

Es könnte so einfach sein, ist es aber nicht.
(Die fantastischen Vier)

Gefördert durch ein Stipendium des Landes Baden-Württemberg.

Lokalisation von Pheromon-Rezeptoren und -Bindeproteinen
in antennalen Sensillen von Insekten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Physiologie
Prof. Dr. H. Breer

vorgelegt von
Thomas Gohl

aus Ditzingen
2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
2.	Material und Methoden	9
2.1	Materialien	9
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	9
2.1.2	Kits	11
2.1.3	Klonierungsvektoren	11
2.1.4	Bakterienstämme	12
2.1.5	DNA- und RNA-modifizierende Enzyme	12
2.1.6	Sonstiges Verbrauchsmaterial	12
2.2	Versuchstiere	13
2.2.1	Insektenzucht	13
2.2.1.1	Aufzucht von <i>Heliothis virescens</i>	13
2.2.1.2	Herstellung des <i>Heliothis virescens</i> Nährmediums	13
2.3	Geräte	16
2.4	Oligonukleotide	17
2.5	Methoden	18
2.5.1	Screening der antennalen cDNA-Bank von <i>Heliothis virescens</i>	18
2.5.1.1	Synthese von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	18
2.5.1.2	Übertragung von Phagen-DNA auf Nylonmembranen	18
2.5.1.3	Hybridisierung der Filtermembranen	19
2.5.1.4	Waschen von Nylonfiltern nach der Hybridisierung	19
2.5.1.5	Immunologischer Nachweis von DIG-markierten Sonden	20
2.5.1.6	Isolierung der DNA aus markierten Phagen	20
2.5.2	Präparation der Gewebe für die RNA-Isolierung	21
2.5.2.1	Präparation verschiedener Gewebe	21
2.5.2.2	Präparation von Antennenfragmenten	22
2.5.2.3	Präparation des antennalen Gewebes von Puppen verschiedener Entwicklungsstadien	22
2.5.2.4	Herstellung von Gehirnpräparaten	23
2.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA und Poly(A) ⁺ - RNA	23
2.5.3.1	Qualitative und quantitative Analyse von RNA und DNA	24
2.5.3.2	Isolierung von mRNA mit Dynabeads Oligo (dT) ₂₅	25

2.5.4	cDNA-Synthese aus Poly(A ⁺)-RNA	26
2.5.5	Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz mit der Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	26
2.5.6	Detektion und Analyse von PCR-Reaktionsprodukten durch	27
	Agarose-Gelelektrophorese	
2.5.6.1	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen mit dem	28
	GeneClean-Kit	
2.5.7	Transformation rekombinanter Plasmide	29
2.5.7.1	Herstellung kompetenter Bakterien	29
2.5.7.2	Transformation	29
2.5.8	DNA-Isolierung und Restriktionsanalyse rekombinanter	30
	Plasmide	
2.5.8.1	Mini-Präparation	30
2.5.8.2	Midi-Präparation	31
2.5.9	Sequenzierung klonierter DNA	32
2.5.9.1	Sequenzierungsprotokoll	32
2.5.9.2	Computerunterstützte Analyse der Sequenzdaten	32
2.5.9.3	„Multiple Sequence Alignment“	33
2.5.9.4	„Identitäts-Dendrogramm“	33
2.6	Histologische Untersuchungen	33
2.6.1	Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie	33
2.6.2	Präparate für Vibratomschnitte	34
2.6.2.1	Herstellung des Gelatine-Albumin-Einbettmediums	34
2.6.2.2	Herstellung von Vibratomschnitten	34
2.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	34
2.7.1	Herstellung der <i>in situ</i> Sonden	35
2.7.1.1	Linearisierung der Plasmid – DNA für die <i>in vitro</i> -	35
	Transkription	
2.7.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	35
2.7.1.3	Herstellung DIG- bzw. Biotin-markierter <i>antisense</i> RNA	36
2.7.1.4	Verkürzung der Sonde	37
2.7.2	Vorbereitung des Präparates	38
2.7.3	Fixierung der Gefrierschnitte	38
2.7.4	Hybridisierung der Dünnschnitte mit der Sonde	39

2.7.5	Immunhistochemischer Nachweis der Sonden	39
2.7.6	Doppel- <i>in situ</i> Hybridisierung	40
2.7.7	Immunhistochemischer Nachweis der Sonden	40
2.8	Untersuchung der Proteinexpression	42
2.8.1	Herstellung Sequenz-spezifischer Antiseren	42
2.8.2	Antiseren	42
2.8.3	Immunhistochemische Untersuchungen von Gewebe- schnitten	43
2.8.4	Gehirnpräparate für histologische Untersuchungen der antennalen Loben	43
2.9	Laserscanningmikroskopie zur Untersuchung immunologisch behandelter Präparate	44
2.10	Berechnung der relativen Anzahl Rezeptor-exprimierender Zellen und Typen trichoider Sensillenhaare auf der Männchenantenne	45
2.11	Auswertung der Daten und Verfassen der Arbeit	46
3.	Ergebnisteil	47
3.1	Identifizierung von Pheromonrezeptor-Kandidaten des Seidenspinners <i>Bombyx mori</i>	47
3.2	Morphologie der Antenne des Seidenspinners <i>Bombyx mori</i>	47
3.3	BmOR-Rezeptor-exprimierende Zellen in der Antenne von <i>Bombyx mori</i>	49
3.4	Etablierung der „whole-mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	50
3.5	Putative Pheromonrezeptoren der „Tabakeule“ <i>Heliothis virescens</i>	55
3.5.1	Pheromone von <i>Heliothis virescens</i>	55
3.5.2	Die Antenne von <i>Heliothis virescens</i>	55
3.5.2.1	Sensilla trichodea	56
3.5.3	Die Expression putativer Pheromonrezeptoren in <i>Heliothis virescens</i>	57
3.5.3.1	Topographisches Expressionsmuster des Rezeptortyps HR13	59
3.5.4	„Sensory Neuron Membrane Protein“ – SNMP	61
3.5.4.1	Colokalisation von SNMP1 und putativen Pheromonrezeptoren	61
3.5.4.2	Nicht-Colokalisation von SNMP1 und putativen Pheromonrezeptoren	63
3.5.5	Vergleich der Lokalisation von Rezeptor-exprimierenden und Pheromonbindeprotein-exprimierenden Zellen	65
3.5.5.1	Lokalisation von HR13- und HvirPBP1-Zellen	65

3.5.5.2	Topographische Lokalisation von HR13- und HPBP2-Zellen	67
3.5.5.3	Lokalisation von HvirPBP1 und HvirPBP2	69
3.5.6	Charakterisierung von SNMP2	70
3.6	Visualisierung des HR13-Rezeptorproteins	74
3.6.1	Dendritische Projektion von HR13-Zellen	77
3.6.2	Axonale Fortsätze von HR13-Neuronen	79
3.7	Projektion von HR13-Zellen zum antennalen Lobus	83
3.7.1	Untersuchung zur Lokalisation von HR13-Protein im antennalen Lobus	85
3.8	Beginn und Verlauf der HR13-Expression während der Entwicklung	88
3.9	Topographisches Expressionsmuster putativer Pheromonrezeptoren	89
	<i>von Heliothis virescens</i>	
4.	Diskussion	93
5.	Zusammenfassung	98
6.	Summary	100
7.	Literaturverzeichnis	102
8.	Erklärung	109
9.	Danksagung	110
10.	Lebenslauf	111
11.	Publikationsliste	111

1. Einleitung

Die Registrierung von chemischen Stoffen und insbesondere von speziellen Signalstoffen in ihrer Umwelt ist für das Überleben der meisten Organismen von essentieller Bedeutung. Um die enorme Vielfalt an flüchtigen Verbindungen zu erfassen, verfügen olfaktorische Systeme über ein möglichst großes Repertoire an relativ unspezifischen „Detektoren“; d.h. olfaktorische Sinneszellen reagieren nicht nur auf einen bestimmten Duftstoff, sondern auf eine Vielzahl an Duftstoffen, allerdings mit unterschiedlicher Intensität. Dies ist bedingt durch die relativ unspezifische Reaktivität des Rezeptortyps der Zelle. Dieses Prinzip erlaubt es, im Sinne einer kombinatorischen Kodierung, eine nahezu unbegrenzte Diversität an chemischen Signalen zu verarbeiten. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob auch sehr spezifische Signalstoffe, wie Pheromone, mittels unspezifischer Rezeptoren erfasst werden. Bei Pheromonen, die z.T. sehr distinkte Verhaltensmuster auslösen, geht man davon aus, dass die relevanten Verbindungen sehr spezifisch erkannt werden. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel für die Kontrolle spezifischer Verhaltensprozesse durch Pheromone ist die Interaktion von Männchen und Weibchen der Nachtfalter. Die Fähigkeit von Nachtfalter-Männchen, ihre Weibchen in der Dunkelheit und über z.T. recht große Entfernungen aufzufinden, wurde erstmals von Fabre (1879) dokumentiert. Das Interesse an der Kommunikation bei Nachtfaltern wurde durch die Identifizierung eines Sexuallockstoffes von *Bombyx mori* beflügelt (Butenandt et al., 1959). Bei diesen umfangreichen analytischen und verhaltensbiologischen Studien wurde E10Z12-Hexadecadienol aus den Drüsen von Weibchen isoliert und als erstes Pheromon identifiziert; diese Verbindung wurde als Bombykol bezeichnet. 1978 gelang es mit Bombykal ein zweites Pheromon von *Bombyx mori* zu identifizieren (Kasang et al., 1978). Inzwischen sind für viele Insekten-Spezies spezifische Pheromone und komplexe Pheromongemische bekannt, u.a. auch für die Spezies *Heliiothis virescens* (Ramaswamy et al., 1986; Teal et al., 1986).

Für eine hochsensitive Registrierung der spezifischen chemischen Verbindungen weisen die Antennen von Nachtfalter-Männchen oft eine extreme Größe und komplexe morphologische Struktur auf. Es hat sich gezeigt, dass als funktionelle Einheiten der Antennen die Sensillenhaare anzusehen sind; unterschiedlich lange kutikuläre Strukturen, die mit Sensillenlymphe gefüllt sind. In diese Haare projizieren

die dendritischen Fortsätze der sensorischen Nervenzellen, die an der Basis der Haare positioniert sind. Mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden die Strukturen von Sensillenhaaren untersucht (Steinbrecht, 1987) und deren Verteilungsmuster auf der Antenne ermittelt (z.B. Almaas and Mustaparta, 1990, 1991). Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits geringste Konzentrationen der Pheromone ausreichen, um elektrische Reaktionen der Männchenantennen auszulösen (Schneider und Kaissling, 1957) und dass die individuellen Sensillen z.T. sehr selektiv nur auf distinkte Pheromone reagieren (Baker et al., 2004). Für einige Motten-Spezies ist inzwischen eine Klassifizierung der Sensillentypen aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Reaktionsspezifität möglich (Steinbrecht, 1970; Meng et al., 1989; Almaas and Mustaparta, 1990, 1991; Baker et al., 2004). Als Grundlage für das sehr spezifische Reaktionsspektrum der Pheromon-sensitiven Neurone wird ihre Ausstattung mit entsprechend spezifischen Rezeptortypen angesehen. Die Identifizierung der entsprechenden Rezeptoren hat sich jedoch als äußerst schwierig und zeitraubend erwiesen. Zwischen der Entdeckung des ersten Pheromons (Butenandt et al., 1959) und der Identifizierung erster olfaktorischer Rezeptoren bei Insekten (Clyne et al., 1999) liegen vier Jahrzehnte. Erst nach Abschluss des *Drosophila* Genom Projektes (Rubin, 1996) wurden entsprechende Gene bei der Fruchtfliege identifiziert (Clyne et al., 1999;). Eine Identifizierung putativer olfaktorischer Rezeptoren bei einem Nachtfalter wurde erst mit dem Zugang zu genomischen Sequenzdaten von *Heliothis virescens* möglich (Krieger et al., 2002). Eine potentielle Rolle dieser Rezeptortypen bei der Erfassung von Pheromonen war jedoch nicht erkennbar.

Im Hinblick auf eine Identifizierung potentieller Rezeptorkandidaten für Pheromone wurden die umfangreichen Sequenzinformationen mittels bioinformatischer Verfahren analysiert unter der Annahme, dass Rezeptoren für die spezifischen Pheromone einem großen negativen Selektionsdruck unterliegen und daher eine relativ konservierte Sequenz aufweisen sollten. In der Tat wurde innerhalb des äußerst divergenten Repertoires an olfaktorischen Rezeptorkandidaten von *Heliothis virescens* eine kleine Gruppe mit relativ konservierter Sequenz identifiziert (Krieger et al., 2004). Allerdings wäre es auch denkbar, dass die relativ hohe Sequenzidentität auf jüngste Genduplikationen zurückzuführen ist. Aufgrund der selektiven Reaktion der Männchen auf distinkte Pheromone sollte man davon ausgehen, dass relevante Rezeptoren ausschließlich oder doch bevorzugt in den Antennen von Männchen

exprimiert werden; entsprechende Experimente haben dies für einige der Rezeptorkandidaten bestätigt. Eines der entscheidenden Parameter für den Nachweis spezifischer Pheromon-Rezeptoren ist deren Expression in den Pheromon-reaktiven Zellen der antennalen Sensillen. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie an der Basis Pheromon-sensitiver Haare lokalisiert sind; außerdem werden die sensorischen Neurone von Glia-ähnlichen Hüllzellen umgeben (Steinbrecht et al., 1992). Man geht davon aus, dass diese Hüllzellen die sogenannten Pheromonbindepoteine produzieren und in die Sensillenlymphe des entsprechenden Haares sezernieren (Steinbrecht et al., 1992). Die Ermittlung der topologischen Verteilung und Positionierung von Rezeptor-exprimierenden Zellen in der Antenne, sowie die Charakterisierung der benachbarten Zellen sollte zur Klärung beitragen, ob die Rezeptorkandidaten von den in Frage kommenden chemosensorischen Neuronen exprimiert werden. Daher wurde im Rahmen dieser Studien mit Hilfe verschiedener *in situ* Hybridisierungsstudien und immunhistochemischer Techniken in Kombination mit moderner mikroskopischer Methodologie versucht, die entsprechenden Zellen zu visualisieren und zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Oligo dT ₂₅ Dynabeads	Dynal
Essigsäure (HAc)	Fluka
Glukose	
Kaliumhydroxid (KOH)	
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumacetat (KAc)	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	
Natriumhydroxid (NaOH)	
Salzsäure (HCl)	
LabM® LB (Luria Bertani) Broth Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% Natriumchlorid)	
Casein-Hydrolysat (Pepton No.140)	Invitrogen
TRizol Reagent	
Select Agar	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Hefeextrakt	
Isopropanol	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
Lithiumchlorid (LiCl)	
LiChrosolv®-Wasser	
Maleinsäure	
Methanol	
Natriumsulfit (Na ₂ SO ₃)	

Saccharose	
Tween 20	
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Peqlab
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Riedel-de-Haen
Didesoxy-Nucleotide	Roche
Ampicillin	Roth
Tri-Natriumcitratdihydrat	
Agarose	Sigma
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	
N, N,-Dimethylformamid (DMFA)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Ethidiumbromid (EtBr)	
Formaldehyd	
Formamid	
Gelatine	
Glycerol	
Natriumacetat (NaAc)	
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Natriumethyldiamintetra-acetat (EDTA)	
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	
Ovalbumin	
Paraformaldehyd (PFA)	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Triton-X100	

Das Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T.TM Compound lieferte die Firma Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, The Netherlands).

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien wurden, in der jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsstufe, von den Firmen Merck, Fluka, Roth oder Sigma bezogen.

Das verwendete Wasser (Bidest. H_2O) wurde zweifach destilliert und für die molekularbiologischen Untersuchungen bei DNA-Experimenten 25 Minuten

autoklaviert, für RNA-Experimente wurde es 50 Minuten bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert.

2.1.2 Kits

Kit	Hersteller
DyeDeoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1	Applied Biosystems
MasterTaq-Kit	Eppendorf
TSA Fluorescence System	Perkin Elmer
Flexiprep Kit	Pharmacia
Geneclean-Gelextraktionskit	QBiogen
Taq RNA Polymerase	Quiagen
DIG RNA-Labeling-Kit	Roche
Biotin RNA-Labeling-Kit	
HNPP Fluorescent Detection Set	

2.1.3 Klonierungsvektoren

Vektor	Hersteller
pBlueskript II – SK(+)	Stratagene
<i>pGEM-T</i>	Promega

2.1.4 Bakterienstämme

Bakterium	Stamm	Verwendung
<i>E. coli</i>	XL1 – blue	Klonierung
<i>E. coli</i>	POP13b	Screening

2.1.5 DNA- und RNA-modifizierende Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden zusammen mit den zugehörigen Puffern von der Firma New England Biolabs (NEB) oder von Invitrogen bezogen. Die Ligation in die verschiedenen Vektoren erfolgte mit der T4-Ligase und dem zugehörigen Puffer, beides stammt von der Firma Invitrogen. RNase-freie DNase stammt von GE-Healthcare.

2.1.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Cellophanpapier	Serva
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser
Röntgenfilme Fuji Medical RX	Fuji
Sekundenkleber	Uhu

2.2 Versuchstiere

Heliothis virescens (Lepidoptera, Noctuidae) wurden als Puppen von der Firma BAYER CropScience AG zur Verfügung gestellt oder stammten aus eigener Zucht. Diese wurden nach Geschlecht sortiert und bis zum Schlüpfen bei 25 °C gehalten. *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) wurden als Kokons von Worldwide Butterflies (Dorset, UK) oder Seritech (Stratford upon Avon, UK) bezogen. Die Kokons verblieben bis zum Schlüpfen der Adulti bei Raumtemperatur. Nach dem Schlüpfen wurde das Geschlecht bestimmt; Männchen und Weibchen wurden getrennt bei 8°C gehalten.

2.2.1 Insektenzucht

Materialien	Hersteller
Petrischalen ohne Nocken	Sarstedt
Klimaschrank LKB 2201	AB Haglund
Sonnenlicht Neonröhren	ExoTerra
Gaze	Lohmann + Rauscher
Gel-Blotting-Papier	Schleicher + Schuell

2.2.1.1 Aufzucht von *Heliothis virescens*

Ein bis zwei Tage alte Larven wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels auf die vorbereiteten und getrockneten Futterschalen gesetzt. Die Schalen wurden in einen Klimaschrank überführt. Auf diesen Futterplatten verblieben die Larven bis zu Verpuppung. Die Puppen wurden mit einer stumpfen Insektenfederstahlpinzette aus den Futterschalen genommen, nach Geschlecht sortiert und in transparente, mit Gaze bespannte und mit einer Schicht Sägespäne ausgestatteten Kunststoffboxen

verbracht. Dort verblieben die Tiere bis zum Schlupf. Zum Absammeln der frisch geschlüpften Adulti werden diese kurz mit CO₂ betäubt.

Zur Weiterzucht wurden Männchen und Weibchen in spezielle Legezylinder gesetzt. Diese waren mit Gel-Blotting-Papier versehen, um ein Ablegen der Eier zu ermöglichen. Durch das Anbringen von mehreren Lagen Gel-Blotting-Papier konnten über die Legedauer von ca. 7 Tagen immer wieder Eigelege entnommen werden. Die Tiere wurden in dieser Zeit mit einer 10%-igen Honiglösung gefüttert. Die Eigelege wurden auf dem Papier belassen und in dicht schließende Plastikboxen gelegt. Dort schlüpfen die Larven und können von dort auf Futterschalen verbracht werden.

2.2.1.2 Herstellung des *Heliothis virescens* Nährmediums

Agar-Agar wurde abgewogen und in 2 Litern Bidest-H₂O gelöst, dann 5 Minuten autoklaviert. Die abgewogene Menge Luzernenmehl-Pellets wurde in 2,5 Litern Bidest-H₂O eingeweicht und mit dem Ultra-Turrax vollends zerkleinert, bis ein homogener Brei entstand. Sämtliche Komponenten wurden nun diesem Brei zugesetzt und gut durchmischt. Zuletzt wurden die 2 Liter heiße Agar-Agar-Lösung hinzu gegeben. Nach dem Durchmischen wurde das Nährmedium in Petrischalen ohne Nocken gegeben, sodass der Boden der Schalen gleichmäßig bedeckt war. Die so hergestellten Futterplatten wurden bei RT 5 Tage lang getrocknet und wurden dann innerhalb einer Woche zu verwendet.

Komponenten	Hersteller	Menge*
Futterhefe	Leiber	200
Luzernen-Pellets	Raiffeisen Kraftfutterwerk	800
Weizenkleie	Tonmühle, Ditzingen	200
Ascorbinsäure	Runika	15
Cholesterin	Roth	2
Wesson Salt-Mixtur	Sigma	10
Vitamin Mix für Insekten	ICN	20
Casein	Merck	100
Zucker	Süd Zucker	50
Ampicillin	Roth	3
Tetracyclin HCl	Roth	3
Kanamycin	Roth	2,5
Nipagin	Fluka	24
Sorbinsäure	Roth	6
Formaldehyd-Lösung (37%)	Roth	6
Speiseöl	Euco	20
Agar-Agar (in Lösung)	Gerbu	70 (in 2000 H ₂ O)
Wasser		2500

*Angaben in Gramm

2.3 Geräte

Autoklav	FVS / 3	Fedegari
Bakterien-Inkubationsschüttler	G 24	New Brunswick Scientific
Binokular	Typ 355110	Wild Heerbrugg
Digitalkamera	SensiCam	PCO imaging
Digitale Farbkamera	M S V	Zeiss Optik
Gefriermikrotom	Mod. 2700 Frigocut	Reichert-Jung
Geldokumentation	Geldocu System	LFT, Labortechnik
Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 META	Zeiss
Mikropipetten	P2-P1000	Gilson
Mikrotomklinge	“b” Klinge	Jung
Mixer	Ultra-Turrax	Janke + Kunkel, IKA Werk
Peltier Thermo Cycler	PTC-200	MJ Research
pH-Meter	Φ 32	Beckman
Photometer	<i>Bio</i> Photometer	Eppendorf
Sequenzierer	ABI 310	PE Biosystems
Thermomixer	5437	Eppendorf
Vakuumtrockner	Speed-Vac	Bachhofer
Vibratom	VT1000S	Leica
Zentrifugen	J2-21	Beckmann
	Minifuge RF	Heraeus
	5417 R	Eppendorf
	5417 C	Eppendorf

2.4 Oligonukleotide

Die für die PCR (Polymerase Chain Reaction) verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Thermo oder der Firma Biomers synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Länge
BmOR1 as	5' – gcc act gtt cgg agc atc acg – 3'	21
BmOR1 s	5' – cgg atc ctt atg gac cca atg – 3'	21
BmOR3 as	5' – ggc tca ttc gga cac ggt acg – 3'	21
BmOR3 s	5' – tga tat cca cgg tat ccg gtc – 3'	21
BmOR4 und BmOR5 as	5' – tcc aac cac ttg ctg gaa agc g – 3'	22
BmOR4 s	5' – gca tta tct tcg gta cag tta – 3'	21
BmOR5 s	5' – cca ttt tcg tct gtg tgg tca g – 3'	22
BmOR6 as	5' – ttt ctt ctt ctg tgt aca tcg ag – 3'	23
<i>BmOR6 s</i>	<i>5' – gac tat ctc act act ata cgg tg – 3'</i>	23
HR 13 as	5' – ctg tgc gac tgt ctg agc atc – 3'	21
HR 13 s	5' – cgg tct act tac tcg gct tgg – 3'	21
HR 14 as	5' – gaa caa cat tgg ccc gaa tac – 3'	21
HR 14 s	5' – gtt cac act gta cct cac tgg – 3'	21
HR 15 as	5' – ggc tac tac tct gta ctc gtc – 3'	21
HR 15 s	5' – caa cta cca acc taa aga cgg – 3'	21
HR 16 as	5' – gag gtc ttc aaa atc gca gcc a – 3'	22
<i>HR 16 s</i>	<i>5' – cga gac caa gtt cca aag tgg – 3'</i>	21

2.5 Methoden

2.5.1 Screening der antennalen cDNA-Bank von *Heliothis virescens*

2.5.1.1 Synthese von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Für das Screening der cDNA-Bank wurden Digoxigenin(DIG)-markierte DNA-Sonden mit dem DIG DNA-Labeling-Mix der Firma Roche hergestellt. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion mit folgenden Komponenten in einem 0,2ml Mikroreaktionsgefäß zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammengegeben: 10 µl TaqMaster-Mix, 5 µl 10x Taq-Puffer (mit 15 mM MgCl₂), 3 µl PCR-DIG-Labeling-Mix, 1 µl Primer 1 (100 pmol/µl), 1 µl Primer 2 (100 pmol/µl), 1 µl DNA-Template und 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl). Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Es wurden die selben Primer eingesetzt, die für die RT-PCR-Analysen verwendet wurden. Alle Komponenten wurden vorsichtig vermischt und der Ansatz in einem Thermocycler, mit dem Programm TOUCH 55 inkubiert. Während der PCR werden zufällig Digoxigenin-markierte dUTP-Nukleotide anstelle von dTTPs in den DNA-Strang eingebaut. Diese ermöglichen die Detektion der Sonde durch einen geeigneten Antikörper nach Hybridisierung mit der Zielsequenz. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden der entsprechenden Größe mit dem GeneClean-Kit aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde der komplette Ansatz in 50 ml 30% Hybridisierungslösung (30% Formamid, 5x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat, pH 7), 0,1% Laurylsarcosin, 0,02% SDS, 2% Blockingreagenz, 100 µg/ml Heringssperma-DNA) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.5.1.2 Übertragung von Phagen-DNA auf Nylonmembranen

Die Herstellung von Phagen-DNA tragenden Nylonmembranen erfolgte in Anlehnung an die von Benton und Davis (1977) beschriebene Methode. Hierzu wurden ca. 60.000 Lambda-Phagen in λ-Dill (10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 0,01% Gelatine, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgenommen und mit 800 µl Bakteriensuspension (*E. coli* Stamm POP13b, OD₆₀₀ = 2,0) in NZ-Medium (1,6% NZ-Broth, 0,5% Hefeextrakt,

0,004% Thymidin) 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagensuspension wurde in 7 ml auf 42°C temperierten Agar (NZ-Medium mit 1% Agar) gegeben, auf 140 mm großen NZ-Platten (NZ-Medium mit 1,5% Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Kühlung der Platten für 1 Stunde bei 8°C wurden für 30 Minuten Nylon-Filtermembranen (GE-Healthcare, Hybond-N⁺, 0,45 µm) aufgelegt. Vor dem Abziehen der Filter wurde deren Position auf der Platte durch Einstiche markiert. Dann wurden die Filter für den Phagenaufschluss und zur DNA-Denaturierung 10 Minuten auf ein mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl getränktes Whatman-Filterpapier gelegt und anschließend zweimal 10 Minuten auf die gleiche Weise mit 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 neutralisiert. Nach der Trocknung wurden der Filter bei Raumtemperatur wurden sie für 2 Stunden bei 80°C ausgebacken. Auf diese Weise wurden je zwei Filter von jeder Platte gezogen, wobei der zweite Filter 45 Minuten auf die Agarplatte aufgelegt wurde.

2.5.1.3 Hybridisierung der Filtermembranen

Zum Verhindern unspezifischer Bindungen der DIG-markierten DNA-Sonde an die Nylonmembran wurden die Filter in Kunststoffolie mit 30%iger Hybridisierungslösung eingeschweißt. Die Hybridisierungslösung wurde vor Gebrauch 10 Minuten aufgekocht und anschließend für mindestens 10 Minuten auf Eiswasser gestellt. Die Inkubation der Tüten erfolgte unter Schütteln bei 30°C für mindestens 4 Stunden im Wasserbad. Im Anschluss an die Vorhybridisierung wurde die Hybridisierungslösung durch die gleiche Lösung, die zusätzlich eine DIG-markierte DNA-Sonde enthielt (2.2.2.1), ausgetauscht und über Nacht bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

2.5.1.4 Waschen von Nylonfiltern nach der Hybridisierung

Nach Meinkoth und Wahl (Meinkoth und Wahl, 1984) hängt die Stabilität eines DNA-DANN-Hybrids definierter Länge bei gegebenem G/C-Gehalt von der NaCl-Konzentration, der Konzentration an helixdestabilisierenden Agenzien (z.B. Formamid) und der Temperatur ab. Durch die Veränderung dieser Parameter lässt sich die „Stringenz“ der Hybridisierung definieren. Entsprechend der zu erwartenden Homologie zwischen Sonde und Zielsequenz wurden die Filter zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC, 0,1% SDS und anschließend dreimal 20 Minuten in

derselben Lösung bei 60°C gewaschen. Hybridisierungen zwischen der DIG-DNA Sonde und der DNA auf den Filtern wurden immunologisch nachgewiesen.

2.5.1.5 Immunologischer Nachweis von DIG-markierten Sonden

Nach der Hybridisierung der DIG-markierten DNA-Sonden können die Hybride durch einen „enzyme-linked immunoassay“ unter Verwendung eines Antikörper-Konjugates (Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, Roche) nachgewiesen werden. Für die Nachweisreaktion wurden hybridisierte und gewaschene Nylonfiltermembranen 1 Minute in MS1-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen, 1 Stunde in 1%iger Blockierlösung (MS1-Puffer mit 1% Blockingreagenz (Roche)) und danach 1 Stunde mit verdünnter Antikörper-Konjugat-Lösung (Anti-DIG-AP-Konjugat in 1%iger Blockierlösung, 1:10000) inkubiert. Anschließend wurden die Filter dreimal jeweils 10 Minuten in MS1-Puffer gewaschen und danach 2 Minuten in MS3-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5) äquilibriert. Zur Visualisierung der Hybridisierungssignale wurde CSPD (Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1_{3,7}]decan}-4-yl) phenylphosphat) in MS3-Puffer 1:200 verdünnt. Die äquilibrierten Filter wurden für 30 Sekunden in CSPD Lösung geschwenkt und danach in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurden den Filtern über Nacht ein Röntgenfilm (Fuji RX) exponiert. Die Filme von je zwei zugeordneten Filtern wurden verglichen, um falsche positiv Signale auszuschließen.

2.5.1.6 Isolierung der DNA aus markierten Phagen

Signale auf den Filmen wurden mit Hilfe eines Leuchttisches den Plaques zugeordnet, diese wurden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in 500 µl λ-Dill gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 8°C inkubiert. Für die Phagen-DNA Isolierung wurden POP13b-Bakterien über Nacht bei 37°C herangezogen und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 3,5 verdünnt. Zu 70 µl dieser Kultur wurden 10 µl Phageneluat gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 20 Minuten wurde die Bakterien/Phagenlösung zu 7 ml NZ-Medium und 70 µl 20% Glucose (steril) gegeben und dann bis zur vollständigen Lyse der Bakterien im Inkubationsschüttler bei 37°C belassen (ca. 5-6 Stunden). Nach Zugabe von 70 µl Chloroform wurde das Lysat 15

Minuten weitergeschüttelt, dann in Zentrifugengläser überführt und 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Corex-Gläser überführt und mit 5 µl RNase A (2 mg/ml) und 7 µl DNase (1 mg/ml) versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 7 ml 20% PEG mit 2 M NaCl zugegeben und gevortext. Nach 2 Stunden Inkubation auf Eiswasser bzw. über Nacht bei 8°C wurde 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand sorgfältig entfernt und das Pellet in 500 µl λ-Dill resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform wurde gevortext und 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 µl Phagenpräp-Puffer (0,8 M Tris, pH 8,5, 100 mM EDTA, 1% SDS) gemischt, 5 Minuten bei 65°C erhitzt und dann 50 µl 5 M KAc zugegeben. Nach 30 Minuten auf Eis wurde wieder 5 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit je einem Volumen Phenol und Chloroform versetzt und geschüttelt. Nach 2 Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand mit 500 µl Chloroform versetzt und noch einmal 2 Minuten zentrifugiert. 450 µl Überstand wurden mit 300 µl Isopropanol gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wieder 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Zum Abschluss wurde dieses Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) mit RNase aufgenommen. Die Phagen-DNA wurde mit EcoRI geschnitten, in einen mit demselben Enzym präparierten Blueskript-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

2.5.2 Präparation der Gewebe für die RNA-Isolierung

2.5.2.1 Präparation verschiedener Gewebe

Für die Untersuchungen der Expression der HR-Rezeptortypen wurden neben den Antennen von Weibchen und Männchen, Köpfe (ohne Kopfanhänge), Proboscises, Beine, Flügel, Thoraces, Abdomen und Muskel (aus dem Thorax) präpariert und in mit flüssigem N₂ gekühlten 1.5ml-Reagiergefäßen gesammelt. Die Gewebe wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Gewebe die für *in situ* Hybridisierungsexperimente benutzt wurden, wurden sogleich in Einbettmedium eingefroren. Für immunhistochemische Untersuchungen wurde das Gewebe sofort nach der Präparation fixiert.

2.5.2.2 Präparation von Antennenfragmenten

Zur Untersuchung der Expression von olfaktorischen Genen entlang des Antennenflagellums, wurde die Antenne in acht Fragmente (F1-F8 zu je 10 Antennensegmenten) unterteilt. Die acht Fragmente wurden unter der Stereolupe präpariert und getrennt in flüssigem Stickstoff gesammelt. Für die Fragmente F1 bis F7 wurden die Antennen von circa 300 Tieren verwendet. Für das Fragment F8 wurden die Antennen von circa 400 Tieren verwendet.

2.5.2.3 Präparation des antennalen Gewebes von Puppen verschiedener Entwicklungsstadien

Die Puppen von *Heliothis virescens* wurden unter der Stereolupe aufpräpariert und anhand eines Bestimmungsschlüssels (Picimbon, J. F. et al. 2001) das Entwicklungsstadium der Puppen bestimmt. Fünf Tage vor dem Schlupf (E-5) sind Flügel, Proboscis, Antenne und Beine weiß gefärbt und die gesamte Puppe ist sehr inkonsistent. Im Stadium E-4, vier Tage vor dem Schlupf, sind die Flügel noch fast weiß und nur gegen einen weißen Hintergrund kann eine sehr schwache bräunliche Pigmentierung erkannt werden. Im Stadium E-3, drei Tage vor dem Schlupf, sind eine leichte Pigmentierung der Flügel, aber noch keine Streifen auf den Flügeln zu erkennen. Zwei Tage vor dem Schlupf (E-2) sind Streifen auf den Flügeln erkennbar; die Intensität der Pigmentierung ist ungefähr halb so intensiv wie die nach dem Schlupf (E0). Einen Tag vor dem Schlupf (E-1) ist die Pigmentierung mit der eines adulten Tieres zu vergleichen. Die Augen sind nun intensiv grün, der Körper ist aber noch sehr feucht. Das Stadium (E0) umfasst den Zeitraum von 24 Stunden nach dem Schlupf.

2.5.2.4 Herstellung von Gehirnpräparaten

Von kältebetäubten Tieren wurde mit Hilfe einer feinen Schere die Kopfkapsel vom Körper abgetrennt. Diese wurde sogleich in einer Präparierschale mit Hilfe von Dentalwachs fixiert. Das mechanisch fixierte Gewebe wurde mit einem Tropfen PBS (1x PBS = 0,85% NaCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,1) bedeckt. Mit einer aus der Ecke einer Rasierklinge hergestellten Klinge wurde die Kopfkapsel aufpräpariert, und unter dem Stereomikroskop mit Hilfe von sehr feinen Pinzetten das Gehirn freipräpariert.

Um das Vorhandensein möglichst langer Bereiche des antennalen Nerven vor dem Eintreten in die „sorting zone“ sicherzustellen, wurde mit Hilfe der feinen Klinge möglichst nah an der Antennenbasis, der antennale Nerv durchtrennt. Nach dem Herauslösen des Gehirnes aus der Kopfkapsel wurde es in eine Präparierschale mit frischem PBS überführt. Diese Präparierschale war mit schwarzem Wachs ausgestattet um störende Tracheen und anderes Gewebe gegen den dunklen Hintergrund einfacher zu erkennen und entfernen zu können.

2.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA und Poly(A)⁺- RNA

TRIzol Reagenz ist ein gebrauchsfertiges Reagenz, das zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben verwendet werden kann. Das Reagenz ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Das Arbeiten mit dieser Lösung stellt eine Verbesserung der Single-Step RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987), Chomczynski (1993) und Chomczynski et al. (1994) dar.

50 – 100 mg Gewebe wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend sofort in 1 ml Trizol Reagenz aufgenommen. Das pulverisierte Gewebe wurde dann in einen Glas-Teflon Homogenisator überführt und darin ca. 5 Minuten homogenisiert.

Die homogenisierten Proben wurden in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. So wird die vollständige Dissoziation aller Nukleoprotein- Komplexe sichergestellt. Pro ml Trizol Reagenz wurden anschließend 0,2 ml Chloroform zu den Proben gegeben, die Tubes 15 Sekunden lang von Hand kräftig geschüttelt und dann für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jede Probe bei 12000 x g (ca. 10000 rpm) für 15 Minuten in der Eppendorffzentrifuge bei 8°C zentrifugiert. Bei der Zentrifugation trennt sich die Mixtur

in eine hellrote Phenol-Chloroform-Phase, eine Zwischenphase und eine obere farblose, wässrige Phase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Phase. Das Volumen der wässrigen Phase beträgt etwa 60% des Volumens der für die Homogenisierung verwendeten TRIzol Reagenz.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugen-Tube überführt und die RNA durch Mischen der wässrigen Phase mit 0,5 ml Isopropyl- Alkohol pro 1 ml TRIzol Reagenz gefällt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 10 Minuten lang inkubiert und dann 15 Minuten bei 12000 x g und 8 °C zentrifugiert. Die ausgefallene RNA ist vor dem Zentrifugationsschritt oft nicht sichtbar. Nach der Zentrifugation bildet sie ein gel-artiges Pellet am Boden und an der Wand des Tubes.

Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet einmal mit 75% Ethanol gewaschen. Mindestens 1 ml 75% Ethanol wurde für die Homogenisierung pro 1 ml Trizol Reagenz verwendet.

Die Proben wurden durch Vortexen gut durchmischt und bei 7.500 x g (ca. 8.400 rpm) 5 Minuten bei 2 - 8°C zentrifugiert. Nach der Aufreinigung der RNA wurde das Pellet 5 – 10 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet sollte nicht vollständig trocknen, da sich ein Übertrocknen negativ auf die Löslichkeit der RNA auswirkt. Die RNA wurde in 20 – 40 µl RNase- freiem Wasser gelöst und bei – 70 °C aufbewahrt.

2.5.3.1 Qualitative und quantitative Analyse von RNA und DNA

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren kann durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden (Sambrook, J. et al.1989). Einer OD_{260} von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml DNA beziehungsweise 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung kann über den Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ermittelt werden. Für eine reine Lösung liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,2. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine oder organische Lösungsmittel hin.

2.5.3.2 Isolierung von mRNA mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅

Das Dynabeads Oligo (dT)₂₅-Kit (Dynal AS, Oslo, Norwegen) wurde für eine schnelle Isolierung von intakter polyadenylierter mRNA aus eukaryotischer Gesamt-RNA mit hohem Reinheitsgrad entwickelt. Das Prinzip der Dynabeads Oligo (dT)₂₅ Isolierung beruht auf den Wechselwirkungen des Poly A – Schwanzes der meisten Messenger-RNAs und den Oligo(dT)s, die an die Oberfläche der Dynabeads gebunden sind. Die RNA- Isolierung mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ beruht auf der Ausnutzung ihrer magnetischen Eigenschaften.

Die Dynabeads wurden vor Gebrauch kräftig resuspendiert, 200 µl der Suspension abgenommen, in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und in einem „Magnetic Particle Concentrator“ (Dynal MPC) platziert. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand abgenommen. Das Röhrchen wurde aus dem MPC herausgenommen und die Dynabeads durch Resuspendieren in 2x Binding Buffer (40 mM Tris- HCl pH 7,5, 2 M LiCl, 4 mM EDTA) gewaschen. Das Röhrchen wurde wieder in den MPC gestellt und der Überstand entfernt. Dieser Waschschrift der Dynabeads wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Dynabeads in 200 µl 2 x Binding Buffer resuspendiert.

Eine Menge von 100 µg Gesamt-RNA wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen mit destilliertem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und für 2 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die 200 µl Gesamt-RNA wurden zur Dynabeads-Suspension gegeben, kräftig gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine optimale Anbindung zu gewährleisten. Sodann wurde das Röhrchen für 30 Sekunden in den MPC gestellt, der Überstand ⁽¹⁾ abgenommen, in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gekühlt. Die Dynabeads wurden mit Hilfe des MPC 2 mal mit 200 µl Washing Buffer (10 mM Tris- HCl pH 7,5, 0,1 M LiCl, 1 mM EDTA) gewaschen⁽²⁾. Die mRNA wurde mit 15 µl ddH₂O eluiert und das Röhrchen für 30 Sekunden in den MPC gestellt. Der Überstand, in dem die mRNA enthalten ist, wurde in ein neues RNase-freies Mikrozentrifugenröhrchen übertragen und bei -70°C aufbewahrt.

Die Dynabeads wurden für die Weiterverwendung 2 mal mit 200 µl Binding Buffer gewaschen. Der Überstand⁽¹⁾ wurde zu den im letzten Arbeitsschritt gewaschenen Dynabeads gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Prozedur

beginnt dann wieder bei ⁽²⁾. Das Endvolumen der präparierten mRNA-Lösung war ca. 30 µl für jedes Gewebe.

2.5.4 cDNA-Synthese aus Poly(A⁺)-RNA

cDNA ist eine DNA- Kopie die aus mRNA synthetisiert wird. 0,6 µl 20 mM Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] (Qbiogene), 1,8 µl 50 mM MgCl₂, 1,5 µl 5x First Strand Synthesis Buffer (FSB) (Invitrogen), 2,0 µl 100 mM Dithiothreitol DTT (Invitrogen), 0,3 µl RNasin, 1,0 µl Oligo(dT)₁₈ -Primer (3 pmol/µl) (Pharmacia Biotech), 10 µl Poly (A)⁺ -RNA und 17,3 µl RNase- freies H₂O werden zu einem Gesamtvolumen von 35 µl in einem sauberen PCR-Tube zusammengegeben. Die Mischung wurde kräftig gevortext. Zum Schluss wurden 0,5 µl Superscript™ Reverse-Transkriptase (50 U / µl) (Invitrogen) dazugegeben, mit der Pipette gut vermischt und im Thermo-Cycler mit dem Programm „RT-TOU“ (50 Minuten 42°C, 10 Minuten 65°C, Kühlen auf 8 °C) inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde bis zum Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

2.5.5 Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz mit der Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase eine *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durchgeführt. Für die Experimente wurde die thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die bei den für die Methode erforderlichen Temperaturen nicht denaturiert wird.

Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden Komponenten in ein PCR-Tube zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammengegeben: 10 µl 5 x TaqMaster-Mix, 5 µl 10 x Taq Puffer (mit 15 mM MgCl₂) (Eppendorf), 5 µl 2 mM dNTPs (Natrium- Salz, Invitrogen), 1 µl 100 pmol/µl Primer 1, 1 µl 100 pmol/µl Primer 2 (gewöhnlich wurden Primer mit einer Länge von 21 Nukleotiden gewählt), 1-2 µl (0,05-1,0 µg) des DNA-Templates und 0,3 µl Taq Polymerase (5 U/µl) (Eppendorf). Alle Komponenten wurden durch vorsichtiges auf und ab Pipettieren durchgemischt. Das Tube wurde in den Thermocycler verbracht. Die Annealing-Temperaturen wurden in Abhängigkeit von den jeweiligen Primern gewählt.

Thermo-Cycler-Programme

TOUCH

Arbeitsschritt	Zeit [min.]	Temperatur (°C)
1	1:40	94
2	0:30	94
3	0:40	X - 0,5°C pro Zyklus
4	1:00	72
5	Go to 2; 19 x	
6	0:30	94
7	0:30	(X – 10)
8	1:00	72
9	Go to 6; 19 x	
10	7:00	72
11	For ever	8
12	END	

X ... 50°C oder 55°C

2.5.6 Detektion und Analyse von PCR-Reaktionsprodukten durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse amplifizierter oder restriktionsverdauter DNA wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. 10 µl Reaktionsansatz wurden mit 5 µl 6x Probenpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 30% Glycerol, TE-Puffer,) versetzt und die Reaktionsprodukte in einem 1,0 - 2,0 %igen Agarosegel mit 1x TAE-Puffer (90 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA, 90 mM Essigsäure) bei 150-200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde der Gellösung 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel nach der Elektrophorese unter UV-Licht (302 nm) mit Hilfe einer Gel-Dokumentationseinheit der Firma LTF-Labortechnik analysiert.

Für die Größenbestimmung der Gelbanden wurde ein Molekulargewichtsstandard mit auf das Probengel aufgetragen; üblicherweise wurde hierzu eine 100 bp-Leiter verwendet.

2.5.6.1 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen mit dem Geneclean-Kit

DNA-Banden der erwarteten Fragmentgröße wurden mit einer sterilen Skalpellklinge aus präparativen Agarosegelen ausgeschnitten, mit vier Volumen Natriumjodid-Lösung versetzt und bei 56°C inkubiert. Während der fünfminütigen Inkubationszeit wurde einige Male kurz gevortext. Anschließend wurde pro Mikrogramm zu isolierender DNA ein Mikroliter gevortexte Glasmilch zugegeben und die Suspension fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für fünf Sekunden bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Gegebenenfalls wurde die Prozedur wiederholt. Das Glasmilchpellet mit der daran gebundenen DNA wurde drei Mal in 500µl eiskaltem „New Wash“-Puffer gewaschen, d.h. resuspendiert, kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Glasmilch in 5 µl Wasser resuspendiert und die DNA durch dreiminütige Inkubation bei 56°C eluiert. Die Silikamatrix wurde durch eine 30 Sekunden dauernde Zentrifugation bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Der wässrige Überstand mit der gelösten DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Wiederholung des Elutionsschrittes wurden die Eluate vereinigt und zur vollständigen Entfernung von Glasmilch-Partikeln erneut für 30 Sekunden zentrifugiert. Die abschließend erhaltenen 10 µl DNA-Lösung wurden entweder direkt für die Ligation oder RNA-Sondenherstellung eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Die Reinheit und die Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde über den Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ermittelt.

2.5.7 Transformation rekombinanter Plasmide

2.5.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterienzellen wurden in Anlehnung an die von Hanahan (1983) entwickelte Methode hergestellt. Dazu wurden 500 µl einer *E.coli* XL1-Blue Bakterien-Übernachtkultur (eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert) zu 100 ml SOB-Medium (2% Bactotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben und im Inkubationsschüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Dann wurden jeweils 50 ml Bakterienkultur in sterile „Falcon-Tubes“ überführt, zehn Minuten auf Eis inkubiert und zwölf Minuten bei 4°C und 3000 rpm in der Minifuge RF zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets vorsichtig in 9 ml eiskaltem TFB-Medium (45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 3 mM [CO(NH₃)₆]Cl₂, 10 mM MES pH 6.3) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zehn Minuten bei 4°C mit 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Bakterienpellets in 2 ml kaltem TFB-Medium resuspendiert und 70 µl DND-Lösung (1 M DTT, 10 mM Kalium-acetat pH 7.5, 90% DMSO) zupipettiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden nochmals 70 µl DND-Lösung zugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation der ligierten Plasmide in die kompetenten Bakterienzellen. Die eine Ampicillin-Resistenz tragenden rekombinanten Vektoren wurden in kompetente *E.coli* XL1-blue transformiert.

2.5.7.2 Transformation

Zur Transformation wurde der Ligationsansatz mit 200 µl kompetenter Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt für 90 Sekunden bei 42°C erfolgte eine Abkühlung auf Eis für zwei Minuten. Danach wurden 800 µl LB-Medium (1 % Bactotrypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf mit 75 µl 100 mM IPTG und 75 µl 2% X-Gal beschichteten LB-Amp-Platten (LB-Medium mit 1,5 % Agar und 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert, um eine „Blau-Weiss-Selektionierung“ rekombinanter

Kolonien zu ermöglichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.5.8 DNA-Isolierung und Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide

2.5.8.1 Mini-Präparation

Nach der Isolierung von Plasmiden kann durch einen Enzymverdau mit Restriktionsendonukleasen geprüft werden, ob es sich wirklich um rekombinante Plasmide handelt.

Zur Isolierung kleiner Plasmidmengen wurde der von der Firma GE Healthcare hergestellte FlexiPrep Kit benutzt.

Dazu wurden zunächst 2 ml LB/Amp-Medium (LB-Medium mit 100µg Ampicillin pro ml) mit einer einzelnen Kolonie rekombinanter *E. coli* XL 1 blue Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Inkubationsschüttler inkubiert. 1,5 ml der Bakterienkultur wurde in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Solution 1 (10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 µg/ml DNase-freie RNase 1) durch Vortexen resuspendiert. Dann wurden 200 µl Solution 2 (0,1 M NaOH, 5,3 % SDS) hinzugegeben. Zum Durchmischen wurde das Gefäß mehrmals invertiert. Sodann wurden 200 µl Solution 3 (3 M Kaliumacetat-Lösung pH 5.2) mit in das Gefäß gegeben und gut durchmischt. Dann wurde die Probe 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Der Überstand wurde mit 450 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; es folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt (14000 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Vor der Benutzung der Sephaglas-Suspension (SephaglasTM FP in 7 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA) wurde diese kräftig gevortext und sogleich 100 µl der Suspension zur Probe pipettiert. Die Probe wurde 1 Minute lang kräftig gevortext und dann 30 Sekunden lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 200 µl Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 60% Ethanol) gevortext. Wieder

wurde die Probe 30 Sekunden lang bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine kurze Zentrifugation. Das nun entstandene Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, dann in 50 µl Bidec aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die vom Sephaglas gelöste DNA wurde durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 14000 rpm vom Sephaglas getrennt und in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt.

2.5.8.2 Midi-Präparation

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde das „Plasmid-Midi-Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Für die Plasmidpräparation wurden 100 ml LB/Amp – Medium (= LB-Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml) mit 100 µl Vorkultur rekombinanter *E. coli* XL1 blue angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Inkubationsschüttler inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde auf zwei 50 ml Falcon-Tubes verteilt und 10 Minuten bei 4°C und mit 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Bakterienpellet in 5 ml Puffer 1 (10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert, mit 5 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) gemischt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 ml gekühlter Puffer 3 (2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8) zugegeben und die Suspension durchmischt. Der Ansatz wurde 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten lang bei 4°C und mit 15000 rpm in Corex-Gläsern zentrifugiert. Eine Qiagen-Säule (Qiagen-Tip 100) wurde mit 4 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 0,15% Triton X 100, 15 % Ethanol) gewaschen und die DNA mit 5 ml QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15% Ethanol) von der Säule in ein steriles Glas eluiert. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert. Die Probe wurde 30 Minuten bei 4 °C und mit 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 5 ml kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, wieder zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 90 µl TE-Puffer pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) aufgenommen und die Qualität und die Quantität der DNA über die Extinktion bei 260/280 nm bestimmt.

2.5.9 Sequenzierung klonierter DNA

2.5.9.1 Sequenzierungsprotokoll

Die nicht-radioaktiven Multi-Color-CE-DNA-Sequenzierungen wurde mit Hilfe eines Dye-Terminator-Sequencing-Kits durchgeführt und mit einem automatischen Sequencer (ABI 310, Perkin Elmer) ausgelesen. Die Sequenzierreaktion erfolgte durch Mischen von 0,2 bis 0,5 µg DNA, 3,2 pmol Primer, 2 µl Big-Dye-Terminator Mix (Perkin Elmer, Applied Biosystems), 1µl Sequenzierpuffer (Perkin Elmer, Applied Biosystems) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Der Ansatz wurde in einem Thermo-Cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research) mit folgendem Profil inkubiert: 30 Sekunden 96°C (Step 1), 10 Sekunden 96°C (Step 2), 5 Sekunden 50°C (Step 3), 4 Minuten 60°C (Step 4), go to step 2, 24 times, 4°C forever. Zum Produkt der Reaktion wurde anschließend 40 µl H₂O gegeben. Durch Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 125 µl 100 % Ethanol wurde das Reaktionsprodukt ausgefällt, bei 4°C und 3000 x g in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5417R) für 30 Minuten abzentrifugiert, in 150 µl 70% Ethanol gewaschen und wieder unter o.g. Bedingungen für fünfzehn Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes und Trocknung bei Raumtemperatur wurde die DNA in 25 µl Lichrosolv[®]-Wasser (Merck) aufgenommen. Nach zehnminütiger Inkubation bei 65 °C zum Lösen des DNA-Pellets wurde gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz in 0,5 ml Sequenzier-Tubes (Sample Tubes, PE Applied Biosystems) überführt. Der Ansatz wurde mit Septen (PE Applied Biosystems) verschlossen und zur automatischen Sequenzierung gegeben (ABI PRISM Genetic Analyser 310).

2.5.9.2 Computerunterstützte Analyse der Sequenzdaten

Die Sequenzen, die aus dem automatischen Sequenzierprozess resultierten, wurden manuell kontrolliert (Chromas ABI Data reader and editor, Conor McCarthy, Brisbane, Australien) und mit dem HUSAR 3.5 Software-Paket (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources), das auf dem Software-Paket 7.2 der Genetic Computer Group (Madison, Wisconsin) basiert, analysiert.

2.5.9.3 „Multiple Sequence Alignment“

Vergleichende Sequenzanalysen wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Dabei werden die Ähnlichkeiten aller Sequenzpaarungen berechnet und daraus eine Dayhoff-PAM-Matrix erstellt. Diese dient als Grundlage für das endgültige multiple Alignment.

2.5.9.4 „Identitäts-Dendrogramm“

Zur Darstellung des „Identitäts-Dendrogramms“ wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW „aligned“ (Thompson et al. 1994) und dann die paarweisen Sequenzunterschiede mit dem Programm Mega Version 2.1 errechnet. Basierend auf einer daraus resultierenden Datenmatrix wurde mit der „Neighbor joining – Methode“ (Saitou and Nei, 1987) das Dendrogramm erstellt (Abb. 2). Anhand des Maßstabs ist die Diversität in Prozent abzulesen. Der grüne Bereich zeigt eine Diversität von maximal 60% an, der blaue Bereich eine Diversität von maximal 40%.

2.6 Histologische Untersuchungen

2.6.1 Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie

Um staubfreie Präparate herstellen zu können, wurden die Antennen von kältebetäubten *Heliothis virescens* einen Tag vor dem Schlupf (E -1) und 1 Tag alten *Bombyx mori* präpariert und an einem staubfreien Arbeitsplatz auf einem spezielle Objekthalter für die Rasterelektronenmikroskopie platziert. Anschließend wurden die Präparate mit Gold bedampft und in das Mikroskop verbracht. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Roland Wurster, Institut für Physik und Meteorologie (Universität Hohenheim) angefertigt.

2.6.2 Präparate für Vibratomschnitte

2.6.2.1. Herstellung des Gelatine-Albumin-Einbettmediums

Zu 200 ml kaltem Wasser wurden unter starkem Rühren 75 mg Ovalbumin gegeben. Um Klümpchenbildung zu verhindern wurde das Becherglas in ein 50°C temperiertes Ultraschallbad gestellt. In 50 ml ebenfalls 50°C warmem Wasser wurden 12 g Gelatine gelöst und der Ovalbuminlösung unter starkem Rühren zugegeben; dabei durften keine Klümpchen zurückbleiben. Die noch warme Lösung wurde aliquotiert und vor dem Verwenden wieder auf circa 50°C erwärmt, sodass das Präparat im flüssigen Medium positioniert werden konnte.

2.6.2.2 Herstellung von Vibratomschnitten

Die Antennen von circa 2 Tage alten, kältebetäubten *Bombyx mori* Männchen wurden abgenommen und eine Stunde in 4% PFA (Paraformaldehyd) mit 1% Triton X100 fixiert. Danach wurden sie in 1x PBS kurz gewaschen. Die fixierten Antennen wurden in kleine Kunststoffformen mit erwärmtem Gelatine-Albumin-Einbettmedium positioniert. Das Medium wurde auf Eis abgekühlt. Das gesamte Förmchen wurde in ein 4% PFA-Fixierbad (mit 1% Triton X-100) überführt.

Am Folgetag wurde das fixierte Gelatine-Albumin-Präparat aus der Kunststoffform herausgelöst und mit Sekundenklebstoff (Uhu) auf dem Präparathalter des Vibratoms fixiert. Geschnitten wurde in einem PBS-Bad. Die zwischen 30 und 50 µm dicken Schnitte wurden in PBS überführt und dann auf Objektträger aufgezogen.

2.7 *In situ* Hybridisierung

Bei der *in situ* Hybridisierung handelt es sich um eine Form der DNA- oder RNA-Hybridisierung. Hier wurde eine nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung an Dünnschnitten von antennalem Gewebe durchgeführt.

Für die im folgenden Abschnitt aufgeführten Methoden waren weitgehend RNase-freie Bedingungen notwendig, um einen Abbau der als Sonde eingesetzten *Antisense*-RNA und der nachzuweisenden zellulären mRNA durch RNasen auszuschließen. Alle Glasgeräte und Lösungen wurden deshalb 50 Minuten bei

121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Zum Teil wurden die Lösungen wurden mit RNase-freien Ausgangskomponenten und autoklaviertem Bidest in ebenfalls autoklavierten Gefäßen angesetzt.

2.7.1 Herstellung der *in situ* Sonden

2.7.1.1 Linearisierung der Plasmid – DNA für die *in vitro*-Transkription

Für die Linearisierung der Plasmid-DNA für die *in vitro* – Transkription verwendet man Restriktionsendonukleasen, die den DNA-Doppelstrang innerhalb spezifischer Basensequenzen trennen. Die Auswahl der Endonukleasen erfolgt anhand der Linearisierungs-Site (T3 oder T7) des Vektorsystems pBlueskript II (SK+) um *antisense* RNA herzustellen. Als Reaktionsgefäße für die Linearisierung dienten 1,5 ml Zentrifugenröhrchen.

Dazu wurden 20 µg des Plasmids (aus einer Midi-Präparation) in einem Reaktionsvolumen von 100 µl „geschnitten“.

Bei diesem Restriktionsverdau wurden 20 µg DNA, 3 µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease und 10 µl eines auf das Enzym abgestimmten Puffers (um maximale Enzymtätigkeit zu erreichen) mit ddH₂O auf ein Reaktionsvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

1 µl des Reaktions-Produktes wurde zur Überprüfung der vollständigen Linearisierung mit einer Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarose-Gel untersucht. Als Marker diente ein λ-DNA-Standard (1:1 Mischung von 1:8 verd. Lambda DNA / *EcoRI*+*HindIII* und 1:8 verd. Lambda DNA / *HindIII*, MBI Fermentas).

2.7.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

100 µl TE-Puffer pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform werden zum Reaktionsansatz des Enzymverdaus gegeben und kurz gevortext. Danach wird dieses Gemisch für 5 Minuten bei 14000 rpm in der Eppendorffzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. 18 µl (d.h. ca. 1/10 des Volumens) 3M Na-Acetat pH 4,8 und 450 µl 100% Ethanol wurden zur oberen Phase gegeben. Es folgte kurzes Vortexen und fünfminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm und Raumtemperatur.

Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol versetzt, um es zu waschen. Die DNA-Ethanol-Suspension wurde 5 Minuten bei 14000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das Pellet vollständig getrocknet, bevor es in 20 µl sterilem H₂O resuspendiert wurde.

Die Konzentration und die Reinheit der dsDNA wurde mit dem Photometer, bei OD_{260/280} bestimmt.

2.7.1.3 Herstellung DIG- bzw. Biotin-markierter *antisense* RNA

Früher waren für die *in situ* Hybridisierung radioaktiv markierte Sonden üblich, Für die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung können DIG- (= Digoxigenin) und Biotin-markierte Sonden eingesetzt werden.

Das Digoxigenin wird aus den beiden Fingerhutarten *Digitalis purpurea* und *Digitalis lantana* gewonnen. Es handelt sich um ein Cardenolid-Steroid. Das Steroid ist über einen Spacer an UTP gekoppelt und kann so in die RNA-Moleküle eingebaut werden. Der Nachweis dieser Markierung erfolgt mit einem DIG-spezifischen Antikörper, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dadurch, dass an jedes Digoxigenin und jedes Biotin mehrere spezifische Antikörper mit angekoppeltem Enzym binden können, kann eine Verstärkung der Signale erreicht werden. Die enzymatische Spaltung eines chromogenen Substrates durch das antikörpergebundene Enzym führt zur Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes. Digoxigenin eignet sich als Label für Sonden bei histologische Untersuchungen in einer großen Anzahl verschiedener Spezies, da dieser Stoff nur im Fingerhut vorkommt. Bei der Biotin- Markierung wird durch *in vitro* Transkription von der RNA-Polymerase an jede 20. bis 25. Position des Transkripts Biotin-UTP eingebaut. Der Nachweis erfolgt über Streptavidin, ein (aus *Streptomyces avidinii* isoliertes) tetrameres Protein, von dem jede Untereinheit eine Bindestelle für Biotin besitzt.

Für die Herstellung einer Digoxigenin-markierten *antisense* RNA durch *in vitro* – Transkription, wurden die folgenden Komponenten in einem sterilen Eppendorfgefäß in einem Gesamtvolumen von 10 µl zusammengegeben:

2 µg linearisierte DNA, 2 µl des 10x Transkriptionspuffers (Roche, Germany), 2 µl DIG RNA Labelling-Mix (Roche) und 1 µl T3 oder T7 (20 U/µl) RNA-Polymerase (Roche). Es erfolgt eine Inkubation für 3 Stunden bei 37°C. Nach Zugabe 1 µl (10 Units / µl) DNase I (GE Healthcare), wurde die Reaktion für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl 5 M LiCl und 75 µl 100% Ethanol dazugegeben und diese Mischung 30 Minuten bei -70°C kaltgestellt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten mit 15000 rpm und 8°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl 70% Ethanol durch Vortexen resuspendiert. Diese Suspension wurde 30 Minuten mit 15000 rpm bei 8°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Trocknen des RNA-Pellets bei Raumtemperatur wurde dieser in 50 µl RNase-freiem ddH₂O gelöst.

2.7.1.4 Verkürzung der Sonde

Um eine optimale Penetration des Zielgewebes zu ermöglichen, wurde die RNA-Sonde nach der Methode von Angerer und Angerer (1992) auf eine Länge von 0,8 kb gekürzt. Dazu wurden 25 µl der RNA-Lösung mit 25 µl 0,2 M Na₂CO₃ pH 10,2 versetzt und für eine bestimmte Zeitdauer, die nach folgender Formel (Angerer, L. M. and Angerer, R. C. 1992) berechnet wurde, bei 60°C inkubiert.

Formel für längenabhängige Verkürzungszeit:

$$\text{Inkubationsdauer (60°C)} = \frac{\text{AL} - \text{WL}}{0,11 \times (\text{AL} \times \text{WL})} \text{ min}$$

AL = Sondenausgangslänge in Kilobasen

WL = Sondenwünschlänge in Kilobasen (hier 0,8 Kilobasen)

Nach der Inkubation bei 60°C wurden 5 µl 10% Essigsäure hinzugefügt. Diese Lösung der verkürzten RNA-Sonde wurde in 250 µl Hybridisierungspuffer (50%

Formamid, 10% Dextransulfat, 2 x SSC (1 x SSC = 0,15 mM NaCl, 0,0015 M Na-Citrat, pH 7,0), 0,2 µg/µl Hefe-tRNA, 0,2 µg/µl Heringssperm-DNA) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Vorbereitung des Präparates

Dem kältebetäubten Insekt werden mit einer feinen Präparationsschere und Pinzette die Antennen abgenommen und sogleich in Gefrier-Einbettmedium eingebettet. Das Einbetten wurde auf zwei unterschiedliche Arten versucht. Zum einen wurde die abpräparierten Antennen in Einbettmedium in einem zylindrisches Hütchen (mit einem Durchmesser von ca. 1,3 cm und einer Höhe von ca. 2,0 cm) aus Aluminiumfolie eingebettet, das auf einem Stück Trockeneis gekühlt wurde. Zum zweiten wurden die Antennen, nach dem Abpräparieren in das Gefriermikrotom überführt und direkt auf der Haltevorrichtung für die Präparate in einem Tropfen Einbettmedium eingebettet. Da sich Präparate, bei denen der Tropfen einen zu großen Durchmesser hatte als sehr schlecht in ihrer Handhabung herausstellten, wurde der durchgefrorene Tropfen mit einem Skalpell zurecht geschnitten. Die Eigenschaften des Jung Tissue Freezing Mediums stellten sich für unsere Zwecke als weniger geeignet heraus, deshalb wurde Tissue-Tek O.C.T.TM Einbettmedium der Firma Sakura benutzt. Von den eingebetteten Antennen wurden mit dem Schneidegeräte Dünnschnitte in einer Dicke von 12 µm angefertigt und auf Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden entweder nach kurzem Trocknen bei Raumtemperatur direkt verwendet oder bei -70 °C aufbewahrt. Das Abschwimmen des Gewebes vom Objektträger stellte ein Problem dar. Zur Behebung dieser Problematik stellten sich Superfrost Plus-Objektträger der Firma Menzel Gläser am geeignetsten heraus.

2.7.3 Fixierung der Gefrierschnitte

Heraus- oder abpräpariertes Gewebe beginnt bereits nach kurzer Zeit sich zu verändern. Um dies zu verhindern und das Gewebe so gut wie möglich in seinem ursprünglichen Zustand zu erhalten wurden die Gewebe mit einer behandelt. Dabei ist hier ein zügiges und vollständiges Durchdringen des Gewebes von der Fixierlösung von großer Bedeutung.

Die Gewebeschnitte wurden für 30 Minuten in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung in 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 9,5) fixiert und anschließend 1 Minute in PBS (phosphate-buffered saline; 0,85% NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,1) gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer 0,2 M HCl-Lösung (zur Denaturierung der Proteine) und mit 1 %igem Triton X-100 in PBS (für 2 Minuten inkubiert (zur Permeabilisierung der Membran). Nach zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 30 Sekunden wurden die Gefrierschnitte für circa zehn Minuten in 50%ige Formamid-Lösung mit 5x SSC gegeben. Bei der anschließenden Hybridisierung mit den spezifischen RNA-Sonden wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrocknen.

2.7.4 Hybridisierung der Dünnschnitte mit der Sonde

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Verdünnungen der markierten Sonden in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 10% Dextransulfat, 2xSSC (1xSSC = 0,15mM NaCl, 15mM Na-Citrat, pH 7,0), 0,2µg/µl Hefe-t-RNA, 0,2 µg/µl Heringssperm-DNA) angesetzt. Dies erfolgte in 1,5 ml-Reagiergefäßen.

Um sicherzustellen, dass die Sonde tatsächlich als Einzelstrang vorliegt, wurde die die Sonden vor dem Gebrauch 10 Minuten in einem Thermomixer auf 65°C erhitzt und anschließend mindestens 5 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µl Sonde auf jeden Objektträger pipettiert und mit einem großem Deckglas abgedeckt. Dies erlaubte mit relativ kleinen Volumina der Sonde zu arbeiten. Um ein rasches Verdunsten der Sonde zu verhindern, wurden die Schnitte in einer „Feuchtkammer“, einem dicht verschlossenen Gefäß mit einer gesättigten Formamid-Atmosphäre, bei 55°C (bzw. bei 65°C) über Nacht inkubiert. Diese Temperatur gewährleistet eine spezifische Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz.

2.7.5 Immunhistochemischer Nachweis der Sonden

Vor dem immunhistochemischen Nachweis wurden am Folgetag die Schnitte mit 0,1x SSC zwei mal jeweils 30 Minuten bei 60°C (beziehungsweise bei 65 °C) gewaschen.

Die zu untersuchenden Dünnschnitte wurden dafür zunächst in Tris-Puffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7.5) äquilibriert und anschließend zwischen 30 Minuten und 45 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 %iger Blockierungslösung (1% Blocking Reagenz, 0,3 % Triton X-100 in Tris-Puffer) in einer Feuchtkammer (Bidest) inkubiert. 100 µl Antikörperlösung (1:500 Anti-DIG-AP, 1:100 Strep-HRP in 1%iger Blockierungslösung) wurden auf jeden Objektträger pipettiert, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und bei 37°C 60 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten in TBS-Waschpuffer (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.05 % Tween 20) wurden die Schnitte kurz in DAP-Puffer (pH 8) äquilibriert. Für die Detektion des Anti-DIG-AP-Konjugats wurden 150 µl HNPP/Fast Red TR-Mix auf die Objektträger gegeben (10 µl HNPP, 10 µl Fast Red TR Solution in 1 ml 100mM Tris HCl, pH 8, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, sterilfiltriert), ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt und in befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde drei Mal fünf Minuten mit TNT-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Reaktion durch Eintauchen der Objektträger in Bidest gestoppt. Die Objektträger wurden mit PBS-Glycerol (1:3) „eingedeckelt“ und zur Erhaltung der Fluoreszenz über einen möglichst langen Zeitraum hinweg bei –20°C gelagert.

2.7.6 Doppel– *in situ* Hybridisierung

Bei dieser speziellen Methode der *in situ* Hybridisierung wurden ebenfalls stets hochstringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen angewandt. Die Verdünnung der DIG- und Biotin-markierten *Antisense*-RNA-Sonden in Hybridisierungspuffer erfolgte gemeinsam in einem 100 µl Ansatz. Der weitere Verlauf der Hybridisierung erfolgte wie zuvor bei der einfachen *in situ* Hybridisierung.

2.7.7 Immunhistochemischer Nachweis der Sonden

Die Deckgläser wurden vorsichtig abgehoben und die Schnitte unter leichtem Schütteln zwei Mal 30 Minuten mit 0,1 x SSC bei 60°C gewaschen. Die Visualisierung DIG-markierter RNA-Hybride erfolgte indirekt durch einen „enzyme-

linked-immunoassay“ unter Verwendung des Anti-DIG-AP-Konjugats. Die Biotin-markierten RNA-Sonden wurden ebenfalls durch einen „enzyme-linked-immunoassay“ visualisiert, jedoch unter Verwendung des Anti-Biotin-Strep-HRP-Konjugats.

Die zu untersuchenden Dünnschnitte wurden zunächst in Tris-Puffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7.5) äquilibriert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 %iger Blockierungslösung (1% Blocking Reagenz, 0,3 % Triton X-100 in Tris-Puffer) in einer Feuchtkammer (Bidest) inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper blockiert. 100 µl Antikörper/Streptavidinlösung (1:500 Anti-DIG-AP, 1:100 Streptavidin-HRP (Horseradish-Peroxidase) in 1 %iger Blockierungslösung) wurden auf jeden Objektträger pipettiert, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und bei 37°C 60 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten in TBS-Waschpuffer wurden die Schnitte kurz in DAP-Puffer (pH 8) äquilibriert. Für die Detektion des Anti-DIG-AP-Konjugats wurden 150 µl HNPP/Fast Red TR-Mix auf die Objektträger gegeben (10 µl HNPP, 10 µl Fast Red TR Solution in 1 ml DAP-Puffer, pH 8, sterilfiltriert), ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt und in befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde drei Mal fünf Minuten mit TNT-Puffer gewaschen. Dann wurden jeweils 100 µl der „Fluorophore Tyramide Working-solution“ (1:50 Verdünnung der „Fluorophore Thyramide Stocksolution“ in „1 x Amplification Diluent“) auf die Objektträger pipettiert, um das Anti-Biotin-SA-HRP-Konjugat zu visualisieren. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für zehn Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen für je fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Eintauchen der Objektträger in Bidest gestoppt. War die Reaktion zu schwach, wurde das zweite Substrat erneut zugegeben und die darauf folgende Prozedur wiederholt. Die Objektträger wurden mit dem „Slow Fade light Antifade Kit with DAPI“ (Molecular Probes) oder in PBS-Glycerol (1:3) „eingedeckelt“ und mit einem kofokalen Laserscanningmikroskop (Carl Zeiss LSM 510 Meta) ausgewertet. Zur Erhaltung der Fluoreszenz über einen möglichst langen Zeitraum wurden die Schnitte hinweg bei -20 °C gelagert.

2.8 Untersuchung der Proteinexpression

2.8.1 Herstellung Sequenz-spezifischer Antiseren

Zur Herstellung von Antiseren gegen eine Peptidsequenz von HR13 wurde das synthetisierte Peptid „keyhole limpet hemocyanin“(KLH)-konjugiert (Squarix Biotechnology, Deutschland). Mit diesem Peptid wurden Kaninchen nach einem Standardprotokoll immunisiert (Charles River Laboratories, Deutschland). Nach dem Ausbluten der Kaninchen, wurden die Antiseren mit Hilfe von Peptid-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Squarix Biotechnology, Deutschland).

2.8.2 Antiseren

Bezeichnung	Hersteller
Anti-HR13 LESNDNNKDEIKDHSYTEEELK (22 AS)	Charles River Lab.
Anti-HRP-Antikörper (Goat, Cy3),	Dianova
Goat α Rabbit, Alexa 488	Invitrogen (Molecular Probes)

2.8.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Gewebeschnitten

Für immunhistochemische Untersuchungen an Antennenschnitten wurden die Antennen von 1 bis 2 Tage alten kältebetäubten Tieren präpariert und 1 h in 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (1,4 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) mit 1% Triton X-100 fixiert. Auf vergleichbare Art und Weise wurden die Antennen von Puppen verschiedener Entwicklungsstadien präpariert. Nach der Fixierung des Gewebes wurde es gründlich mit PBS (0.85% NaCl, 1,4mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH7.4) gewaschen. Danach folgte über Nacht eine Inkubation in 25 % Sucrose in PBS bei einer Temperatur von 8°C.

2.8.4 Gehirnpräparate für histologische Untersuchungen der antennalen Loben

Für histologische Untersuchungen wurden die Präparate in eine 24-Well Platte überführt und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gehirnpräparate über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (1.4 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) mit 1% Triton X-100 fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Präparate 10 x 60 min. in je 500 μl PBS bei 4°C gewaschen.

Die Präparate wurden über Nacht mit einer Blockierungslösung aus 10% NGS (Normal Goat Serum), 0.3 % Triton X-100 in PBS inkubiert. In diese Blockierungslösung wurde anschließend der primäre Antikörper in einer entsprechenden Konzentration 1:1000 zu den Präparaten gegeben. Um ein komplettes Durchdringen des Gewebes sicherzustellen verblieben die Gehirne 3 Tage bei 4°C in der Antikörperlösung. Anschließend wurde die Antikörperlösung durch PBS ersetzt, worin die Gehirne bis zum Folgetag verblieben, um anschließend 10 x 60 min in PBS gewaschen zu werden.

Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 in Blockierlösung eingesetzt. Die Gehirne verbleiben ebenfalls 3 Tage bei 4°C in dieser

Antikörperlösung und wurden dann erneut 10 x 60 min. in PBS gewaschen. Gewaschen wurde wie bereits nach dem primären Antikörper.

Für die mikroskopische Untersuchung der „whole mount“-Präparate wurden auf ein großes Deckglas für mikroskopische Präparate 5 Lochverstärker aus dem Bürobedarf übereinandergeklebt. Jeweils ein Präparat wurde in die Mitte in einen Tropfen PBS/Glycerol (1:3) platziert, mit einem kleinen Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Auf diese Weise wurde das Präparat nicht deformiert und ein Mikroskopieren aus beiden Richtungen wurde ermöglicht.

2.9 Laserscanningmikroskopie zur Untersuchung immunologisch behandelte Präparate

Zur Untersuchung der immunologisch behandelten Präparate wurde die konfokale Laserscanningmikroskopie angewendet. Bei der Laserscanningmikroskopie wird ein Laserstrahl auf einen sehr kleinen Bereich des Gewebes fokussiert, um mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge spezifisch Fluorophore anzuregen.

Diese Technik wurde dazu eingesetzt gefärbte Präparate dreidimensional aufzulösen und um für feine Gewebstrukturen durch Ausblenden von Streulicht außerhalb des Fokus ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Verwendet wurde ein Carl Zeiss LSM 510 Meta auf Basis eines inversen Axiophot. Die Verwendung eines Durchlichtdetektors ermöglichte das zeitgleiche Aufnehmen eines Durchlichtbildes. So wird eine Orientierung im Gewebe deutlich vereinfacht oder eine Zuordnung von gefärbten zu ungefärbten Gewebeteilen erst möglich.

Bei der Verwendung von mehreren unterschiedlichen Fluorophoren, wie bei Doppel-Fluoreszenz Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung etc. wurden Multitracks gefahren, um die Farbstoffe in getrennten Durchläufen mit der passenden Laserlinie und dem passenden Filter aufzunehmen. So wird ein „Durchbluten“ in einen anderen Kanal verhindert, was essentiell für die Untersuchung einer möglichen Coexpression ist.

2.10 Berechnung der relativen Anzahl Rezeptor-exprimierender Zellen und Typen trichoider Sensillenhaare auf der Männchenantenne

Zur Berechnung des relativen Anteils verschiedener Typen von Sensilla trichodea auf der Männchenantenne wurden Daten von Baker et al., 2004 herangezogen, die auf elektrophysiologischen Untersuchungen beruhen. Die Zahlen wurden gegen den Sensillentyp C normalisiert.

	Typ A	Typ B	Typ C
Pheromonkomponente	Z11-16:Al	Z9-14:Al	Z11-16:Ac Z11-16:OH / Z9-14:Al
Prozentualer Anteil an gemessenen Sensillen	81%	3%	16%
n-fache der Anzahl von Sensilla trichodea Typ C	5	0,2	1

Die n-fachen des Sensillentyps C beruhen auf den Daten von Baker et al., 2004.

Für einen Vergleich der rel. Anzahl der verschiedenen Sensilla trichodea Typen und eine mögliche Zuordnung distinkter Rezeptortypen wurde eine Berechnung des relativen Anteils von HR-exprimierenden Zellen auf der Männchenantenne durchgeführt. Dafür wurden markierte Zellen von Antennensegmenten mit gleicher Schnittdicke und gleicher Schnittführung ausgezählt. Als Material wurden mit den entsprechenden Sonden behandelte Schnitte aus voneinander unabhängigen *in situ* Hybridisierungs-experimenten verwendet. Die markierten Zellen aus fünf einzelnen Segmenten wurden gezählt und gegen die Zahl der HR16-exprimierenden Zellen normalisiert.

Rezeptortyp	Schnittdicke	Schnittführung	Anzahl markierter Zellen	Mittelwert	n-fache der Anzahl HR16-Zellen
HR13	12 µm	Longitudinal	7	5,2	3,3
			4		
			4		
			6		
			5		
HR14	12 µm	Longitudinal	1	1	0,6
			1		
			1		
			1		
			1		
HR16	12 µm	Longitudinal	2	1,6	1
			2		
			1		
			2		
			1		

Ausgezählt wurden Antennensegmente aus voneinander unabhängigen *in situ* Hybridisierungsexperimenten.

2.11 Auswertung der Daten und Verfassen der Arbeit

Acrobat	Adobe
LSM Image Browser	Carl Zeiss
LSM Confocal Microscopy Software	Carl Zeiss
Photoshop	Adobe
Powerpoint	Microsoft
Word XP	Microsoft
Windows XP	Microsoft

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Pheromonrezeptor-Kandidaten des Seidenspinners *Bombyx mori*

Im Rahmen eines Screening-Projektes wurde mit spezifischen Sonden basierend auf Sequenzdaten von olfaktorischen Rezeptoren der „Tabakeule“ *Heliothis virescens* das Screening einer antennalen cDNA-Bank von *Bombyx mori* durchgeführt. Im Zuge dieses Screenings konnten zwei Klone (BmOR1 und BmOR3) identifiziert werden, deren Aminosäuresequenzen sowohl untereinander, als auch zu putativen Pheromonrezeptoren von *Heliothis virescens* (Krieger et al., 2004) einen relativ hohen Grad an Identität aufweisen. Mit Hilfe von BLAST-Analysen der partiellen *Bombyx mori* Genom-Datenbank wurden drei weitere genomische Fragmente und entsprechende cDNAs (BmOR4, 5 und 6) identifiziert. Die von diesen cDNAs abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen ebenfalls einen relativ hohen Grad an Sequenzverwandtschaft mit den Rezeptoren von *Heliothis virescens* auf (Krieger et al., 2004). Als ein Aspekt dieser Promotionsarbeit sollte die Topologie der Expression dieser Rezeptoren visualisiert werden. Als Voraussetzung dafür wurden zunächst mittels Rasterelektronenmikroskopie spezielle Verteilungsmuster von Pheromon-sensitiven Sinneshaaren der Antennen untersucht. Die Morphologie der Antenne ist in Abbildung 1 und Abbildung 2 gezeigt.

3.2 Morphologie der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*

Die Antenne von *Bombyx mori* wird in Hauptast und Seitenäste unterteilt. Im Stereomikroskop sind deutlich Hauptast (st) und Seitenäste (br) zu unterscheiden (Abb.1 und Abb.2). So weist die korbähnlich geformte Antenne von *Bombyx mori* ~30 paarige Seitenäste auf. Die Seitenäste werden von großen Haemolymphräumen durchzogen, die durch ein Septum voneinander getrennt sind (Abb. 2C und D). Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops können die auf den Seitenästen positionierten Sensillenhaare visualisiert werden (Abb. 1B, Abb. 2A). Bei einem Großteil der in Abbildung 2A und B sichtbaren Sensillenhaare handelt es sich um lange Sensilla trichodea. Die Antennen der Männchen, welche in erster Linie der Detektion von Sex-Pheromonen dienen, weisen insgesamt circa 17000 Sensilla trichodea auf (Steinbrecht, 1970). Dabei handelt es sich um verschieden lange, leicht

gebogene Sensillenhaare (Abb. 2B). Die langen *S. trichodea* sind in zwei lateral lokalisierten Reihen entlang der Seitenäste positioniert (Abb. 2 C, D). Neben den Pheromon-sensitiven langen *Sensilla trichodea* (lt) verfügen die Antennen über circa 2500 *Sensilla trichodea* mittlerer Größe (mt), 5000 *Sensilla basiconica* (b), und 800 *Sensilla coeloconica* (c). Diese tragen möglicherweise zur Detektion von generellen Duftstoffen bei. In Abbildung 2C ist ein Schnitt durch einen Seitenast gezeigt. Die Schemazeichnung einer vergleichbaren Schnittebene nach Schneider und Kaissling (Schneider and Kaissling, 1957, 1958) veranschaulicht die Lokalisierung wichtiger histologischer Details des Antennenseitenastes. Neben verschiedenen Sensillenhaaren sind auch die olfaktorischen Neurone (on) und der antennale Nerv (an) gezeigt (Abb. 2D).

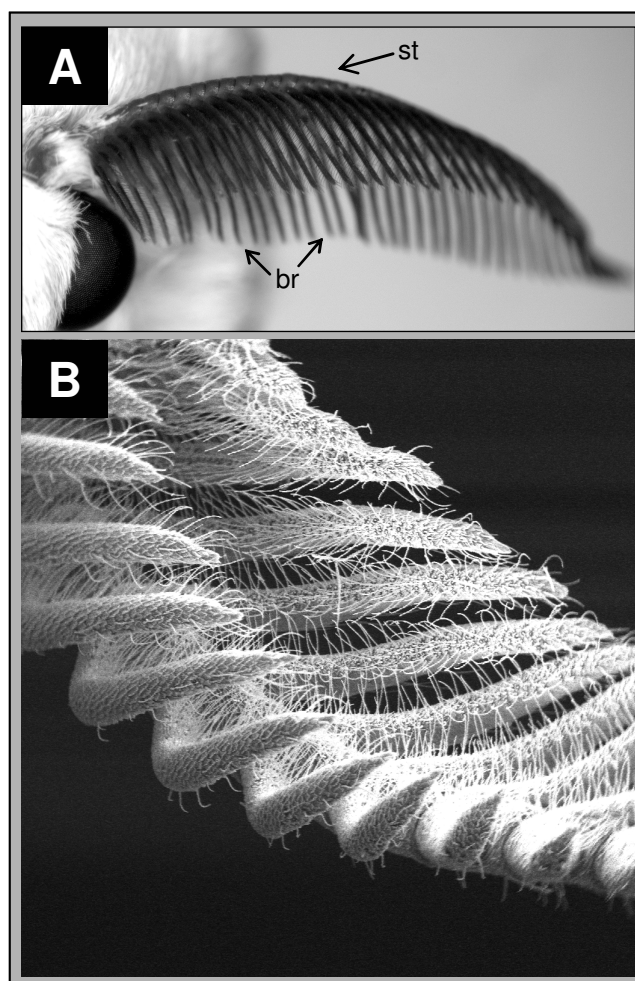


Abb. 1 Die Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*

A Die Antenne von *Bombyx mori* in der Übersicht. Deutlich sind Hauptast (st=stem) und Seitenäste (br=branch) zu unterscheiden. So weist die Antenne von *Bombyx mori* ~30 Paare von Seitenästen auf, welche der Antenne eine korbähnliche Struktur verleihen.

B In dieser rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme sind deutlich die auf den Seitenästen positionierten Sensillenhaare zu erkennen.

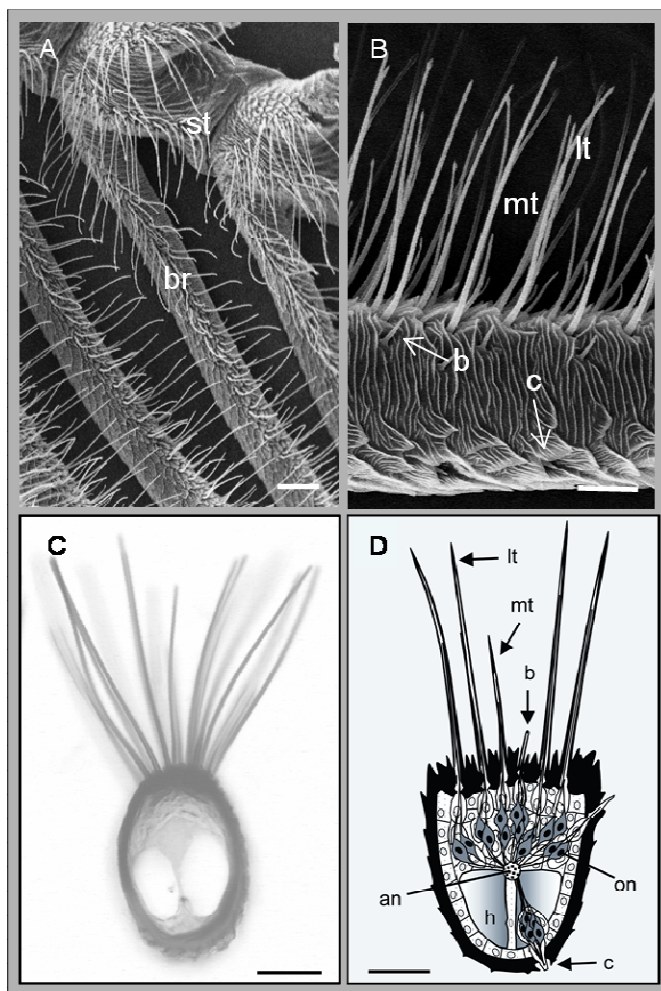


Abb. 2 Morphologie der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*

A Dargestellt ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Männchenantenne. Lange Sensillenhaare (Sensilla trichodea) sind auf den Segmenten des Hauptastes oder Antennenstamms (st) und den Seitenästen (br) so angeordnet, dass sie eine siebförmige Struktur bilden. Maßstab = 50 μm

B Man unterscheidet lange Sensilla trichodea (lt), Sensilla trichodea mittlerer Länge (mt), basicische Sensillenhaare (b) und Sensilla coeloconica (c). Maßstab = 25 μm

C Gezeigt ist ein Vibratomschnitt (Dicke 50 μm) durch den Seitenast einer *Bombyx mori* Antenne. Maßstab = 25 μm

D Schema eines Querschnittes durch einen Seitenast (vergleichbar zu C; nach Schneider and Kaissling, 1957, 1958). Olfaktorische Neurone (on) projizieren ihre Dendriten in verschiedene Typen von sensorischen Haaren und ihre Axone in Richtung des antennalen Nerven (an). (h) kennzeichnet den Haemolymph-Raum. Maßstab = 25 μm

3.3 BmOR-Rezeptor-exprimierende Zellen in der Antenne von *Bombyx mori*

Zur Visualisierung und topologischen Lokalisation der antennalen Zellen, die potentiell Rezeptortypen von *Bombyx mori* exprimieren, wurden *in situ* Hybridisierungsexperimente mit Dünnschnitten von Männchenantennen durchgeführt. Eine Analyse von Schnitten durch einen antennalen Seitenast mit

Rezeptor-spezifischen RNA-Sonden ergab, dass distinkte Populationen von Zellen markiert wurden. Abbildung 3 zeigt einen Dünnschnitt durch den Seitenast einer Männchenantenne, der in einem *in situ* Hybridisierungsexperiment mit einer BmOR1-spezifischen RNA-Sonde behandelt wurde. Die rot markierten BmOR1-Zellen sind deutlich zu erkennen; eine präzise Zuordnung zu distinkten Sensillenhaaren war hier nicht möglich. Dargestellt ist eine ausgewählte Ebene eines konfokalen Bildstapels. Der Fluoreszenzkanal (rot) wurde mit dem Bild des Durchlichtkanals hinterlegt.

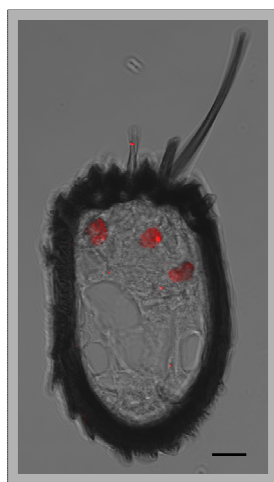


Abb. 3 Lokalisation von BmOR1-Zellen

Gezeigt ist ein Dünnschnitt durch den Seitenast einer Männchenantenne. Durchgeführt wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer BmOR1-spezifischen RNA-Sonde. Die rot markierten BmOR1-Zellen sind deutlich zu erkennen. Eine Zuordnung zu Sensillenhaaren ist unmöglich. Gezeigt ist eine ausgewählte Ebene eines konfokalen Bildstapels. Der Fluoreszenzkanal (rot) wurde mit dem Bild des Durchlichtkanals hinterlegt. Maßstab = 10 μ m

3.4 Etablierung der „whole-mount“ *in situ* Hybridisierung

Um eine bessere Zuordnung der Rezeptor-exprimierenden Zellen in der Antenne von *Bombyx mori* zu ermöglichen wurde versucht ein Protokoll für „whole-mount“ *in situ* Hybridisierungsexperimente zu etablieren. Mit Hilfe dieser Methode in Kombination mit konfokaler Laserscanningmikroskopie sollte es möglich sein, die Rezeptor-exprimierenden Zellen im intakten Gewebe zu visualisieren. Der in einer raster-elektronenmikroskopischen Aufnahme gezeigte Bereich einer Männchenantenne (Abb. 4 links) repräsentiert einen vergleichbaren Antennen-Abschnitt, wie er in den folgenden lichtmikroskopischen Aufnahmen gezeigt wird.

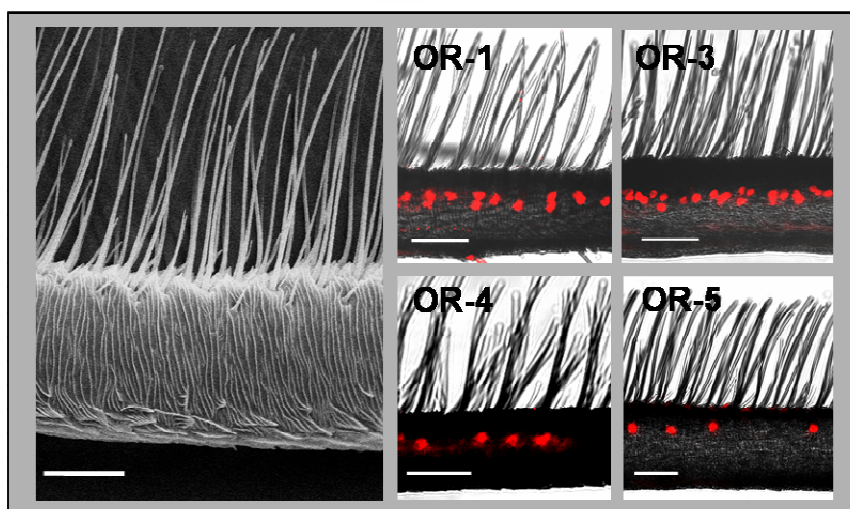


Abb. 4 Verteilung BmOR-exprimierender Zellen entlang des Seitenastes der Männchenantenne von *Bombyx mori*

Links Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Seitenastes der Antenne von *Bombyx mori* (♂). Der gezeigte Ausschnitt repräsentiert einen vergleichbaren Bereich der Antenne, wie er für die Abbildungen in denen die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungsexperimente mit BmOR1- und BmOR3- bis BmOR5-spezifischen RNA-Sonden dargestellt ist. Maßstab = 25 µm

In **OR-1 (BmOR1)** und **OR-3 (BmOR3)** bis **OR5 (BmOR5)** sind die Ergebnisse von *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit der jeweiligen Rezeptor-spezifischen, DIG-markierten antisense RNA-Sonde an „whole-mount“-Präparaten von Seitenästen der *Bombyx mori* Antenne gezeigt. Markierte Zellen wurden mit HNPP/ Fast Red visualisiert. Eine große Anzahl von Zellen welche BmOR1 und BmOR3 exprimieren, ist deutlich entlang der Längsachse des Seitenastes zu erkennen. Die Anzahl von BmOR4- und BmOR5-exprimierenden Zellen ist deutlich geringer. Gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen eines konfokalen Bildstapels. Der rote Fluoreszenzkanal wurde dem Durchlichtkanal überlagert. Maßstab = 50 µm

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der „whole-mount“ *in situ* Hybridisierungsexperimente mit spezifischen RNA-Sonden für BmOR1, BmOR3, BmOR4 und BmOR5 dargestellt. Gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen konfokaler Bildstapel. Der rote Fluoreszenzkanal wurde mit dem Durchlichtkanal überlagert. Markierte Zellen wurden mit HNPP/ Fast Red visualisiert. Eine große Anzahl BmOR1- und BmOR3- markierter Zellen ist charakteristisch entlang der Längsachse des Seitenastes positioniert. Sie treten dort in regelmäßigen Abständen auf. Da bei Anwendung dieser Methode nahezu alle langen trichoiden Sensillenhaare erhalten blieben, zeigte sich, dass Rezeptor-exprimierende Sinneszellen und Pheromonsensitive Sensillen in ähnlich regelmäßigen Abständen voneinander entfernt auf den Seitenästen lokalisiert sind. In Hybridisierungsexperimenten mit BmOR4- und BmOR5-Sonden wurden deutlich weniger Zellen markiert. Mit der BmOR6-Sonde konnten keine markierten Zellen nachgewiesen werden.

Die relativ hohe und vergleichbare Anzahl von Zellen, die mit BmOR1- bzw. BmOR3-Sonden markiert wurden, führt zur Frage, ob die beiden Rezeptortypen in den gleichen Zellen exprimiert werden. Daher wurden „Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimente“ an Dünnschnitten von Antennenseitenästen mit einer Biotin-markierten BmOR1- und einer DIG-markierten BmOR3-Sonde durchgeführt. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse solcher Hybridisierungsexperimente gezeigt. Die BmOR1-Zellen sind mit grüner Fluoreszenz und BmOR3-Zellen mit roter Fluoreszenz markiert.

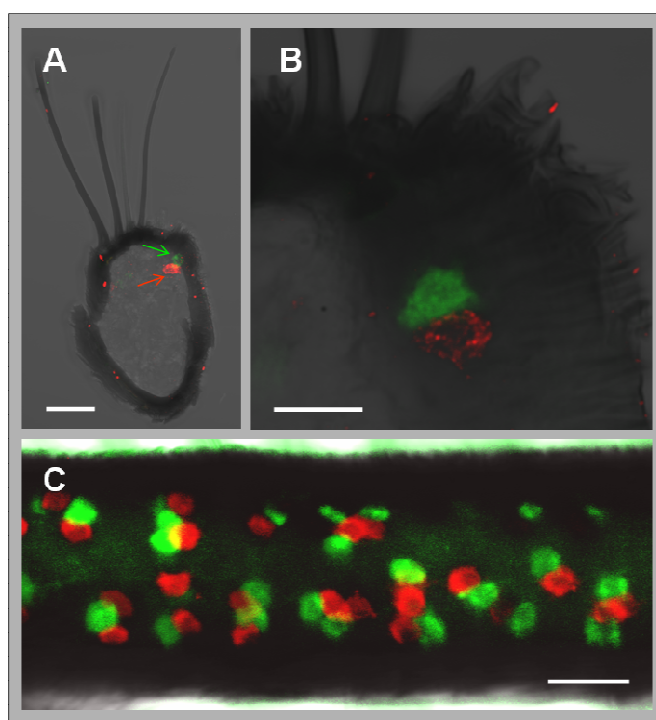


Abb. 5 Expressionsmuster von BmOR1 und BmOR3

Gezeigt sind die Ergebnisse von Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit einer BmOR1-spezifischen antisense RNA-Sonde und einer BmOR3-spezifischen antisense RNA-Sonde. BmOR1-Zellen sind mit grüner Fluoreszenz und BmOR3-Zellen mit roter Fluoreszenz markiert. Gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen konfokaler Bildstapel. Die Fluoreszenzkanäle sind mit dem Durchlichtkanal überlagert.

A Doppel- *in situ* Hybridisierung an einem Querschnitt durch den Seitenast einer *Bombyx mori* Männchenantenne mit einer Biotin-markierten antisense RNA-Sonde für BmOR1 und einer DIG-markierten antisense RNA-Sonde für BmOR3. Maßstab = 20 μ m

B Bei einer höheren Vergrößerung ist deutlich zu erkennen, dass BmOR1- und BmOR3-Zellen unmittelbar nebeneinander lokalisiert sind. Maßstab = 10 μ m

C Betrachtung des Antennenseitenastes von der Seite, welche den Sensillenhaaren gegenüber liegt. In dieser Darstellung sind zwei Reihen von direkt benachbarten BmOR1-Zellen (grün) und BmOR3-Zellen (rot) zu erkennen. Maßstab = 20 μ m

In Abbildung 5 A und B sind ausgewählte optische Ebenen konfokaler Bildstapel gezeigt. Die Fluoreszenzkanäle sind mit dem Durchlichtkanal überlagert. Es zeigte sich, dass die beiden Rezeptortypen in distinkten, nicht überlappenden Zellpopulationen exprimiert werden (Abb. 5A). Darüber hinaus wurde bei höherer Vergrößerung deutlich, dass die BmOR1- und BmOR3-Zellen jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert sind (Abb. 5B). Bei der gleichzeitigen Behandlung von „whole-mount“ Präparaten mit BmOR1- und BmOR3-Sonden konnte gezeigt werden, dass diese beiden Zellpopulationen (rot und grün markiert) in perlschnurartiger Anordnung von jeweils einer BmOR1- und einer direkt assoziierten BmOR3-Zelle vorliegen (Abb. 5C). Mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskopes gelang es Aufnahmen von Ventral auszuführen.

Da bislang Teile der Seitenäste untersucht wurden, die eher dem apikalen Drittel der Antennenseitenäste zuzuordnen sind, wurden gezielt Bereiche in der Nähe des Antennenhauptastes untersucht, um zu prüfen, ob dieses Verteilungsmuster für BmOR1- und BmOR3-Zellen für die gesamte Länge der Seitenäste gilt. Dazu wurden Teile der Seitenäste für die Durchführung der Hybridisierungsexperimente am Hauptast belassen. Zur Orientierung ist in Abbildung 6A eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines vergleichbaren Bereiches der Antenne gezeigt. Abbildung 6 B zeigt das Ergebnis eines „whole mount“ *in situ* Hybridisierungsexperiments mit einer Biotin-markierten BmOR1- und einer DIG-markierten BmOR3-Sonde. Der Nachweis erfolgte über Fluoreszenz-Substrate. Der grüne Kanal (BmOR1) und der rote Kanal (BmOR3) wurden mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Gezeigt ist eine ausgewählte optische Ebene eines konfokalen Bildstapels, der mit Hilfe des Laserscanningmikroskopes aufgenommen wurde. In der REM-Aufnahme ist deutlich zu erkennen, dass auch der Antennenhauptast Sensillenhaare aufweist. Mittels „whole mount“ *in situ* Hybridisierungsexperimenten konnten im Bereich des Hauptastes jedoch keine markierten Zellen visualisiert werden (Abb. 6B).

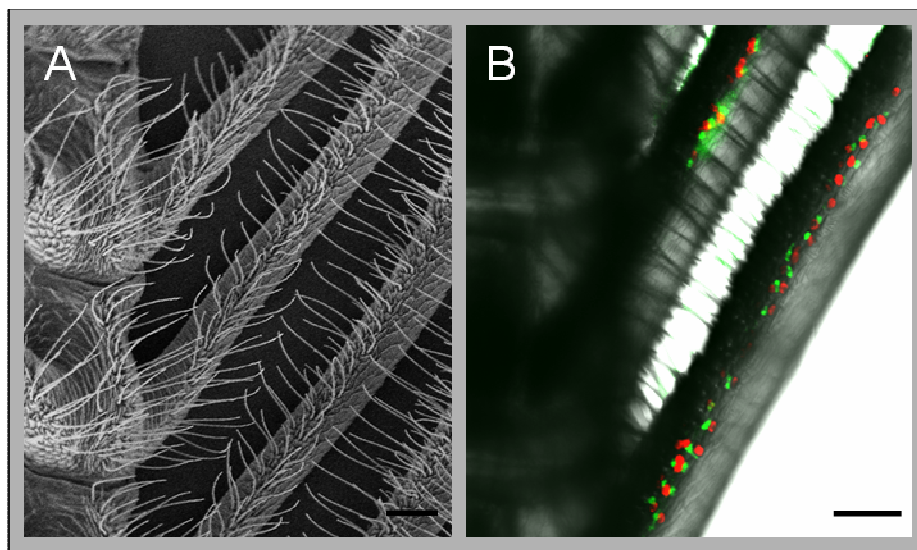


Abb. 6 Expressionsmuster von BmOR1 und BmOR3 im Bereich der Basis des Seitenastes

A Dargestellt ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *Bombyx mori* Antenne. Auch in Bereichen nahe des Antennenstamms und auf dem Antennenstamm kommen lange trichoide Sensillenhaare vor. Maßstab = 50 µm

B Gezeigt ist das Ergebnis eines „whole mount“ *in situ* Hybridisierungsexperiments mit einer Biotinmarkierten BmOR1- und einer DIG-markierten BmOR3-Sonde. Der Nachweis erfolgte über Fluoreszenz-Substrate. Der grüne Kanal (BmOR1) und der rote Kanal (BmOR3) wurden mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Gezeigt ist eine ausgewählte optische Ebene eines konfokalen Bildstapels, der mit Hilfe des Laserscanningmikroskops aufgenommen wurde. Maßstab = 50 µm

3.5 Putative Pheromonrezeptoren der „Tabakeule“ *Heliothis virescens*

3.5.1 Pheromone von *Heliothis virescens*

Neben dem Seidenspinner *Bombyx mori* ist das Schadinsekt *Heliothis virescens* ein weiteres wichtiges Modellsystem, welches zu Untersuchungen der Pheromondetektion in Lepidopterenart herangezogen wird. Im Gegensatz zum domestizierten Seidenspinner *Bombyx mori*, dessen Pheromon aus den beiden Komponenten Bombykol und Bombykal besteht (Butenandt et al., 1959; Kasang et al., 1978), setzen die Weibchen von *Heliothis virescens* ein komplexes Pheromongemisch frei. In den vergangenen Jahren ist es gelungen verschiedene Komponenten zu identifizieren (Klun et al., 1980; Teal et al., 1986) und die spezifischen Effekte der einzelnen Substanzen zu untersuchen (Almaas and Mustaparta, 1991; Vickers and Baker, 1992, 1994; Berg et al., 1998; Baker et al., 2004).

3.5.2 Die Antenne von *Heliothis virescens*

Die Antennen von *Heliothis virescens* unterscheiden sich deutlich von den korbähnlich geformten Antennen des Seidenspinners *Bombyx*; die eher fadenförmige Antenne besteht aus circa 80 Antennensegmenten (Annuli). In Abbildung 7 wird deutlich, dass eine Seite der Antenne mit verschiedenartigen Sensillen besetzt ist; diese Seite zeigt in Flugrichtung und wird als „Leading edge“ bezeichnet. Die gegenüberliegende Seite ist dicht mit chitinösen Schuppen besetzt; zwischen diesen Schuppen kommen nur vereinzelt Sensillen vor.

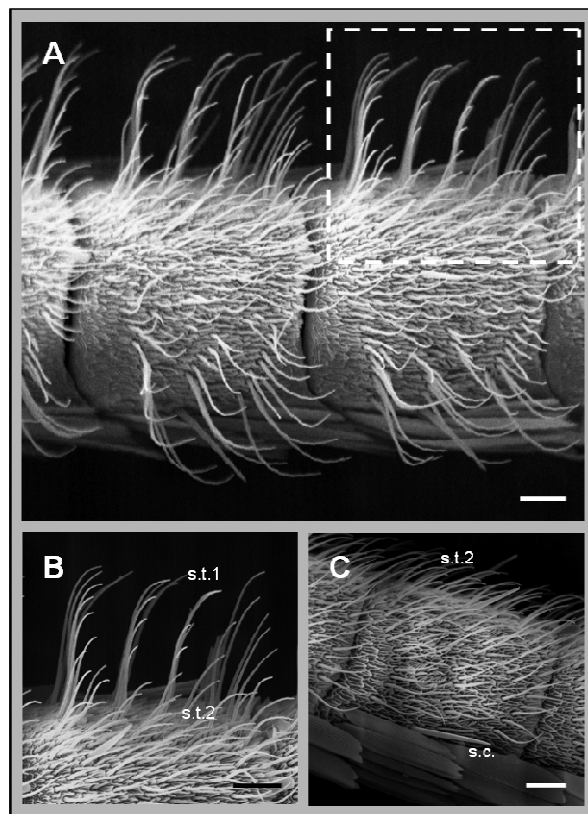


Abb. 7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Männchenantenne von *Heliothis virescens*

A Darstellung zweier Segmente, welche männchenspezifische lange, leicht gebogene Sensilla trichodea Typ 1 (s.t.1) tragen. Diese sind nur auf den ~ 50 proximalen Antennensegmenten (Annuli) zu finden. Maßstab = 25 μ m

B Höhere Vergrößerung des in A mit der gestrichelten Linie markierten Bereiches. Männchenspezifische Sensilla trichodea Typ 1 sind in drei bis vier Reihen auf der „Leading Edge“ des Antennensegmentes positioniert. Diese Seite der Antenne zeigt während des Fluges nach vorn. Kürzere Sensilla trichodea Typ 2 sind zwischen diesen Reihen von langen Sensillenhaaren positioniert. Maßstab = 25 μ m

C Gezeigt ist eines der ~ 30 distalen Antennensegmente einer Männchenantenne, welches kürzere Sensilla trichodea Typ 2 aufweist (s.t.2). An der Grenze der „Leading Edge“ befinden sich Sensilla chaetica (s.c.) Maßstab = 25 μ m

3.5.2.1 Sensilla trichodea

Die Morphologie der Antennen von *Heliothis virescens* weist charakteristische Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern auf. Die langen, leicht gebogenen Sensillenhaare, Sensilla trichodea Typ 1, wie sie in Abbildung 7A und 7B dargestellt sind, kommen nur auf den Antennen der Männchen vor. Sie sind auf den circa 50 proximalen Antennensegmenten lokalisiert; auf den circa 30 distalen Antennensegmenten kommen sie nicht vor (Abbildung 7C). Diese langen Sensillenhaare stehen in drei bis vier Reihen spiegelsymmetrisch auf einer Seite der Antenne. Zwischen diesen Reihen von Sensilla trichodea Typ 1 und auf den distalen

Antennensegmenten sind kürzere Sensillenhaare lokalisiert, die als Sensilla trichodea Typ 2 bezeichnet werden. Frühere elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Typen von Sensilla trichodea pheromonsensitive Neurone aufweisen (Almaas and Mustaparta, 1990; Almaas and Mustaparta, 1991; Baker et al., 2004).

3.5.3 Die Expression putativer Pheromonrezeptoren in *Heliothis virescens*

Beim Vergleich putativer olfaktorischer Rezeptoren von *Bombyx mori* (Krieger et al. 2005) und *Heliothis virescens* (Krieger et al., 2002, 2004) wurde deutlich, dass die generell sehr diversen Rezeptorgene neben den beiden OR83b-Orthologen BmOR2 und HR2, eine kleine Gruppe von Rezeptoren mit ungewöhnlich hohem Grad an Sequenzidentität 33-49% aufweisen. Diese ausgeprägte Ähnlichkeit in den Primärstrukturen wird aus einem Identitätsdendrogramm deutlich (Abb. 8). Eine Konservierung über die Speziesgrenzen hinaus stellt eine Besonderheit dar.

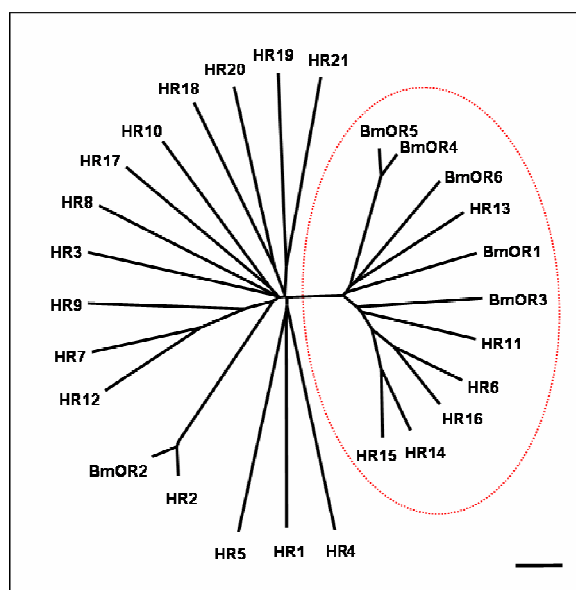


Abb. 8 Vergleich von HR- und BmOR-Rezeptorgenen dargestellt als Identitätsdendrogramm

Im Dendrogramm wird deutlich, dass es sich bei den Genen für putative olfaktorische Rezeptoren der Lepidopterenpezies *Bombyx mori* und *Heliothis virescens* generell um eine sehr heterogene Genfamilie handelt. Innerhalb dieser Familie zeichnet sich, neben den OR83b-Orthologen BmOR2 und HR2, eine Gruppe von Rezeptorgenen mit einer bemerkenswerten Sequenzverwandtschaft ab (rote Markierung). Maßstab = 10% Differenz der Aminosäuresequenz

Die Rezeptoren HR13, HR14-HR16 sind von besonderem Interesse, da sie selektiv oder dominant in den Antennen von Männchen exprimiert werden (Krieger et al., 2004). Mittels *in situ* Hybridisierung sollte nun versucht werden, die Zellen zu visualisieren, die einen distinkten Rezeptortyp exprimieren.

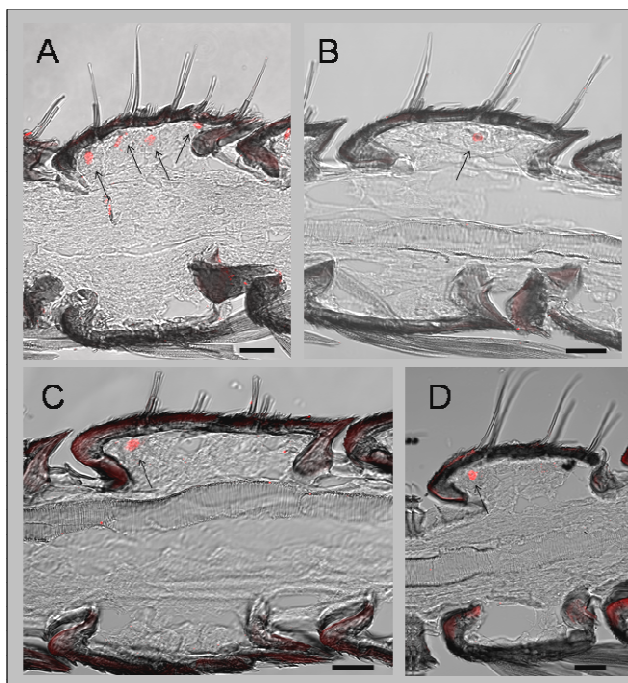


Abb. 9 Expression von Pheromonrezeptorkandidaten in der Männchenantenne von *Heliothis virescens*

An Longitudinalschnitte (sagittale Schnittführung) der Antennen von *Heliothis* Männchen wurden mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden für HR13 (A), HR14 (B), HR15 (C) und HR16 (D) *in situ* Hybridisierungsexperimente durchgeführt und markierte Zellen mit Hilfe von HNPP/Fast Red visualisiert. Gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen aus konfokalen Bildstapeln, welche mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop generiert wurden. Der Fluoreszenzkanal (rot) wurde mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Pfeile kennzeichnen markierte Zellen. Maßstab = 20 μ m

Longitudinalschnitte von Antennen der *Heliothis*-Männchen wurden mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden für HR13 (9A), HR14 (9B), HR15 (9C) und HR16 (9D) *in situ* Hybridisierungsexperimenten analysiert und die markierten Zellen mit Hilfe von HNPP/Fast Red visualisiert. Exemplarische Ergebnisse der entsprechenden Experimente sind in Abbildung 9 dokumentiert; gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen aus konfokalen Bildstapeln, die mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops generiert wurden. Der Fluoreszenzkanal (rot) wurde mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Pfeile kennzeichnen markierte Zellen.

Bei einer Betrachtung verschiedener Präparate und einem Vergleich der markierten Zellen für die verschiedenen Rezeptortypen wurde deutlich, dass HR13 in besonders vielen Zellen nachzuweisen war. Außerdem zeigte sich, dass die Antennen von

Weibchen keine HR13-exprimierenden Zellen aufwiesen (Krieger et al., 2004; Gohl, 2004). HR13-Zellen aber auch HR14-, HR15- und HR16-Zellen waren stets unter den Männchen-spezifischen Sensilla trichodea Typ 1 lokalisiert (Abb. 9).

3.5.3.1 Topographisches Expressionsmuster des Rezeptortyps HR13

Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Reaktionen auf verschiedene Pheromonkomponenten nicht auf die Teile der Antenne beschränkt sind, die Männchen-spezifische Sensilla trichodea aufweisen (Almaas and Mustaparta, 1991).

Für eine Erfassung der Expressionsareale von HR13 wurden die aus circa 80 Segmenten bestehenden Antennen in acht Abschnitte von zehn Segmenten geteilt, das Gewebe präpariert und getrennt gesammelt. Von jedem der acht Antennenfragmente wurde cDNA hergestellt und in RT-PCR Experimenten unter Verwendung eines HR13-spezifischen Primerpaares die Expression von HR13 entlang des Antennenflagellums untersucht. In diesen qualitativen PCR-Studien, deren Ergebnis in Abbildung 10A dargestellt ist, wurden Banden in der erwarteten Größe (745 bp) in allen acht cDNA-Präparationen festgestellt.

Dies deutete darauf hin, dass HR13 entlang der gesamten Antenne exprimiert wird. Anschließend wurden mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung gezielt solche Abschnitte der Antenne untersucht, die eine charakteristische Ausstattung mit verschiedenen Sensillenhaaren aufweisen. Die Auswertung wurde mit Hilfe des HNPP-Fluoreszenz-Detektionssystems und des konfokalen Laserscanningmikroskopes durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Zellen mit HR13-mRNA wurden sowohl in Bereichen mit Sensilla trichodea Typ 1 (Abb. 10B), als auch in Bereichen in denen ausschließlich Sensilla trichodea Typ 2 (Abb. 10C) lokalisiert sind visualisiert. Auch in der Antennenspitze, die ringsherum mit Sensillenhaaren besetzt ist (Abb. 9D), wurden HR13-Zellen nachgewiesen. Auch hier wurde die „whole mount“ *in situ* Hybridisierung angewendet. So konnte die in diesem Bereich besonders empfindliche Struktur der Antenne erhalten werden. Auch unter den dort vorhandenen Sensilla trichodea Typ 2 konnten HR13-Zellen visualisiert werden (Abb. 10D). Insgesamt zeigten die Befunde, dass HR13-exprimierende Zellen in verschiedenen Bereichen der Antenne vorkommen und in zwei trichoiden Sensillentypen lokalisiert sind.

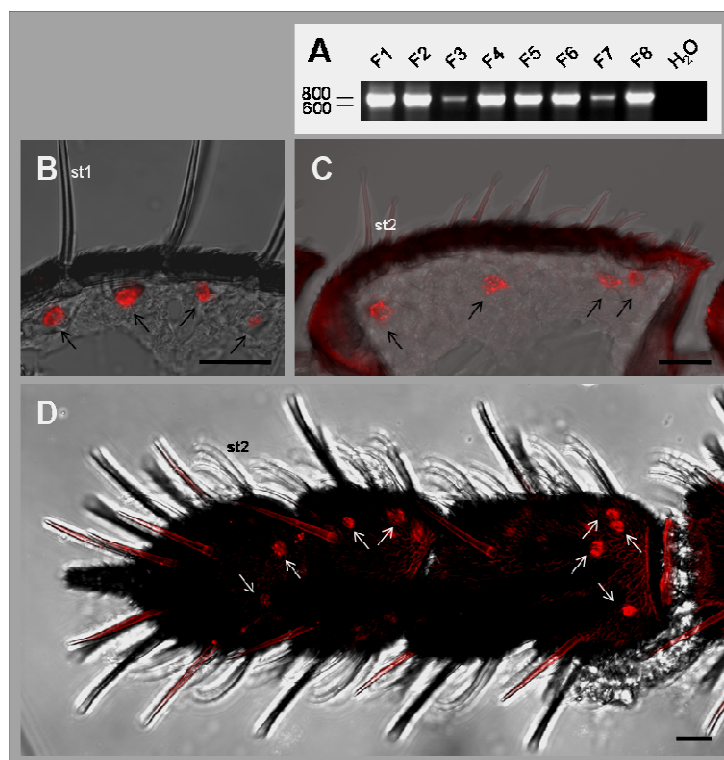


Abb. 10 Expression von HR13 in Bereichen der *Heliobius virescens* Männchenantenne mit charakteristischer Morphologie

A RT-PCR Experiment. Expression von HR13 entlang der Antenne. RT-PCR mit einem spezifischen Primerpaar für HR13 und cDNAs aus den entsprechenden Fragmenten der Männchenantenne. Die Lokalisation von Banden eines 100 bp DNA-Markers ist neben den Banden angegeben; es wird deutlich, dass HR13 (erwartete Bandengröße=745 bp) entlang der gesamten Antenne exprimiert wird.

B Longitudinalschnitt der *Heliobius* Männchenantenne. Es wurde ein *in situ* Hybridisierungsexperiment mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden für HR13 durchgeführt und markierte Zellen mit Hilfe von HNPP/Fast Red visualisiert. In den ~50 proximalen Antennensegmenten sind HR13-exprimierende Zellen unter männchenspezifischen, langen Sensilla trichodea (Typ 1; st1) lokalisiert. Maßstab = 20 μ m

C Longitudinalschnitt der *Heliobius* Männchenantenne (gleiche Behandlung wie in B). In den ~30 distalen Antennensegmenten kommen keine Sensilla trichodea Typ 1 vor. Hier sind HR13 exprimierende Zellen unter kürzeren Sensilla trichodea Typ 2 (st2) lokalisiert. Maßstab = 20 μ m

D Gezeigt ist ein „whole mount“-Präparat einer *Heliobius virescens* Antennenspitze einer Männchenantenne. Hier ist ebenfalls nur kurze Variante trichoider Sensillenhaare (Sensilla trichodea Typ 2; st2) lokalisiert. Für diese *in situ* Hybridisierung wurde ebenfalls eine DIG-markierte antisense RNA-Sonde für HR13 verwendet. Maßstab = 25 μ m. Gezeigt sind ausgewählte optische Ebenen aus konfokalen Bildstapeln (B und C) oder eine Projektion konfokaler Bildebenen (D). Diese Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop generiert. Der Fluoreszenzkanal (rot) wurde mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Pfeile kennzeichnen markierte Zellen.

3.5.4 „Sensory Neuron Membrane Protein“ - SNMP

Die Gene der putativen Pheromonrezeptoren von *Heliothis virescens* bilden eine besonders konservierte Subfamilie; dazu gehören die nahe verwandten Rezeptortypen HR6, HR11, HR13 bis HR16 (Krieger et al., 2004). Um zu prüfen, ob diese Rezeptoren in entsprechenden Zellen der Antenne exprimiert werden, wurde eine mögliche Co-Lokalisation mit dem „Sensory Neuron Membrane Protein 1“ (SNMP1) von *Heliothis virescens* untersucht. Dieses Protein wurde ursprünglich in den Dendriten von Neuronen in pheromonsensitiven Sensillen von *Antheraea polyphemus* identifiziert und gilt seither als ein Markerprotein für pheromonsensitive Neurone (Rogers et al., 1997).

3.5.4.1 Colokalisation von SNMP1 und putativen Pheromonrezeptoren

In früheren Studien hat sich gezeigt, dass alle HR6-Zellen auch mit der SNMP1-Sonde markiert wurden (Krieger et al., 2002). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob auch die anderen Rezeptortypen der konservierten Genfamilie mit SNMP1 coexprimiert werden. Dazu wurden Doppelmarkierungen mit einer Biotin-markierten SNMP1-Sonde und einer DIG-markierten HR13-Sonde durchgeführt. In Abbildung 10A sind die SNMP1-Zellen in grüner Fluoreszenz dargestellt; eine Vielzahl von Zellen wurde mit dieser Sonde markiert. Gezeigt sind drei Antennensegmente (horizontale Schnitfführung) in der Übersicht. Die HR13-Zellen wurden über den roten Fluoreszenzkanal visualisiert. In Abbildung 11A und 11B ist jeweils die Projektion eines konfokalen Bildstapels dargestellt. Es zeigt sich, dass HR13 zwar in vielen Zellen exprimiert wird, die Population der SNMP1-exprimierenden Zellen aber wesentlich größer ist.

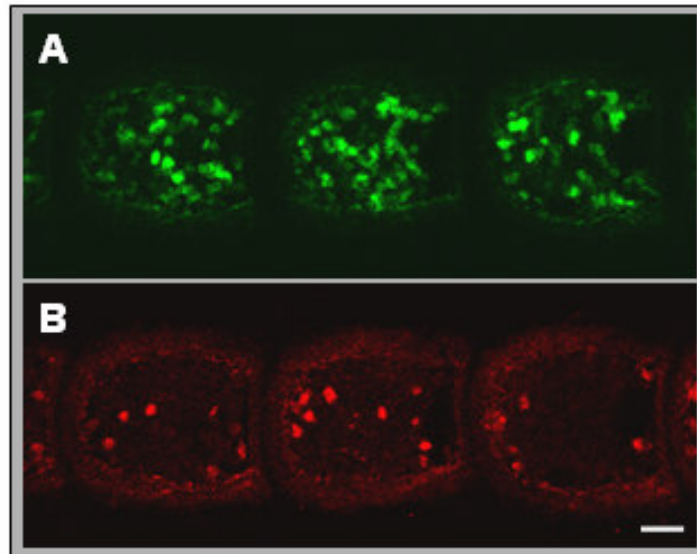


Abb. 11 Lokalisation von SNMP1- und HR13-Zellen

In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR13 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer SNMP1 antisense RNA-Sonde (Biotin) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne (horizontale Schnittführung) untersucht. Die gezeigten Bilder stellen jeweils die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. In A sind SNMP1-Zellen (grüne Fluoreszenz) und in B HR13-Zellen (rote Fluoreszenz) gezeigt. Es sind wesentlich mehr SNMP1-Zellen detektierbar, als HR13-exprimierende Zellen. Maßstab = 25 μ m

In Abbildung 12 ist ein vergleichbares Präparat bei höherer Vergrößerung dokumentiert; SNMP1-exprimierende Zellen (grün) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zur Verdeutlichung der Befunde wurde für den Kanal zur Visualisierung von HR13-markierten Zellen als Falschfarbe (Lila) gewählt (Abb. 12 C). Deutlich sind zwei lila markierte Zellen zu erkennen. Bei der Überlagerung des grünen und des lila Fluoreszenzkanals wurden zwei der SNMP1-exprimierenden Zellen auch von der HR13-Sonde markiert. Dies ist besonders klar an der weißen Färbung der Doppelt markierten Zellen in Abbildung 12 C zu sehen. Eine weitere SNMP1-Zelle, die nicht von der HR13 antisense Sonde markiert wurde (nur grüne Fluoreszenz) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Befunde zeigen, dass für einige der putativen Pheromonrezeptoren HR6 (Krieger et al., 2002) und HR13 eine Coexpression mit SNMP1 vorliegt.

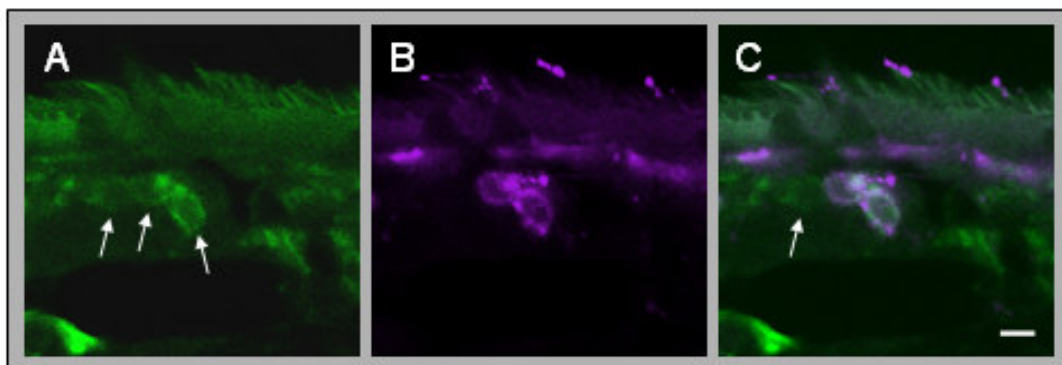


Abb. 12 Co-Lokalisation von HR13 mit SNMP1

Doppel- *in situ* Hybridisierung mit einer Kombination einer HR13 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer SNMP1 antisense RNA-Sonde (Biotin) auf einem Dünnschnitt einer Männchenantenne. Beim gezeigten Bildausschnitt handelt es sich um eine Projektion eines konfokalen Bildstapels

In **A** wurden SNMP1-exprimierende Zellen über den grünen Fluoreszenzkanal detektiert. Markierte Zellen wurden mit Pfeilen gekennzeichnet. **B** zeigt HR13-exprimierende Zellen, welche über den roten Fluoreszenzkanal aufgenommen wurden, hier jedoch aus Darstellungsgründen in lila angezeigt sind. **C** zeigt die Überlagerung des lila und des grünen Kanals. Doppelt gefärbte Zellen erscheinen hier leicht weißlich. Eine nicht Doppelt markierte SNMP1-Zelle ist mit einem Pfeil markiert. Maßstab = 20 µm

3.5.4.2 Nicht-Colokalisation von SNMP1 und putativen Pheromonrezeptoren

Als Nächstes wurde der Rezeptor HR14 hinsichtlich einer Coexpression mit SNMP1 untersucht. In Abbildung 13 ist das Ergebnis eines Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimentes mit einer Biotin-markierten SNMP1-spezifischen antisense RNA-Sonde und einer DIG-markierten HR14-Sonde dokumentiert. In der Projektion optischer Ebenen eines konfokalen Bildstapels zeigte sich, dass der Rezeptortyp HR14 im gewählten Ausschnitt in einer distinkten Zelle exprimiert wird. Ebenso wurde in diesem Ausschnitt eine grün markierte SNMP1-Zelle visualisiert. In der gezeigten Überlagerung von rotem und grünem Fluoreszenzkanal mit dem Durchlichtkanal wird deutlich, dass die rote und grüne Markierung nicht colokalisiert sind, d.h. für SNMP1 und den Rezeptortyp HR14 konnte keine Coexpression nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung des Rezeptortyps HR16 und SNMP1 wurden Antennendünnschnitte mit einer DIG-markierten HR16-Sonde und der Biotin-markierten SNMP1-Sonde behandelt. In Abbildung 14 wird die große Anzahl von SNMP1 Zellen durch die grüne Fluoreszenz-Markierung deutlich. Über ein rotes Fluoreszenzsubstrat wurden die HR16-Zellen visualisiert. Am konfokalen Mikroskop wurden ein Z-Stapel für rote und grüne Fluoreszenz, sowie die entsprechenden

Durchlichtbilder aufgezeichnet. Alle Kanäle wurden übereinander gelegt und die Bilder des Z-Stapels in eine Ebene projiziert. Bei der Analyse der Abbildungen war festzustellen, dass rote und grüne Markierungen in unterschiedlichen Populationen von Zellen nachzuweisen sind; d.h. auch HR16 wird nicht mit SNMP1 coexprimiert. Diese Befunde zeigen, dass für einige konservierte Rezeptortypen von *Heliothis virescens* keine Coexpression mit SNMP1 vorliegt.

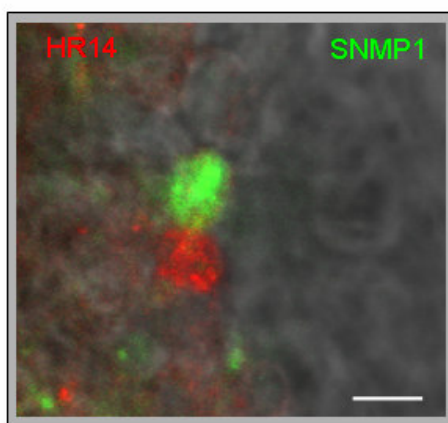


Abb. 13 Nicht-Coexpression von HR14 und SNMP1

In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR14 antisense RNA-Sonde (DIG, rot) und einer SNMP1 antisense RNA-Sonde (Bio, grün) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne untersucht. Das gezeigte Bild stellt die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. Roter und grüner Fluoreszenzkanal sind zusammen mit dem Durchlichtkanal gezeigt. HR14 und SNMP1 werden in voneinander verschiedenen Zellpopulationen exprimiert. Maßstab = 5 μ m

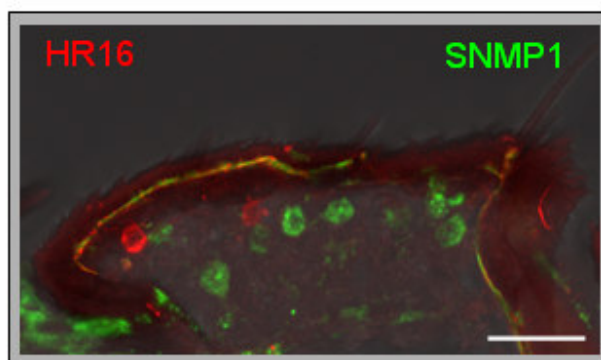


Abb. 14 Nicht-Coexpression von HR16 und SNMP1

In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR16 antisense RNA-Sonde (DIG, rot) und einer SNMP1 antisense RNA-Sonde (Bio, grün) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne untersucht. Das gezeigte Bild stellt die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. Roter und grüner Fluoreszenzkanal sind zusammen mit dem Durchlichtkanal gezeigt. HR16 und SNMP1 werden in voneinander verschiedenen Zellpopulationen exprimiert. Maßstab = 20 μ m

3.5.5 Vergleich der Lokalisation von Rezeptor-exprimierenden und Pheromonbindeprotein-exprimierenden Zellen

Die dendritischen Fortsätze der Sinneszellen projizieren in das mit Sensillenlymphe gefüllte Lumen der Sensillen; sie sind damit geschützt und von einem charakteristischen wässrigen Medium umgeben (Ernst, 1969; Steinbrecht and Gnatzy, 1984). Durch feine Poren der Kutikula gelangen Odorantien und Pheromone ins Innere des Sinneshaares. Da es sich bei den chemosensorisch relevanten Stoffen vornehmlich um hydrophobe Kohlenstoffverbindungen handelt, wie z.B. die Pheromonkomponente Z11-hexadecenal von *Heliothis virescens* (Roelofs et al., 1974; Tumlinson et al., 1975), wird davon ausgegangen, dass der Transfer durch die wässrige Sensillenlymphe zur Sinneszelle speziellen Odorant- und Pheromonbindeproteinen (OBPs bzw. PBPs) eine wichtige Rolle zukommt (Vogt and Riddiford, 1981;). In der Regel sind olfaktorische Neurone eines Sensillenhaares von drei Hüllzelltypen (trichogene, tormogene und thekogene Zelle) ummantelt (Steinbrecht and Gnatzy, 1984; Keil und Steiner; 1990), wobei die trichogenen und tormogenen Zellen Bindeproteine produzieren und in die Sensillenlymphe abgeben (Steinbrecht et al., 1992). Lange Zeit war es nicht möglich, die Topologie von Rezeptor-spezifischen Sinneszellen und deren assoziierten Hilfszellen zu untersuchen. Mit Hilfe von DIG- bzw. Biotin-markierten Sonden für PBPs bzw. Rezeptoren sollte es nun möglich sein, mittels Doppel- *in situ* Hybridisierung die olfaktorischen Neurone bzw. Hilfszellen selektiv zu visualisieren (Abb. 15 und Abb. 16) und dadurch insbesondere die Assoziation von HR13-exprimierenden Zellen und von PBP-exprimierenden Zellen zu prüfen.

3.5.5.1 Lokalisation von HR13- und HvirPBP1-Zellen

Um diese Topologie von HR13-exprimierenden Zellen und HvirPBP1-Zellen zu ermitteln, wurden Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimente mit einer DIG-markierten HR13-spezifischen Sonde und einer Biotin-markierten Sonde für das *Heliothis* PBP1 (HvirPBP1; Krieger et al., 1993) durchgeführt. In Abb. 15 ist das Ergebnis eines entsprechenden Experimentes gezeigt. Mehrere HR13-Zellen pro Antennensegment sind als fluoreszenzmarkierte (rote) Signale visualisiert. Bei der Untersuchung dieser Präparate mit dem Laserscanningmikroskop wurde bei paralleler Aufzeichnung des roten und des grünen Fluoreszenzkanals deutlich, dass

HR13-Zellen und HvirPBP1-Zellen (grün) eng benachbart im Gewebe angeordnet sind. Eine direkte Assoziation ist vor allem in den ausgewählten optischen Ebenen des Z-Stapels zu erkennen. Außerdem wird deutlich, dass die HR13-exprimierende Zelle von den HvirPBP1-exprimierenden Zellen wie von einer Art Käfig umgeben wird. Anhand dieser Aufnahmen wird durch die Anordnung der Hüllzellen ersichtlich, dass eine weitere, nicht von der HR13-Sonde markierte Zelle vorhanden ist, die in unmittelbarer Nähe zur HR13-Zelle lokalisiert und von denselben Hilfszellen umhüllt ist.

Bei der Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle mit dem ebenfalls aufgenommenen Durchlichtbild ist die Anordnung des weiß markierten, vergrößerten Bereichs und einer weiteren Gruppierung von rot bzw. grün markierten Zellen unter Sensilla trichodea Typ 1 ersichtlich.

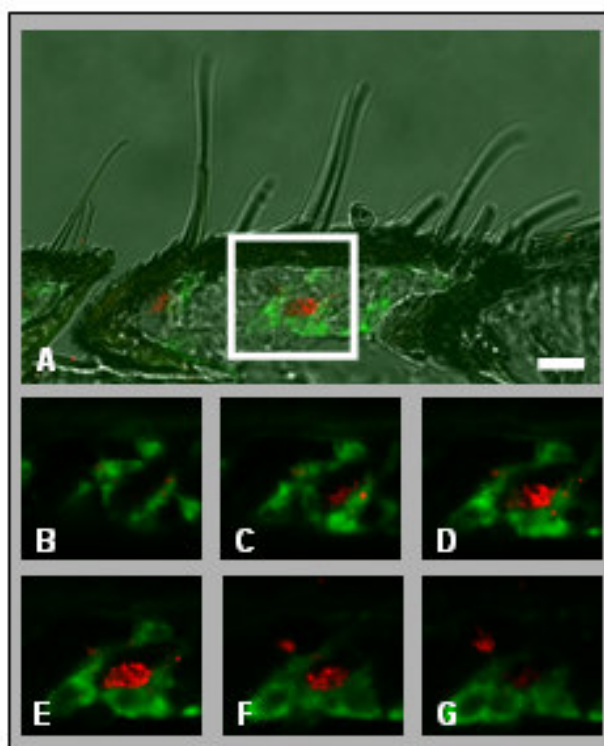


Abb. 15 Lokalisation von HR13- und *Heliothis virescens* PBP1-exprimierenden Zellen

A In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR13 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer HvirPBP1 antisense RNA-Sonde (Biotin) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne untersucht. Das gezeigte Bild stellt die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. Roter und grüner Fluoreszenzkanal wurden mit dem Durchlichtkanal hintergelegt. Die HR13-Zellen (rot) sind von grün markierten HvirPBP1-exprimierenden Zellen umgeben. Der mit einer weißen Linie markierte Bereich ist in B bis G vergrößert dargestellt.

B – G Die einzelnen Bilder stellen optische Ebenen des konfokalen Bildstapels dar, welche der Prozessierung der Projektion aus (A) zugrunde liegen. Es ist zu sehen, dass die Rezeptor-exprimierenden Zellen von HvirPBP1-exprimierenden käfigartig umgeben sind. Maßstab = 10 µm

3.5.5.2 Topographische Lokalisation von HR13- und HvirPBP2-Zellen

Für *Heliothis virescens* wurde kürzlich ein weiterer PBP-Subtyp, HvirPBP2, nachgewiesen (Abraham et al., 2005), auch für dieses Pheromonbindeprotein konnte eine Lokalisation unter Sensilla trichodea Typ 1 aufgezeigt werden (Gohl, 2004). Nun sollte untersucht werden, ob ein topologischer Zusammenhang von HR13-exprimierenden Zellen und HvirPBP2-exprimierenden Zellen besteht. Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimente wurden mit Biotin-markierten, HvirPBP2-spezifischen antisense RNA-Sonden zusammen mit einer DIG-markierten HR13-Sonde, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 16 gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die rot markierten, HR13-exprimierenden Zellen und die durch die HvirPBP2-spezifische Biotin-Sonde (grün) markierten Zellen. In Abbildung 15A, sind der rote und grüne Fluoreszenzkanal zusammen mit dem Durchlichtkanal gezeigt, dabei wurde deutlich, dass HR13- und HvirPBP2-Zellen den langen trichoiden Sensillenhaaren zugeordnet werden konnten. Mit dem Fokus auf einer rot bzw. grün markierten Zellgruppe konnte bei der Analyse verschiedener optischer Ebenen eines konfokalen Bildstapels gezeigt werden, dass HR13-exprimierende Zellen und HvirPBP2-positive Zellen benachbart sind und die HR13-Zelle ebenfalls von den HvirPBP2-exprimierenden Zellen umschlossen wird.

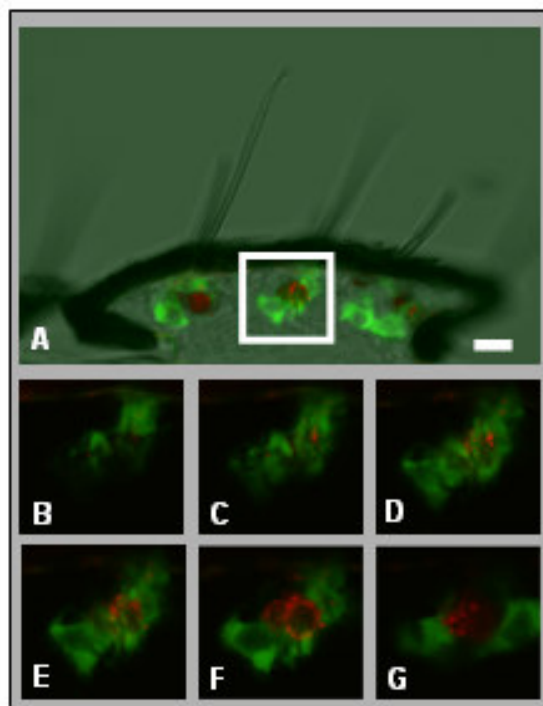


Abb. 16 Lokalisation von HR13- und *Heliothis virescens* PBP2-exprimierenden Zellen

A In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR13 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer HvirPBP2 antisense RNA-Sonde (Biotin) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne untersucht. Das gezeigte Bild stellt die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. Roter und grüner Fluoreszenzkanal wurden mit dem Durchlichtkanal hintergelegt. Die HR13-Zellen (rot) sind von grün markierten HvirPBP2-exprimierenden Zellen umgeben. Der mit einer weißen Linie markierte Bereich ist in B bis G vergrößert dargestellt.

B – G Die einzelnen Bilder stellen optische Ebenen des konfokalen Bildstapels dar, welcher der Projektion aus (A) zugrunde liegt. Es ist zu sehen, dass die Rezeptor-exprimierenden Zellen von HvirPBP2-positiven Zellen käfigartig umgeben sind. Maßstab = 10 μ m

3.5.5.3 Lokalisation von HvirPBP1 und HvirPBP2

Aufgrund der sehr ähnlichen Expressionstopologie von HvirPBP1- und HvirPBP2-positiven Zellen, lag der Verdacht nahe, dass die beiden Bindeproteine unter Umständen von den selben Zellen exprimiert werden. Deshalb wurden mittels Doppel- *in situ* Hybridisierung mit den beiden antisense RNA-Sonden auf antennalem Gewebe ein direkter Vergleich der Expressionstopologie vorgenommen.

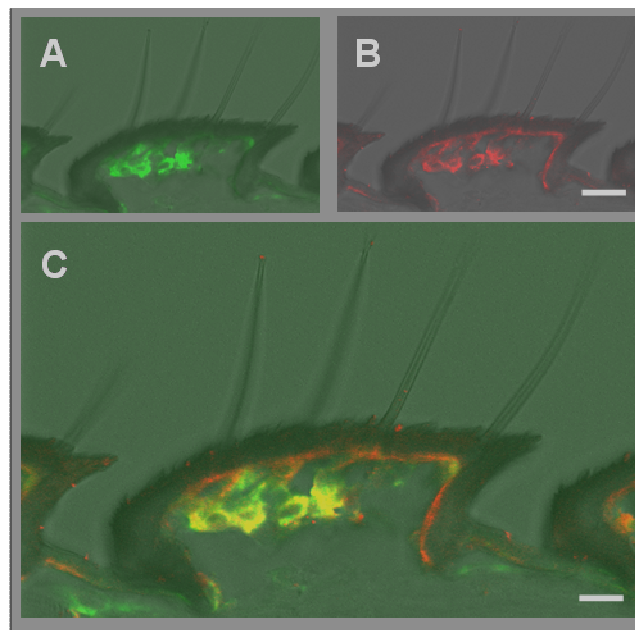


Abb. 17 Co-Lokalisation von HvirPBP1 und HvirPBP2

Ergebnis einer Doppel- *in situ* Hybridisierung mit einer Biotin-markierten HvirPBP1-Sonde und einer DIG-markierten HvirPBP2-Sonde.

A HvirPBP1-exprimierende Zellen wurden mit einer spezifischen Biotin-markierten antisense RNA-Sonde detektiert und mit grüner Fluoreszenz visualisiert.

B HvirPBP2-exprimierende Zellen wurden mit einer DIG-markierten antisense RNA-Sonde detektiert und über den roten Fluoreszenzkanal aufgenommen.

C Überlagerung des grünen und roten Fluoreszenzkanals.

Gezeigt ist eine Projektion konfokaler Bildebenen unterlegt mit dem entsprechenden Durchlichtbild. Eine Co-Expression von HvirPBP1 (grün) und HvirPBP2 (rot) wird anhand der gelb markierten Zellbereiche deutlich. A und B Maßstab = 10 μ m, C Maßstab = 10 μ m

In Abbildung 17 A ist deutlich zu erkennen, dass distinkte Zellen von der HvirPBP1-Sonde (grün) markiert wurden. Abbildung 17 B zeigt in roter Fluoreszenz Zellen in denen HvirPBP2-mRNAs detektiert werden konnten. Wieder waren die rot und grün markierten Zellen unter langen Sensilla trichodea lokalisiert. Beim Überlagern des grünen und des roten Fluoreszenzkanals (Abb. 17 C) war anhand der nun gelb erscheinenden Zellen deutlich zu erkennen, dass mRNAs für beide PBPs in gleichen Zellen vorhanden sind und somit eine Co-Expression von HvirPBP1 und HvirPBP2 vorliegt.

3.5.6 Charakterisierung von SNMP2

Die bislang erzielten Ergebnisse zeigen, dass nur eine Subpopulation der olfaktorischen Neurone mit putativen Pheromonrezeptoren auch SNMP1 exprimiert. Um zu prüfen, ob in den Antennen von *Heliothis virescens* u.U. unterschiedliche SNMP-Typen exprimiert werden, wurde ein Screening der antennalen cDNA-Bank mit Hilfe von DIG-markierten Sonden durchgeführt. Dabei wurde ein weiterer SNMP-Typ von *Heliothis virescens* identifiziert, der ausgeprägte Sequenz-Homologie mit SNMP-Typ 2 von *Manduca sexta* (Robertson et al., 1999) aufweist. In weiterführenden Studien wurde mit *in situ* Hybridisierungsexperimenten untersucht, in welchen antennalen Zellen das SNMP2 exprimiert wird. Zunächst wurde das Expressionsmuster der beiden SNMP-Subtypen verglichen. In Abbildung 18 ist das Ergebnis eines Experimentes dargestellt, in dem eine Biotin-markierte SNMP1-spezifische Sonde zusammen mit einer DIG-markierten SNMP2-Sonde eingesetzt wurde. Im entsprechenden Fluoreszenzkanal waren deutlich grün markierte SNMP1-Zellen zu erkennen (Abb. 18A), welche sich im zugleich angezeigten Durchlichtkanal aufgrund ihrer Position den Sensilla trichodea zuordnen ließen. Im roten Fluoreszenzkanal waren ebenfalls markierte Zellen zu erkennen (Abb. 18B). Diese SNMP2-Zellen unterschieden sich in der Morphologie jedoch deutlich von den SNMP1-Zellen, konnten aber im Durchlichtbild ebenfalls den Sensilla trichodea zugeordnet werden (Abb.18D). Beide Zellpopulationen wiesen also ein ähnliches Verteilungsmuster auf. Beim Überlagern des roten und des grünen Fluoreszenzkanals (Abb. 18C) wurde deutlich, dass die roten SNMP2-Zellen eine käfigartige Struktur um die grünen SNMP1-Zellen bilden.

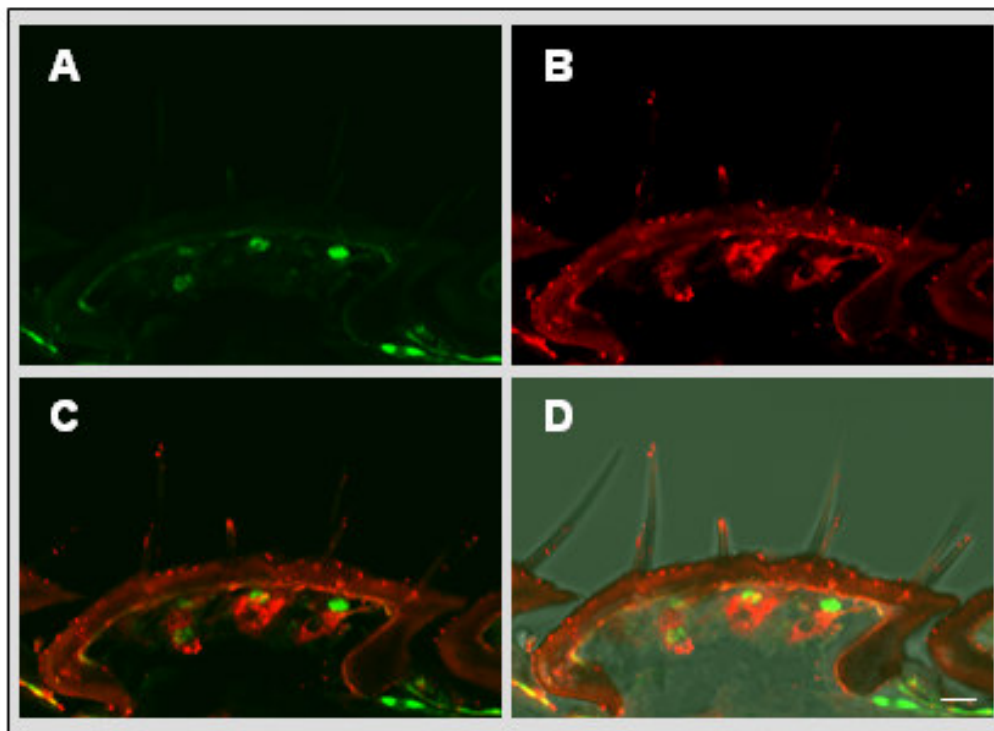


Abb. 18 Expressionsmuster von SNMP1 und SNMP2

Gezeigt sind die Ergebnisse von Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit einer SNMP1-spezifischen antisense RNA-Sonde und einer SNMP2-spezifischen antisense RNA-Sonde. SNMP1-Zellen sind mit grüner Fluoreszenz und SNMP2-Zellen mit roter Fluoreszenz markiert. Gezeigt sind Projektionen optischer Ebenen. Die Fluoreszenzkanäle sind mit dem Durchlichtkanal überlagert.

A SNMP1-exprimierende Zellen wurden mit grüner Fluoreszenz visualisiert.

B Die Population von Zellen, welche SNMP2 exprimieren wurden mit roter Fluoreszenz dargestellt.

C Bei der Überlagerung des roten und des grünen Fluoreszenzkanals ist deutlich zu erkennen, dass die fluoreszierende Markierung in unterschiedlichen Zellpopulationen lokalisiert ist.

D Bei der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle mit dem Durchlichtkanal können die beiden fluoreszenzmarkierten Zellpopulationen Sensilla trichodea zugeordnet werden. Maßstab = 10 μ m

Aufgrund dieses Befundes wurde als Nächstes die Verteilung von SNMP2-Zellen und HR13-Zellen untersucht. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis einer *in situ* Hybridisierung in der ein Antennen-Dünnschnitt mit einer DIG-markierten HR13-Sonde und einer Biotin-markierten SNMP2-Sonde behandelt wurde. In Abbildung 19A bis D sind verschiedene optische Ebenen eines konfokalen Bildstapels gezeigt. Durch Verschieben der Fokusebene (in Z-Richtung) konnte gezeigt werden, dass die HR13-Zellen (rot) mit Zellen assoziiert waren, die aufgrund der grünen Fluoreszenz als SMMP2-Zellen identifiziert wurden.

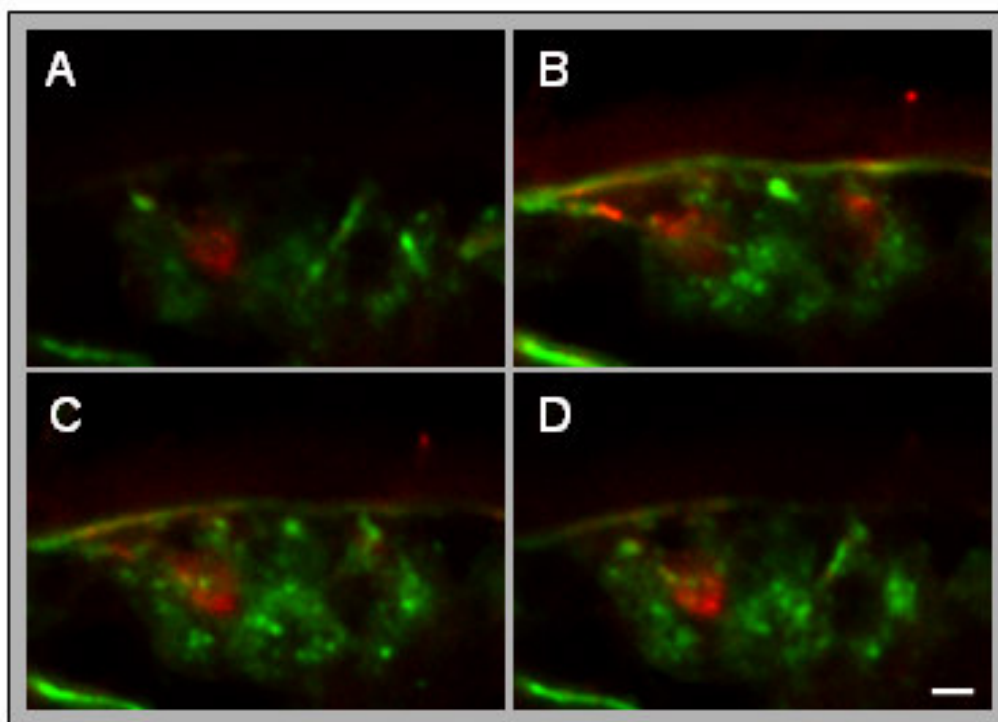


Abb. 19 *In situ* Hybridisierung mit einer HR13- und einer SNMP2-spezifischen Sonde

Doppel- *in situ* Hybridisierung mit einer DIG-markierten HR13-spezifischen und einer Biotin-markierten SNMP2-spezifischen antisense RNA-Sonde. In A bis D sind ausgewählte optische Ebenen eines konfokalen Bildstapels gezeigt. HR13-Zellen (rot) und SNMP2-Zellen (grün) liegen miteinander assoziiert im antennalen Gewebe vor. Maßstab = 5 μ m

Dieses Färbungsmuster (Abb. 19) führte zu der Frage, ob es sich bei den SNMP2-exprimierenden Zellen um Hüllzellen der olfaktorischen Neurone handelt. Daher wurden in Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit einer DIG-markierten SNMP2-spezifischen und einer Biotin-markierten HvirPBP2-Sonde durchgeführt. Ein Vergleich der rot markierten SNMP2-Zellen (Abb. 20) und der grün markierten HvirPBP2-Zellen zeigt, dass Zell-Populationen vergleichbarer Größe markiert wurden. Eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle ergab, dass von beiden Sonden Zellen in exakt den selben Positionen angefärbt wurden. Die gelbe Färbung in großen Bereichen der Zellen (Abb. 20) ist ein starker Hinweis auf eine Coexpression von SNMP2 und HvirPBP2 in den selben Zellen. Da auch HvirPBP1 in denselben Zellen coexprimiert wird (Grosse-Wilde et al., 2007), könnte SNMP2 ein Marker für PBP-exprimierende Zellen von Sensilla trichodea sein.

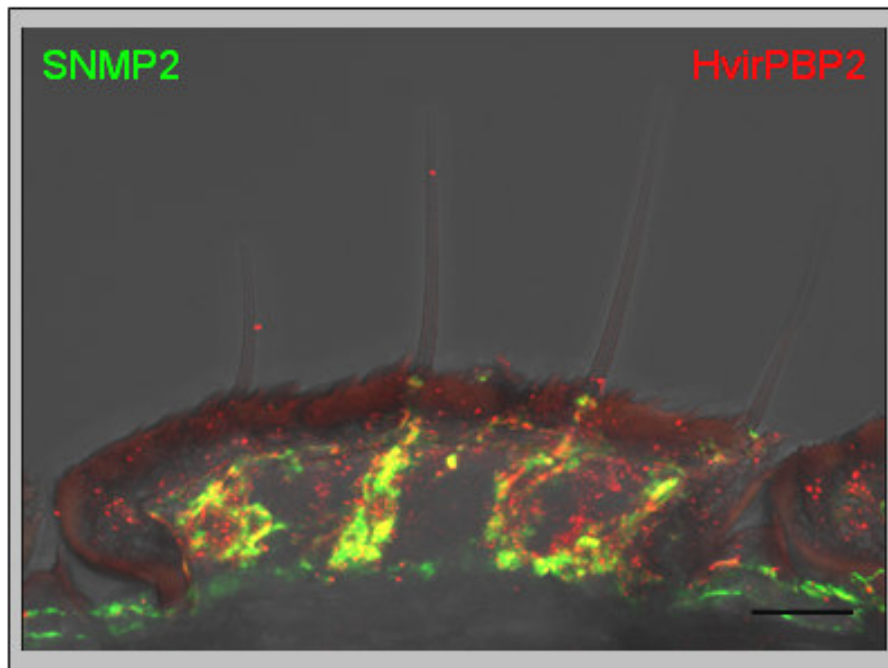


Abb. 20 Co-Lokalisation von SNMP2 und HvirPBP2

Ergebnis einer Doppel- *in situ* Hybridisierung mit einer DIG-markierten HvirPBP2-Sonde und einer Biotin-markierten SNMP2-Sonde. Gezeigt ist eine Projektion konfokaler Bildebenen. Die beiden Fluoreszenzkanäle sind mit einem Durchlichtbild überlagert. Eine Co-Expression von HvirPBP2 (rot) und SNMP2 (grün) wird anhand der gelb markierten Zellbereiche deutlich. Maßstab = 20 μ m

3.6 Visualisierung des HR13-Rezeptorproteins

Alle bisherigen Befunde basieren auf einem Nachweis von spezifischer mRNA in den Antennen. Ein Nachweis des Rezeptorproteins war bisher nicht möglich. Daher wurde versucht, Rezeptor-spezifische Antikörper zu generieren. Für die Immunisierung der Kaninchen wurde ein HR13-spezifisches Peptid synthetisiert und mit „keyhole limpet hemocyanin“(KLH)-konjugiert. Das Peptid mit der 22 Aminosäuren langen Sequenz LESNDNNKDEIKDHSYTEELK repräsentiert den Sequenzabschnitt AS 248 bis AS 270 im prognostizierten zweiten extrazellulären Loop des HR13-Rezeptorproteins (Krieger et al, 2004). Das gewonnene Antiserum wurde mit Hilfe von Peptid-Affinitätschromatographie aufgereinigt und für immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten der Antenne eingesetzt. Dabei sollte zunächst die Topographie der immunreaktiven Zellen mit den mittels *in situ* Hybridisierung visualisierten Zellen verglichen werden. Abbildung 21A zeigt ein Ergebnis dieser immunhistochemischen Untersuchungen; es wird deutlich, dass die Antikörper in jedem Antennensegment mehrere Zellkörper markierten; diese Zellen waren unter Sensilla trichodea lokalisiert.

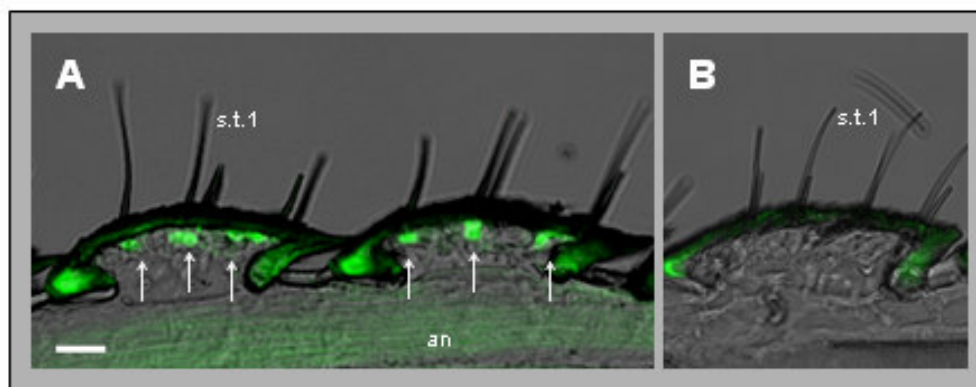


Abb. 21 Immunhistochemische Untersuchung der Antenne von *Heliothis virescens* mit dem anti-HR13-Antiserum

A Dargestellt ist ein Longitudinalschnitt durch die Männchenantenne von *Heliothis virescens* der mit dem anti-HR13-Antiserum behandelt wurde. Markierte Zellen unter langen Sensilla trichodea sind mit Pfeilen markiert. Des Weiteren wurde der antennale Nerv (an) gefärbt. **B** Der hier gezeigte Schnitt durch eine Männchenantenne wurde wie der Schnitt in (A) behandelt, jedoch erfolgte die Behandlung mit dem Antiserum in Gegenwart eines HR13-spezifischen Peptides, welches zur Generierung des Antiserums benutzt wurde. Eine Immunfärbung wurde gänzlich unterbunden.

(A) und (B) stellen Projektionen konfokaler Bildstapel dar, welche mittels konfokalem Laserscanningmikroskop aufgenommen wurden. Immunreaktivität wurde mit Hilfe eines Alexa 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Der Fluoreszenzkanal wurde mit dem Durchlichtkanal unterlegt. Maßstab = 20 µm

Die Spezifität der Markierung mit den anti-HR13-Antikörpern wurde durch Experimente überprüft, in denen das zur Generierung der Antikörper genutzte HR13-spezifische Peptid, zusammen mit den anti-HR13-Antikörpern eingesetzt wurde. In diesen Ansätzen war keine Markierung nachzuweisen (Abbildung 21B).

Im Hinblick auf einen direkten Vergleich der Markierungen mit den HR13-spezifischen Sonden und den HR13-spezifischen Antikörpern wurde eine Doppelmarkierungstechnik etabliert, die es erlaubt einen Gewebeschnitt sowohl mit den anti-HR13-Antikörpern, als auch mit den HR13-spezifischen antisense RNA-Sonden zu markieren. Ergebnisse dieser experimentellen Ansätze sind in Abbildung 22 dokumentiert. In Abbildung 22A sind die immunreaktiven Zellen durch die grüne Fluoreszenzmarkierung visualisiert; in Abbildung 22B sind Zellen mit HR13-Transkripten durch eine rote Fluoreszenzmarkierung sichtbar. Bei einer Überlagerung des roten und des grünen Kanals wird deutlich, dass von den Antikörpern und der antisense RNA-Sonde dieselben Zellen markiert wurden; die Zellen erscheinen gelb (Abb. 22C). Die Fluoreszenzkanäle wurden mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Bei höherer Vergrößerung mit dem Fokus auf einem einzelnen Sensillenhaar wurden diese Befunde bestätigt. In Abbildung 22E sind die immunreaktiven Zellen und in Abbildung 22F die durch Hybridisierung visualisierten Zellen dargestellt. Durch die Kombination von Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung konnte auch die zelluläre Verteilung von RNA und Rezeptorprotein in den sensorischen Neuronen untersucht werden.

Mittels Übereinanderlegen von rotem und grünem Fluoreszenzkanal konnte gezeigt werden, dass das Soma sowohl von der Sonde als auch von den Antikörpern markiert wurde; der dendritische Fortsatz der Zelle wurde jedoch ausschließlich von den anti-HR13-Antikörpern markiert. Diese Befunde untermauern die Spezifität der anti-HR13-Antikörper.

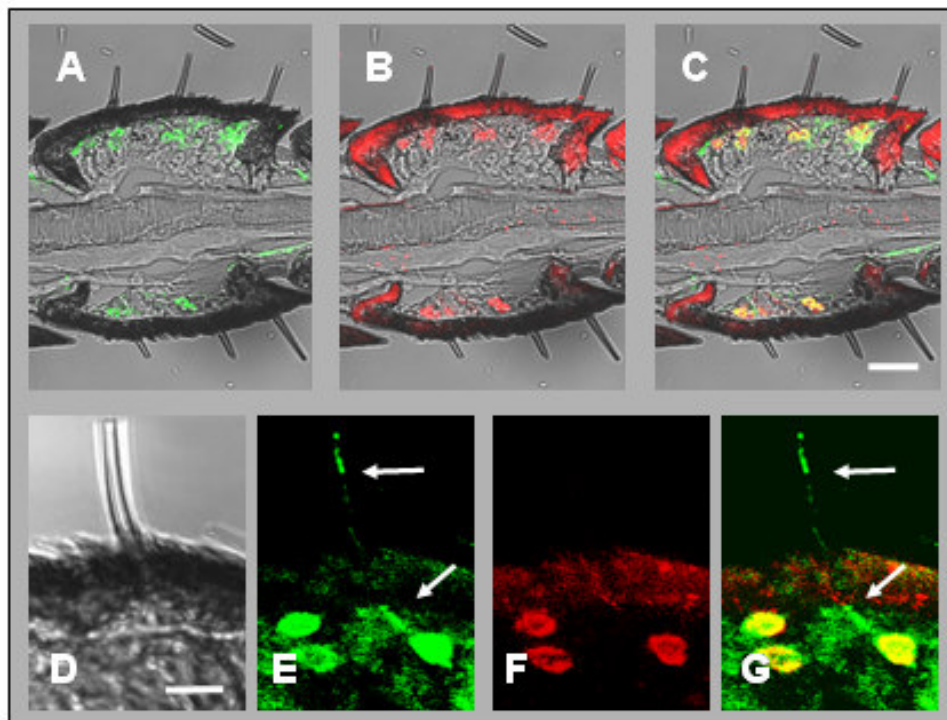


Abb. 22 Expression von HR13 in der Männchenantenne

Gezeigt ist das Ergebnis einer Kombination aus Immunohistochemie mit dem anti-HR13-Antiserum und *in situ* Hybridisierung mit einer DIG-markierten HR13 antisense RNA-Sonde auf einem Dünnschnitt einer Männchenantenne. Immunreaktive Zellen wurden mit einem Alexa 488-markierten Sekundärantikörper und Zellen in welchen mit der HR13 antisense RNA-Sonde entsprechende mRNAs detektiert werden konnten mit HNPP/Fast Red visualisiert. (A) bis (C) Longitudinalschnitte durch ein Segment einer Männchenantenne mit horizontaler Schnittrichtung. **A** Immunreaktive Zellen (grüne Fluoreszenz) sind unter Reihen von Sensilla trichodea Typ 1 lokalisiert.

B Zellen in denen HR13-Transkripte detektiert werden konnten, weisen eine rote Fluoreszenzmarkierung auf.

C Die bei einer Überlagerung der Bilder, welche in (A) und (B) abgebildet sind gelb erscheinenden Zellen deuten darauf hin, dass diese Zellen sowohl vom Antiserum, als auch von der antisense RNA-Sonde markiert werden. Die Fluoreszenzkanäle wurden mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. Maßstab = 20 μm

D – G Höhere Vergrößerung eines Bereiches direkt unter einem Sensillenhaar. Der Gefrierschnitt wurde unter gleichen Bedingungen wie in (A)-(C) behandelt. Gezeigt sind in (D) der Durchlichtkanal, in (E) immunreaktive Zellen und in (F) Zellen, welche HR13-Transkripte aufweisen. In (G) sind beide Fluoreszenzkanäle überlagert. Der Bereich des Somas der Zellen wird sowohl von der antisense RNA-Sonde, als auch vom Antiserum gefärbt (Gelbfärbung). Zusätzlich zum Zellkörper markiert das Antiserum den Dendriten einer Zelle (mit Pfeilen markiert), welcher in ein trichoides Sensillenhaar projiziert. Die Bilder stellen Projektionen von optischen Ebenen eines konfokalen Bildstapels dar, welche mit dem Laserscanningmikroskop aufgenommen wurden. Maßstab = 10 μm

3.6.1 Dendritische Projektion von HR13-Zellen

Da eine große Anzahl von Zellen den Rezeptortyp HR13 exprimieren, war eine genaue Zuordnung von Zellen und Sensillenhaar nur schwer möglich. Daher wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie Bildstapel von Antennendünnschnitten aufgenommen, die mit HR13-Antikörpern markiert waren. In Abbildung 23A ist eine Projektion konfokaler Bildebenen dargestellt. Eine größere Anzahl von markierten Zellkörpern ist sichtbar. Im dem mittels gestrichelter Linie gekennzeichneten Areal sind Zellkörper lokalisiert, die grün gefärbte dendritische Fortsätze aufweisen; es ist aber nicht zu entscheiden, welcher Dendrit in welches der beiden im Durchlichtkanal sichtbaren Sensillenhaare projiziert. In Abbildung 23B und 23C sind zwei optische Ebenen eines konfokalen Bildstapels dargestellt, dabei wird deutlich, dass der Dendrit einer HR13-immunreaktiven Zelle in eines der Sensillenhaare projiziert (Abb. 23B) und der Dendrit einer nahe gelegenen HR13-immunreaktiven Zelle in eines der benachbarten Sensillenhaare (Abb. 23C).

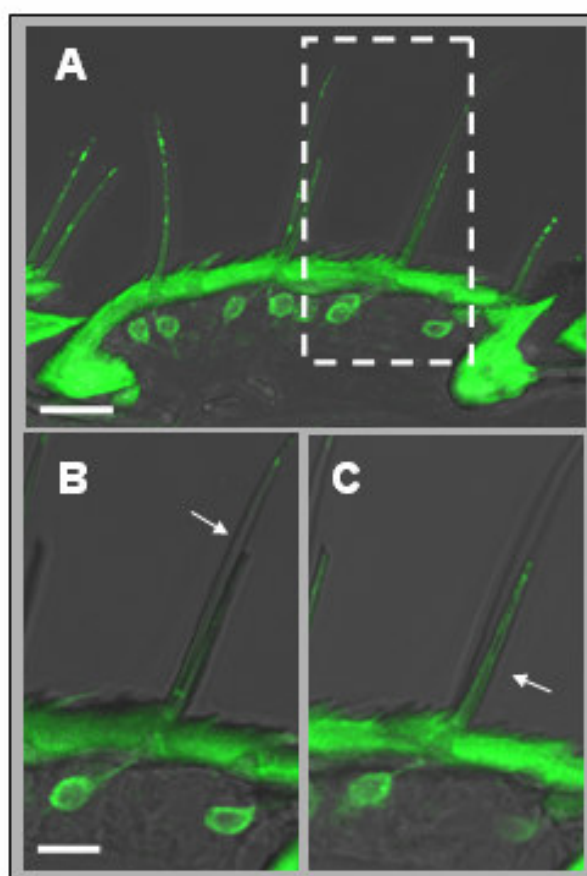


Abb. 23 Projektion HR13-exprimierender Neurone in lange trichoide Sensillenhaare – Sensilla trichodea Typ 1

Zu Abb. 23 Projektion HR13-exprimierender Neurone in lange trichoide Sensillenhaare – Sensilla trichodea Typ 1

Ein Longitudinalschnitt durch eine Männchenantenne wurde mit dem anti-HR13-Antiserum behandelt und Immunreaktivität mit grüner Fluoreszenz nachgewiesen. Um die Orientierung im Gewebe zu erleichtern wurde der Fluoreszenzkanal mit dem Durchlichtkanal hinterlegt. **A** Projektion eines konfokalen Bildstapels, welcher mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop von einem Antennensegment aufgenommen wurde. Einige immunreaktive Neurone wurden angefärbt. Markierte Dendriten sind in den langen Sensillenhaaren zu erkennen. Maßstab = 20 μm
B und **C** Höhere Vergrößerung des Bildausschnittes welcher in (A) durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet ist. Aus diesem Ausschnitt wurden zwei verschiedene optische Ebenen des konfokalen Bildstapels ausgewählt. So wird deutlich, dass die Dendriten dieser Zellen in verschiedene Sensillenhaare projizieren (Pfeile). Maßstab = 10 μm

Noch deutlicher ist dies mit dem Fokus auf die Basis zweier Sensillenhaare zu erkennen, wie in Abbildung 24 gezeigt. Auch hier wurden Longitudinalschnitte durch eine Männchenantenne mit anti-HR13-Antikörpern behandelt und die Immunreaktivität als grüne Fluoreszenz nachgewiesen. In der Projektion sind die Nähe der sensorischen Zellen zueinander und der geringe Abstand zwischen den Sensillenhaaren deutlich zu erkennen. In Abbildung 24 B und 24 C sind zwei optische Ebenen des konfokalen Bildstapels ausgewählt. Es wird erneut deutlich, dass die Dendriten dieser Zellen in verschiedene Sensillenhaare projizieren. Untersuchungen eines mehr distal gelegenen Bereiches, in dem keine Sensilla trichodea Typ1, sondern ausschließlich Typ2 vorkommen, haben gezeigt, dass maximal eine HR13-Zelle zu einem trichoiden Sensillenhaar gehört (Abb. 25). In Abbildung 25A und 25B sind im Schaft von Sensilla trichodea Typ2 markierte Dendritenbereiche zu erkennen. Es zeigt sich also, dass eine distinkte HR13-Zelle einem Sensillenhaar zugeordnet werden kann.

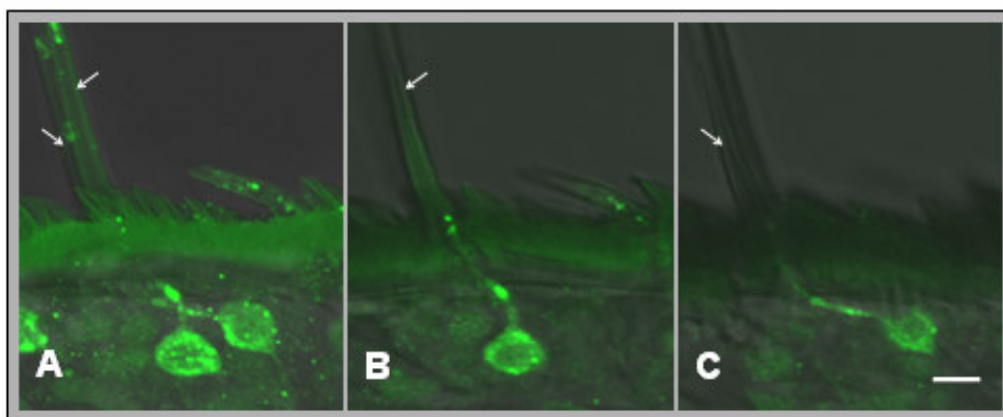


Abb. 24 Projektion HR13-exprimierender Neurone in lange trichoide Sensillenhaare – Sensilla trichodea Typ 1

Zu Abb. 24 Projektion HR13-exprimierender Neurone in lange trichoide Sensillenhaare – Sensilla trichodea Typ 1

Ein Longitudinalschnitt durch eine Männchenantenne wurde mit dem anti-HR13-Antiserum behandelt und Immunreaktivität mit grüner Fluoreszenz nachgewiesen. Um die Orientierung im Gewebe zu erleichtern wurde der Fluoreszenzkanal mit dem Durchlichtkanal hinterlegt.

A Projektion eines konfokalen Bildstapels, welcher mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop von einem Antennensegment aufgenommen wurde.

B und **C** Aus der in (A) gezeigten Projektion sind zwei optische Ebenen des konfokalen Bildstapels ausgewählt. Auch hier wird deutlich, dass die Dendriten dieser Zellen in verschiedene Sensillenhaare projizieren (Pfeile). Maßstab = 5 μm

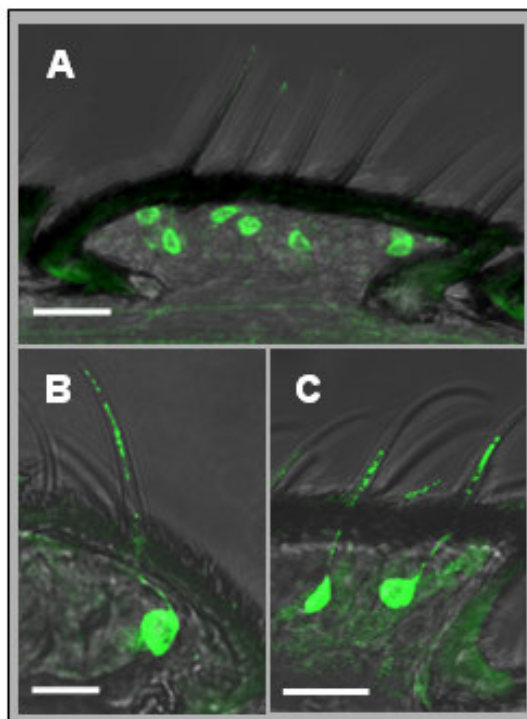


Abb. 25 Projektion HR13-exprimierender Neurone in kurze trichoide Sensillenhaare – Sensilla trichodea Typ 2

Ein Longitudinalschnitt durch eine Männchenantenne wurde mit dem anti-HR13-Antiserum behandelt und Immunreaktivität mit grüner Fluoreszenz nachgewiesen. Um die Orientierung im Gewebe zu erleichtern wurde der Fluoreszenzkanal mit dem Durchlichtkanal hinterlegt.

A Projektion eines konfokalen Bildstapels, der verschiedene markierte Zellen unter den kurzen Sensilla trichodea Typ 2 in einem Segment einer Männchenantenne zeigt. Maßstab = 20 μm

B und **C** Hier sind deutlich immunreaktive Neurone zu erkennen, welche ihre Dendriten in kurze Sensilla trichodea Typ 2 projizieren. In (B) Maßstab = 10 μm , in (C) Maßstab = 20 μm

3.6.2 Axonale Fortsätze von HR13-Neuronen

Die Analyse der immunhistochemischen Präparate ergab, dass die anti-HR13-Antikörper neben Soma und Dendriten auch die proximalen Axonabschnitte markierte. In Abbildung 26A sind grün markierte HR13-Zellen gezeigt, deren markierte Dendriten in Sensilla trichodea Typ 1 projizieren. Der Dendrit weist unterschiedlich stark markierte Bereiche auf. Der in Abbildung 26B gezeigte Ausschnitt aus Abbildung 26A zeigt zwei HR13-Zellen, deren proximale

Axonabschnitte markiert sind. Bereits einige Mikrometer hinter dem Soma scheinen die beiden HR13-Axone zu einem Bündel zusammenzufinden. In der Übersicht (Abb. 26A) ist auch eine Markierung im Bereich des antennalen Nerven zu erkennen. In Abbildung 26C ist die Vergrößerung des gekennzeichneten Bereiches (Abb. 26A) im antennalen Nerven gezeigt.

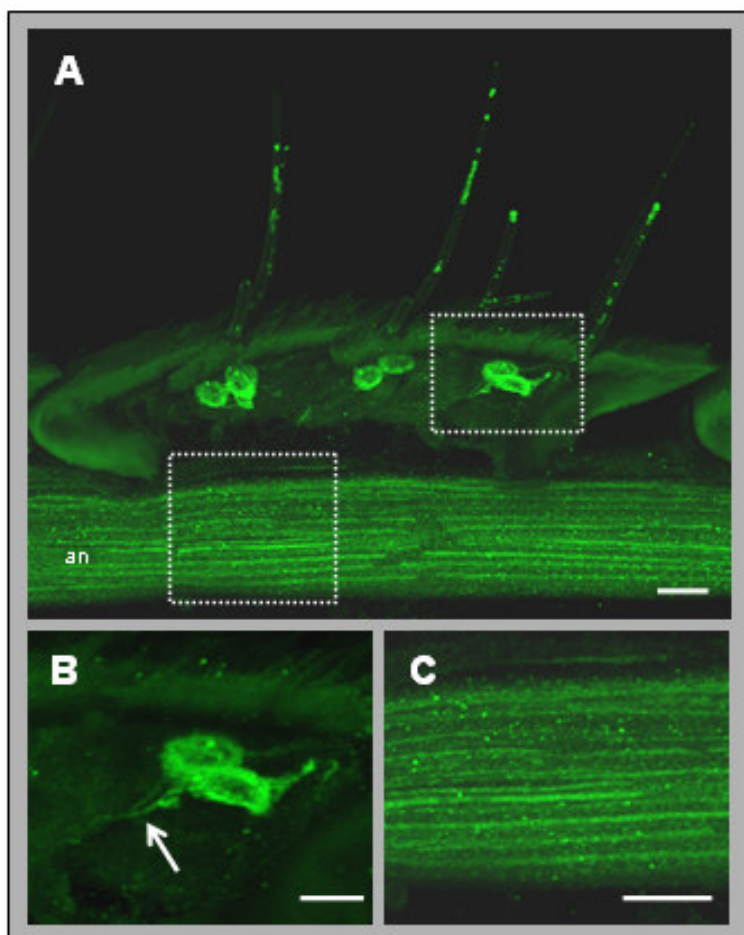


Abb. 26 Markierung der axonalen Fortsätze von HR13-Neuronen

Immunhistochemische Untersuchung an einem Longitudinalschnitt durch eine Männchenantenne mittels anti-HR13-Antiserum.

A Die Dendriten immunreaktiver Zellen projizieren in Sensilla trichodea Typ 1. Außerdem sind deren axonale Fortsätze gefärbt. Im antennalen Nerven (an) sind deutlich grün markierte Fasern zu erkennen. Maßstab = 10 μm

B und C Höhere Vergrößerung der Bildausschnitte welche in (A) durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet sind. Maßstab = 5 μm

B Das HR13-Protein lässt sich mittels anti-HR13-Antiserum auch in den axonalen Fortsätzen immunreaktiver Zellen nachweisen (Pfeil). In **(C)** Vergrößerung des Bereiches des antennalen Nerven. Eine Vielzahl von Bündeln im antennalen Nerven (an) zeigen bei einer Behandlung mit dem anti-HR13-Antiserum Immunreaktivität. Maßstab = 5 μm

Deutlich sind bündelartige markierte Strukturen zu erkennen, wobei sich die Intensität der Markierung bei den verschiedenen Bündeln unterscheidet. Detaillierte Untersuchungen von markierten Axonen in einzelnen Antennensegmenten haben gezeigt (Abb. 27A), dass sich die markierten Axone mehrerer HR13-Zellen zu einem Bündel vereinigen und als Bündel in den antennalen Nerven integriert werden.

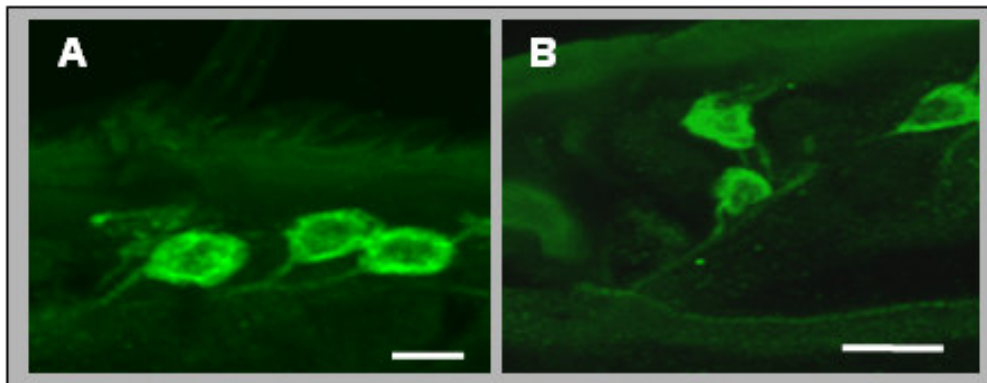


Abb. 27 „Interaktionen“ axonaler Fortsätze von HR13-exprimierenden Neuronen

Immunhistochemische Untersuchung an einem Longitudinalschnitt durch eine Männchenantenne mit dem anti-HR13-Antiserum.

A und B Bilder verschiedener antennaler Schnitte, welche immunreaktive Zellen zeigen, welche gefärbte axonale Fortsätze aufweisen.

A Mit Hilfe des anti-HR13-Antiserums wurden verschiedene Zellkörper und deren axonale Fortsätze gefärbt. HR13-Axone faszikulieren innerhalb des antennalen Segmentes. Maßstab = 5 μ m

B Verschiedene HR13-positive Axone eines Antennensegmentes münden zusammen in ein HR13-immunreaktives Axonbündel des antennalen Nerven (an). Hier abgebildet sind Projektionen konfokaler Bildstapel welche mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen wurden. Maßstab = 10 μ m

Um zu prüfen, ob die markierten Axone Rezeptor-spezifische Axonbündel bilden oder zusammen mit anderen Axonpopulationen z.B. Segment-spezifische Bündel bilden, wurde versucht mit Cy3-markierten anti-horseradish-peroxidase (anti-HRP)-Antikörpern, einem allgemeinen Marker für Insektenneurone (Jan and Jan, 1982), alle Neurone und deren Fortsätze in einem Schnitt zu visualisieren. In Immunfärbungen mit anti-HRP-Antikörpern wurden sowohl Soma, als auch Dendrit und der axonale Fortsatz von antennalen Neuronen markiert (rote Fluoreszenz)(Abb.28).

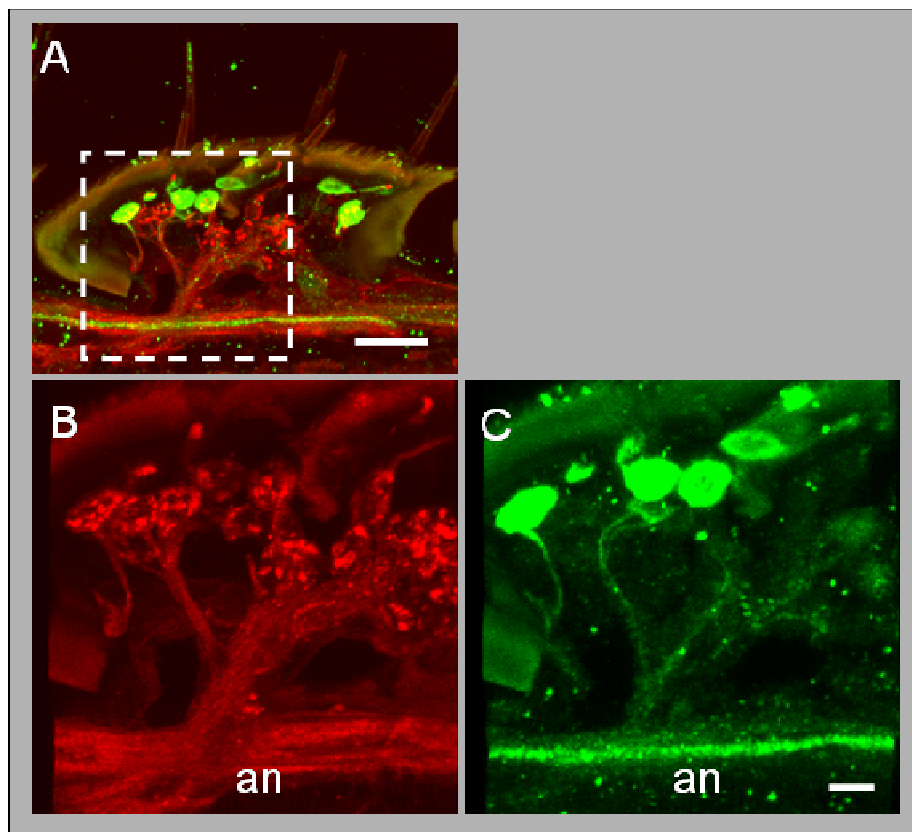


Abb. 28 Faszikulation HR13-exprimierender Zellen in einem Segment der Männchenantenne

Oben: Immunhistochemische Untersuchung eines Longitudinalschnittes der Männchenantenne mit einem Cy3-markierten anti-HRP-Antiserum (rot) und einem anti-HR13-Antiserum. Der Nachweis des anti-HR13-Antiserums erfolgte über einen fluoreszenzmarkierten (Alexa 488) Sekundärantikörper (grün). Gezeigt ist die Projektion eines konfokalen Bildstapels. Der rote und grüne Kanal sind in der Übersicht übereinandergelagert. Maßstab = 20 μm

Unten: Der in der Übersicht mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnete Bereich ist nun in einer höheren Vergrößerung gezeigt.

Links: Mit Hilfe des anti-HRP-Antiserums wurde eine Population von Nervenzellen markiert (rot). Deutlich zu erkennen sind Zellkörper sowie axonale Zellfortsätze. Die markierten Axone faszikulieren innerhalb des Antennensegmentes. Dieses Axonbündel mündet in den antennalen Nerven (an).

Rechts: Durch das anti-HR13-Antiserum wurde eine Population von Zellen markiert. Mittels Sekundärantikörper visualisiert sind deutlich markiert die Zellkörper und die axonalen Fortsätze einer Population von Zellen zu erkennen. HR13-Axone faszikulieren innerhalb des antennalen Segmentes. Das Bündel von HR13-positiven Axonen mündet in den antennalen Nerven (an). Maßstab = 5 μm

Das Ergebnis von Doppelmarkierungsexperimenten ist in Abbildung 27 gezeigt. Es wird deutlich, dass eine Subpopulation der HRP-Zellen HR13-Immunreaktivität aufweist (grüne Fluoreszenz). Im antennalen Nerven findet sich in einem größeren Strang eine Subpopulation von HR13-Fasern.

Somit scheint, dass ein großer Teil der Axone eines Antennensegmentes als ein großes Bündel zusammengefasst, in den antennalen Nerv eintritt. Innerhalb dieses großen Bündels verschiedenster Axone verlaufen Bündel von Axonen benachbarter

HR13-Zellen. Diese Axonbündel verlaufen dann im antennalen Nerven assoziiert mit größeren HR13-Axonbündeln.

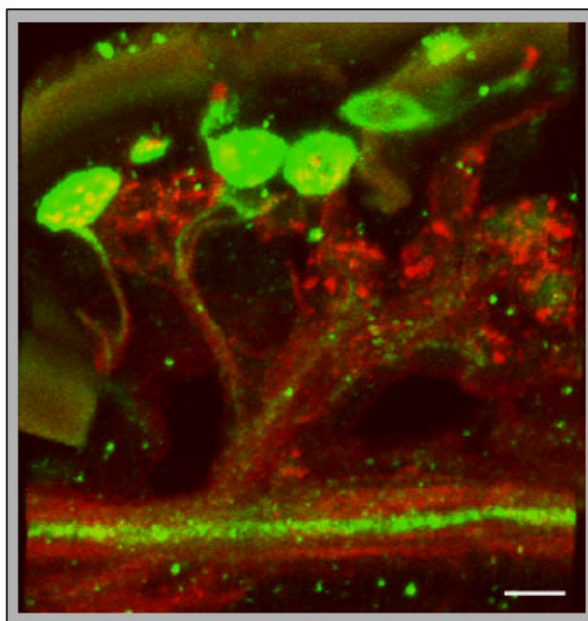


Abb. 29 Faszikulation HR13-exprimierender Zellen in einem Segment der Männchenantenne (Ausschnitt)

Immunhistochemische Untersuchung eines Longitudinalschnittes der Männchenantenne mit einem Cy3-markierten anti-HRP-Antiserums (rot) und einem anti-HR13-Antiserum. Der Nachweis des anti-HR13-Antiserums erfolgte über einen fluoreszenzmarkierten (Alexa 488) Sekundärantikörper (grün). Gezeigt ist die Projektion eines konfokalen Bildstapels. Der rote und grüne Kanal sind in der Übersicht übereinandergelegt. Gezeigt ist eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle die in Abb. 27 getrennt dargestellt sind. Maßstab = 20 μm

3.7 Projektion von HR13-Zellen zum antennalen Lobus

Sinneszellen im olfaktorischen Epithel von Wirbeltieren exprimieren jeweils nur einen olfaktorischen Rezeptor aus einem großen Repertoire von olfaktorischen Rezeptoren (ORs) (Malnic et al., 1999). Die Axone der Sinneszellen verlaufen im Riechnerv vom Sinnesepithel bis zu ihrem Ziel im olfaktorischen Bulbus. Die Sinneszellen, welche einen distinkten OR exprimieren projizieren nach der Neuordnung der Faserbündel in einen spezifischen Glomerulus (Astic et al., 1987; Mori, 1993). Da vor kurzem mit Hilfe von OR-spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte, dass olfaktorische Rezeptorproteine entlang des gesamten Neurons, d.h. vom Dendriten der Sinneszelle bis in die axonalen Endigungen im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen

werden können (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004) ist eine Funktion des Rezeptorproteins über die Detektion von Duftstoffen hinaus denkbar. Vor allem das Vorhandensein des Proteins in den Endigungen der Axone könnte für eine Funktion in der Wegfindung der auswachsenden Nervenzellen sprechen.

Die Beobachtung, dass das Rezeptorprotein auch im Axon nachzuweisen war, warf die Frage auf, ob die markierten Axone auf ihrem Weg hin zu ihrem Projektionsort verfolgt werden können. Da alle bislang erzielten Befunde dafür sprachen, dass HR13 eine Rolle bei der Pheromonerkennung zukommt, wäre die Färbung eines distinkten Glomerulus des makroglomerulären Komplexes (engl. Macroglomerular Complex = MGC) (Berg et al., 1998) zu erwarten.

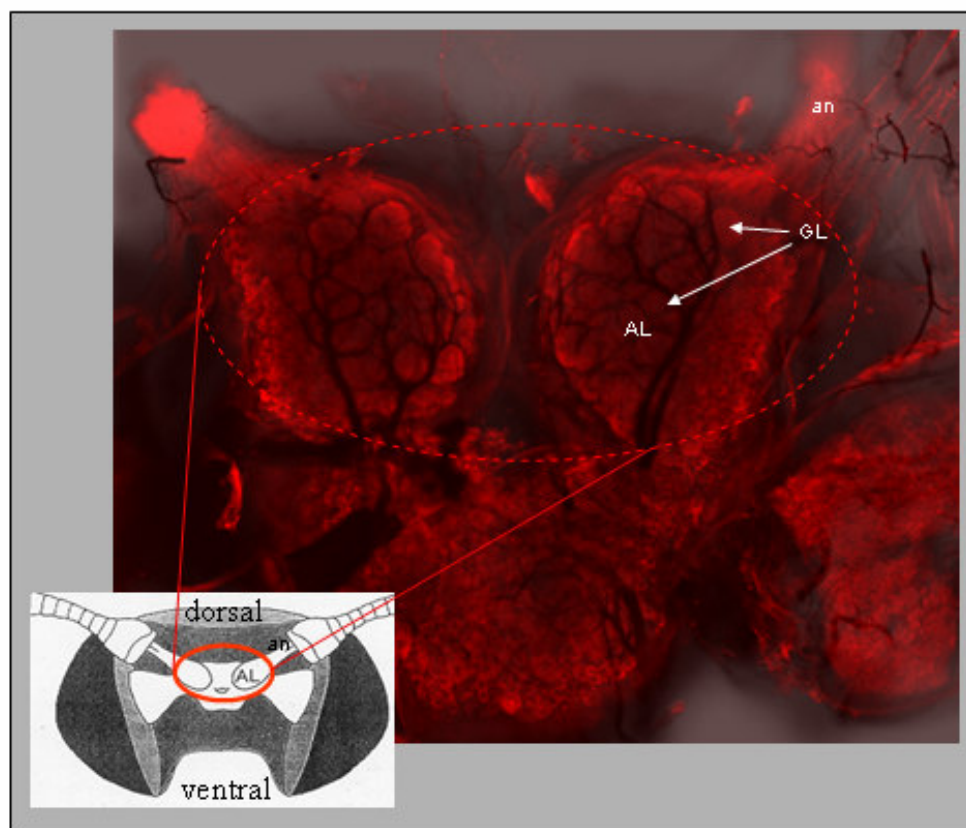


Abb. 30 Markierung von Neuronen im antennalen Lobus und benachbarten Geweben im Gehirn von *Heliothis virescens*

Mit Hilfe des Cy3-markierten anti-HRP-Antiserums wurden Neurone des Gehirnpräparates eines *Heliothis virescens* Männchens visualisiert. Abgebildet ist die Projektion eines konfokalen Bildstapels, wobei der Fluoreszenzkanal mit dem Durchlichtkanal unterlegt wurde. Deutlich zu erkennen sind der intensiv gefärbte antennale Nerv (an) und verschiedene glomeruläre Strukturen (GL) in den antennalen Loben (AL). Zur Veranschaulichung und zur Orientierung im Gewebe wurden in einer Skizze (Hildebrand et al., 1997) wichtige Gewebe markiert.

Der Makroglomeruläre Komplex ist als Äquivalent zum akzessorischen olfaktorischen Bulbus der Vertebraten, dem Projektionsort von VNO-Neuronen (Brennan and Keverne, 2004) zu sehen. Diese speziellen Glomeruli sind direkt an der Basis des antennalen Nerven lokalisiert und schließen unmittelbar an die so genannte „sorting zone“ an (Rössler et al., 1999). Bei der „sorting zone“ handelt es sich um einen rund 140 µm langen Bereich, in dem die Axonbündel des antennalen Nerven aufgelöst werden und die Axone zu ihrem jeweiligen Zielglomerulus konvergieren. In den immunhistochemischen Untersuchungen von Dünnschnitten des antennalen Nerven hat sich gezeigt, dass sowohl in proximalen, als auch in distalen Bereichen HR13-markierte Axonbündel des antennalen Nerven visualisiert werden konnten. Für Untersuchungen der Basis des antennalen Nerven und des antennalen Lobus erschienen immunhistochemische Untersuchungen an „whole mount“-Präparaten erfolgversprechender. Die zu untersuchenden Gehirne wurden so aus der Kopfkapsel herauspräpariert, dass möglichst lange Abschnitte des antennalen Nerven erhalten blieben; auf diese Weise war eine bessere Zuordnung der Strukturen möglich.

3.7.1 Untersuchung zur Lokalisation von HR13-Protein im antennalen Lobus

Für pheromonsensitive Neurone konnte bereits über elektrophysiologische Untersuchungen, welche mit Cobaltlysin-Backfills kombiniert wurden, gezeigt werden, dass diese in einen distinkten Bereich des antennalen Lobus, den Makroglomerulären Komplex (engl. Macroglomerular Complex = MGC) projizieren.

Um einen Überblick über die Morphologie des antennalen Lobus, und speziell die Lokalisation von glomerulären Strukturen zu erhalten, wurden zunächst Färbungen mit anti-HRP-Antikörpern durchgeführt. In Abbildung 30 ist ein entsprechend behandeltes Präparat dargestellt. Deutlich sind die antennalen Loben, die Eintrittstellen der antennalen Nerven in die antennalen Loben und auch die glomerulären Strukturen zu erkennen. Zur Verdeutlichung ist ebenfalls eine Schemazeichnung abgebildet.

Durch Färbungen mit anti-HRP-Antikörpern wurde zunächst generell der Verlauf der Axone in verschiedenen Bereichen des antennalen Nerven visualisiert. Abbildung 31 A zeigt einen Abschnitt des antennalen Nerven (An), von dem mittels konfokaler Mikroskopie eine optische Ebene aufgenommen wurde; rot markierte, fast parallel

verlaufende Bündel von Axonen wurden sichtbar. Der Beginn der „sorting zone“ ist mit (Sc) gekennzeichnet. Eine weiter distal gelegene Region ist in Abbildung 31B gezeigt; es wird deutlich, dass nach Passieren der „sorting zone“ die Axonbündel des antennalen Nerven (An) die relativ strenge Anordnung verlassen und in verschiedene Richtungen projizieren. Anschließend wurde in Doppelmarkierungsexperimenten die Lokalisation von HR13-Protein im antennalen Lobus untersucht. Ein mit anti-HRP Antikörpern und anti-HR13-Antikörpern behandeltes Präparat ist in Abbildung 31 dargestellt. In dieser Doppelfärbung ist eine Vielzahl von Neuronen zu erkennen, die vom antennalen Nerv in den Bereich der „sorting zone“ einlaufen. In diesem Bereich defazikulieren die Axonbündel; es sind viele, wesentlich kleinere Bündel zu erkennen. Auch werden die Glomeruli (hier ist der Rand des Kumulus zu erkennen, zusätzlich mit einer punktierten Linie markiert) deutlich gefärbt. Betrachtet man nun im grünen Fluoreszenzkanal die Färbung mit den anti-HR13-Antikörpern, so sind im antennalen Nerven vor der „sorting zone“ deutlich grün markierte Bündel von Axonen zu erkennen. Im weiteren Verlauf in Richtung der „sorting zone“ wird die Grünfärbung immer schwächer. In der „sorting zone“ können keine grün markierten Axonbündel mehr visualisiert werden. Im antennalen Lobus war mit den anti-HR13-Antikörpern keine Markierung zu visualisieren.

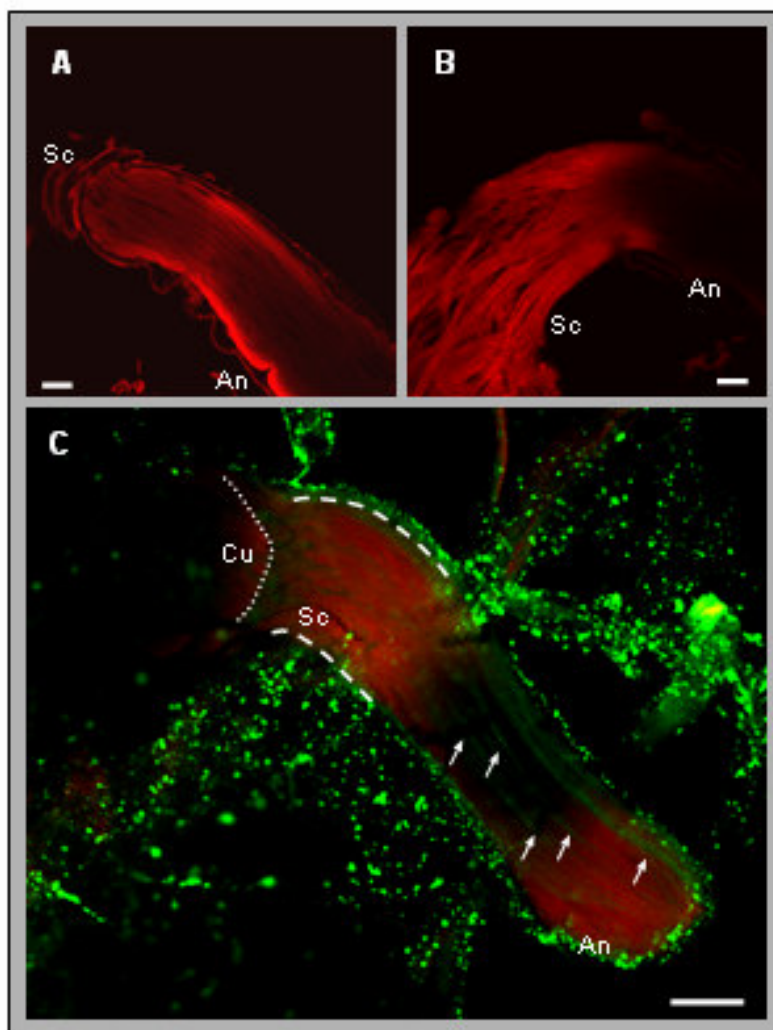


Abb. 32 Untersuchungen von „whole mount“ Präparaten mit anti-HRP- und anti-HR13-Antikörpern

A Immunhistochemische Untersuchung eines Gehirn „whole mount“ Präparates mit einem Cy3-markierten anti-HRP-Antiserum (rot).

Gezeigt ist eine optische Ebene eines konfokalen Bildstapels mit dem Fokus auf einem Bereich des antennalen Nerven (An) nahe der Antennenbasis. Maßstab = 20 μ m

B Immunhistochemische Untersuchung eines Gehirn „whole mount“ Präparates mit einem Cy3-markierten anti-HRP-Antiserums (rot). Gezeigt ist eine optische Ebene eines konfokalen Bildstapels mit dem Fokus auf einen Bereich der „sorting zone“ (Sc). Maßstab = 20 μ m

Der in der Übersicht mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnete Bereich ist nun in einer höheren Vergrößerung gezeigt. Maßstab = 20 μ m

C Deutlich sind HR13-immunreaktive Neurone (grün) als Subpopulation von anti-HRP-immunoreaktiven Neuronen zu erkennen. Auch werden die Glomeruli (hier ist der Rand des Kumulus zu erkennen, zusätzlich mit einer punktierten Linie markiert) deutlich gefärbt. Die Intensität der Markierung von HR13-immunreaktiven Axonbündeln (grün) nahe der „sorting zone“, wird immer schwächer. In der „sorting zone“ sind keine grün markierten Axonbündel mehr visualisierbar. Im antennalen Lobus konnte mit Hilfe der anti-HR13-Antikörper kein markierter Glomerulus gezeigt werden.

Maßstab = 50 μ m

3.8 Beginn und Verlauf der HR13-Expression während der Entwicklung

Im Hinblick auf ein Verständnis der Frage, wann die Pheromonsensitivität der Antennen ausgeprägt wird, war eine Erfassung des Beginns und des Verlaufs der Rezeptorexpression von besonderem Interesse. Daher wurden die Antennen von Tieren verschiedener Entwicklungsstadien präpariert; dabei wurden Stadien von E-5 (fünf Tage vor dem Schlüpfen) bis E0 (Tag des Schlüpfens) erfasst. Aus den Geweben wurde die entsprechende cDNA generiert und in RT-PCR Experimenten mit einem für HR13-spezifischen Primerpaar eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dokumentiert. Für die Entwicklungsstadien E-5 bis E-3 waren keine Banden detektierbar. Ab dem Entwicklungsstadium E-2 waren Banden in der zu erwartenden Größe nachweisbar. Ein Vergleich der Banden zeigte eine Zunahme der Bandenstärke bis zum Schlüpfen. An Schnitten von Antennen verschiedener Entwicklungsstadien wurde versucht, das Rezeptorprotein nachzuweisen. Es ist gelungen ab dem Entwicklungsstadium E-3 Antennen für Gefrierschnitte zu präparieren. Es hat sich gezeigt, dass in den Stadien E-3 und E-2 kein HR13-Protein nachzuweisen war. In Gewebeschnitten des Stadiums E-1 konnten mit den anti-HR13-Antikörpern distinkte Zellen visualisiert werden. In diesem Stadium waren die dendritischen Fortsätze markiert; die axonalen Fortsätze waren nicht markiert. Ab dem Stadium E0 und nach dem Schlupf der Tiere waren nicht nur die Dendriten, sondern auch die Axone gefärbt worden.

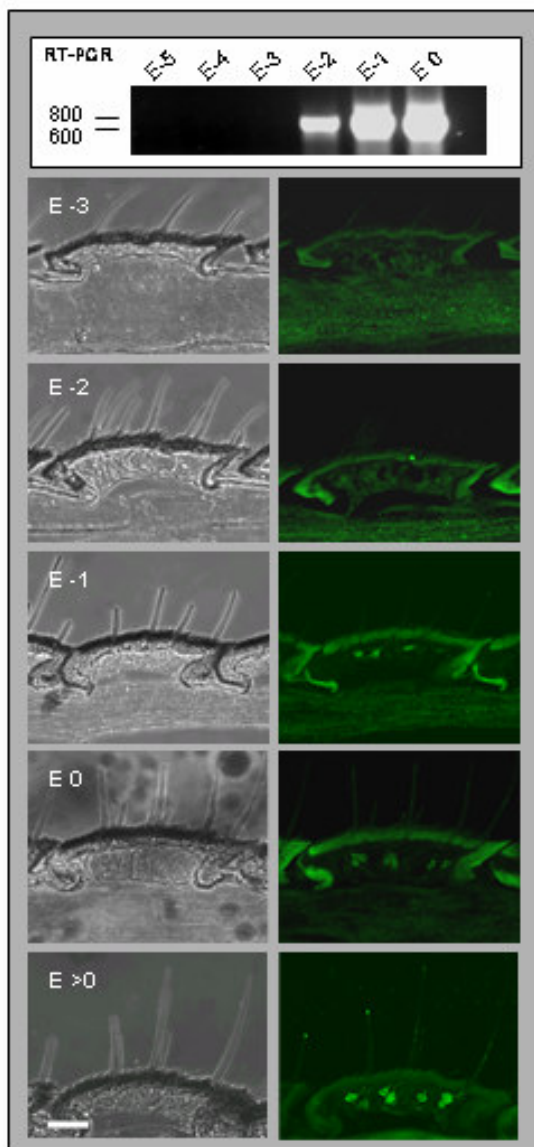


Abb. 32 Aufkommen der HR13-Expression in der Männchenantenne

RT-PCR: Expression von HR13 in den Antennen verschiedener Entwicklungsstadien. RT-PCR mit einem spezifischen Primerpaar für HR13 und cDNAs aus den Antennen entsprechender Entwicklungsstadien. Die Lokalisation von Banden eines 100 bp DNA-Markers ist neben den Banden angegeben. HR13 kann ab dem Stadium E-2 in der RT-PCR nachgewiesen werden.

Longitudinalschnitte durch die Antenne von Männchen verschiedener Entwicklungsstadien (**E-3 bis E>0**) wurden mit dem anti-HR13-Antiserum untersucht. Auf Gewebeschnitten von Tieren der Entwicklungsstadien E-3 (3 Tage vor dem Schlüpfen) und E-2 (2 Tage vor dem Schlüpfen) sind keine immunreaktiven Zellen detektierbar. Eine Markierung des Zellsomas und des Dendriten konnte erst im Entwicklungsstadium E-1 (1 Tag vor dem Schlüpfen) festgestellt werden. Vom Entwicklungsstadium E0 (Schlüpfen der Adulti) an ist das Muster der Immunreaktivität von dem in älteren Tieren (E>0) nicht zu unterscheiden. Die gezeigten Bilder stellen Projektionen konfokaler Bildstapel dar. Links wird das jeweilige Durchlichtbild zum rechts abgebildeten Bild des grünen Fluoreszenzkanals gezeigt. Maßstab = 25 µm

3.9 Topographisches Expressionsmuster putativer Pheromonrezeptoren von *Heliothis virescens*

Elektrophysiologische Untersuchungen haben ergeben, dass es drei verschiedene Typen von Sensilla trichodea auf der Männchenantenne gibt (Almaas and Mustaparta, 1991; Berg et al., 1998; Baker et al., 2004). Am häufigsten kommt der Sensillentyp A vor, welcher Neurone beherbergt, die auf die Hauptkomponente des *Heliothis virescens* Pheromons Z-11-hexadecenal (Z11-16:Al) reagieren. Über die Reaktivität einer zweiten Sinneszelle, welche in Sensilla trichodea Typ A vorkommt

ist nichts bekannt. In Typ B Sensillenhaaren kommen Neurone vor, welche auf eine Nebenkomponente des Pheromons, Z-9-tetradecenal (Z9-14:Al) reagieren. Im dritten Typ, den Sensilla trichodea Typ C, lassen sich zwei Neurone unterscheiden, von denen eines auf Z-11-hexadecenylacetat (Z11-16:Ac) und ein zweites auf Z-9-tetradecenal und Z-11-hexadecenol (Z11-16:OH) reagiert, wobei es sich um Pheromonkomponenten einer anderen Nachtfalterart handelt (Vickers, 2006). Mit *in situ* Hybridisierungsexperimenten sollte unter Verwendung von Kombinationen verschiedener Rezeptor-spezifischer antisense RNA-Sonden das Verteilungsmuster verschiedener Pheromonrezeptorkandidaten untersucht werden. Für die Rezeptortypen HR13 und HR14 wurden Hybridisierungsexperimente mit unterschiedlich markierten RNA-Sonden durchgeführt.

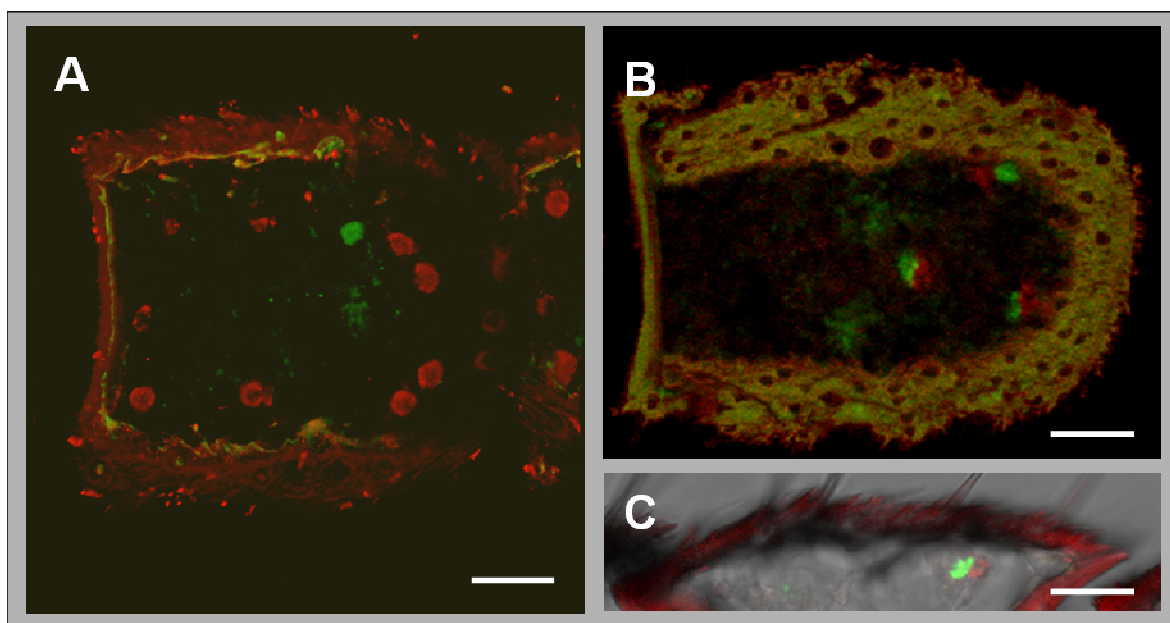


Abb. 33 Lokalisierung HR13-, HR14- und HR16-exprimierender Zellen in der Antenne

Zu Abb. 33 Lokalisierung HR13-, HR14- und HR16-exprimierender Zellen in der Antenne

A Lokalisation HR13- und HR14-exprimierender Zellen in der Antenne. In einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR13 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer HR14 antisense RNA-Sonde (Biotin) ein Dünnschnitt einer Männchenantenne (horizontale Schnittführung) untersucht. Das gezeigte Bild stellt die Projektion eines konfokalen Bildstapels dar. Roter und grüner Fluoreszenzkanal wurden übereinander gelegt. HR13 und HR14 werden in räumlich voneinander getrennten Zellpopulationen exprimiert. Während eine große Zahl von Zellen von der HR13-Sonde (rot) markiert wird, wurde nur eine Zelle von der HR14-Sonde (grün) markiert. Maßstab = 20 µm

B Antennale Lokalisation von HR16-Zellen. Mittels einer Doppel- *in situ* Hybridisierung wurde mit einer Kombination einer HR16 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer HR14 antisense RNA-Sonde (Biotin) ein Gewebeschnitt einer Männchenantenne (horizontale Schnittführung) untersucht. Wieder zeigt das Bild die Projektion eines konfokalen Bildstapels. Roter und grüner Fluoreszenzkanal wurden übereinander gelegt. HR16-exprimierende Zellen (rot) sind immer in unmittelbarer Nähe zu HR14-exprimierenden Zellen (grün) lokalisiert. Maßstab = 20 µm

C Mit einer Kombination einer HR16 antisense RNA-Sonde (DIG) und einer HR14 antisense RNA-Sonde (Biotin) wurde Gewebeschnitt einer Männchenantenne (sagittale Schnittführung) untersucht. Wieder zeigt das Bild die Projektion eines konfokalen Bildstapels. Roter und grüner Fluoreszenzkanal wurden übereinander gelegt. HR16-exprimierende Zellen (rot) sind immer in unmittelbarer Nähe zu HR14-exprimierenden Zellen (grün) lokalisiert. Maßstab = 20 µm

Die Ergebnisse sind in Abbildung 33A dokumentiert. Beide Rezeptortypen wurden in unterschiedlichen Zellpopulationen detektiert. Darüber hinaus wurde deutlich, dass HR13 in einer größeren Population von Zellen (rot) exprimiert wird als HR14 (grün). Diese beiden Zelltypen lagen in keinem Fall assoziiert vor, was darauf hindeutet, dass diese Zellen in verschiedenen Populationen von Sensillen vorkommen.

Beim Vergleich der Expressionsmuster verschiedener putativer Pheromonrezeptoren konnte festgestellt werden, dass die beiden Rezeptortypen HR14 und HR16 in ähnlich großen Zellpopulationen vorkommen. In Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimenten konnte (dargestellt in Abb. 33B) mit Sonden für die Rezeptortypen HR14 und HR16 festgestellt werden, dass diese Rezeptoren ebenfalls in zwei verschiedenen Populationen von Zellen exprimiert werden. Das Expressionsmuster dieser Rezeptoren unterscheidet sich aber dahingehend vom Expressionsmuster von HR13 und HR14, dass HR14-Zellen (grün) und HR16-Zellen (rot) in unmittelbarer Nähe zueinander festgestellt wurden. Dieses Verteilungsmuster deutet darauf hin, dass HR14- und HR16-Zellen in einem Sensillenhaar vorkommen.

Weiter wurden die relativen Anteile der HR-exprimierenden Zellen und der drei Typen von Sensilla trichodea auf der Antenne der Männchen betrachtet. Die Anteile der Sensillentypen wurden anhand der elektrophysiologischen Daten von Baker et al. (2004) berechnet. Sensilla trichodea Typ A kommen wesentlich häufiger vor als Typ B und Typ C. Die Daten für die Rezeptortypen HR13, HR14 und HR16 stammen aus unabhängigen *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit Rezeptor-spezifischen

antisense RNA-Sonden. Sonden für HR13 markierten eine wesentlich größere Zahl von Zellen, als die spezifischen Sonden für HR14 und HR16 (Abb. 34).

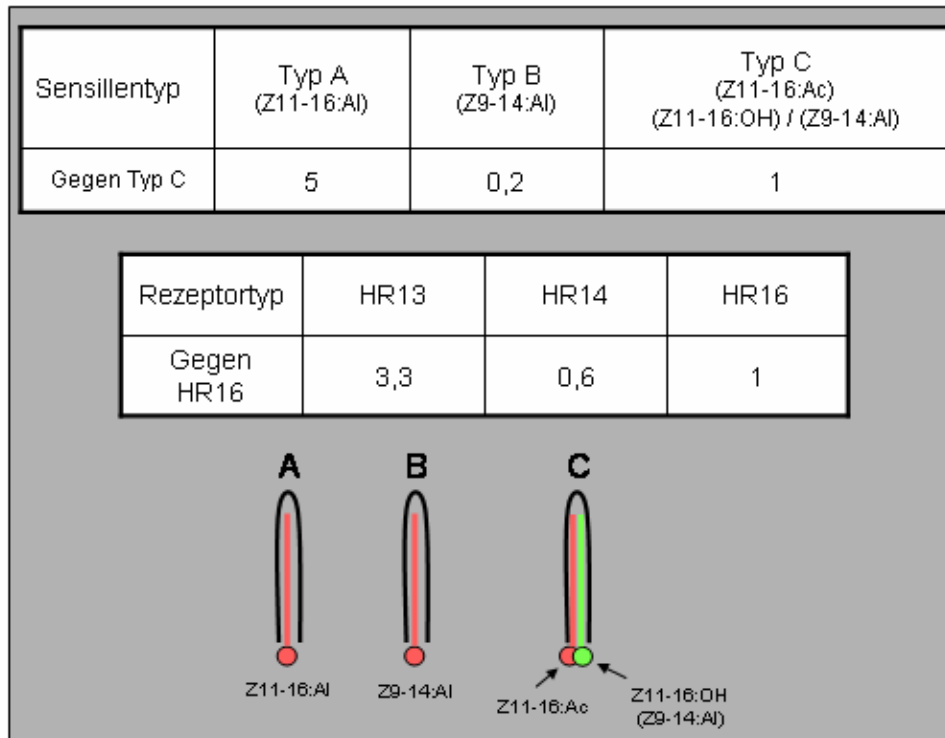


Abb. 34 Verhältnisse HR13-exprimierender Zellen und Sensilla trichodea Typ A auf der Männchenantenne von *Heliothis virescens*

Obere Reihe: Relativer Anteil der drei verschiedenen Typen langer Sensilla trichodea. Die in der Tabelle gezeigten Werte wurden anhand der Publikation von Baker et al., 2004 berechnet. Sensillenhaare des Typs A kommen deutlich häufiger vor als Typ B und Typ C.

Mittlere Reihe: Relativer Anteil HR-exprimierender Zellen in der Männchenantenne. Zugrunde liegen voneinander unabhängige *in situ* Hybridisierungsexperimente mit spezifischen antisense RNA-Sonden für HR13, HR14 und HR16. Ausgezählt wurden markierte Zellen zufällig ausgewählter einzelner Antennensegmente. Die Anzahl markierter Zellen ist als Vielfaches der Gesamtzahl markierter HR16-exprimierender Zellen dargestellt. Verglichen mit der Größe der Zellpopulation von HR14- und HR16-Zellen, konnte eine Expression von HR13 mRNA in einer wesentlich größeren Population von Zellen nachgewiesen werden.

Untere Reihe: Schematische Darstellung der verschiedenen Typen von Sensillenhaaren Typ A bis C. Die in ihnen beherbergten Neurone unterscheiden sich in der Rezeptorausstattung und der Reaktivität auf distinkte Pheromonkomponenten. Die Zellkörper der olfaktorischen Neurone sind kreisförmig dargestellt. Die geraden Linien stellen die Dendriten dar. Die jeweiligen Komponenten sind angegeben (nach Baker et al., 2004). (Siehe: Material und Methoden 2.10).

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rezeptortypen von *Bombyx mori* und *Heliothis virescens* charakterisiert, die als Kandidaten für Pheromon-Rezeptoren angesehen werden. Es hat sich gezeigt, dass sie zur Gruppe der olfaktorischen Rezeptoren gehören, die generell eine sehr diverse Genfamilie darstellt. Die Rezeptorkandidaten bilden jedoch eine abgegrenzte, Spezies-übergreifende Subfamilie mit auffällig konservierten Sequenzen. Spezies-übergreifende Sequenzidentität wurde u.a. auch für Transmitterrezeptoren, wie Acetylcholinrezeptoren, beschrieben (Vernier et al., 1995). Die These, dass es sich bei den relativ konservierten Rezeptoren um Pheromonrezeptoren handelt, wird dadurch unterstützt, dass die Rezeptor-exprimierenden Neurone in den Pheromon-sensitiven Sensillen der Antennen lokalisiert sind und von Zellen umhüllt werden, die distinkte Pheromonbindepoteine (PBPs) exprimieren (Abb. 15, 16). Diesen PBPs wird eine zentrale Rolle bei der Solubilisierung und dem Transfer der hydrophoben Pheromone in der Sensillenlymphe zugeschrieben. Detaillierte Studien an PBPs von *Antheraea polyphemus* sprechen dafür, dass diesen Proteinen u.U. komplexere Funktionen zukommen. *Antheraea polyphemus* verfügt über drei PBP-Subtypen und drei Pheromone: (E4,Z9)-tetradecadienyl-1-acetat, (E6,Z11)-hexadecadienyl-1-acetat, (E6,Z11)-hexadecadienal. Für einen der PBP-Subtypen konnte gezeigt werden, dass er alle drei Pheromone mit vergleichbarer Affinität bindet (Bette et al., 2002), dass aber nur die Bindung des „passenden“ Pheromons eine Konformationsänderung bewirkt (Mohl et al., 2002). Man geht davon aus, dass PBPs verschiedene hydrophobe Liganden binden können, dass aber offenbar nur mit dem passenden Liganden ein „adäquater“ Komplex gebildet wird. Ein großer Teil der durch die wie Reusen wirkenden Sensillenhaare eingefangenen hydrophoben Pheromon-komponenten wird offenbar mittels PBPs in der Sensillenlymphe gelöst; sie können entweder mit den „passenden“ Sinneszellen interagieren oder werden von den „Odor Degrading Enzymes“ (ODEs) inaktiviert (Blomquist and Vogt, 2003). Auf diese Weise würden die PBPs nicht nur eine essentielle Rolle bei der Erfassung der Pheromone spielen, sondern wären auch für deren Inaktivierung von Bedeutung. *Heliothis virescens* verfügt über mindestens zwei PBP-Subtypen, HvirPBP1 und HvirPBP2, die in trichoiden Sensillenhaaren vorkommen. Eine spezifische Funktion konnte bisher für HvirPBP2 gezeigt werden; HvirPBP2 interagiert mit dem Pheromon

Z11-Hexadecenal und dem heterolog exprimierten Rezeptortyp HR13 (Grosse-Wilde et al., 2007). Dieser Befund wird als ein Indiz dafür gewertet, dass u.U. jeder PBP-Subtyp zur Erfassung eines spezifischen Pheromons beiträgt. Dies deutet darauf hin, dass mehr PBP-Subtypen existieren, als bisher identifiziert wurden.

Die genauen Abläufe beim Transfer von Pheromonen in der Sensillenlymphe und bei der Interaktion mit dem Rezeptorprotein in der sensorischen Dendriten-Membran sind noch nicht bekannt. Es ist spekuliert worden, ob es zu einer Interaktion des PBP/Pheromon-Komplexes mit einem weiteren Membranprotein kommt, das als eine Art „Docking“-Stelle dient. Eine solche Funktion wurde für das „Sensory Neuron Membrane Protein“ (SNMP) diskutiert (Blomquist and Vogt, 2003), das in den Dendriten olfaktorischer Neurone nachgewiesen wurde (Rogers et al., 1997). Im Rahmen dieser Studie wurde bei *Heliothis* ein weiterer SNMP-Typ (SNMP2) identifiziert (Abb. 20). Es hat sich aber gezeigt, dass SNMP2 nicht, wie der Name impliziert, in Neuronen sondern in den Hüllzellen von trichoiden Sensillen exprimiert wird. Eine Interaktion von PBP-Komplexen mit den Hüllzellen wurde bislang aber noch nicht beschrieben. SNMPs gehören zur großen Familie der CD36-Proteine (Rogers et al., 2001). Einigen Mitgliedern wird eine Rolle bei der Endocytose von Komplexen aus Transportproteinen und kleinen hydrophoben Molekülen zugeschrieben (Acton et al., 1996; Ohgami et al., 2000). Es wäre also denkbar, dass SNMP2 eine endocytotische Aufnahme von PBP/Pheromon-Komplexen in die Hüllzellen vermittelt und so zum „turn-over“ dieser Proteine, aber auch zu einer „Clearance“ der Pheromone beiträgt.

Als ein besonders wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die immunhistochemische Visualisierung des HR13-Rezeptorproteins anzusehen. Mit dem erstmaligen Nachweis eines olfaktorischen Rezeptor-Proteins in den Dendriten von sensorischen Neuronen in Pheromon-sensitiven Sensillen in Lepidopteren konnte darüber hinaus das Funktionsprotein in dem Kompartiment der Zelle lokalisiert werden, wo die Interaktion mit den spezifischen Liganden stattfinden sollte (Jacquin-Joly and Merlin 2004; Dahanukar et al. 2005; Rützler and Zwiebel 2005). Detaillierte Analysen der mit dem anti-HR13-Antiserum gefärbten Dendriten haben gezeigt, dass die Immunreaktivität eine perlschnurartige Verteilung aufwies (Abb. 22-25). In diesem Zusammenhang sind u.U. frühere rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bedeutung, die gezeigt haben, dass die Dendriten von antennalen Neuronen Verdickungen mit einem vergleichbaren Verteilungsmuster aufweisen

(Eschrich et al., 1998). Diesen Strukturen wurde in der Vergangenheit nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt; es wäre aber denkbar, dass durch die bläschenförmigen Verdickungen die Dendriten-Membran in sehr geringer Distanz zu den Poren platziert wird, durch die volatile Stoffe ins Lumen der Sensillenhaare gelangen. Außerdem wurde beschrieben, dass Dendriten wendelartig im Sensillenhaar verlaufen, und so sehr direkt an den Poren vorbeiziehen (Steinbrecht, 1973). An den Poren-nahen Strukturen wäre die Distanz für die Pheromone zur chemosensorischen Membran sehr kurz. Die intensiv markierten immunreaktiven Bereiche könnten nun in solchen Verdickungen des Dendriten lokalisiert sein und auf eine hohe Konzentration des Rezeptorproteins in diesem Poren-nahen Bereich hindeuten. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass sich ein vergleichbares Färbungsmuster der Dendriten auch mit den SNMP1-Antikörpern ergab, von besonderem Interesse (Rogers et al., 1997). Eine Kombination von immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen sollte zur Klärung der offenen Fragen beitragen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für z.T. stark fluoreszierende Bereiche des Dendriten könnten vesikuläre Strukturen sein, die den Transport des Rezeptorproteins entlang des Dendriten bewerkstelligen. Vesikel-ähnliche Strukturen wurden auch bei der Markierung mit Rezeptor-Antikörpern in olfaktorischen Dendriten der Maus beobachtet (Strotmann et al., 2004; Schwarzenbacher et al., 2005).

Mittels HR13-spezifischer Antikörper ist es erstmals gelungen, auch die axonalen Fortsätze der entsprechenden Neurone zu färben (Abb. 26-30). In Anbetracht der Länge und der komplexen Morphologie der Antenne waren Untersuchungen zur Projektion dieser Neurone von großem Interesse. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten HR13-Faserbündel im antennalen Nerv zwar bis zur „sorting zone“ visualisiert werden, jedoch konnte in den Zielgebieten der axonalen Endigungen, in den entsprechenden Glomeruli kein Rezeptorprotein nachgewiesen werden (Abb. 32). Dieser Befund kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die Rezeptorproteine offenbar nicht unmittelbar an der Weg- und Zielfindung der Axone bei der „Verdrahtung“ der Antenne mit dem antennalen Lobus beteiligt sind. Dieses Ergebnis bestätigt, dass bei *Drosophila* Mutanten mit Neuronen ohne olfaktorischem Rezeptor (Dobritsa et al., 2003), sogen. „empty neurons“ (Syed et al., 2006) keinerlei morphologische Unterschiede bezüglich der Innervation des Lobus nachzuweisen

waren. Selbst die ektopische Expression anderer Rezeptoren in diesen *Drosophila*-Neuronen, bewirkten keine Veränderungen in der Architektur des antennalen Lobus (Syed et al., 2006; Kurtovic et al., 2007). Dies scheint ein deutlicher Gegensatz zu den Befunden bei Vertebraten zu sein; an transgenen Mauslinien konnte überzeugend dokumentiert werden, dass die Expression eines distinkten Rezeptors für ein korrektes Targeting der olfaktorischen Neurone unerlässlich ist (Lin et al., 2000; Zhao and Reed, 2001); außerdem wurden mit OR-spezifischen Antikörpern Rezeptorproteine auch in den entsprechenden Glomeruli des olfaktorischen Bulbus nachgewiesen (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004). Ob die deutlich geringere Anzahl von distinkten Projektionsorten (Glomeruli bei *Drosophila* ~50, bei der Maus ~1800 (Nozawa and Nei, 2007)) dafür eine ursächliche Rolle spielt, ist unklar. In diesem Zusammenhang ist u.U. auch die Tatsache, dass olfaktorische Neuronen bei Vertebraten einem lebenslangen „turn-over“ unterliegen, von besonderem Interesse. Ein entsprechendes Phänomen ist bei Insekten nicht bekannt; nach einer Etablierung des Systems kommt es offenbar zu keinem Ersatz von Neuronen. Insgesamt könnten die Beobachtungen darauf hindeuten, dass für das olfaktorische System der Insekten ein strikt festgelegtes „Verdrahtungsmuster“ existiert, das durch andere Parameter als die Rezeptorproteine determiniert wird. Möglicherweise wird bei Insekten das Targeting der olfaktorischen Axone durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren in einer bestimmten räumlichen und zeitlichen Verteilung dirigiert. Über erste Hinweise für die Bedeutung synchroner Entwicklungsabläufe in der Antenne und im antennalen Lobus wurde von Lipscomb und Tolbert (2006) berichtet; es hat sich gezeigt, dass eine temperaturbedingte Verzögerung der Entwicklungsabläufe in der Antenne zu einem Mis-Targeting von Axonen im unbehandelten antennalen Lobus führte. So ist es denkbar, dass die Ausprägung der Architektur des olfaktorischen Systems bei Insekten über temporäre und topographische Expressionsmuster von Zelloberflächen-Proteinen gesteuert wird. Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass dem Transmembranprotein Semaphorin-1a (Sema-1a) dabei eine zentrale Rolle zukommen könnte (Lattemann et al., 2007; Sweeny et al., 2007; Bashaw, 2007). Es hat sich gezeigt, dass Sema-1a im Verlauf der Entwicklung des antennalen Lobus ein kompliziertes räumliches Expressionsmuster aufweist (Lattemann et al., 2007). Allerdings wurde auch deutlich, dass eine korrekte Zielfindung der Axone nicht ausschließlich auf einer „Steuerung“ durch Sema-1a beruht.

Es ist zu erwarten, dass die stetige Verbesserung der neuen histologischen Analyse-Verfahren und die viel versprechenden molekularbiologischen Ansätze wichtige Beiträge zur Aufklärung der komplexen Prozesse liefern, die der Etablierung der Rezeptor-spezifischen Verdrahtungsmuster zwischen Antenne und antennalem Lobus zugrunde liegen.

5. Zusammenfassung

Die bemerkenswerte Reaktivität von Motten auf spezifische Pheromone basiert auf einer extrem hohen Selektivität und Sensitivität der sensorischen Zellen in den Männchenantennen. Als Grundlage dafür wird eine Ausstattung der Zellen mit spezifischen Rezeptoren angesehen. Erst die Genom-Sequenzierung von *Bombyx mori* und *Heliothis virescens* hat eine Identifizierung von Kandidaten-Genen für olfaktorische Rezeptoren ermöglicht; dabei hat sich gezeigt, dass diese generell sehr heterogene Gruppe von Rezeptorgenen eine Subfamilie umfasst, die über Speziesgrenzen hinaus eine auffällige Sequenzhomologie aufweist. Eine konservierte Primärstruktur war für Pheromonrezeptoren postuliert worden. Im Hinblick auf eine Charakterisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen experimentellen Ansätzen geprüft, ob diese Rezeptorkandidaten in Zellen der Pheromon-sensitiven Sensillenhaare (Sensilla trichodea) exprimiert werden. Mittels „whole mount“ *in situ* Hybridisierung wurde in den Antennen von *Bombyx mori* die RNA der Rezeptortypen BmOR1 bzw. BmOR3 in Zellen visualisiert, die unmittelbar benachbart positioniert sind und in ihrem Verteilungsmuster den trichoiden Sensillenhaaren entsprechen. Entsprechend konnte auch bei *Heliothis virescens* für einige Rezeptortypen dieser Gruppe (HR13, HR14, HR16) gezeigt werden, dass sie in Zellen exprimiert werden, die den Pheromon-sensitiven trichoiden Sensillenhaaren zugeordnet werden konnten. Neben den spezifischen Rezeptoren der Sinneszellen wird bei der Detektion von hydrophoben Pheromonmolekülen auch den Pheromonbindeproteinen (PBPs) eine wichtige Funktion zugeschrieben; PBPs werden in Glia-ähnlichen Zellen produziert, welche die Sinneszellen umgeben. In Doppel- *in situ* Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass z.B. die HR13-Zellen in der Tat von HvirPBP1- und HvirPBP2-exprimierenden Zellen umgeben sind. Vergleichende Untersuchungen zur Topologie verschiedener Rezeptortypen haben gezeigt, dass HR13-Zellen dem trichoiden Sensillen-Typ A zuzuordnen sind, während HR14 und HR16 in Zellen des Sensillen-Typs C exprimiert werden. Diese charakteristischen topologischen Expressionsmuster sind als weiterer Hinweis zu werten, dass es sich bei den Rezeptorkandidaten tatsächlich um Rezeptoren für Pheromone handeln dürfte. Die Zuordnung individueller Rezeptortypen zu distinkten Sensillen-Typen eröffnet neue Ansätze für die Ermittlung der funktionellen Implikationen von Rezeptortypen für die

Registrierung von Haupt- und Nebenkomponten komplexer Pheromon-Gemische. Im Verlauf einer weiteren Charakterisierung von Rezeptor-exprimierenden Zellen hat sich gezeigt, dass nur der Rezeptortyp HR13 eine Coexpression mit einem „Markerprotein“ für sensorische Neurone, dem SNMP1 (Sensory Neuron Membrane Protein 1) aufwies, nicht jedoch die beiden Rezeptortypen HR14 und HR16. Zur Überprüfung der These ob u. U. ein weiterer SNMP-Subtyp existiert, wurden Screeningverfahren durchgeführt und dabei tatsächlich ein neuer SNMP-Typ (SNMP2) von *Heliothis virescens* identifiziert. Untersuchungen zur Expression haben gezeigt, dass die topologische Verteilung der SNMP2-Zellen zwar mit der von SNMP1-Zellen vergleichbar ist, dass sie jedoch eine sehr unterschiedliche Morphologie aufweisen. Weiterführende Untersuchungen haben dann gezeigt, dass SNMP2 in den PBP-produzierenden Hüllzellen der trichoiden Sensillenhaare exprimiert wird. Diese Befunde stellen die SNMP-Proteine in einen neuen Kontext und eröffnen neue Spekulationen über deren mögliche Funktionen.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war der Versuch, die Rezeptor-relevanten Zellen nicht nur mittels mRNA-Visualisierung zu identifizieren, sondern die eigentlichen Rezeptorproteine immunhistochemisch zu erfassen. Obwohl sich die Generierung von Antikörpern für olfaktorische Rezeptoren als extrem schwierig erwiesen hat, ist es gelungen, für den Rezeptortyp HR13-spezifische Antikörper zu gewinnen. Mit Hilfe dieser Antikörper war es dann erstmals möglich, immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation des Rezeptorproteins HR13 durchzuführen. In Doppelmarkierungsstudien mit einer HR13 antisense RNA-Sonde und den HR13-spezifischen Antikörpern konnte die Colokalisation von mRNA und Protein in den entsprechenden Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es mit konfokaler Laserscanningmikroskopie möglich, die Verteilung des Rezeptorproteins in den verschiedenen Kompartimenten, insbesondere auch in den sensorischen Dendriten, zu visualisieren. Außerdem hat sich gezeigt, dass Rezeptorproteine auch in den axonalen Fortsätzen der sensorischen Zellen vorkommen. Durch Rezeptor-spezifische Markierungen wurde deutlich, dass die Axone mit HR13-Rezeptoren im antennalen Nerv als Bündel organisiert sind. Im Antennen-Nerv konnten HR13-markierte Axone bis zum Eintritt in die „sorting zone“ des antennalen Lobus visualisiert werden; im Unterschied zu den Befunden bei der Maus, war eine Markierung in den entsprechenden Glomeruli nicht nachweisbar.

6. Summary

The remarkable reactivity of moth to specific pheromones is based on the extreme selectivity and sensitivity of sensory cells in the male antennae. This feature is supposed to be based on cells equipped with specific receptors. Only the sequencing of the genomes of *Bombyx mori* and *Heliothis virescens* provided the possibility to identify candidate genes of olfactory receptors in moths. Upon detailed inspection of candidate receptors it turned out that within the generally very heterogeneous group of receptor-genes a subfamily exists containing members of both species showing striking sequence homology. A conservation of the primary structure of receptors for pheromones has been postulated. For a continuing characterization in these studies different approaches were used to verify that these receptors are indeed expressed in cells of pheromone-sensitive sensilla (sensilla trichodea). By means of “whole mount” *in situ* hybridization experiments the RNA of the receptor types BmOR1 and BmOR3 could be visualized in directly neighboring cells reflecting the topology of trichoid sensilla. Also some of the *Heliothis* receptor types (HR13, HR14, HR16) could be assigned to sensilla trichodea. In addition to the specific receptors, the pheromone binding proteins (PBPs) are expected to play an important role in the detection of hydrophobic pheromone molecules. PBPs are produced by glia-like cells surrounding the sensory neurons. In double *in situ* hybridization experiments it could be shown that HR13-cells are indeed surrounded by cells expressing HvirPBP1 and HvirPBP2. Analysis comparing the topology of different receptor-types showed that cells expressing HR13 can be assigned to sensilla trichodea type A, whereas HR14 and HR16 are expressed in cells of sensilla trichodea type C. This characteristic expression pattern is considered as a further indication that these candidate-receptors are indeed pheromone-receptors. The assignment of individual receptor-types to distinct sensilla-types provides the basis for investigating the functional implications of receptor-types for the registration of main or minor components of complex pheromone-blends. Further it turned out that HR13 shows coexpression with SNMP1 (sensory neuron membrane protein 1) which is considered as a “marker”-protein for antennal sensory neurons. This is however not the case for receptor types HR14 and HR16. In search of further SNMP-types screening-experiments were carried out which led to the identification of a novel SNMP-type (SNMP2) of *Heliothis virescens*. Subsequent studies concerning the expression of SNMP2 showed that the

topologic distribution of SNMP2-cells is comparable to SNMP1-cells, but they show a different morphology. Further experiments revealed that SNMP2 is in fact expressed in PBP-producing cells. These findings imply that the proposed putative function of SNMPs has to be reconsidered. One major goal of this study was the attempt, to identify receptor-relevant cells by visualization of mRNA via *in situ* hybridization but to visualize the localization of the receptor-protein via immunohistochemical approaches. Although the generation of antibodies for olfactory receptors is very difficult, it was possible to raise antibodies specific for receptor type HR13. Using these antibodies in immunohistochemical approaches allowed to also visualize HR13-receptor-protein. By means of double-staining experiments using HR13-specific antisense RNA-probes and anti-HR13 antibodies mRNA and protein were visualized in the same specific cells. Using confocal laserscanning microscopy, it was possible to document that receptor-protein was indeed located in the sensory dendrites. Further, the receptor-protein was also visualized in the axonal processes of sensory cells and the receptor-specific staining revealed that within the antennal nerve HR13-axons appear to be organized in fascicles. These HR13-immunolabeled fascicles were visible until they reach the “sorting zone” of the antennal lobe; in contrast to mouse olfactory bulb, no receptor specific staining was visible in the antennal lobe.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham D, Löfstedt C, Picimbon JF (2005) Molecular characterization and evolution of pheromone binding protein genes in *Agrotis* moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1100-1111.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 271(5248):518-20.
- Almaas TJ, Mustaparta H (1990) Pheromone reception in tobacco budworm moth, *Heliothis virescens*. *J. Chem. Ecol.*, 16, 1331-1347.
- Almaas TJ, Mustaparta H (1991) *Heliothis virescens*: Response characteristics of receptor neurons in sensilla trichodea type 1 and type 2 *J. Chem. Ecol.* 17 953-972.
- Astic L, Saucier D, Holley A (1987) Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 424(1):144-52.
- Baker TC, Ochieng SA, Cosse AA, Lee SG, Todd JL, Quero C, Vickers NJ (2004) A comparison of responses from olfactory receptor neurons of *Heliothis subflexa* and *Heliothis virescens* to components of their sex pheromone. *J. Comp. Physiol. [A]*, 190, 155-165.
- Barnea G, O'Donnell S, Mancina F, Sun X, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (2004) Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science.* 304(5676):1468.
- Bashaw G (2007) Semaphorin Directs Axon Traffic in the Fly Olfactory System. *Neuron*, 53(2): 157-159.
- Berg BG, Almaas TJ, Bjaalie JG, Mustaparta H (1998) The macroglomerular complex of the antennal lobe in the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*: specified subdivision in four compartments according to information about biologically significant compounds. *J. Comp. Physiol. [A]*, 183, 669-682.

- Bette S, Breer H, Krieger J (2002) Probing a pheromone binding protein of the silkworm *Antheraea polyphemus* by endogenous tryptophan fluorescence. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(3):241-6.
- Blomquist GJ and Vogt RG (2003) *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology: The Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles.* Elsevier Academic Press, London ISBN 0-121-07151-0
- Brennan PA, Keverne EB (2004) Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Current Biology*, 14:R81-R89.
- Butenandt A, Beckman R, Stamm D, Hecker E (1959) Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*, Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforschung*, B14, 283–284.
- Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR (1999) A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*. 22(2):327-38.
- Dahanukar A, Hallem EA, Carlson JR (2005) Insect chemoreception. *Curr Opin Neurobiol.* 2005 Aug;15(4):423-30.
- Dobritsa AA, van der Goes van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR (2003) Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 37(5):827-41.
- Ernst KD (1969) Die Feinstruktur von Riechsensillen auf der Antenne des Aaskäfers *Necorphorus* (Coleoptera). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 94: 72-102.
- Eschrich R, Kumar GL, Keil TA, Guckenberger R (1998) Atomic-force microscopy on the olfactory dendrites of the silkworms *Antheraea polyphemus* and *A. pernyi*. *Cell Tissue Res.*294(1):179-85.
- Fabre JH (1879) Übersetzung aus „Souvenirs du Entomologique“ I.-X. in Kosmos, Gesellschaft der Naturfreunde
- Gohl T (2004) Expression putativer olfaktorischer Rezeptoren von *Heliothis virescens*

- Grosse-Wilde E, Gohl T, Bouché E, Breer H, Krieger J (2007) Candidate pheromone receptors provide the basis for the response of distinct antennal neurons to pheromonal compounds. *Eur. J. Neurosci.*, 16 (4): 619-28.
- Hildebrand J, Rössler W, Tolbert LT (1997) Postembryonic development of the olfactory system in the moth *Manduca sexta*: primary-afferent control of glomerular development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 8(2):163-70.
- Jan LY, Jan YN (1982) Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2700-2704.
- Jacquín-Joly E, Merlin C (2004) Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *J Chem. Ecol.* (12):2359-97.
- Kasang G, Kaissling K-E, Vostrowsky O, Bestmann HJ (1978) Bombykal, a second pheromone component of the silkworm moth *Bombyx mori* L. *Z. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17:60.
- Keil T, Steiner C (1990) Morphogenesis of the antenna of the male silkworm, *Antheraea polyphemus*. II. Differential mitoses of "dark" precursor cells create the anlagen of Sensilla. *Tissue and Cell*, 22: 705-720.
- Klun JA, Bierl-Leonhardt BA, Plimmer JR, Sparks AN, Primiani M, Chapman OL, Lepone G, Lee GH (1980) Sex pheromone chemistry of the female tobacco budworm moth, *Heliothis virescens* J. *Chem. Ecol.*, 6, 177-183.
- Krieger J, Ganssle H, Raming K, Breer H (1993) Odorant binding proteins of *Heliothis virescens*. *Insect Biochem Mol Biol.* 23(4):449-56.
- Krieger J, Raming K, Dewey YM, Bette S, Conzelmann S, Breer H (2002) A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur J Neurosci.* 16(4):619-28.
- Krieger J, Grosse-Wilde E, Gohl T, Dewey YM, Raming K, Breer H (2004) Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(32):11845-50.

- Krieger J, Grosse-Wilde E, Gohl T, Breer H (2005) Candidate pheromone receptors of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur. J. Neurosci.* 21(8):2167-76
- Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ. (2007) A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature.* 446(7135):542-6.
- Lattemann M, Zierau A, Schulte C, Seidl S, Kuhlmann B, Hummel T. (2007) Semaphorin-1a controls receptor neuron-specific axonal convergence in the primary olfactory center of *Drosophila*. *Neuron.* 18;53(2):169-84.
- Lin DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, Ngai J, Brunet L (2000) Formation of Precise Connections in the Olfactory Bulb Occurs in the Absence of Odorant-Evoked Neuronal Activity. *Neuron*, Vol. 26, 69–80.
- Lipscomb BW, Tolbert LP (2006) Temporally Staggered Glomerulus Development in the Moth *Manduca sexta*. *Chem. Senses.* 31: 237 - 247.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell.* 96(5):713-23.
- Meng LZ, Wu CH, Wicklein M, Kaissling KE, Bestmann HJ (1989) Number and sensitivity of three types of pheromone receptor cells in *Antheraea pernyi* and *A. polyphemus*. *J Comp Physiol A* 165, 139-146.
- Mohl C, Breer H, Krieger J (2002) Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. *Invert Neurosci.* 4(4):165-74.
- Mori K (1993) Molecular and cellular properties of mammalian primary olfactory axons. *Microsc Res Tech.* 24(2):131-41.
- Nozawa M, Nei M (2007) Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in *Drosophila* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(17):7122-7.
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H (2000) Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 276(5):3195-202.

- Ramaswamy SB, Roush RT (1986) Sex pheromone titers in females of *Heliothis virescens* from three geographical locations (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Gen.* 12: 19-23.
- Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KK, Nardi JB (1999) Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol Biol.* 8(4):501-18.
- Roelofs W, Hill AS, Cadré RT, Baker TC (1974) Two sex pheromone components of the tobacco budworm moth, *Heliothis virescens*. *Life Sci.* 14: 1555-1562.
- Rogers ME, Sun M, Lerner MR, Vogt RG (1997) Snmp-1, a Novel Membrane Protein of Olfactory Neurons of the Silk Moth *Antheraea polyphemus* with Homology to the CD36 Family of Membrane Proteins. *J. Bio. Chem.* 272(23):14792-9.
- Rogers ME, Krieger J, Vogt RG (2001) Antennal SNMPs (Sensory Neuron Membrane Proteins) of Lepidoptera Define a Unique Family of Invertebrate CD36-like Proteins. *J Neurobiol.* 49(1):47-61.
- Rössler W, Oland LA, Higgins MR, Hildebrand JG, Tolbert LP (1999) Development of a glia-rich axon-sorting zone in the olfactory pathway of the moth *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* 19(22): 9865-9877.
- Rubin GM (1996) Around the genomes: the *Drosophila* genome project. *Genome Res.* 6(2):71-9.
- Rutzler M, Zwiebel LJ (2005) Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 191(9):777-90.
- Schneider D, Kaissling K-E (1957) Der Bau der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. II. Sensillen, cuticulare Bildungen und innerer Bau. In *Zoologische Jahrbücher*. VEB Gustav Fischer, Jena, pp. 223–250.
- Schneider D, Kaissling K-E (1958) Der Bau der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. III & Das Bindegewebe und das Blutgefäß. In Kaestner A, Stresemann GM & Hassenstein B (Ed.), *Zoologische Jahrbücher*. VEB Gustav Fischer, Jena, pp. 111–132.

- Schwarzenbacher K, Fleischer J, Breer H (2006) Odorant receptor proteins in olfactory axons and in cells of the cribriform mesenchyme may contribute to fasciculation and sorting of nerve fibers. *Cell Tissue Res.* 323(2):211-9.
- Steinbrecht, RA (1970) Zur Morphologie der Antenne des Seidenspinners, *Bombyx mori* L. Zahl und Verteilung der Riechsensillen (Insecta, Lepidoptera). *Z. Morph. Tiere*, 68, 93-126.
- Steinbrecht RA (1973) The fine structure of olfactory sensilla in the silk moth (Insecta, Lepidoptera). Receptor processes and stimulus conduction apparatus. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 139(4):533-65.
- Steinbrecht RA, Gnatzy W (1984) Pheromone receptors in *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*. I. Reconstruction of the cellular organization of the sensilla trichodea. *Cell. Tissue Res.*, 235: 25-34.
- Steinbrecht RA, Ozaki M, Ziegelberger G (1992) Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in the moth antennae. *Cell Tissue Res.* 270: 287-302.
- Strotmann J, Levai O, Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H (2004) Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci.* 24(35):7754-61.
- Sweeney LB, Couto A, Chou YH, Berdnik D, Dickson BJ, Luo L, Komiyama T (2007) Temporal target restriction of olfactory receptor neurons by Semaphorin-1a/PlexinA-mediated axon-axon interactions. *Neuron.* 53(2):157-9.
- Syed Z, Ishida Y, Taylor K, Kimbrell DA, Leal WS. (2006) Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(44):16538-43.
- Teal PEA, Tumlinson JH, Heath RR (1986) Chemical and behavioral analyses of volatile sex pheromone components released by calling *Heliothis virescens* (F.) females (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Chem. Ecol.* 12:107-126.
- Tumlinson JH, Hendricks DE, Mitchell ER, Doolittle RE, Brennan MM (1975) Isolation, identification and synthesis of the sex pheromone of the tobacco budworm. *J. Chem. Ecol.* 1: 203-214.

- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H, Vincent JD (1995) An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 16(11):375-81.
- Vickers NJ (2006) Inheritance of olfactory preferences I. Pheromonemediated behavioral responses of *Heliothis subflexa* x *Heliothis virescens* hybrid male moths. *Brain Behav. Evol.* 68: 63-74.
- Vickers NJ, Baker TC (1992) Male *Heliothis virescens* maintain upwind flight in response to experimentally pulsed filaments of their sex pheromone (Lepidoptera: noctuidae). *J. Insect. Behav.*, 5, 669-687.
- Vickers NJ (2006) Inheritance of olfactory preferences I. Pheromone-mediated behavioral responses of *Heliothis subflexa* x *Heliothis virescens* hybrid male moths. *Brain Behav Evol.* 68(2):63-74.
- Vickers NJ, Baker TC (1994) Reiterative responses to single strands of odor promote sustained upwind flight and odor source location by moths. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5756-5760.
- Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell.* 96(5):725-36.
- Zhao H, Reed RR (2001) Inactivation of the OCNC1 Channel Gene Reveals a Role for Activity-Dependent Competition in the Olfactory System. *Cell*, Vol. 104, 651–660

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese
Dissertationsarbeit selbstständig angefertigt,
nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt und wörtlich oder inhaltlich
übernommene Stellen als solche
gekennzeichnet wurden.

Datum

Thomas Gohl

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Heinz Breer bedanken. Die Überlassung dieses interessanten Themas und das Vorhandensein der Möglichkeiten im Institut für Physiologie habe ich nie als Selbstverständlichkeit angesehen. Vielen Dank für stetigen Rat bei Experimenten und bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ein großer Dank auch für sein Engagement, das er seinem Institut entgegenbringt.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Jürgen (Dr. Jürgen Krieger) richten, der mir seit dem ersten Tag am Institut immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Jürgen hat immer eine Engelsgeduld bewiesen, immer mit seinem scheinbar unerschöpflichen Erfahrungsschatz weitergeholfen. Danke Jürgen! Warst neben stetigem Ratgeber auch immer ein Vorbild für mich!

Ein ganz liebes Dankeschön auch an die „Insektengruppe“ (Inga, Elli, Gesa und Ewald). Es war schön mit Euch zu arbeiten und Euch jeden Tag um mich zu haben.

Liebe Maike! Hast es oft geschafft, mich mit Deiner scheinbar unerschöpflichen guten Laune in Staunen zu versetzen und mich damit anzustecken.

Weiter möchte ich mich bei Karin für offenes Ohr und Rat in allen Lebenslagen bedanken!

Aufwach, aufsteh, anzieh, abgeh, Gas geb... Heiko! Vielen Dank für all die „beruhigenden und inspirierenden“ Aufenthalte beim König! Und die Novemberwochenenden sind für die nächsten Jahre freigehalten !...

Vielen Dank an alle Kollegen für die gute Zusammenarbeit, für alles was zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Wolfgang Hanke (Prof. Dr. W. Hanke) der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand! Dies gilt ebenso für den Rest der „Hankes“!

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Roland Wurster, der die REM-Aufnahmen ermöglichte.

Herzlichen Dank auch an Burkhard Rook und seine Kollegen von Bayer CropScience für die Hilfe bei der Insektenzucht.

Ein ganz besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern, meiner Schwester Sabine, Andi Köngeter und meiner restlichen Familie, ohne deren stetige Unterstützung all das gar nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank Euch allen!

10. Lebenslauf

Thomas Gohl
Diplom Biologe
Geboren am 8. Mai 1979 in Stuttgart

Schulbildung

09.85 – 06.89 Grundschule in Ditzingen
 09.89 – 07.98 Gymnasium in der Glemsau in Ditzingen

Studium an der Universität Hohenheim

10.99 – 10.01 Grundstudium (Universität Hohenheim)
 10.01 – 08.03 Hauptstudium (Universität Hohenheim)
 mit den Schwerpunkten Physiologie, Biophysik,
 Membranphysiologie
 08.03 – 03.04 Diplomarbeit (Expression putativer olfaktorischer
 Rezeptoren von *Heliothis virescens*)

Promotion an der Universität Hohenheim

03.04 Beginn der Promotion am Institut für Physiologie der Universität Hohenheim

11. Publikationsliste

Große-Wilde, E., **Gohl, T.**, Bouché, E., Breer, H., Krieger, J. (2007) Candidate pheromone receptors provide the basis for the response of distinct antennal neurons to pheromonal compounds. *Eur J Neurosci* 25, 2364-2373

Forstner, M., **Gohl, T.**, Breer, H. and Krieger, J. (2006) Candidate pheromone binding proteins of the silkworm *Bombyx mori*. *Invert Neurosci* 6, 177-187

Gohl, T. and Krieger, J. (2006) Immunolocalization of a candidate pheromone receptor in the antenna of the male moth, *Heliothis virescens*. *Invert Neurosci* 6, 13-21

Krieger, J., Große-Wilde, E., **Gohl, T.** and Breer, H. (2005) Candidate pheromone receptors of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Neurosci* 21, 2167-2176

Krieger, J., Grosse-Wilde, E., **Gohl, T.**, Dewer, Y.M.E., Raming, K. and H. Breer (2004) Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). *Proc Nat Acad Sci USA (PNAS)* 101, 11845-11850