser Studie vorgenommen sie genauer zu analysieren. Die qPCR ist eine sehr sensitive Methode, die zum Nachweis spezifischer mRNA als Routinemethode in der Molekularbiologie Verwendung findet. In unserer Expressionsuntersuchung wurde gezeigt, dass alle drei Rezeptoren in beiden Geschlechtern exprimiert sind, allerdings wurde dabei signifikant eine erhöhte Expression in Weibchen gezeigt, was die Resultate der Microarray-Analyse bestätigt. Dadurch können wir Männchen-spezifische Verhaltensweisen wie die Pheromondetektion im Bezug zu unseren untersuchten ORs ausschließen. Somit bleiben Verhaltensweisen, welche wesentlich für die Weibchen sind, wie die Suche nach Eiablageplätzen.

In den Weibchen von *B. mori* detektiert ein OSN (beherbergt in den Sensillum trichodeum) (\pm)-Linalool (Heinbockel und Kaissling, 1996). Daher folgt die Annahme, dass von *M. sexta* Blütenduft detektierende ORs in dem Sensillum trichodeum lokalisiert sind. Zur Überprüfung, ob es sich bei unseren ORs um Blütenduft detektierende Rezeptoren handelt, wurde die räumliche Expression der Rezeptoren in den Antennen mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Mittels dieser Methode wurde schon die Expression von putativen ORs in den Antennen von *B. mori*, *H. virescens* und *M. sexta* nachgewiesen (Krieger et al., 2002, Sakurai et al., 2004, Patch et al., 2009). MsexOR-7 konnte nur in der Spitze der Antennen der Männchen nachgewiesen werden. Die exprimierten Zellen befinden sich unterhalb der Kutikula, nicht unterhalb der langen Sensilla trichoidea, wie bei Pheromonrezeptoren (Patch et al., 2009). Für MsexOR-10 konnten keine Signale in den Zellen nachgewiesen werden. Obwohl alle Kontrollen die erwartenden Resultate erbrachten, konnte dessen Expression in dieser Untersuchung nicht lokalisiert werden. Die

MsexOR-41 exprimierenden Zellen sind unterhalb der Kutikula lokalisiert, aber nicht unterhalb der Sensilla trichodea. Mit der *in-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass MsexOR-7 nur in der Spitze, MsexOR-41 in mehreren antennalen Regionen, lokalisiert ist, wohingegen für MsexOR-10 keine Aussage getroffen werden kann. Des Weiteren können sie zur Detektion von Blütenduftstoffen ausgeschlossen werden.

Über die Expressionsuntersuchungen entlang der Antenne, konnten aufgrund der Lokalisation der ORs Rückschlüsse auf deren Funktionen über elektrophysiologische Messungen erfolgen. Eine Studie untersuchte dies an Weibchen von *S. littoralis* (Binyameen et al., 2010). Die OSNs in den 15. antennalen Segmenten der Spitze und Basis zeigten Antworten auf Düfte, welche unter anderem eine Rolle bei der Wahl des Eiablageplatzes spielten. Bei *M. sexta* gibt es bisher auf dieser Basis keine Veröffentlichungen. Aufgrund unserer bisherigen Resultate, lässt sich in Bezug zu den von uns untersuchten ORs auf Verhaltensweisen spekulieren, welche in Weibchen eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits erwähnt vermittelt der Geruchssinn verschiedene Verhaltensweisen der Insekten. Die dabei auftretenden geschlechtsspezifischen Unterschiede können an den unterschiedlichen olfaktorischen Fähigkeiten zwischen beiden Geschlechtern liegen (Alarcón et al., 2010). Bei *M. sexta* ist das olfaktorische System von Männchen auf die Detektion von Sexpheromonen spezialisiert (J. G. Hildebrandt, 1995). Die OSNs der Weibchen sind dagegen sensitiver für Pflanzendüfte (Fraser et al., 2003). Für den Linalool detektierenden BmOR-19 wurden zwei putative Homologe in *M. sexta* (MsexOR-5 und MsexOR-6) identifiziert (Große-Wilde et al., 2011). Somit ist es wahrscheinlich das unsere drei Kandidaten nicht der Detektion von Blütenduft fungieren. Möglicherweise spielen sie aber bei der Wahl der Wirtspflanzen über die Geruchsdetektion der Dichte, beispielsweise von Raupen eine Rolle. Bisherige OR vermittelte Weibchen-spezifische Verhaltensweisen können in der Detektion flüchtiger organischer Verbindungen bei Pflanzenschäden liegen. Bei Eiablegenden Weibchen in *H. virescens* rief dies ein abweisendes Verhalten hervor (De Moraes et al., 2001). So könnten die von uns untersuchten ORs die Duftstoffe von beschädigten Pflanzen detektieren.

Zur weiteren Prüfung der Expression von MsexOR-7 und MsexOR-10, welche nur in einzelnen antennalen Abschnitten lokalisiert wurden, erfolgte eine qPCR entlang der Antenne. Die Expressionsuntersuchungen entlang der Antenne beider Geschlechter zeigten keinen Unterschied zwischen den Segmenten in Männchen. Aber in Weibchen zeigten sie eine unterschiedliche Expression entlang der Antenne. MsexOR-7 ist in Weibchen im Bezug zum Ende (Segmente ab 61) in der Spitze (Segmente 1-20) und in der mittleren Region (Segmente 21-40) signifikant höher exprimiert. Ebenso wurde MsexOR-10 im Bezug zum Ende (Segmente ab 61) in der mittleren Region (Segment 41-60) der Weibchen signifikant höher exprimiert. Mit der *in-situ*-Hybridisierung konnte dafür keine Bestätigung erfolgen. Aufgrund der Limitation dieser Methode konnte nur ein Ausschnitt aus dem Gewebe lokalisiert werden.

In dieser Arbeit lassen sich nur mögliche Funktionen von MsexOR-7, welcher in der Spitze und in der ersten mittleren Region der Weibchen höher exprimiert ist vermuten. So könnte MsexOR-7 aufgrund der erhöhten Expression in der Spitze der Weibchen eine Richtungsinformation über die Geruchswahrnehmung vermitteln. MsexOR-10 ist in den basalen Segmenten der Antenne der Weibchen erhöht exprimiert und hat vielleicht die Aufgabe Pflanzendüfte zu detektieren. MsexOR-41 wurde über *in-situ*-Hybridisierung in mehreren antennalen Segmenten gefunden. Zudem ist er ebenso in der Antenne der Weibchen signifikant erhöht exprimiert. Möglicherweise ist dieser OR für die Detektion noch nicht identifizierter männlicher Sexpheromone zuständig (Anderson et al., 2009).

Da die untersuchten ORs eine signifikant höhere Expression in den Antennen der Weibchen als in denen der Männchen haben, lässt sich eine niedrige Expression in Männchen vermuten. Derzeitige Erkenntnisse über die Geschlechtsspezifität in Männchen beruhen auf der Entdeckung, dass Pheromonrezeptoren in verschiedenen Spezies, wie *B. mori*, *O. furnacalis*, *H. zea* und *H. virescens* (Sakurai et al., 2004, Takanashi et al., 2006, Krieger et al., 2002, 2003, Cossé et al., 1998) Männchen-spezifisch sind. Es wurden zwei Pheromonrezeptoren in *M. sexta*, MsexOR-1 und MsexOR-4, beschrieben (Patch et al., 2009, Große-Wilde et al. 2010). Diese gehören aber zu einer anderen Untergruppe als MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41.

Mit unseren Ergebnissen können wir sagen, dass MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 nicht geschlechtsspezifisch sind. Des Weiteren lässt sich sagen, dass diese Rezeptoren in Weibchen signifikant höher exprimiert sind als in Männchen. Weiterhin konnte anhand der Lokalisation mittels *in-situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass MsexOR-7 und MsexOR-41 olfaktorische Rezeptoren sind. Morphologisch werden ORs in olfaktorischen Sinnesneuronen unterhalb der Kutikula exprimiert (Shields und Hildebrand, 1999); die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierungen weisen eine Expression genau dort nach. Wir vermuten anhand unserer Resultate, dass die drei Kandidaten eine Rolle bei der Suche nach geeigneten Eiablageplätzen, z. B. über die Geruchsdetektion der Dichte bzw. der Pflanzenschäden, und/oder der Futtersuche spielen.

Die Funktionen von MsexOR-7, MsexOR-10 und MsexOR-41 müssen durch heterologe Expressionssysteme z.B., Zellkultur, Fliegen und Knockdown und elektrophysiologische Untersuchungen charakterisiert werden. Unsere Arbeit trägt zum Verständnis des Geruchssinns in Insekten bei und eröffnet neue Wege in der Erforschung der Geruchsrezeptoren.

5. Literaturverzeichnis

Anderson, A. R., Wanner, K. W., Trowell, S. C., Warr, C. G., Japuin-Joly, E., Zagatti, P., Robertson, H., Newcomb, R. D. (2009).

Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori*.

Insect Biochemistry and Molecular Biology **39**: 189-197

Alarcón, R., Riffell, J. A., Davidowitz, G., Hildebrand, J. G., Bronstein, J. L. (2010).

Sex-dependent variation in the floral preferences of the hawkmoth *Manduca sexta*.

Animal Behaviour **80**: 289-296

Binyameen, M., Schlyter, F., Anderson, P. (2010).

Morphology and electrophysiology of olfactory sensilla on the antennae of female cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*.

ECRO Congress, Poster Session P **90**: Board 40

Bohbot, J., Vogt, R. G. (2005).

Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.); characterization of odorant-binding protein 10 and takeout.

Insect Biochemistry and Molecular Biology **35**: 961-979

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., and Hecker, E. (1959).

Concerning the sexual attractant of the silkworm *Bombyx mori*. Purification and composition.

Z Naturforschg **14b**: 283–284

Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., Carlson, J. R. (1999).

A Novel Family of Divergent Seven-Transmembrane Proteins: Candidate Odorant Receptors in *Drosophila*.

Neuron **22**: 327-338

Cossé, A. A., Todd, J. L., Baker, T. C. (1998).

Neurons discovered in male *Helicoverpa zea* antennae that correlate with pheromone-mediated attraction and interspecific antagonism.

J. Comp. Physiol. A **182**: 585-594

- Datta, S. R., Vasconcelos, M. L., Ruta, V., Wong, A., Demir, E., Flores, J., Balzone, K., Dickson, B. J., Axel, R. (2008).**
The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit.
Nature **452**: 473-477
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C., Tumlinson, J. H. (2001).**
Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females.
Nature **410**: 577-580
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R., Smith, D. P. (2003).**
Targeted Mutation of a *Drosophila* Odor Receptor Defines Receptor Requirement in a Novel Class of Sensillum.
The Journal of Neuroscience **23**: 9906-9912
- Fraser, A. M., Mechaber, W. L., Hildebrand, J. G. (2003).**
Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant head-space volatiles.
Journal of Chemical Ecology **29**: 1813-1833
- Gao, Q., Chess, A. (1999).**
Identification of Candidate *Drosophila* Olfactory Receptors from Genomic DNA Sequence.
Genomics **60**: 31-39
- Große-Wilde, E., Svatoš, A., Krieger, J. (2006).**
A Pheromone-Binding Protein Mediates the Bombykol-Induced Activation of a Pheromone Receptor In Vitro.
Chem. Senses **31**: 547-555
- Große-Wilde E., Stieber R., Forstner M., Krieger J., Wicher D., Hansson B.S. (2010).**
Sex-specific odorant receptors of the tobacco hornworm *Manduca sexta*.
Front Cell Neuroscience **4**: 22
- Große-Wilde, E., Kübler, L. S., Bucks, S., Vogel, H., Wicher, D., Hansson B. S. (2011).**
Antennal transcriptome of *Manduca sexta*.
108(18): 7449–7454
- Hallem, E. A., Ho, M. G., Carlson, J. R. (2004).**
The Molecular Basis of Odor Coding in the *Drosophila* Antenna.

Cell **117**: 965-979

Hallem, E. A., Dahanukar A., Carlson, J. R. (2006).

Insect Odor and Taste Receptors.

Annu. Rev. Entomol. **51**:113-135

Heinbockel, T., Kaissling, K.-E. (1996).

Variability of Olfactory Receptor Neuron Responses of Female Silkmoths (*Bombyx mori* L.) to Benzoic Acid and (\pm)-Linalool.

J. Insect Physiol., Vol. **42**: 565-578

Hildebrandt, J. G. (1995).

Analysis of chemical signals by nervous systems.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 67-74

Hillier, N. K., Vickers, N. J. (2004).

The Role of Heliothine Hairpencil Compounds in Female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Behavior and Mate Acceptance.

Chem. Senses **29**: 499-511

Kalberer N. M., Reisenman, C. E., Hildebrand J. G. (2010).

Male moths bearing transplanted female antennae express characteristically female

behaviour and central neural activity.

The Journal of Experimental Biology **213**: 1272-1280

Kaissling, K-E, Hildebrand, J. G., Tumlinson, J. H. (1989).

Pheromone receptor cells in the male moth *Manduca sexta*.

Archives of Insect Biochemistry and Physiology **10**: 273-279

Keil, T. A. (1989).

Fine structure of the pheromone sensitive sensilla on the antenna of the hawkmoth, *Manduca sexta*.

Tissue & Cell **21**: 139-151

Krieger, J., Raming, K., Dewer, Y. M. E., Bette, S., Conzelmann, S., Breer, H. (2002).

A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*.

European Journal of Neuroscience Vol. **16**: 619-628

Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K., Breer, H. (2003).

A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders.

J. Comp. Physiol. A **189**: 519-526

Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., Vosshall, L. B. (2004).

OR83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction.

Neuron **43**: 703-714

Lee, J.-K. und Strausfeld, N. J. (1990).

Structure, distribution and number of surface sensilla and their receptor cells on the olfactory appendage of the male moth *Manduca sexta*.

Journal of Neurocytology **19**: 519-538

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001).

Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Method.

Elsevier Science (USA) **01**: 1046-2023

Matsumoto, S. G., Hildebrand, J. G. (1981).

Olfactory mechanisms in the moth *Manduca sexta*: response characteristics and morphology of central neurons in the antennal lobes.

Proc. R. Soc. Lond. B **213**: 249-277

Mechaber, W. L., Capaldo, C. T., Hildebrand, J. G. (2002).

Behavioral responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to hostplant volatiles change with age and mating status.

Journal of Insect Science **2**: 5

Mombearts, P. (2006).

AxonalWiring in the Mouse Olfactory System.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **22**:713–37

Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., Touhara K. (2005).

Insect Sex-Pheromone Signals Mediated by Specific Combinations of Olfactory Receptors.

Science **307**: 1638-1642

Patch, H. M., Velarde, R. A., Walden, K. O., Robertson, H. M. (2009).

- A Candidate Pheromone Receptor and Two Odorant Receptors of the Hawkmoth *Manduca sexta*.
Chem. Senses **34**: 305-316
Pfaffl, M. W. (2010).
Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.
Biospektrum, 1/04
- Pitts, J. R., Fox, N. A., Zwiebel, J.** (2004).
A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*.
PNAS **101**: 5058-5063
- Reisenman C. E., Christensen T. A., Francke W., Hildebrand J. G.** (2004).
Enantioselectivity of Projection Neurons Innervating Identified Olfactory Glomeruli.
The Journal of Neuroscience **24**: 2602-2611
- Reisenman C. E., Dacks, A. M., Hildebrand J. G.** (2011).
Local interneuron diversity in the primary olfactory center of the moth *Manduca sexta*.
J. Comp. Physiol. A **197**: 653-665
- Robertson, H. M., Wanner, K. W.** (2006).
The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family.
Cold Spring Harbor Laboratory Press **16**: 1395-1403
- Sakurai, T., Nakagawa, T., Mitsuno, H., Mori, H., Endo, Y., Tanoue, S., Yasukochi, Y., Touhara, K., Nishioka, T.** (2004).
Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*.
PNAS **101**: 16653-16658
- Sanes, J. R., Hildebrandt, J. G.** (1976a).
Structure and Development of Antennae in a Moth, *Manduca sexta*.
Developmental Biology **51**: 282-299
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J.** (2008).
Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method.
Nature Protocols **3**: No.6

Shields, V. D. C., Hildebrandt, J. G. (1999).

Fine structure of antennal sensilla of the female sphinx moth, *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). L. Trichoid and basiconic sensilla.

Can. J. Zool. **77**: 290-301

Starrat, A. N., Dahm, K. H., Allen, N., Hildebrandt, J. G., Payne, T. L., Röller, H. (1979).

Bombykal, a sex pheromone of the sphinx moth *Manduca sexta*.

Z. Naturf. **34C**: 9-12

Takanashi, T., Ishikiwa, Y., Anderson, P., Huang, Y., Löfstedt, C., Tatsuki, S., Hansson, B. S. (2006).

Unusual response characteristics of pheromone-specific olfactory receptor neurons in the Asian corn borer moth, *Ostrinia furnacalis*.

The Journal of Experimental Biology **209**: 4946-4956

Tumlinson, J. H., Brennan, Doolittle, R. E., M. M., Mitchell E. R., Brabham, A., Mazomenos, B. E., Baumhover, A. H., Jackson, D. M. (1989).

Identification of a pheromone blend attractive to *Manduca sexta* (L.) males in wind tunnel.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **10**: 255-271

Tumlinson, J. H., Mitchell, E. R., Doolittle, R. E., Jackson, D. M. (1994).

Field tests of synthetic *Manduca sexta* sex pheromone.

Journal of Chemical Ecology **20**: 255-591

Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., Axel, R. (1999).

A Spatial Map of Olfactory Receptor Expression in the *Drosophila* Antenna.

Cell **96**: 725-736

Vosshall, L. B., Wong, A. M., Axel, R. (2000).

An olfactory sensory map in the fly brain.

Cell **102**: 147-159

Vosshall, L. B., Hansson, B. S. (2011).

A Unified Nomenclature System for the Insect Olfactory Coreceptor.

Chem. Senses **36**: 497-498

Danksagung

Nachfolgend möchte ich all jenen danken, die mich bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bill S. Hansson als Leiter der Abteilung und PD Dr. Dieter Wicher, die mir ermöglichten an diesem interessanten Thema zu forschen.

Ganz besonderer Dank geht auch an Herrn Dr. Ewald Große-Wilde für seine hilfreiche und fürsorgliche Betreuung bei Experimenten, sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

In diesem Sinne möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Kollegen aus dem Molekularbiologie Labor bedanken:

Sascha Bucks, Regina Stieber, Christine Mißbach, Katrin Groh, Christopher König und Christian Kliner

für ihre Unterstützung, Ratschläge und ihre netten, aufmunternden Worte.

Mein ausdrücklicher Dank geht auch an Sylke Dietel für die *Manduca* Zucht.

Ich danke auch allen Mitarbeitern für die gemeinsamen Konversationen. Es war mir eine Ehre in dieser Gruppe arbeiten zu dürfen.

Ebenfalls ein besonderer Dank an Holger Domhardt für das Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt vor allem auch meinen Eltern, die mich während meines Studiums unterstützt und immer ermutigt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst und noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Jena, den 06. März 2012

Loreen Heinrich

