



**Auswirkungen der RNA-Interferenz
auf allatoregulierende Neuropeptide und
Lokalisation der B- Typ Allatostatine bei
*Spodoptera frugiperda***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für **Biologie, Chemie und Geowissenschaften**
der **Universität Bayreuth**
Lehrstuhl Tierökologie I
Professor Dr. K. H. Hoffmann

vorgelegt von
Manuela Griebler
aus Bayreuth
Bayreuth, im Februar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2004 bis Februar 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Hubert Hoffmann am Lehrstuhl für Tierökologie I der Universität Bayreuth angefertigt.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel (Antrag ME 2034/1-1) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Tag der Einreichung: 02.02.2009

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 29.06.2009

1. Gutachter: PD Dr. Martina Meyering-Vos

2. Gutachter: PD Dr. St. Heidmann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. K. Dettner, PD Dr. St. Heidmann, Prof. Dr. K.H. Hoffmann, Prof. Dr. E. Komor, PD Dr. Martina Meyering-Vos

Vorsitzender: Prof. Dr. E. Komor

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Der Nachtfalter <i>Spodoptera frugiperda</i> | 1 |
| 1.2 Das endokrine System der Insekten | 1 |
| 1.2.1 Juvenilhormone und Ecdysteroide | 2 |
| 1.2.2 Regulation der Juvenilhormonbiosynthese | 4 |
| 1.2.3 Allatotropine | 5 |
| 1.2.4 A-Typ Allatostatine | 6 |
| 1.2.5 B-Typ Allatostatine | 8 |
| 1.2.6 Allatostatin C-Typ | 11 |
| 1.2.7 Allatostatin CC-Typ | 12 |
| 1.2.8 Neuropeptide als biologische Insektizide | 13 |
| 1.3 Zielsetzung | 14 |
| 2 Materialien | 16 |
| 2.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> -Futter | 16 |
| 2.2 Oligodesoxyribonukleotide | 16 |
| 2.3 Gebrauchsfertige Reagenziensätze | 18 |
| 2.4 Substanzen, Puffer und Lösungen | 18 |
| 2.4.1 Injektion, Präparation | 18 |
| 2.4.2 PCR | 19 |
| 2.4.3 Gelelektrophorese | 19 |
| 2.4.4 Transformation, Fermentation und Plasmidpräparation | 20 |
| 2.4.5 Substanzen für Southern Blot, Hybridisierung und Immunodetektion | 21 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.6 | RNA-Isolierung und DNA-Verdau | 22 |
| 2.4.7 | RT-PCR | 23 |
| 2.4.8 | Substanzen für Real-time RT-PCR | 23 |
| 2.4.9 | Substanzen für Immunodetektion | 23 |
| 2.4.10 | Allgemeine Chemikalien | 24 |
| 2.5 | Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.6 | Geräte | 25 |
| 2.7 | Software | 27 |
| 3 | Methoden | 28 |
| 3.1 | Haltung und Aufzucht der Versuchstiere | 28 |
| 3.1.1 | Behandlung der Tiere | 28 |
| 3.1.2 | Injektion der dsRNA | 29 |
| 3.1.3 | Gewebepräparation | 30 |
| 3.2 | Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von <i>G. bimaculatus</i> B-Typ AS in verschiedenen Geweben von <i>Spodoptera frugiperda</i> | 30 |
| 3.3 | Bestimmung des Juvenilhormon-Titers mittels LC-MS (Liquid-Chromatography-Mass-Spectro-metry) | 32 |
| 3.3.1 | Gewinnung der Proben | 32 |
| 3.3.2 | Aufarbeitung der Proben | 32 |
| 3.3.3 | Messung der Proben | 33 |
| 3.3.4 | Datenerhebung | 34 |
| 3.4 | Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 3.4.1 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 34 |
| 3.4.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 36 |
| 3.4.3 | Reinigung und Isolierung von DNA | 37 |
| 3.4.4 | Konzentrationsbestimmung über Absorptionsspektroskopie | 38 |
| 3.4.5 | Berechnung der Fragmentgröße | 39 |
| 3.4.6 | Southern Blot | 39 |
| 3.4.7 | Klonierung von DNA-Fragmenten | 41 |
| 3.4.8 | Amplifikation und Isolierung des DNA-Fragments | 41 |
| 3.4.9 | Ligation | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5 | Die Genklonierung | 42 |
| 3.5.1 | Stammhaltung und Anzucht von Bakterien | 43 |
| 3.5.2 | Die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 43 |
| 3.5.3 | Transformation: Die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen | 44 |
| 3.5.4 | Plasmid-Präparation | 47 |
| 3.5.5 | Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen | 48 |
| 3.5.6 | Identifizierung des klonierten Plasmids | 49 |
| 3.5.7 | Mikromethode zur Präparation genomischer DNA aus <i>S. frugiperda</i> | 49 |
| 3.6 | Genexpressionsanalyse | 50 |
| 3.6.1 | RNA-Isolierung mit dem „RNeasy® Mini Kit“ | 50 |
| 3.6.2 | RNA-Isolierung mit Trifast | 51 |
| 3.7 | Herstellung der dsRNA | 53 |
| 3.7.1 | Amplifizierung der T7-Template | 53 |
| 3.7.2 | <i>In vitro</i> Transkription | 55 |
| 3.8 | RT-PCR | 57 |
| 3.8.1 | Optimierung der RT-PCR | 58 |
| 3.8.2 | Real-time RT-PCR | 60 |
| 3.8.3 | Herstellung eines Standards | 63 |
| 3.8.4 | Auswertung der Real-time RT-PCR | 64 |
| 3.9 | Statistik | 65 |
| 4 | Ergebnisse | 66 |
| 4.1 | Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in <i>Spodoptera frugiperda</i> | 66 |
| 4.2 | Mortalität nach Injektion von dsRNA bei <i>Spodoptera frugiperda</i> Larven und Adulten | 72 |
| 4.3 | Expressionsanalysen der Gene AS-C bzw. AT 2 von <i>Spodoptera frugiperda</i> quantifiziert mittels Real-time RT-PCR | 73 |
| 4.3.1 | Vergleich verschiedener RT-PCR Analyse-methoden zur Bestimmung der Genexpression von AS-C bzw. AT 2 | 74 |
| 4.3.2 | Expressionsvergleich der AS-C bzw. AT 2 Gene in Ringer-injizierten Tieren in Abhängigkeit von Gewebe und Alter | 78 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3.3 | Auswirkungen der RNA-Interferenz auf die AS-C bzw. AT 2 Genexpression | 83 |
| 4.4 | Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA <i>in vivo</i> auf die Entwicklung und Reproduktion von <i>Spodoptera frugiperda</i> | 88 |
| 4.4.1 | Körpergewichtszunahme im Larvenstadium | 88 |
| 4.4.2 | Effekte der AS-C- und AT 2-dsRNA Injektionen auf den JH- und Ecdysteroid-Titer der Larven | 90 |
| 4.4.3 | Effekte der AS-C- und AT 2-dsRNA Injektionen auf den JH- und Ecdysteroid-Titer adulter Weibchen | 94 |
| 4.4.4 | Ursachen für die Auswirkungen der Verpaarung von <i>Spodoptera frugiperda</i> auf den JH-Titer in der Hämolymphe | 103 |
| 4.4.5 | Auswirkungen der dsRNA Injektionen auf die Oviposition der <i>Spodoptera frugiperda</i> Weibchen | 107 |
| 4.4.6 | Auswirkungen der Suppression der AS-C und AT 2 Gene auf die Reproduktionsleistung von <i>Spodoptera frugiperda</i> Weibchen | 111 |
| 4.4.7 | Effekte der RNA Interferenz mit dem AS-C und AT 2 Gen auf die Fertilität injizierter <i>Spodoptera frugiperda</i> Männchen | 116 |
| 4.4.8 | Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Hodengewicht von <i>Spodoptera frugiperda</i> Männchen | 118 |
| 5 | Diskussion | 123 |
| 5.1 | Molekulare Charakterisierung des B-Typ Allato-statin Gens von <i>Spodoptera frugiperda</i> | 123 |
| 5.2 | Immunolokalisation von B-Typ Allatostatin Peptiden bei <i>Spodoptera frugiperda</i> | 125 |
| 5.3 | Vorteile der RNA-Interferenz bei der Aufklärung von Funktionen allatoregulierender Neuropeptide | 128 |
| 5.3.1 | Real-time PCR und Southern Blot | 129 |
| 5.3.2 | Hemmung der Genexpression | 130 |
| 5.3.3 | Entdeckung, Expression und bekannte Funktionen von AS-C Peptiden | 132 |
| 5.3.4 | Auswirkung der Gensuppression auf die Körpergewichtszunahme bei Larven | 134 |
| 5.3.5 | JH-Hämolymphtiter vor und nach Suppression der allatoregulierenden Gene bei Larven | 135 |
| 5.3.6 | JH-Hämolymphtiter vor und nach Suppression der allatoregulierenden Gene bei adulten Weibchen | 137 |

| | | |
|----------|---|--------------|
| 5.3.7 | Der JH-Hämolymphtiter bei den Männchen | 138 |
| 5.4 | Funktionen der JH-Übertragung bei der Verpaarung | 140 |
| 5.5 | Wirkungen der Gensuppression auf die Oviposition und die Ovarentwicklung adulter Weibchen | 142 |
| 5.6 | Ausblick | 146 |
| 6 | Zusammenfassung | 147 |
| 7 | Summary | 150 |
| 8 | Anhang | 152 |
| 8.1 | Sequenzen | 152 |
| 8.1.1 | cDNA-Teilsequenz des β -Aktins aus <i>S. frugiperda</i> | 152 |
| 8.1.2 | cDNA-Teilsequenz des Sulfakinins aus <i>G. bimaculatus</i> | 153 |
| 8.1.3 | cDNA-Teilsequenz des AS-C aus <i>S. frugiperda</i> | 154 |
| 8.1.4 | cDNA-Teilsequenz des AT 2 aus <i>S. frugiperda</i> | 155 |
| | Literaturverzeichnis | XVIII |
| | Danksagung | XL |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 1 | Lokalisation von B-Typ Allatostatin Peptiden im Gehirn von <i>S. frugiperda</i> . | 68 |
| Abb. 2 | Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in verschiedenen Ganglien. | 69 |
| Abb. 3 | Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in Malpighischen Gefäßen. | 70 |
| Abb. 4 | Totalpräparat der Hoden von Larven des vorletzten Larvenstadiums von <i>S. frugiperda</i> . | 70 |
| Abb. 5 | Totalpräparat des Mitteldarmes eines adulten Weibchens von <i>S. frugiperda</i> . | 71 |
| Abb. 6 | Vergleich der relativen Expression des AS-C Gens bestimmt mittels RT-PCR mit Southern Blot im Gehirn bzw. Darm von <i>S. frugiperda</i> Larven (L5/3) oder mittels der Real-time RT-PCR. | 76 |
| Abb. 7 | Vergleich der AT 2 Genexpression bestimmt mittels der RT-PCR kombiniert mit Southern Blot oder der Real-time RT-PCR im Gehirn bzw. Darm von Larven von <i>S. frugiperda</i> im vorletzten Larvenstadium (L5/3). | 77 |
| Abb. 8 | Vergleich der AS-C bzw. AT 2 Genexpression im Gehirn und Darm von Larven von <i>S. frugiperda</i> im vorletzten Larvenstadium. | 78 |
| Abb. 9 | Vergleich der AS-C bzw. AT 2 Genexpression im Gehirn adulter Weibchen von <i>S. frugiperda</i> unterschiedlichen Alters. | 80 |
| Abb. 10 | Vergleich der AS-C bzw. AT 2 Genexpression im Gehirn adulter <i>S. frugiperda</i> Männchen unterschiedlichen Alters. | 82 |
| Abb. 11 | Suppression der AS-C und AT 2 Genexpression im Gehirn und Darm der Larven von <i>S. frugiperda</i> . | 84 |
| Abb. 12 | Suppression der AS-C und AT 2 Genexpression im Gehirn von adulten <i>S. frugiperda</i> Weibchen. Kontrollinjektionen mit Sulfa-kinin (SK-2)-dsRNA aus <i>G. bimaculatus</i> . | 86 |
| Abb. 13 | Suppression der AS-C und AT 2 Genexpression im Gehirn von adulten <i>S. frugiperda</i> Männchen. | 87 |
| Abb. 14 | Auswirkung der Suppression der Genexpression auf die Körpergewichtszunahme bei Larven von <i>S. frugiperda</i> . | 90 |
| Abb. 15 | JH-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von <i>S. frugiperda</i> . | 91 |
| Abb. 16 | JH-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von <i>S. frugiperda</i> nach Suppression der Genexpression mit AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA. | 92 |
| Abb. 17 | ES-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von <i>S. frugiperda</i> nach Suppression der Genexpression mit AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA. | 93 |
| Abb. 18 | JH-Hämolymphtiter in adulten unverpaarten <i>S. frugiperda</i> Weibchen nach Gensuppression mit AS-C- und AT 2-dsRNA. | 95 |
| Abb. 19 | JH-Hämolymphtiter in adulten verpaarten <i>S. frugiperda</i> Weibchen. | 96 |
| Abb. 20 | JH-Hämolymphtiter und Ecdysteroid-Titer in adulten verpaarten Weibchen von <i>S. frugiperda</i> nach Gensuppression. | 97 |
| Abb. 21 | JH-Hämolymphtiter in adulten unverpaarten <i>S. frugiperda</i> Männchen. | 99 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Abb. 22 | Vergleich der JH-Titer in der Hämolymphe von adulten unverpaarten und verpaarten mit Ringer injizierten Weibchen mit adulten unverpaarten und mit Ringer injizierten Männchen. | 100 |
| Abb. 23 | Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe von adulten unverpaarten Weibchen von <i>S. frugiperda</i> nach Gensuppression. | 101 |
| Abb. 24 | JH-Titer in akzessorischen Drüsen von adulten <i>S. frugiperda</i> Männchen vor und nach Gensuppression. | 104 |
| Abb. 25 | JH-Titer in der Bursa copulatrix von adulten <i>S. frugiperda</i> Weibchen, die mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren. | 106 |
| Abb. 26 | Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf die Oviposition adulter <i>S. frugiperda</i> Weibchen. | 109 |
| Abb. 27 | Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen der Weibchen auf die Anzahl der bei den Verpaarungen aufgenommenen Spermatophoren. | 110 |
| Abb. 28 | Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Ovargewicht von adulten <i>S. frugiperda</i> Weibchen. | 113 |
| Abb. 29 | Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf die Gesamtproduktionsleistung von <i>S. frugiperda</i> Weibchen. | 115 |
| Abb. 30 | Auswirkungen der Suppression der AS-C bzw. AT 2 Genexpression bei adulten <i>S. frugiperda</i> Männchen auf die Oviposition der mit diesen Männchen verpaarten Weibchen. | 117 |
| Abb. 31 | Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Hodengewicht von unverpaarten und verpaarten <i>S. frugiperda</i> Männchen. | 121 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Bekannte Strukturen und Funktionen der B-Typ Allatostatin Peptide | 9 |
| Tabelle 2: Lösungsmittelzusammensetzung im Wasch-, Elutions- und Spülschritt des HPLC-Laufes | 33 |
| Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz | 35 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung des Ligationsansatzes | 42 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung des Restriktionsverdau | 49 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung des DNase-Verdau | 52 |
| Tabelle 7: PCR-Programm für die Herstellung des T7-AS-C Fragments | 54 |
| Tabelle 8: PCR-Programm für die Herstellung des T7- AT 2 Fragments | 54 |
| Tabelle 9: PCR-Programm für die Herstellung des T7-Sulfakinin-Fragments | 55 |
| Tabelle 10: Pipettierschema für den Transkriptionsansatz | 56 |
| Tabelle 11: Zusammenstellung der Komponenten für die RT-Reaktion | 58 |
| Tabelle 12: Temperaturprofil für die Reverse Transkription | 59 |
| Tabelle 13: PCR-Programm für die Amplifizierung der Fragmente | 60 |
| Tabelle 14: Zusammensetzung eines Ansatzes für die RT-Reaktion | 61 |
| Tabelle 15: Temperaturprofil für die RT-Reaktion | 61 |
| Tabelle 16: Zusammenstellung des Ansatzes für die Real-time PCR | 61 |
| Tabelle 17: Real-time PCR-Programm | 63 |
| Tabelle 18: Sterblichkeit von <i>S. frugiperda</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien | 73 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| A | Absorptionsmaximum |
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetat |
| ACN | Acetonitril |
| ad | adult |
| AD | Akzessorische Drüsen |
| Ak | Antikörper |
| AKH | adipokinetisches Hormon |
| Akt | β-Aktin |
| Amp | Ampicillin |
| AS | Aminosäure/ Allatostatin |
| ASG | accessory sex glands |
| AT | Allatotropin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Konzentration |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Corpora allata |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CC | Corpora cardiaca |
| cDNA | complementary oder copy DNA |
| cm | Zentimeter |
| Cp | Crossing point |
| C _t /C _t | Cycle threshold |
| d | day (Tag) |
| 0d | frisch geschlüpft |
| Da | Dalton/ Darm |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| dATP | 2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytosin 5'-Triphosphat |

| | |
|-------------------|--|
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | 2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat |
| <i>Dippu</i> -AST | <i>Diploptera punctata</i> -Allatostatin |
| Dig-11-dUTP | Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'-Triphosphat |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | 2' – Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxiribonuklease |
| dNTP | Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dUTP |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| dTTP | 2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat |
| dUTP | 2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ES | Ecdysteroide |
| 20HE | 20-Hydroxyecdysion |
| EtOH | Ethanol |
| F-PBS | 4 % Paraformaldehyd in phosphate buffered saline |
| FS | Fettsäure |
| g | Gramm oder standard gravitation |
| G | Gehirn |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| gDNA | genomische DNA |
| GE | Germarium |
| H | Stunde |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzsäure) |
| Ho | Hoden |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IGR | insect growth regulators |

| | |
|---------------------------------|--|
| immun. | immunologisch |
| IOD | integrierte optische Dichte |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactosid |
| JH | Juvenilhormone |
| JHBP | Juvenilhormon-bindende Proteine |
| JHE | Juvenilhormon-Esterase |
| JHEH | JH Epoxid-Hydrolasen |
| K | Kontrolle |
| Kb | Kilobasenpaare |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| l | Liter |
| L | Längenstandard oder Larven |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| LC-MS | Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| LL | letztes Larvenstadium |
| Lsg. | Lösung |
| M | Molar oder Männchen |
| Manse-AST | <i>Manduca sexta</i> -Allatostatin |
| Manse-AT | <i>Manduca sexta</i> -Allatotropin |
| MCS | Multiple cloning site |
| β -Me | β -Mercaptoethanol |
| MeOH | Methanol |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min. | Minute |
| MIP | myoinhibitorische Peptide |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| mRNA | messenger RNA |

| | |
|---|--|
| N | Teilchenzahl (ist die Zahl der Teilchen eines Körpers der Stoffmenge n) |
| N ₂ | Stickstoff |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumsalz |
| ng | Nanogramm |
| NG-Ringer | Niedrig-Glucose-Ringer |
| NH ₄ OH | Ammoniaklösung/Ammoniumhydroxid |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | Ammoniumsulfat |
| nm | Nanometer |
| ns | nicht signifikant |
| nt | Nukleotide |
| NTC | non template control |
| OD | optische Dichte |
| Oligo(dT) | Oligonukleotid aus Deoxythymidin-nukleotiden |
| OSG | Oberschlundganglion |
| p.a. | pro analysi |
| PAP | Peroxidase-anti-Peroxidase |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PBT | PBS + 0,1 % Tween20 |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Pyroglutamat |
| pg | Pikogramm |
| pH | pondus Hydrogenii/potentia Hydrogenii, pH-Wert |
| pmol | Pikomol |
| PP | Präpuppenstadium |
| PTGS | Posttranscriptional gene silencing |
| PTSP | prothoracicostatic peptides |
| R | Ringer |
| RACE | Rapid amplification cDNA end |
| RdRP | RNA dependent RNA-polymerase |

| | |
|--------------|---|
| RecRNA | rekombinante RNA |
| RISC | RNA-inducing silencing complex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA Interferenz |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | ribosomale RNA |
| rpm | rounds per minutes (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Reverse Transkription/ Raumtemperatur/ reverse Transkriptase |
| RT-PCR | reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| RZ | Reifungszone |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec. | Sekunde |
| sequ. | sequenziert |
| siRNA | small interfering RNA |
| SK | Sulfakinin |
| SOC | SOB + Glucose |
| Spofr | <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| ssRNA | single strand RNA |
| SYBR Green I | 2-{2-[3-Dimethylamino-propyl)-propyl- amino]-1-phenyl- 1Hchinolin-4-yliden- methyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium- Kation |
| T | Temperatur |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Unit |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| VE | voll entsalzt |
| % (v/v) | Volumenprozent pro Volumen |
| % (w/v) | Gewichtsprozent pro Volumen |
| W | Weibchen |
| Wt | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ M | mikromolar |

1 Einleitung

1.1 Der Nachtfalter *Spodoptera frugiperda*

Insekten haben eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung unserer Ökosysteme. Etwa 1 % der Insekten gelten als Schädlinge [Pedigo, 1996]. Die Ordnung der Lepidoptera umfasst weit mehr als 160.000 Arten und zählt damit nach den Coleoptera bei den Tieren zu der Gruppe mit der größten Biodiversität. In dieser Ordnung umfasst die Familie der Noctuidae (>50.000 Arten) die meisten Arten und beinhaltet einige Vertreter, die als große Schädlinge in der Landwirtschaft gelten. Diese Nachtfalter sind auf allen Kontinenten zu finden und befallen wichtige Kulturpflanzen. Zu ihnen gehört auch der Agrarschädling *S. frugiperda*, der im Südosten der USA beheimatet ist und dort als Schädling mit breitem Nahrungsspektrum gilt. Dieser zeigt keine Diapause, sondern überwintert in Florida und Texas [Pitre & Hogg, 1983]. Das Weibchen verpaart sich einige Male und lockt die Männchen mit Pheromonen an [Sekul & Sparks 1976]. Es ist Kannibalismus zu beobachten, der unabhängig vom Geschlecht, jedoch häufiger beim Weibchen auftritt, was wahrscheinlich auf die energetisch höheren Kosten wie Oviposition und Eientwicklung zurückzuführen ist. Ein Weibchen legt insgesamt 1.500-2.000 Eier ab. Das Lebensalter beträgt 7-21 Tage und es entwickeln sich 5-10 Generationen im Jahr [Sparks, 1979]. Die Ernteeinbußen für die Landwirtschaft umfassen ca. 5-20 %. Dieser Schädling hat auch einige natürliche Feinde, darunter *Cotesia marginiventris*, *Chelonus texanus*, *Archytas marmoratus*, *Labidura riparia* (Dermaptera), Käfer, Vögel, Skunks, Nagetiere und Pilze: *Entomophaga aulicae*, *Nomuraea rileyi*, *Erynia radicans*.

1.2 Das endokrine System der Insekten

Ebenso wie Vertebraten besitzen Insekten ein hoch entwickeltes endokrines System, dessen Botenstoffe als Hormone bezeichnet werden. Diese werden in endokrinen Drüsen gebildet, in die Hämolymphe ausgeschüttet und steuern viele

unterschiedliche Prozesse, unter anderem Wachstum, Metamorphose und Reproduktion. Die bei Insekten identifizierten Hormone gehören verschiedenen chemischen Stoffklassen an [Gäde et al., 1997].

1.2.1 Juvenilhormone und Ecdysteroide

Juvenilhormone (JH) und Ecdysteroide (ES) haben grundlegende Funktionen bei der Regulierung der Entwicklung, der Reproduktion und des Verhaltens [Feyereisen, 1985]. Juvenilhormone sind Sesquiterpenoide, die in den Corpora allata (CA) synthetisiert und aus ihnen freigesetzt werden. Zusammen mit den Corpora cardiaca (CC) bilden die CA den Retrocerebralkomplex, der eine neurale Verbindung zum Gehirn hat. Die JH-Biosynthese findet hauptsächlich in den CA statt, aber auch in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen von männlichen Moskitos wird vermutlich JH produziert [Borovsky et al., 1994]. Eine wichtige Funktion der JH ist die Regulierung der Metamorphose in der postembryonalen Entwicklung als Gegenspieler von Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson (20HE). Die Anwesenheit von JH verhindert bei holometabolen Insekten, dass Larven das Puppenstadium oder Puppen das Adultstadium erreichen [Riddiford, 1994, 1996]. An einem kritischen Punkt während der letzten Häutung verschwindet JH und schafft damit die Grundlage für die Metamorphose zum Imago [Riddiford, 1994; Goodman & Granger, 2005]. Bei Adulten scheint die Regulierung der Reproduktion eine der hauptsächlichsten Aufgaben von JH zu sein, aber auch andere Funktionen wurden gefunden. So spielt JH z.B. eine Rolle in der Diapause von Insekten, bei der Migration, der Färbung, der Kastendifferenzierung bei sozialen Insekten, der Regulierung des Verhaltens z.B. von Honigbienen und dem Polyphänismus bei Läusen oder Heuschrecken [Wyatt & Davey, 1996; Nijhout, 1998].

Bei adulten Weibchen werden gonadotrope Funktionen wie die Vitellogenese und Einlagerung von Vitellogenin in die Ovarien, sowie die Reifung von Ovarien durch JH reguliert. Beim Männchen werden durch JH die Spermatogenese und das Wachstum der akzessorischen Drüsen, aber auch das Paarungsverhalten [Koepppe et al., 1985; Steel & Davey, 1985; Nijhout, 1994; Riddiford, 1994; Wyatt & Davey, 1996; Gäde et al., 1997] beeinflusst.

Von den Männchen bei der Kopula übertragene Substanzen können die Produktion von JH in den Weibchen stimulieren [Park et al., 1998].

Substanzen, die mit der Spermatophore übertragen werden, verhindern die Paarungsbereitschaft und stimulieren Oviposition und Eireifung [Gillott, 2003]. Bei Lepidopteren wie *Heliothis virescens* wird die Eireifung durch JH aus der akzessorischen Drüse der Männchen stimuliert [Park & Ramaswamy, 1998]. Bei *Cecropia* haben die Männchen große Mengen JH in ihrer akzessorischen Drüse und übertragen dieses bei der Verpaarung auf die Weibchen [Shirk et al., 1980, 1983].

Der JH-Titer in der Hämolymphe der Tiere wird durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren reguliert. Der wichtigste Faktor ist die JH-Biosynthese, die durch allatotrope und allatostate Faktoren beeinflusst wird. Zudem wird der JH-Metabolismus mittels katabolischer Enzyme gesteuert [Browder et al., 2001].

Die Ecdysteroide leiten sich von Sterolen ab, zu denen das Cholesterin zählt, und wurden erstmals aus *Bombyx mori* isoliert [Butenandt & Karlson, 1954]. Ecdysteroide finden sich aber nicht nur bei Insekten, sondern auch bei anderen Tieren und Pflanzen [Lafont & Horn, 1989]. In Insektenlarven werden sie in den prothorakalen Drüsen gebildet, in die Hämolymphe abgegeben und kontrollieren die Entwicklung und Metamorphose zum Imago [Rees, 1989; Grieneisen, 1994]. Bei allen Arthropoden sind sie an der Häutung beteiligt [Riddiford, 1985; Gilbert et al., 2002], aber sie haben auch verschiedene andere Funktionen unter anderen während der Embryogenese, der Metamorphose, Ecdysis, Reproduktion, Diapause, im Energiestoffwechsel oder bei der Pheromonbiosynthese [Koolman, 1982; Denlinger, 1985; Hagedorn, 1985; O'Connor, 1985; Steel & Davey, 1985; Truman, 1985]. Die weibliche Paarungsbereitschaft ist mit der Eireifung verbunden, deren wichtiger Regulator 20HE ist, das von den Ovarien adulter Weibchen produziert werden kann [Buszczak et al., 1999]. Bei Adulten werden die Ecdysteroide i.d.R. in den Follikelzellen der Ovarien [Grieneisen, 1994; Romañá et al., 1995] und in den Hoden [Koolman et al., 1979; Loeb et al., 1984, 2001] produziert und sind an der Reifung und Funktion der männlichen und weiblichen Reproduktionsorgane beteiligt [Hagedorn et al., 1985; Simonet et al., 2004; Gäde & Hoffmann, 2005].

1.2.2 Regulation der Juvenilhormonbiosynthese

Die JH-Biosynthese in den CA wird über Neuropeptide wie stimulierende Allatotropine und inhibierende Allatostatine reguliert, welche die Drüsen über die Hämolymphe und/ oder über nervöse Verbindungen erreichen [Gäde et al., 1997, 2002; Bendena et al., 1999; Nässel, 1999, 2002; Stay, 2000; Goodman & Granger, 2005]. Die Biosynthese von Ecdysteroiden wird durch Ecdysiotropine und Ecdysiostatine gesteuert. Neuropeptide die direkt Einfluss auf die Gonaden haben, werden als Gonadotropine bzw. Antigonadotropine bezeichnet [Gäde & Hoffmann, 2005].

Unter dem Begriff Neuropeptide werden, obwohl sie sich strukturell stark unterscheiden, Substanzen zusammengefasst, die in neurosekretorischen Zellen synthetisiert und gespeichert werden. Neuropeptide wirken auf unterschiedliche Weise als Hormone, über direkte Innervierung, Neuromodulation oder über parakrine Effekte [Gäde et al., 1997; Predel & Eckert, 2000; DeLoof et al., 2001; Hewes & Taghert, 2001; Orchard et al., 2001; Vanden Broeck, 2001; Nässel, 2002]. Diese kurzen Proteinbotenstoffe sind Hauptregulatoren verschiedenster zellulärer Vorgänge wie z.B. embryonale und postembryonale Entwicklung, Wachstum, Reproduktion, Fressverhalten, Metabolismus, Osmoregulation, Homöostase, Migration, und Verhalten [Gäde et al., 1997; Stay, 2000; Nässel et al., 2002; Bellés & Maestro, 2005]. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten werden Neuropeptide in verschiedenen Familien zusammengefasst.

Neuropeptide, die die Juvenilhormon-Biosynthese in den CA stimulieren, werden Allatotropine genannt, während diejenigen mit hemmender Wirkung auf die JH-Produktion Allatostatine heißen [Stay et al., 1994]. Zusammengefasst werden sie als allatoregulierende Neuropeptide bezeichnet.

Die vielen Formen der Allatostatine können aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt werden: Den A-Typ (FGL-amide), den B-Typ [W(X)₆W-amide] und den C-Typ (PISCF). Die bisher bekannten Allatotropine (AT) unterscheiden sich funktionell und strukturell sehr von den Allatostatinen (AS). Sie haben die C-terminale Sequenz TARGFa und sind amidiert. Die Allatotropine wurden wegen ihrer stimulierenden Wirkung auf die Juvenilhormon-Biosynthese der CA bei Schmetterlingen benannt, zeigten aber bei näherer Betrachtung auch neurale,

endokrine und myoaktive Funktionen [Gäde et al., 1997, 2002; Elekonich & Horodyski, 2003].

1.2.3 Allatotropine

Das erste amidierete Tridecapeptid das die JH-Biosynthese der CA von adulten Weibchen stimulierte, wurde aus dem Kopfextrakt adulter *Manduca sexta* isoliert [Kataoka et al., 1989], kloniert [Taylor et al., 1996] und als Allatotropin (AT) (GFKNVEMMTARGF-NH₂) bezeichnet. Die Expression von Manse-AT wurde von Horodyski et al., 2001 untersucht. Aus *Pseudaletia unipuncta* sowie aus *Agrius convolvuli* [Elekonich & Horodyski, 2003] wurde eine identische Sequenz wie aus *M. sexta* isoliert [Truesdell et al., 2000], und auch das aus *B. mori* klonierte Präprohormon beinhaltet die Manse-AT-Peptid Sequenz [Park et al., 2002].

Manse-AT stimuliert die JH-Biosynthese bei der Honigbiene, *Apis mellifera* [Rachinsky & Feldlaufer, 2000] und der Fliege *Phormia regina* [Tu et al., 2001]. Die JH-Biosynthese in larvalen CA konnte zum Beispiel bei *Lacanobia oleracea*, *Samia cynthia ricini* [Audsley et al., 2000; Li et al., 2002] und *Galleria mellonella* [Bogus & Scheller, 1996] durch AT aktiviert werden. Außerdem wurde bei adulten *Locusta migratoria* [Lehmborg et al., 1992], *Schistocerca gregaria* [Veelaert et al., 1996], *Gryllus bimaculatus* [Lorenz & Hoffmann, 1995], *Diploptera punctata* [Unnithan et al., 1998] und bei adulten Weibchen von *Pyrrhocoris apterus* [Hodkova et al., 1996] allatotrope Aktivität nachgewiesen.

Es wurden weitere Homologe oder AT-ähnliche Peptide aus *L. migratoria* [Paemen et al., 1991], *Leptinotarsa decemlineata* [Spittaels et al., 1996], *Aedes aegypti* [Veenstra & Costes, 1999; Li et al., 2003], und in unserer Arbeitsgruppe aus *S. frugiperda* [Oeh et al., 2000] isoliert.

Die aktivierende Funktion des AT beschränkte sich nicht nur auf die CA, sondern konnte bei *M. sexta* und *P. unipuncta* auch auf den Herzschlag [Veenstra et al., 1994; Koladich et al., 2002] nachgewiesen werden. Außerdem konnte ein myotroper Effekt auf den Darm bei *Helicoverpa armigera* und *H. virescens* gezeigt werden [Duve et al., 1999, Oeh et al., 2003].

Bei *M. sexta* wirkte AT hemmend auf den Ionentransport im larvalen Mitteldarm *in vitro* [Lee et al., 1998, 2002].

In unserer Arbeitsgruppe konnte aus *S. frugiperda* eine cDNA Sequenz identifiziert werden, von der ein als Spofr-AT 2 (AT 2) benanntes Peptid abgeleitet wurde. Dieses ist C-terminal strukturell mit dem Manse C-Typ Allatostatin verwandt, zeigt aber eine allatotrope Wirkung auf die JH-Biosynthese der CA *in vitro* bei 2 und 3 Tage alten adulten Weibchen [Abdel-Latif et al., 2004 c]. Northern Blots zeigten, dass ein einziges Transkript von diesem Gen exprimiert wird und RT-PCR Analysen ergaben eine entwicklungsabhängige Expression im Gehirn, Mitteldarm und Ovar von *S. frugiperda*. Bei der weiten Verbreitung von Manse-AT immunreaktiven Zellen im Nervensystem verschiedener Insektenarten sind vielfältige Funktionen für die Allatotropine zu erwarten [Veenstra & Hagedorn, 1993; Veenstra et al., 1994; Zitnan et al., 1993, 1995; Persson & Nässel, 1999; Rudwall et al., 2000; Tu et al., 2001]. Der erste AT-Rezeptor wurde aus *B. mori* molekular charakterisiert [Yamanaka et al., 2008].

1.2.4 A-Typ Allatostatine

Derzeit sind über 200 Peptide der A-Typ Allatostatine bei Insekten (z.B. Dictyoptera, Ensifera, Caelifera, Diptera und Lepidoptera) [Donly et al., 1993; Duve et al., 1993; Ding et al., 1995; East et al., 1996; Vanden Broeck et al., 1996; Davis et al., 1997; Gäde et al., 1997; Veenstra et al., 1997; Weaver et al., 1998; Belles et al., 1999; Bendena et al., 1999; Davey et al., 1999; Hoffmann et al., 1999; Lenz et al., 2000 a; Meyering-Vos et al., 2001], und anderen Invertebraten [Duve et al., 1997 b, 2002; LaTrelle et al., 1997; Dircksen et al., 1999; Fu et al., 2005; Yin et al., 2006] nachgewiesen worden. Peptide der A-Typ AS scheinen weit verbreitet zu sein und wurden durch immunohistochemische Färbungen mittels eines A-Typ AS Antikörpers in verschiedenen Zellen von z.B. Hydrozoa, Cestoda, Trematoda, Turbellaria, Nematoda, Oligochaeta, Gastropoda, und Cephalopoda [Smart et al., 1994, 1995], und sogar im Gehirn von Ratten, nachgewiesen [Oster et al., 2002]. Methoden der Peptidisolierung waren Gewebeextrakte und HPLC, identifiziert wurden sie immunochemisch, mit Hilfe von Massenspektrometrie oder über molekularbiologische Analysen. Immunhistochemische und Hybridisierungsstudien zeigten eine weite Verbreitung der Peptide bzw. deren Precursor in verschiedensten Geweben, wie im Gehirn/Retrocerebralkomplex, anderen Bereichen des

Nervensystems, im Darmtrakt [Reichwald et al., 1994], und auch in den Reproduktionsorganen [Bendena et al., 1999; Stay, 2000; Meyering-Vos & Hoffmann, 2003, Abdel-Latief et al., 2004 a; Bellès & Maestro, 2005; Gäde & Hoffmann, 2005], was auf eine multifunktionale Rolle der Peptide hinweist.

Eine generelle Funktion von Peptiden aus allen Allatostatin-Gruppen scheint ihre myoinhibitorische Aktivität in viszeralen Geweben zu sein. Ansonsten scheinen sie pleiotrope Funktionen bei verschiedenen biologischen Prozessen zu haben, wie Versuche mit synthetischen Peptiden in *in vitro* Bioassays zeigten.

Eine Hemmung der Juvenilhormonbiosynthese in den CA *in vitro* durch A-Typ Allatostatine wurde nur bei Schaben, Grillen und Termiten nachgewiesen [Woodhead et al., 1989; Lorenz et al., 1995; Hoffmann et al., 1999; Yagi et al., 2005]. Weitere Untersuchungen ergaben myoinhibitorische Wirkungen dieser Peptide auf die viszerale Muskulatur z.B. des Darmtraktes und der Eileiter [Gäde & Hoffmann, 2005; Stay & Tobe, 2007], aber auch auf den Herzschlag bei Schaben [Vilaplana et al., 1999]. Zudem inhibieren A-Typ Allatostatine die Vitellogeninproduktion und Vitellogeninfreisetzung im bzw. aus dem Fettkörper von Schaben [Martin et al., 1996, 1998]. Experimente zur Futteraufnahme [Aguilar et al., 2003] und Verdauung ergaben eine Reduktion der Futteraufnahme und eine Aktivierung kohlenhydratverdauender Enzyme im Mitteldarm von Schaben [Fuse et al., 1999; Aguilar et al., 2003; Sakai et al., 2006].

Es wurden mehrere Rezeptoren für die A-Typ Allatostatine z.B. aus *Drosophila melanogaster*, [Birgül et al., 1999; Lenz et al., 2000, 2001], aus *Periplaneta americana* [Auerswald et al., 2001] und *B. mori* [Secher et al., 2001; Gäde et al., 2002] identifiziert und auf ihre Aktivierung durch A-Typ AS Peptide als Liganden getestet [Larsen et al., 2001]. Die A-Typ AS Rezeptoren werden hauptsächlich im Mitteldarm exprimiert [Lenz et al., 2001 b, c]; eine Expression des A-Typ AS Rezeptors aus *B. mori* konnte auch im Gehirn und in anderen Teilen des Verdauungssystems detektiert werden [Secher et al., 2001].

1.2.5 B-Typ Allatostatine

Bei der Mittelmeerfeldgrille, *G. bimaculatus*, wurde eine große Anzahl von Neuropeptiden identifiziert [Lorenz et al., 1995], die sich strukturell von den A-Typ Allatostatinen aus *D. punctata* unterscheiden, aber ebenfalls allatostate Aktivität haben und als B-Typ Allatostatin Peptide benannt wurden.

B-Typ Allatostatin Peptide sind am C-Terminus amidiert und besitzen in der Regel 9 Aminosäuren, wobei die 2. und 9. ein Tryptophan ist [W(X₆)W] (Tab. 1). Die ersten B-Typ AS Peptide wurden bei der Heuschrecke *L. migratoria* identifiziert und als Lom-MIP I und II (myoinhibitorisches Peptid) bezeichnet, da sie inhibitorisch auf den Enddarm und die Kontraktionen des Ovidukts *in vitro* wirkten [Schoofs et al., 1991, 1993]. Ähnliche Peptide wurden bei verschiedenen Schmetterlingsarten [Blackburn et al., 1995 a; 2001; Hua et al., 1999; Audsley & Weaver, 2003 a, b], bei *P. americana* (Peram-MIP) [Predel et al., 2001], bei *A. mellifera* [Christie et al., 2008], bei *Tribolium castaneum* [Weaver & Audsley, 2008] und bei *Carausius morosus* [Lorenz et al., 2000] gefunden. Zudem konnte ein B-Typ Allatostatin Peptid bei *Cancer productus* [Fu et al., 2005] identifiziert werden.

Aus *G. bimaculatus* wurden fünf Peptide isoliert, die inhibitorische Wirkung auf die Juvenilhormon-Biosynthese der CA *in vitro* [Lorenz et al., 1995 b, 1999] zeigten. Bei Grillen hatten diese Allatostatine zusätzlich eine inhibitorische Wirkung auf die ovarielle Ecdysteroidbiosynthese [Lorenz et al., 1997]. Von *D. melangaster* [Williamson et al., 2001 a] und *B. mori* [Tanaka & Hua, 2001] sind vergleichbare B-Typ AS Peptide bzw. ihre Prohormone bekannt. Bei Larven von *B. mori* wurde eine Hemmung der Ecdysteroidbiosynthese in den Prothoraxdrüsen durch B-Typ Allatostatine beobachtet, weshalb diese Neuropeptide auch als „prothoracicostatic peptides“ (Bom-PTSP) bezeichnet wurden. Bei Heuschrecken konnte eine myoinhibitorische Funktion auf die spontane Kontraktion des Hinterdarms und des Ovidukts *in vitro* nachgewiesen werden [Schoofs et al., 1991], und bei *M. sexta* eine Hemmung der Peristaltik des Hinterdarms [Blackburn et al., 1995]. Dies führte dazu, dass Neuropeptide aus dieser Familie bei diesen Insekten auch als myoinhibitorische Peptide (MIP) bezeichnet wurden (Tab. 1). Bei *L. migratoria* inhibiert das Lom-MIP die durch eine Erhöhung des cAMP Spiegels induzierte Freisetzung des adipokinetischen Hormons (AKH) [Vullings et al., 1999].

Interessanterweise haben einige B-Typ AS Peptide Sequenzähnlichkeiten zum N-Terminus des Galanin Neuropeptids von Vertebraten [Blackburn et al., 1995].

Bisher sind cDNA Strukturen für B-Typ Allatostatine von *D. melanogaster* [Williamson et al., 2001], *B. mori* (nicht publiziert, GeneDatabank Accession Number AB 073553) und *G. bimaculatus* [Teilsequenz: Wang et al., 2004 a] charakterisiert worden. In allen Fällen sind mehrere mögliche B-Typ Peptide auf einem Prohormonprecursor codiert.

Immunohistochemisch konnten die Peptide im Gehirn/Retrocerebralkomplex, in der ventralen Nervenketten, in Nervenfasern, die die Muskeln des Herzen, des Ovidukts und des Hinterdarms innervieren, in den Speicheldrüsen und auch in Ovarien nachgewiesen werden [Schoofs et al., 1996; Witek et al., 1999, 2001; Predel et al., 2001; Davis et al., 2003]. Da die Immunreaktionen gegenüber MIP im Verlauf der Entwicklung von *M. sexta* und *B. mori* kurz vor der Häutung besonders intensiv war, und kurz danach wieder abnahm, wurde dies als Hinweis auf eine Rolle der Peptide im Häutungsprozess betrachtet. In Hybridisierungsstudien konnte beobachtet werden, dass die Expression des B-Typ AS Gens in allen Stadien der Entwicklung von *D. melanogaster* stattfindet. Bei Grillen wurde mit der One-Step RT-PCR, RNA dot blot Analysen und der RT-*in situ*-PCR-Methode eine Expression in verschiedensten Geweben wie dem Zentralnervensystem, den Verdauungs- und Reproduktionsorganen, dem Fettkörper und der Thoraxmuskulatur nachgewiesen [Wang et al., 2004 a, b].

Bisher ist nur ein G protein-gekoppelter Rezeptor (CG14484) aus *D. melanogaster* bekannt, der spezifisch B-Typ Allatostatine bindet [Johnson et al., 2003]. Dieser Rezeptor ist strukturell mit dem Bombesin-Rezeptor der Vertebraten verwandt.

Tabelle 1: Bekannte Strukturen und Funktionen der B-Typ Allatostatin Peptide

Vergleich der Aminosäuresequenz von B-Typ Allatostatin Homologen bei verschiedenen Tiergruppen im Bereich des Sequenzmotives. Die Namen leiten sich oftmals von ihrer zuerst beobachteten Funktion her. Außerdem wurde noch der Nachweis für die bekannten Sequenzen dargestellt.

| | Aminosäuresequenz | Name | Nachweis | Funktion |
|---|--------------------------|-------------|-----------------|------------------|
| Caelifera <i>Locusta migratoria</i> | AWQDLNAGWamid | Locmi-MIP | sequ. immun. | myoinhibitorisch |

| | | | | |
|--|------------------|---------------|----------------|----------------|
| | AWSSLHSGWamid | Bommo-PTSP4 | | Prothoraxdrüse |
| | AWSALHGTWamid | Bommo-PTSP5 | | |
| | GWNDISSVWamid | Bommo-PTSP6 | | |
| | SWQDLNSVWamid | Bommo-PTSP7 | | |
| | APEKWAAFHGSWamid | Bommo-PTSP8 | | |
| Coleoptera <i>Tenebrio molitor</i> (<i>Tribolium castaneum</i>) | DWNKDLHIWamid | Trica-AST-B-1 | MS (genom.) | nicht bekannt |
| | GWNNLHEGWamid | Trica-AST-B-2 | | |
| | AWQSLQSGWamid | Trica-AST-B-3 | | |
| | NWGQFHGGWamid | Trica-AST-B-4 | | |
| | SKWDNFRGSWamid | Trica-AST-B-5 | | |
| | EPAWSNLGIWamid | Trica-AST-B-6 | | |

Abkürzungen: genom.: genomische Datenbank; sequ.: isolierte und sequenzierte Peptide; MS: Massenspektrometrie; immun.: immunologische Nachweise; cDNA: von einer cDNA abgeleitet und isoliert.

1.2.6 Allatostatin C-Typ

Die Allatostatine des C-Typs, die i.d.R. das C-terminale Sequenzmotiv PISCF-OH tragen, sind nicht immer amidiert. Zuerst wurden sie aus *M. sexta* isoliert und aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf die *in vitro* Juvenilhormon-Biosynthese benannt [Kramer et al., 1991]. Das Manse-AS Peptid wird i.d.R. posttranslational N-terminal modifiziert, was zu einer Blockierung mit Pyroglutamat (pE) führt. Diese Modifizierung dient wahrscheinlich dem Schutz kleiner Peptide gegen den Abbau durch Exopeptidasen. Eine weitere Charakteristik dieser Peptide sind zwei Cystein-Reste, die wahrscheinlich intramolekulare Brücken bilden [Gäde, 2002]. Weitere ähnliche Sequenzen wurden bei *Lacanobia oleracea*, *H. virescens*, *Helicoverpa zea* und bei *Spodoptera littoralis* [Audsley et al., 1998, 1999, 2000, 2005; Edwards et al., 2001; Teal, 2002; Audsley & Weaver, 2003] gefunden. Einige Zeit galt das Manse-AS als schmetterlingsspezifisch, allerdings wurde dann ein ähnliches Peptid bei *D. melanogaster* [Williamson et al., 2001; Price et al., 2002] identifiziert und auch aus dem Genom von *Anopheles gambiae* [Riehle et al., 2002], sowie später von *A aegypti* [Li et al., 2006], abgeleitet. Vor kurzem wurde das Peptid bei *T. castaneum* [Li et al., 2008] nachgewiesen. Die cDNA Strukturen sind bisher aus *P. unipuncta*

[Jansons et al., 1996], *S. frugiperda* [Abdel-latif et al., 2003], *S. cynthia ricini* [Sheng et al., 2007] und *D. melanogaster* [Williamson et al., 2001 b] charakterisiert worden, wobei der Prohormonprecursor in allen Fällen nur jeweils ein PISCF-Peptid enthält. Bei der Honigbiene wurde ein Peptid isoliert, das sich von den anderen AS-C Peptiden unterscheidet, so dass es nicht als AS-C erkannt wurde [Hummon et al., 2006]. Auch aus anderen Insekten konnten Peptide isoliert werden, die Sequenzähnlichkeiten mit dem AS-C der Honigbiene haben. Diese Peptide sind C-terminal amidiert, aber N-terminal nicht blockiert [Veenstra et al., 2008].

Bei Lepidopteren hemmen AS-C Peptide die JH-Biosynthese der CA *in vitro* [Gäde & Hoffmann, 2005]. Synthetisches Manse-AS beeinflusst die *in vitro* Juvenilhormon-Sekretion der CA adulter *S. frugiperda* nicht direkt, allerdings wird die Juvenilhormon-Biosynthese gehemmt, wenn die CA vorher mit Allatotropin von *M. sexta* aktiviert wurden [Oeh et al., 2000]. Die JH-Biosynthese in den CA von *P. americana*, *Melanoplus sanguinipes* und *Tenebrio molitor* wird durch Manse-AS nicht beeinflusst [Kramer et al., 1991].

Bei der Mücke *A. aegypti* kommt es zu einer Hemmung der JH-Biosynthese in den CA *in vitro* durch ein zum Manse AS-C verwandtes Peptid [Li et al., 2004]. AS des C-Typs werden in einer zeit- und gewebespezifischen Weise im Gehirn, im Verdauungstrakt und in reproduktiven Geweben exprimiert [Jansons et al., 1996; Abdel-Latif et al., 2004 b]. Bei *D. melanogaster* werden Peptide diesen Typs im Gehirn, den Ventralganglien und im Darm exprimiert und zeigen eine myotrope Wirkung auf den Kropf und den Herzschlag [Price et al., 2002].

Es konnten zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus *D. melanogaster* isoliert werden, die durch das AS-C-Typ aktiviert werden können [Kreienkamp et al., 2002], und die strukturell mit der Opioid/Somatostatin-Rezeptorfamilie verwandt sind. Außerdem wurde ein Rezeptor bei *D. punctata* [Lungchukiet et al., 2008], *P. americana* [Auerswald et al., 2001], *A. mellifera*, *T. molitor* und *B. mori* gefunden [Hauser et al., 2008; Yamanaka et al., 2008].

1.2.7 Allatostatin CC-Typ

Bei Arthropoden wurde ein zweites Gen gefunden, dessen abgeleitetes Peptid Ähnlichkeiten zum AS-C Peptid aufweist, und als AST-CC bezeichnet wird [Veenstra,

2008]. Es wurden Gene für beide Peptide bei *Ixodes scapularius*, Dipteren, Coleopteren, Aphidoideen und Phthirapteren identifiziert. Teile oder auch vollständige cDNA`s abgeleitet von AST-CC wurden bei einer großen Zahl von Arten einschließlich *D. melanogaster*, *B. mori* und *Rhodnius prolixus* gefunden.

AST-C (AS-C) und AST-CC Peptide haben eine große Strukturähnlichkeit, was darauf schließen lässt, dass die beiden Gene, von denen sie abgeleitet werden, durch Genduplikation entstanden sind. Der Grad der strukturellen Identität zwischen AST-C und AST-CC scheint vergleichbar zu sein, mit der zwischen Vasopressin und Oxytocin, oder Gastrin und Cholecystokinin bei den Vertebraten.

Die Expression des *Drosophila* AST-CC Gens ist scheinbar sehr niedrig. Die cDNA für das Präprohormon wurde aus vier verschiedenen cDNA Bibliotheken erhalten und diente als Basis für die Identifikation anderer AST-CC Gene. Bei *Anopheles*, *Apis*, *Rhodnius* und *Locusta* wurden AST-CC EST's aus dem Gehirn, bei *B. mori* aus dem Mitteldarm und bei *Litopenaeus* aus abdominalen Ganglien isoliert. Die Expressiondaten für *D. melanogaster* [Chintapalli et al., 2007] zeigten statistisch gesehen eine nicht detektierbare Expression von AST-CC in Adulten, dagegen war die Expression von AST-C leicht detektierbar [Veenstra, 2008]. Obwohl AST-CC so gering exprimiert wird, lassen P-Element Insertionen bei *D. melanogaster* Embryonen vermuten, dass AST-CC essentiell ist.

1.2.8 Neuropeptide als biologische Insektizide

Da Schadinsekten weltweit verbreitet sind, wird seit vielen Jahren intensiv auch nach „biologischen“ Substanzen zum Einsatz in der Schädlingsbekämpfung gesucht. Am Anfang wurden chemische Verbindungen wie chlorierte Kohlenwasserstoffe (z. B. DDT) verwendet. Diese wurden jedoch bald durch Stoffe ersetzt, die aus Pflanzen gewonnen wurden (z. B. *Pyrethrum*) und als sogenannte „natürliche“ Insektizide galten. Leider wirkten sich diese ebenfalls negativ auf Nutzinsekten aus [Birgersson et al., 1988]. Es wurde klar, dass die Insektizide der Zukunft gewisse „ökologische“ Bedingungen erfüllen sollten. Nach Möglichkeit sollten sie nicht toxisch, sondern umweltfreundlich und spezifisch für Schadinsekten sein. Auch die nächste Generation der Insektizide, die „insect growth regulators“ (IGR) wie z.B. Juvenilhormonanaloga konnten die hohen Erwartungen nicht erfüllen.

Insektenneuropeptide sind primäre Zielsubstanzen für die Entwicklung neuartiger Insektizide, da sie die Physiologie und das Verhalten der Insekten während der Entwicklung und Reproduktion beeinflussen bzw. regulieren [Hoffmann & Lorenz, 1998; Cusson, 2000; Altstein et al., 2000; Gäde & Goldsworthy, 2003]. Um Neuropeptide sinnvoll bei der Entwicklung von Bioinsektiziden zu nutzen, ist es wichtig, ihre Strukturen und ihre Funktionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei Schadinsekten aber auch bei anderen Insekten, genau zu kennen.

Neuropeptidantagonisten haben großes Potential zum Einsatz gegen Schadinsekten, aber ihre Anwendung erscheint schwierig. Fortschrittliche Technologien, wie die Verwendung rekombinanter DNA und die genetische Manipulation zur Unterbrechung der endokrinen Prozesse bei Schadinsekten, wären denkbar. So ist es möglich, Gene die für Neuropeptide kodieren oder Enzyme, die Hormone metabolisieren können, in einen Baculovirus Expressionsvektor zu inserieren [Nijhout, 1998]. Infektionen mit diesem manipulierten Baculovirus könnten die endokrinen Prozesse unterbrechen. Mit Hilfe der RNA Interferenztechnik ist es möglich, spezifische endogene Ziel RNA herunterzuregulieren [Fire et al., 1998; Elbashire et al., 2001; Meister & Tuschl, 2004; Mello & Conte, 2004]. Wird diese dsRNA mit Hilfe eines Plasmidvektors, der einen Teil des Zielgenes in umgekehrter Richtung trägt, in eine Zelle gebracht, kann dies zu einer Hairpin loop Struktur führen, welche die RNA Interferenz in dem Wirt auslöst [Tavernarakis et al., 2000].

1.3 Zielsetzung

Aus dem Heerwurm *S. frugiperda* wurden bereits mehrere allatoregulierende Neuropeptide identifiziert [Abdel-latif et al., 2003; 2004]. Die beiden bekannten Neuropeptide AT 2 und AS-C, die strukturell ähnlich sind, sollten in dieser Arbeit durch Geninhibition mit der RNA Interferenz Methode *in vivo* charakterisiert werden. Die Methode der RNA Interferenz hatte sich bereits bei anderen allatoregulierenden Neuropeptiden als effektiv zur Charakterisierung von *in vivo*-Funktionen erwiesen [Meyering-Vos et al., 2006]. Es sollten Expressionsstudien an unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien nach Injektion der spezifischen dsRNA in die Tiere durchgeführt werden, um die Wirksamkeit der Injektion und die Dauer des Effektes zu beurteilen. Die Effekte der dsRNA Injektion im Vergleich zu

Kontrollinjektionen sollten an verschiedenen physiologischen Leistungen beobachtet werden, wie z. B. der Larvenentwicklung und den Ecdysteroid- bzw. JH-Hämolymphtitern. Außerdem sollten die Ecdysteroid- bzw. JH-Titer in der Hämolymphe und in verschiedenen Reproduktionsorganen der Weibchen und Männchen bestimmt werden. Schließlich sollten Untersuchungen zur Reproduktionsleistung und Fertilität der Tiere durchgeführt werden.

Zwischen den bekannten B-Typ Allatostatinen aus verschiedenen Tierarten gibt es strukturelle Ähnlichkeiten. Mit Hilfe der homologen Bereiche sollte das B-Typ Allatostatin Präprohormon von *S. frugiperda* identifiziert werden. Hierzu sollte eine Vielzahl von degenerierten Oligonucleotidprimern, die unterschiedliche homologe Bereiche abdecken, abgeleitet werden. Als Template der PCR diene eine cDNA library aus der mRNA der Gehirne von 1-3 d alten adulten *S. frugiperda*. Zudem sollten weitere möglich Template, wie z. B. genomische DNA und mRNA anderer Gewebe getestet werden. Außerdem sollten verschiedene Methoden genutzt werden, um zunächst eine Teilsequenz des B-Allatostatin Prohormons identifizieren zu können. Grybi-AS B1 (GWQDLNGGW-NH₂) weist hohe Homologie zu einigen Peptiden auf, die aus Lepidopteren isoliert wurden bzw. deren Sequenzen aus der cDNA abgeleitet wurden, so dass Kreuzreaktivitäten mit den potentiellen analogen B-Typ Allatostatinen aus *S. frugiperda* im immunhistochemischen Experiment wahrscheinlich sind. Deshalb sollten immunhistochemische Färbungen mit einem vorhandenen Grybi-AS B1 Antikörper durchgeführt werden, um die mutmaßliche Lokalisation des Peptids zu bestimmen.

2 Materialien

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde steriles Milli-Q-H₂O (Entsalzungsfiter: Millipore 0,2 µm) verwendet.

2.1 *Spodoptera frugiperda*-Futter

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Sucrose | Sigma-Aldrich, Steinheim (D) |
| Trockenfuttermischung für Noctuiden | Bayer AG, Leverkusen (D) |

2.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg (D) bezogen. Die T7-Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase wurde fett markiert.

| Primer | Nukleotidsequenz (5'→3') | Länge (bp) |
|----------|---|------------|
| ATf: | 5'-ACT CAA GCT ATG CAT CCA ACG CT-3' | 23-mer |
| ATr: | 5'-AGG AAA TTG GGT TCC CGC GTA CTC-3' | 24-mer |
| AS-Cf: | 5'-TGC GCC AAT GGA GGC GGA CGA T-3' | 22-mer |
| AS-Cr: | 5'-CTC TGC ATC AAG TTG CAG CAG CAG-3' | 24-mer |
| Actf: | 5'-CCT CAA CCC TAA GGC CAA CAG G-3' | 22-mer |
| Actr: | 5'-CCA TCA CCG GAG TCC AAG ACG-3' | 21-mer |
| T7SKf10: | 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG AAG CGC | 40-mer |

| | | |
|------------------------|--|--------|
| | CCC TGC ACT CGC AC-3` | |
| T7SKr10: | 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG ACT GCC TCT TGC TCA TCT CG-3` | 40-mer |
| T7-Ascf: | 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CTG CGC CAA TG-3` | 31-mer |
| T7-nAsR10=T7-SpoAS-Cr: | 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCA CTT GCG GAA-3` | 32-mer |
| T7Asdf1=T7-AT 2f: | 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAC GCG TTG GGA GCT C-3` | 37-mer |
| T7 Asdr1=T7-AT 2r: | 5`- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TAA ATT GGT AAT GCT ATG C-3` | 40-mer |
| Oligo (dT): | 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3' | |

Die für die Herstellung der T7-Template und der Standards für die Real-time RT-PCR verwendeten Plasmide werden im Folgenden aufgeführt, welche als Insert die Teilsequenz einer bestimmten cDNA aus *S. frugiperda* bzw. *G. bimaculatus* tragen (siehe Anhang). Bei allen aufgeführten Plasmiden wurde das Insert in den pGEM®-T-Easy Vektor (Promega) bzw. pGEM®-T Vector (Promega) ligiert.

| | |
|--------------------|---|
| Plasmid Aktin-150: | Teilsequenz aus der Spofr-β-Aktin cDNA |
| Plasmid Aktin-500: | Teilsequenz aus der Spofr-β-Aktin cDNA |
| Plasmid Mal2: | Teilsequenz aus der Spofr-AS -C cDNA |
| Plasmid Mal10: | Teilsequenz aus der Spofr- AT 2 cDNA |
| Plasmid SK2: | Teilsequenz des SK-Gens aus <i>G. bimaculatus</i> |

2.3 Gebrauchsfertige Reagenziensätze

| | |
|--|---|
| GeneJET™ Miniprep Kit | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| GFX™ PCR DNA and Gel Band Purifikation Kit | Amersham Biosciences, Little Buckinghamshire (GB) |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Linaris- Detektions-Kit | Wertheim-Bettingen (D) |
| MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit | Ambion, Austin (USA) |
| MicroAmp™ PowerSYBR® Green PCR MasterMix | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| peqGOLD Gel Extraction Kit | peqLab, Erlangen (D) |
| pGEM® – T Vector System | Promega, Madison (USA) |
| pGEM®-T Easy Vector System | Promega, Madison (USA) |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden (D) |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden (D) |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen, Hilden (D) |
| RT-PCR Grade Water | Ambion, Austin (USA) |
| TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit BD | Biosciences Clontech, Palo Alto (USA) |

2.4 Substanzen, Puffer und Lösungen

2.4.1 Injektion, Präparation

| | |
|------------------------|---|
| Noctuidenringer-Lösung | 7,1 mM CaCl ₂ ; 22 mM Na-β-glycero-phosphat; 13,5 mM MgSO ₄ ; 26,9 mM MgCl ₂ ; 29,5 mM KCl pH 6,8 mit KH ₂ PO ₄ ; steril filtrieren |
| Ringer-Lösung | 86 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 3 mM CaCl ₂ ; Fermentas, St. Leon-Rot (D) |

2.4.2 PCR

| | |
|---|--|
| dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 mM) | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| MgCl ₂ (25 mM) | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| Primer, reverse und forward | MWG Biotech, Ebersberg (D) |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U / µl) | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| 10 x <i>Taq</i> -Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄ | 750 mM Tris-HCl; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 % Tween 20; pH 8,8 |

2.4.3 Gelelektrophorese

| | |
|-----------------------------------|---|
| EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat p. A. | AppliChem, Darmstadt (D) |
| Laufpuffer | 0,5 x TBE-Puffer |
| Probenpuffer | Ambion, Austin (USA) 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 40 % (w/v) Sucrose in H ₂ O |
| 5 x TBE-Puffer | 445 mM Tris; 445 mM Borsäure; 12,5 mM EDTA; pH 8,0; mit Milli-Q-Wasser angesetzt |

Längenstandard

| | |
|---|-----------------------------|
| Ethidiumbromid (10 mg / ml) | Promega, Madison (USA) |
| PeqGOLD Universal Agarose | PeqLab, Erlangen (D) |
| Small DNA low melt Agarose | Biozym Hess., Oldendorf (D) |
| 1 kb DNA Ladder (Fragmentgrößen: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000) | Promega, Madison (USA) |
| 100 bp DNA Ladder (Fragmentgrößen: 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp) | Diagonal, Münster (D) |

2.4.4 Transformation, Fermentation und Plasmidpräparation

| | |
|--|--|
| Ampicillin-Lösung | 100 mg / ml H ₂ O _{steril} |
| Bakterienstamm <i>E. coli</i> JM109 Genotyp: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac</i> - <i>proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i>] | Promega, Madison (USA) |
| BSA acetyliert (10 mg / ml) | Promega, Madison (USA) |
| DNase-frei RNase A Lösung (100 µg / µl) | Sigma, St. Louis (USA) |
| Hefeextrakt | AppliChem, Darmstadt (D) |
| IPTG-Lösung (= Isopropyl-β-D-thiogalactosid) | IPTG AppliChem, Darmstadt (D) 100 mM IPTG in H ₂ O _{steril} |
| KAc-Lösung (Puffer N3) | 3 M K ⁺ ; 5 M Ac ⁻ ; pH 4,8= 60 ml 5 M KAc+ 11,5 ml HAc+ 28,5 ml H ₂ O |
| LB-Agar | Luria-Bertani-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar |
| LB-Platten | autoklavierter 60 °C LB-Agar mit Ampicillin-Lösung (100 µg / ml Medium) in Petrischalen gegossen |
| Luria-Bertani-Medium (= LB Medium) | 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7, mit H ₂ O _{steril} auf 1 l; autoklavieren |
| Lysepuffer | 0,4 N NaOH-Lösung + 2 % SDS (1:1) |
| pGEM [®] -T Easy Vektor (ohne Insert) | Promega, Madison (USA) |
| Puffer A | 25 mM Tris / HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose |
| Restriktionsenzym EcoRI (12U / µl) | Promega, Madison (USA) |
| SOB-Medium | 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) BactoTrypton 10 mM NaCl; 250 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; pH 6,4 |
| SOC-Medium | SOB-Medium mit 20 ml steril filtrierter 1 M Glucose-Lösung auf 1 l |

| | |
|---------------|--|
| TE-Puffer | 10 mM Tris/HCl, pH 8; 2 mM EDTA (0,1 ml 1 M Tris, pH 8; 0,02 ml 0,5 M EDTA, mit Wasser auf 10 ml auffüllen) |
| Trypton | INC Biomedicals Inc. (Aurora, USA) |
| X-Gal-Lösung | AppliChem, Darmstadt (D); 20 mg / ml X-Gal in Dimethylformamid |
| 10 x Puffer H | Promega, Madison (USA) |

2.4.5 Substanzen für Southern Blot, Hybridisierung und Immunodetektion

| | |
|---|---|
| Anti-Dig-AP-Konjugat (150 U) | Roche Applied Science, Penzberg (D) |
| BCIP-Lösung (50 mg / ml in 100 % DMSO) | AppliChem, Darmstadt (D) |
| Blocking Reagenz | Boehringer Ingelheim, Heidelberg (D) Roche Applied Science, Mannheim (D) |
| Blotting-Puffer | 10 x SSC |
| Colour-Substrate-Lösung | 2 % (v/v) NBT/BCIP-Lösung |
| Detektionspuffer | |
| Detektionspuffer | 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl ₂ |
| Diethylpyrocarbonat (= BCIP) | AppliChem, Darmstadt (D) |
| F-PBS | 40 g / l Formaldehyd in 1x PBS |
| Hybond-N ⁺ Blotting Membran | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg (D) |
| Konjugations-Lösung | 1 x Blocking-Lösung; 0,01 % (v/v) anti-Dig- AP-Konjugat |
| Maleinsäure Puffer | 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5; 0,15 M NaCl |
| NBT-Lösung | 50 mg / ml in 70 % (v/v) DMSO/H ₂ O |
| NBT/BCIP-Lösung 56 % (v/v) NBT-Lösung; 29 % (v/v) | BCIPLösung; 15 % (v/v) 60 % DMSO/H ₂ O |
| Nitroblau-Tetrazoliumsals (= NBT) | AppliChem, Darmstadt (D) |

Materialien

| | |
|---------------------------------------|--|
| N-Lauroylsarcosin-Na-Salz (30 % Lsg.) | Boehringer Ingelheim, Heidelberg (D) |
| PBT | 1xPBS; 0,1 % Tween20 |
| Skim Milk | Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks (USA) |
| Standardhybridisierungspuffer | 5 x SSC-Puffer; 0,1 % Lauroylsarcosin; 1 % Blocking Reagenz (Boehringer); steriles Wasser; 0,02 % SDS |
| Tris | Roth, Karlsruhe (D) |
| Waschpuffer A | 2 x SSC; 0,1 % SDS |
| Waschpuffer B | 0,1 x SSC; 0,1 % SDS |
| Waschpuffer C | Maleinsäurepuffer; 3 % (v/v) Tween 20 |
| Whatman Gel-Blotting-Papier (3 mm) | Schleicher & Schuell, Dassel, (D) |
| 1 x PBS | 130 mmol / l NaCl; 7mmol / l Na ₂ HPO ₄ ; 3 mmol / l NaH ₂ PO ₄ |
| 10 x Blocking-Lösung | Maleinsäurepuffer; 10 % (w/v) Skim Milk |
| 20 x SSC | 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat 2 H ₂ O, pH 7 |

2.4.6 RNA-Isolierung und DNA-Verdau

| | |
|-------------------|---|
| β-Mercaptoethanol | Sigma, St. Louis (USA) |
| Dnase I | Fluka, Neu-Ulm (D) |
| Ethanol | Merck, Darmstadt (D) |
| peqGOLD Trifast | peqLab, Erlangen (D) |
| Turbo-DNase | Ambion, Austin (USA) |
| 10 x DNase-Puffer | 100 mM Tris; 25 mM MgCl ₂ ; 5 mM CaCl ₂ ; pH 7,5 |

2.4.7 RT-PCR

Für RNA-Arbeiten wurde RNase-freies H₂O (DEPC-H₂O) verwendet:

| | |
|--|---|
| DEPC-H ₂ O | 1 ml DEPC (= Diethylpyrocarbonat), 1 l Milli-Q- H ₂ O; Inkubation über Nacht auf Schüttler (50 rpm) bei 37°C; anschließend 20 min. autoklavieren |
| dNTP-Mix (10 mM) | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| Oligo(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg / µl) | Promega, Madison (USA) |
| RNase Inhibitor | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| RNase Zap | Ambion, Austin (USA) |

2.4.8 Substanzen für Real-time RT-PCR

| | |
|---|-------------------------------------|
| dNTP-Mix (2,5 mM) | Roche Applied Science, Penzberg (D) |
| M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant | Promega, Madison (USA) |
| Random Primer | Promega, Madison (USA) |
| RNase Inhibitor | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| T7-RNA-Polymerase | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |
| 5 x-Puffer | Fermentas, St. Leon-Rot (D) |

2.4.9 Substanzen für Immunodetektion

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| AS-B Antikörper | SNP Neosystem, Strasbourg (F) |
| Goatserum | Merck, Darmstadt (D) |
| Peroxidase-anti-Peroxidase | Sigma, Deisenhofen (D) |
| Tween20 | Sigma, Deisenhofen (D) |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt (D) |
| 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid | Sigma, Deisenhofen (D) |

2.4.10 Allgemeine Chemikalien

| | |
|-------------------|---|
| β-Mercaptoethanol | Sigma, St.Louis (USA) |
| Ethanol | Merck, Darmstadt (D) |
| Methanol | Fluka, Neu-Ulm (D) |
| Natriumchlorid | VWR International, Fontenay s. Bois (F) |
| Xylol | Fluka, Neu-Ulm (D) |

2.5 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---------------------------------------|
| Einmal Plastikküvetten 1,5 ml HalbmikroBrand | Brand, Wertheim (D) |
| Mikropipetten Blaubrand [®] intra Mark (5 µl, 10 µl, 20 µl) | Brand, Wertheim (D) |
| PCR-Tubes (0,2 ml) | Brand, Wertheim (D) |
| PCR-Tubes (0,5 ml) | ABgene House, Epsom (UK) |
| Quali Mikrozentrifugengefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) | Kisker Biotech, Steinfurt (D) |
| Quali Standard-Spitzen (10-1000 µl) | Kisker Biotech, Steinfurt (D) |
| Rotilabo [®] - Probenfläschchen (2 ml), Deckel und Septen | Roth, Karlsruhe (D) |
| Safelock Eppendorf Tubes | Eppendorf AG, Hamburg (D) |
| 10 µl Pipettenspitzen P2 – 10 | Gilson [®] , Middleton (USA) |
| 100 µl Pipettenspitzen | Daslab [®] |
| 100 µl Pipettenspitzen | Greiner bio-one, Frickenhausen (D) |
| 200 µl Pipettenspitzen (long tips) | Kisker Biotech, Steinfurt (D) |

LC-MS (Liquid-Chromatography–Mass-Spectrometry)

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Ecdysteroiden (E, 20-H E) | Sigma, St. Louis (D) |
| JH I, II, III | Fluka, Neu-Ulm (D) |

| | |
|---------------------------|---|
| MeOH (HPLC grade); | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf (D) |
| Methanol-Isooctan-Gemisch | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf (D) |
| Shimadzu Autoinjektor | Spark, Emmen (NL) |
| Wasser | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf (D) |

2.6 Geräte

| | |
|---|--|
| Analysenwaage 1219MP; MC210P | Sartorius, Göttingen (D) |
| Biofuge 13 | Heraeus Instruments, Hanau (D) |
| Binocular M5A Wild | Wild, Heerbrugg (D) |
| Binokular M7S | Wild, Heerbrugg (D) |
| Centrifuge 5415C | Eppendorf, Hamburg (D) |
| CertoClav CV-EL10 | Kleinfeld Labortechnik, Traun (A) |
| Elektrophorese-Spannungsquelle PowerPac 3000 | Bio-Rad, Hercules (USA) |
| Feinwaage 1219 MP | Sartorius, Göttingen (D) |
| Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha RVC 2-4 | Christ, Osterode (D) |
| Gewebehomogenisator (motor cordless) | Kontes, Vineland (USA) |
| Heizofen T 5042K | Heraeus, Hanau (D) |
| Hybridisierungsofen Compact Line OV 4 | Biometra, Göttingen (D) |
| Image Master [®] VDS System | Pharmacia Biotech, San Francisco (USA) |
| Injektionsspritze Microliter [™] Syringes (10 µl, 100 µl) | Hamilton, Bonaduz (CH) |
| Inkubator BK 6160 | Heraeus Instruments, Hanau (D) |
| Kaltlichtquelle KL 1500 electronic | Schott, Feldbach (D) |
| Kühlzentrifuge Multifuge 1 _{L-R} | Heraeus Instruments, Hanau (D) |
| MicroAmp [™] | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Mikrowelle | Bosch, Stuttgart (D) |

Materialien

| | |
|---|---|
| Mikro20 Zentrifuge | Hettich, Noblesville (USA) |
| Optical Adhesive Film Kit | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Optical Cups | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Optical 8-Tube strip (0,2 ml) | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick, Berlin (D) |
| Pipetten Pipetman [®] P P10, P20, P100, P200, P1000 | Gilson, Middleton (USA) |
| Präzisionsküvette aus Quarzglas (100 µl) Suprasil 105.202-QS (Schichtdicke: 10 mm) | Hellma, Müllheim (D) |
| PTC-200 Peltier Thermal Cycler | Biozym, Hess. Oldendorf (G) |
| Reprosil-Pur ODS-3 Säule (5µm; Dr. Maisch GmbH) | Ammerbuch, (D) |
| Schüttler: orbital shaker 51300 Serie | Cole Parmer, Vernon Hills, (USA) |
| Shimadzu Massenspektrometer LC-MS-2010A | Shimadzu, Duisburg (D) |
| Spannungsquelle Power Pac3000 | Biorad, Hercules (USA) |
| Splash Free 96-Well Base | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Thermal Cycler T-Personal | Biometra, Göttingen (D) |
| Thermoblock TB1 | Biometra, Göttingen (D) |
| Ultraschallbad Transsonic 460 | Elma, Singen (D) |
| UV-Crosslinker Biolink BLX 254 | Vilbert Lourmat, Marne-La Vallee (F) |
| UV-Flächenstrahler | Konrad Benda, Wiesloch (D) |
| UV/VIS Spektrometer Lambda 25 | Perkin Elmer Instruments, Shelton (USA) |
| Vorsäule: C18; Phenomenex | Aschaffenburg, (D) |
| Vortexer REAX 2000 | Heidolph, Schwabach (D) |
| Wärmeschrank | Haereus, Hanau (D) |
| 7300 Real-time PCR System und Dell Laptop | Applied Biosystems, Foster City (USA) |

2.7 Software

| | |
|--|---|
| FastPCR (Version 4.0.27) Ruslan Kalendar | Helsinki (Finland) |
| Image Master [®] VDS System (Version 3.0) | Pharmacia Biotech, San Francisco (USA) |
| Microsoft [®] Excel 2002 | Microsoft Corporation |
| Microsoft [®] Office Excel 2003 | Microsoft Corporation |
| Primer Express Applied Biosystems | Foster City (USA) |
| SDS 7300 Systems Software | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA für Windows | [Software-System für Datenanalyse] Version 6. www.statsoft.com |
| UV Winlab Standard L 610-0025 | Perking Elmer (Version 4.0), Shelton (USA) |
| WinSTAT für Excel | Fitch Software, Bad Krozingen (D) |

3 Methoden

3.1 Haltung und Aufzucht der Versuchstiere

Als Versuchstier diente der Heerwurm, *S. frugiperda*, ein Vertreter der Noctuidae (Lepidoptera). Die Puppen des Nachtfalters *S. frugiperda* wurden von der Firma Bayer AG (Leverkusen) bezogen. Bei einer Temperatur von 27°C wurden die Tiere unter konstanten Langtagbedingungen (16 h Licht- und 8 h Dunkelphase) in der Klimakammer gehalten. Für die Nachzucht wurden adulte Männchen und Weibchen in mit Zellstoff ausgelegten Gerdaboxen (20 x 20 x 10 cm, Gerda GmbH und Co., Schwelm) verpaart. Die Larven wurden ab dem vierten Larvenstadium aufgrund des zunehmenden Kannibalismus in Schlupfkästen (49 x 32 x 36 mm pro Kompartiment, Licefa, Bad Salzuflen) vereinzelt, wo sie bis zur Verpuppung mit Kunstfutter gefüttert wurden. Bei dem Futter für die Larven handelte es sich um eine semisynthetische Standarddiät für Noctuiden, die als Trockenfuttermischung ebenfalls von der Bayer AG (Leverkusen) geliefert wurde. Adulte Tiere erhielten täglich Wasser und eine 10 %ige Sucroslösung (Sigma, Steinheim) *ad libitum*. Zur Herstellung der Hämolymp-Matrix bei der Juvenilhormontiter-Bestimmung wurden Mittelmeerfeldgrillen, *G. bimaculatus* de Geer (Ensifera; Gryllidae) verwendet. Die Grillen wurden bei 27°C unter Langtagbedingungen (LD 16 : 8 Std.) gehalten. Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-60 % erfolgte die Aufzucht in großen Plastikwannen (60 x 40 x 40 cm). Die Fütterung erfolgte mit einer Mischung aus Kaninchen Nr. 2021, Ratten/Mäuse Nr. 1311 und Katzen Nr. 5031 Standarddiäten (Altromin GmbH, Lage) [4 : 2 : 1], sowie Wasser *ad libitum*.

3.1.1 Behandlung der Tiere

Die Larven von *S. frugiperda* wurden immer unmittelbar nach der Häutung ins fünfte Larvenstadium (L5/1) injiziert. Die Gewichtszunahme der Larven wurde täglich vom fünften Larvenstadium bis zur Verpuppung mit einer Feinwaage kontrolliert. Für die Durchführung der Genexpressionsanalysen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten

eine Gewebeentnahme. Die Gewebe wurden unter Ringerlösung von anhängendem Fettgewebe befreit und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Die Hämolymphe (20 μl) der Tiere wurde für die Bestimmung der JH- bzw. Ecdysteroid-Titer zum passenden Zeitpunkt entnommen. Dafür wurde mit einer Nadel lateral die Haut der Larven bzw. adulten Tiere durchstoßen und die austretende Hämolymphe mit einer 10 μl -Mikropipette aufgenommen. Adulte Tiere wurden direkt nach der Imaginalhäutung injiziert und anschließend in Bellaplastboxen gehalten, deren Deckel mit Gaze abgeklebt war. Die Tiere wurden entweder unverpaart einzeln gehalten oder die Weibchen wurden mit 0-2 Tage alten Männchen verpaart. Ab dem ersten Tag nach der Verpaarung wurde die Oviposition (Eiablage) bestimmt. Parallel dazu wurde das Ovargewicht bzw. das Hodengewicht von 0 bis 6 Tage alten Tieren ermittelt, bei gleichzeitiger Beobachtung der Oviposition der Weibchen bis zum Tag der Präparation.

3.1.2 Injektion der dsRNA

Die Injektion der Larven erfolgte nach der Häutung ins fünfte Larvenstadium (L5/1) unter Verwendung einer 10 μl -Hamilton-Spritze. Als Einstichstelle für die Injektion wurde die Basis einer der hinteren Pseudopodien gewählt, da bei den Larven in dieser Region nach dem Entfernen der Nadel kaum Hämolymphe heraustrat. So wurde gewährleistet, dass sie die dsRNA auch tatsächlich aufgenommen hatten. In einem Vortest wurde der Austritt der Injektionslösung mit Hilfe eines Farbstoffes getestet. Außerdem wurde die Verteilung des Farbstoffes im Inneren der Tiere und auch der Zustand der inneren Organe überprüft. Die Nadel wurde bei der Injektion flach unter der Haut in Richtung Kopf entlang geführt, um innere Verletzungen zu vermeiden. Injiziert wurden 3 μg dsRNA in einem Volumen von 5 μl . Kontrolllarven wurden mit 5 μl einfach konzentriertem Noctuidenringer injiziert.

Alternativ wurden frisch geschlüpfte Adulte, also 0 Tage alte Tiere, injiziert. Die Injektion erfolgte mit einer 10 μl -Hamilton-Spritze bei flacher Nadelführung lateral in das Abdomen der Tiere. Auch bei den adulten Tieren wurden Vortests mit einem Farbstoff durchgeführt.

Die Tiere wurden mit 1 µg dsRNA injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 2 µl. Als Kontrolle dienten Tiere, denen eine einfach konzentrierte Noctuidenringer-Lösung (2 µl) injiziert wurde.

3.1.3 Gewebepräparation

Für die Gewebepräparation wurden die Tiere im entsprechenden Alter aus ihren Boxen gefangen. Mit einer Präparierschere wurden Flügel und Beine der Adulten entfernt und diese am Thorax festgesteckt. Die Larven wurden am Vorder- und Hinterende festgesteckt. Die anschließenden Präparationsschritte erfolgten in Ringerlösung für Noctuiden [Davenport & Wright, 1985] mit Hilfe eines Binokulars. Für die Präparation von akzessorischen Drüsen, Bursa copulatrix, Nervensystem, Darm, Hoden und Ovar wurde das Abdomen lateral mit der Schere aufgeschnitten, die Gewebe herauspräpariert und diese von anhängenden Fettkörpern, Tracheen und Malpighischen Gefäßen befreit. Die Präparation des Gehirns erfolgte an der Abschnittsstelle des Kopfes. Für die Ermittlung der Ovar- und Hodengewichte wurden die Gewebe mit einer Feinwaage gewogen. Die Gewebe für die Expressionsanalyse wurden sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

3.2 Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von *G. bimaculatus* B-Typ AS in verschiedenen Geweben von *Spodoptera frugiperda*

Aus Larven und Adulten von *S. frugiperda* wurden verschiedene Gewebe isoliert und entweder komplett oder als Gewebeschnitte mit dem Grybi-AS B1 Antikörper inkubiert, woran sich eine Immunfärbung unter Anwendung der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) Methode mit einer Diaminobenzidin (DAB) Farbreaktion in Gegenwart von H₂O₂ anschloss. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Die Gewebe wurden über Nacht in F-PBS (4 % Paraformaldehyd in phosphate buffered saline) fixiert. Danach wurden diese 3 x 10 min. mit PBS bzw. PBT (PBS + 0,1 % Tween20) gewaschen. Nach wiederholtem Waschen wurden die Schnitte zum Blocken unspezifischer Bindungen in 5 % normalem Ziegen Serum für 5 min. geblockt. Über Nacht wurden die Gewebe bei 4°C mit 1 µl primärem Antikörper gegen *G. bimaculatus* Allatostatin-B in 1 ml PBS bzw. PBT inkubiert.

Nach dem Waschen von 3 x 10 min. mit PBS bzw. PBT (PBS +0,1 % Tween20) bei Raumtemperatur wurden die Proben im sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Dann wurde 3 x 10 min. mit PBS bzw. PBT gewaschen. Eine erneute Inkubation der Gewebe erfolgte mit dem Peroxidase anti-Peroxidase Komplex für eine Stunde. Wieder schloss sich ein Waschschrift für 3 x 10 min. mit PBS bzw. PBT an. 2,5 % DAB (3,3`Diaminobenzidine) wurde zugegeben und für ca. 5 min. inkubiert bis die Färbung intensiv genug war. Danach wurde nochmal 3 x 10 min. mit PBS bzw. PBT gewaschen.

Als Kontrollexperiment wurden immer Negativkontrollen ohne Grybi-AS B1 Antikörper parallel durchgeführt.

Die Dokumentation aller Präparate erfolgte an einem Mikroskop mit Digitalkamera.

3.3 Bestimmung des Juvenilhormon-Titers mittels LC-MS (Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry)

3.3.1 Gewinnung der Proben

Die mit Hilfe einer geeichter Glaskapillare gewonnene Hämolymphe wurde in ein Fisher-Vial (Culture Tube) mit 200 µl eines Methanol-Isooctan-Gemisches überführt. Verschlossen wurden die Proben mit Aluminiumfolie und Parafilm. Das Fisher-Vial wurde gevortext und 30 min. bei Raumtemperatur belassen. Bei -70 °C wurde es bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

3.3.2 Aufarbeitung der Proben

Die Fisher-Vials wurden in Eppendorfreaktionsgefäße gestellt und 20 min bei 9500 g zentrifugiert. Die obere flüssige Phase (Isooctan) wurde mit einer Hamiltonspritze in ein neues Fisher-Vial überführt. Die untere Phase wurde erneut gevortext und zentrifugiert. Danach wurde die abgehobene Methanolphase mit der oberen Phase vereinigt. Dabei war es wichtig kein Protein mit zu überführen. Zwischen jedem Probentransfer wurde die Hamiltonspritze 3 x mit Isooctan gespült. Die Proben wurden in der Speed Vac eingeeengt, bis die obere Isooctanphase nach ca. 5 min. vollständig verdampft war. Erneut wurde 5 min. bei 9500 g zentrifugiert, und die Probe in Autosamplergefäße überführt ohne Präzipitat mitzunehmen. Zwischen jedem Probentransfer wurde 3 x mit Methanol gespült. Die Vials wurden danach in braune Probenfläschchen mit ausgeglühten Autosamplereinsätzen gesteckt. Mit Alufolie und Parafilm verschlossen konnten sie bis zur Messung bei -70 °C aufbewahrt werden.

Kurz vor der Messung wurden die Autosamplereinsätze in Eppendorfreaktionsgefäße gestellt. In der Speedvac wurden die Proben eingeeengt bis nur noch etwa 20 µl Flüssigkeit vorhanden war. Mit einer 50 µl-Hamiltonspritze wurde das Volumen überprüft. Dabei sollte das Endvolumen zwischen 18 µl und 25 µl liegen.

3.3.3 Messung der Proben

Die in den Proben enthaltenen Komponenten wurden mit Hilfe der liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) bestimmt [Westerlund & Hoffmann, 2004]. Die LC-MS Analyse wurde an einem Shimadzu Massenspektrometer (LC-MS-2010A, Duisburg), gekoppelt an einen Autosampler und an ein Eldex MicroPro HPLC System durchgeführt. Dabei wurden die Proben mit einer Reprosil-Pur ODS-3 Säule (5 µm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch), geschützt durch eine Vorsäule (C18, Phenomenex, Aschaffenburg) aufgetrennt. Zur Elution wurde ein Methanolgradient (HPLC grade, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf) bei einer Flussrate von 200 µl / min. verwendet. Davor lief ein Waschschrift bei 30 % Methanol und zum Schluss wurde die Säule mit 100 % Methanol gespült (Tab. 2).

Tabelle 2: Lösungsmittelzusammensetzung im Wasch-, Elutions- und Spülschritt des HPLC-Laufes

| Zeit (min) | % Lösungsmittel |
|------------|---|
| 0-5 | 30 % MeOH (v/v) in H ₂ O |
| 5-10 | 30-100 % MeOH (v/v) in H ₂ O |
| 10-12 | 100 % MeOH (Lauf) (v/v) |
| 12-15 | 100-30 % MeOH (v/v) in H ₂ O |

10 µl jeder Probe wurden mit dem Shimadzu Autoinjektor injiziert. Die Temperatur der Säule wurde während des Laufes im Säulenofen (Spark, Emmen, Niederlande) konstant bei 37°C gehalten. Die Analyse der Juvenil hormone und Ecdysteroide erfolgte mit der Methode der Elektrospray Ionisierung (ESI) im positiven Modus, mit einem Gasfluss (N₂) von 3.76 l / min, einer CDL Temperatur von 250°C und einer Heizblock-Gerätetemperatur von 200°C. Die Detektorspannung betrug 1.5 kV, die höchste Probenspannung 4.5 kV, die CDL Spannung –5.0 V. Die Quantifizierung erfolgte über einen externen Standard, wobei die folgenden Ionen beobachtet und deren Retentionszeiten mit denen des Standards verglichen wurden: *m/z* 317, 295 und 333.1 (JH I [M+Na]⁺ und [M+K]⁺ Addukte); *m/z* 303, 281 und 319.1 (JH II [M+Na]⁺ und [M+K]⁺ Addukte); *m/z* 289, 267 und 305.1 (JH III [M+Na]⁺ und [M+K]⁺ Addukte).

3.3.4 Datenerhebung

Die Menge der einzelnen Komponenten in der Hämolymphe wurden mit Hilfe der externen Standard Methode quantifiziert, wobei die $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ Addukte betrachtet wurden.

Um dem Problem des Matrixeffektes entgegenzuwirken, wurden beim Erstellen der Kalibrierkurven *G. bimaculatus* Hämolymphextrakte angereichert mit verschiedenen Standards unterschiedlicher Konzentrationen verwendet (standard addition method) [Westerlund & Hoffmann 2004].

Es wurde Hämolymphe 1 d alter Weibchen verwendet, da diese einen sehr geringen Gehalt an JH besitzen. Hämolymphe ohne Juvenilhormon ist nicht isolierbar, da dieses in allen Stadien der Insektenentwicklung vorhanden ist. Zuletzt wurde für jede Komponente mit Hilfe der Shimadzu Software eine Regressionsgerade errechnet, um eine Quantifizierung durchführen zu können.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) wird zur enzymatischen Vermehrung eines DNA-Fragmentes in verschiedensten wissenschaftlichen Bereichen verwendet.

Dabei erfolgt im ersten Schritt der PCR, die in einem Thermal Cycler durchgeführt wird, die Denaturierung des DNA-Doppelstranges. Die DNA wird hierbei auf etwa 94-96°C erhitzt, was zum Zerfall der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren und somit zur Trennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge führt. Im folgenden Schritt werden die einzelsträngigen Forward- und Reverse-Primer an die DNA hybridisiert (Annealing), d.h. sie heften sich bei Temperaturen von 50-65°C gegenläufig an den komplementären DNA-Abschnitt an. Die exakte Temperatur hängt von den verwendeten Primern ab und liegt etwa 2-3°C unter deren Schmelztemperatur. Im letzten Schritt findet die Elongation der Primer statt, wobei die DNA-Polymerase die komplementären Stränge durch Anheftung von dNTPs synthetisiert (68-72°C). Aufgrund der hohen Temperaturen während der

Denaturierung der DNA verwendet man inzwischen regelmäßig die thermostabile Taq-Polymerase.

Nach einem Zyklus hat sich die DNA verdoppelt. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht, so dass mit einer geringfügig eingesetzten Menge nach erfolgreich durchgeführter PCR das Fragment in millionenfacher Anzahl von Kopien vorliegt.

Die Methode der PCR wurde für verschiedene Zwecke genutzt. Das nachfolgende Pipettierschema (Tab. 3) stellt die Zusammensetzung eines solchen PCR-Ansatzes zur Produktion von Amplifikaten dar.

Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

| | |
|--------------------------|---------|
| H ₂ O steril | 34,5 µl |
| 10 x Puffer | 5,0 µl |
| dNTPs | 4,0 µl |
| MgCl ₂ | 3,0 µl |
| 20 µM forward-Primer | 1,0 µl |
| 20 µM reverse-Primer | 1,0 µl |
| Template (1:10 verdünnt) | 0,5 µl |
| Taq-Polymerase | 1,0 µl |
| Gesamtvolumen | 50,0 µl |

Die in (Tab. 3) aufgeführten Komponenten wurden nacheinander in PCR-Tubes pipettiert. Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermal Cycler mit den entsprechenden PCR-Programmen.

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das Verfahren der Elektrophorese wird in der Chemie und Molekularbiologie als eine analytische Methode für die Auftrennung von Molekülen verschiedener Größe und Ladung (DNA, RNA und Proteine) eingesetzt. Dabei wird eine Probe, welche die zu trennenden Fragmente enthält, auf ein Gel aufgetragen, das sich in einer ionischen Pufferlösung befindet. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Moleküle abhängig von Größe und Ladung unterschiedlich schnell durch das Gel. Kleine Fragmente wandern schneller als große Fragmente, negativ geladene Moleküle wandern in Richtung Anode und positiv geladene Moleküle wandern zum negativen Pol, der Kathode. Ein häufig genutztes Trägermaterial für die Gelelektrophorese ist die Agarose. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente hängt neben der Größe auch von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und von der Agarose-Konzentration ab. Die Agarosepolymere bilden im Gel ein engmaschiges Netzwerk, so dass mit zunehmender Agarose-Konzentration die Poren im Gel kleiner werden und deshalb kleine Moleküle schneller wandern. Des Weiteren hängt die Wanderung im elektrischen Feld von der Konformation der DNA ab. Um die Nukleinsäuremoleküle im Gel sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid, ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, zugegeben, welcher sich zwischen den Basenpaaren in den Nukleinsäure-Strängen anlagert. Bei anschließender Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert der Farbstoff im sichtbaren Bereich, so dass die Banden der Nukleinsäuremoleküle gut zu erkennen sind.

Für die einzelnen Experimente wurden Gele verschiedener Größe und Konzentration verwendet. Eine anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfordert eine niedrigere Agarose-Konzentration, da die Agarose in den für die Gelelektion verwendeten Säulen hängen bleibt und die Säulen verstopft, was die Ausbeute verschlechtert. Deshalb erfolgte die Analyse der über die PCR amplifizierten T7-Fragmente mit einem 1,5 %igen Gel. Für die Optimierungsversuche der Genexpressionsanalyse wurden 1,8 – 2 %ige Gele verwendet, um eine optimale Auftrennung der Banden zu erreichen. Für die Herstellung eines Gels zur Analyse der dsRNA wurde der 5 x TBE-Puffer mit RNase freiem DEPC-H₂O anstelle des sonst verwendeten Milli-Q-H₂O verdünnt.

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde die Agarose in der entsprechenden Menge 0,5 x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe des Ethidiumbromids (Endkonzentration = 0,5 µg / ml) wurde die Lösung sofort in eine vorbereitete Gelkammer der entsprechenden Größe gegossen. Nach einer Abkühlzeit von etwa 20-30 min. war das Gel fest, so dass die Kämme gezogen und das Gel samt Gelträger in die Elektrophorese-Apparatur, welche ebenfalls mit TBE-Laufpuffer gefüllt war, gestellt werden konnte. Anschließend wurden die mit Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen (2 µl Puffer auf 10 µl Probe). Um die Größe der in den Proben befindlichen Moleküle zu bestimmen, wurden zudem 7 µl eines Längenstandards, welcher DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 8 V / cm für 20 bis 40 min. durchgeführt. Danach wurde das Gel mittels des Image Master VDS fotografiert, wobei die Banden durch UV-Bestrahlung sichtbar wurden.

3.4.3 Reinigung und Isolierung von DNA

Isolierung aus dem Agarose-Gel mittels Gelelution

Die Reinigung der über die Gelelektrophorese getrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purifikation Kit“, dem „peqGOLD GEL Extraction Kit“ oder dem „QIAquick Gel Extraction Kit“. Für die Aufreinigung wurden die Banden mit den gewünschten DNA-Fragmenten zunächst auf einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht, mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zugabe des im Kit enthaltenen Bindepuffers bewirkt die Auflösung der Agarose, die Denaturierung der Proteine, sowie die selektive Bindung von doppelsträngiger DNA an eine Säule mit Glasfibrermatrix. Mit der Auftragung des Waschpuffers auf die Säule werden sämtliche Salze und Proteinreste herausgewaschen. Mit dem Elutionspuffer werden die DNA-Stränge von der Säule gelöst und können separat als Eluat aufgefangen werden.

Die Durchführung der Reinigungsschritte erfolgte nach Herstellerangaben. Für die DNA-Elution von der Säule wurde der im jeweiligen Kit enthaltene Elutionspuffer oder

steriles Wasser verwendet. Die Lagerung der isolierten und gereinigten DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Isolierung der DNA aus dem PCR-Ansatz

Für die alternativ durchgeführte DNA-Isolierung aus dem Reaktionsansatz wurde das „peqGOLD GEL Extraction Kit“ verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Eine Isolierung direkt aus dem PCR-Ansatz wurde nur dann angewendet, wenn das PCR-Produkt zuvor auf Erfolg und Qualität der Amplifikationsreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft worden war. Das Vorhandensein von Nebenbanden schließt die Anwendung dieser Extraktion aus. In diesem Fall musste der gesamte PCR-Ansatz auf einem Agarose-Gel fraktioniert werden, und die DNA anschließend über Gelelution gewonnen werden. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung über Absorptionsspektroskopie

Um die hergestellten DNA- bzw. RNA-Lösungen für weitere Zwecke gezielt einsetzen zu können, sind Kenntnisse über die Konzentration der Nukleinsäuren in den Proben erforderlich. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über Absorptionsmessung am UV-VIS Spektrometer Lambda 25. DNA und RNA absorbieren im UV-Bereich. Das Absorptionsmaximum der Nukleosidmonophosphate liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm (5'-CMP als Ausnahme bei 280 nm), so dass diese Wellenlänge für die Bestimmung der Konzentration verwendet wird. Dabei wird bei der Absorptionsmessung von Nukleinsäuren bei einer Absorptionseinheit A_{260} (1 OD_{260}) von einer bestimmten Nukleinsäurekonzentration ausgegangen. Für die Konzentrationsbestimmung der dsRNA wurde derselbe Wert wie für dsDNA verwendet. Für ssRNA gilt bei einer OD_{260} eine Konzentration von 40 ng / μ l und für dsRNA wurde von einem Wert von 50 ng / μ l ausgegangen.

Die Konzentration der vermessenen Nukleinsäuren ergab sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration} = A_{260} * \text{Verdünnung} * \text{spez. Absorptionskoeffizient}$$

Die Messung der Konzentration erfolgte nach geeigneter Verdünnung der jeweiligen Probe mittels einer Mikro-Quarzküvette. Als Referenz diente eine Küvette mit sterilem Wasser. Des Weiteren wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Bei 280 nm haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. Aus dem Verhältnis von A_{260} / A_{280} lässt sich auf die Reinheit der DNA bzw. RNA schließen. So liegt dieses Verhältnis bei proteinfreien Nukleinsäuren im Bereich von 1,8 bis 2,0.

3.4.5 Berechnung der Fragmentgröße

Die Bestimmung der Größe der Fragmente auf den Agarosegelen erfolgte anhand einer Eichgerade, die mit Hilfe eines Längenstandard (=Marker) erstellt wurde. Zur Erstellung der Eichgerade wurden die gemessenen Laufstrecken zum Logarithmus der entsprechenden Länge der Markerfragmente in bp aufgetragen. Für die Bestimmung der Länge der geblotteten und hybridisierten spezifischen DNA-Fragmente wurden die RF-Werte herangezogen, die aus der relativen Laufstrecke im Verhältnis zur Gellänge ermittelt wurden.

3.4.6 Southern Blot

An die Gelelektrophorese wurde ein Southern Blot mit Hybridisierung und Immunofarbdetektion angeschlossen, um zu analysieren, welche der gebildeten DNA-Fragmente einer spezifischen Sequenz der allatoregulierenden Neuropeptidgene entsprechen und um die relative Quantität der Banden zu bestimmen. Für den Transfer der DNA Fragmente auf eine Nylon N⁺ Membran wurde der klassische Southern-Blot verwendet.

Dazu wurde Transferpuffer, hier 10 x SSC-Lösung, in ein Vorratsgefäß gefüllt und ein Steg mit Hilfe einer Glasschale und einer daraufgelegten Glasplatte aufgebaut. Auf den Steg kamen Filterpapierstreifen, die in den Transferpuffer eintauchten. Darauf wurde ein vorher mit der 10 x SSC-Lösung befeuchtetes 3 mm Whatman Gel-

Blotting-Papier gelegt. Danach kam im Aufbau des Southern Blots das jeweilige Agarosegel, worauf jeweils eine Nylon N⁺ Membran, die man vorher auf die exakte Größe des Gels zugeschnitten hatte, gelegt wurde und ein weiteres mit SSC-Lösung befeuchtetes Filterpapier. Auf das obere, feuchte Blotting-Papier wurde noch eine Schicht von ca. 2 cm trockenem Blotting-Papier gelegt und darauf einfacher Zellstoff, immer in Gelgröße. Zuletzt brauchte man noch ein Gewicht zum Beschweren der Apparatur. Aufgrund von Kapillarkräften wird die SSC-Lösung durch das Agarosegel und die Membran nach oben angesaugt und die DNA vom Gel auf die Membranen übertragen. Die Übertragung der Nukleinsäuren auf die Membranen dauerte über Nacht. Nach Durchführung des Southern Blots wurde die DNA auf der Membran mit Hilfe von UV-Belichtung (154 nm, 120 J / cm²; Biolink BLX) fixiert, damit sie durch die folgenden Hybridisierungs- und Waschschrte nicht abdiffundieren konnte.

Hybridisierung und Immuno-Farbdetektion

Anschließend wurden die Membranen zur Prähybridisierung in Glaszylinder (Biometra) gegeben und mit 10 ml, auf 60 °C vorgewärmten Standardhybridisierungspuffer versetzt. Darin wurden sie bei 60 °C unter Rotation im Hybridisierungssofen 1 Stunde inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membranen zu blockieren. Danach wurde der Standardhybridisierungspuffer verworfen und die vorher hergestellte entsprechende Dig-Sonde dazu gegeben. Die Hybridisierung dauerte über Nacht, aber nicht länger als 16 Stunden.

Die Immuno-Farbdetektion der Fragmente erfolgte am nächsten Tag nach dem *Protocol for Detection of Digoxigenin Labelled DNA or RNA* (nach Roche). Nach der Hybridisierung und nachfolgenden Waschschrten wurde das DNA Fragment auf der Membran mit Anti-Dig-AP-Konjugat markiert. An dem Anti-Dig-AP-Konjugat befand sich eine alkalische Phosphatase, die die abschließend zugegebenen Substanzen NTB und BCIP zu einem blauen Farbstoff umsetzte. Da die alkalische Phosphatase über den Antikörper an die DNA auf der Membran gebunden war, wurde eine blaue Bande auf der Membran sichtbar, die genau die Position und Stärke der DNA-Fragmente zeigte. Die Farbreaktion wurde nach ca. 5-20 min. durch das Überführen der Membran in VE-Wasser gestoppt. Nach dem Stoppen der Reaktion konnten die Banden mit Hilfe des Image Master VDS Systems (Pharmacia Biotech) fotografiert

werden. Die integrierte optische Dichte (IOD) der einzelnen Banden wurde durch die Image MasterVDS Software ermittelt. Es wurden jeweils mehrere Experimente parallel durchgeführt. Dabei wurde immer ein Ansatz für AS-C bzw. AT 2 und β -Aktin gemeinsam durchgeführt. Der Messwert von AS-C bzw. AT 2 wurde mit dem entsprechenden IOD-Wert von β -Aktin aus dem gleichen Versuchsansatz normalisiert.

3.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Bei der Klonierung von DNA werden Bakterien verwendet, welche die Fremd-DNA in einem rekombinanten Plasmid tragen. Durch die Herstellung identischer Zellen dieser Bakterien, welche die replizierten Fremdgene enthalten, können auch seltene DNA-Fragmente nahezu unbegrenzt vermehrt werden. Die Genklonierung kann in mehrere Teilschritte gegliedert werden. Mit Hilfe einer PCR wird das DNA-Fragment zuerst amplifiziert. Die isolierte DNA wird dann in einen geeigneten Vektor ligiert und das rekombinante Plasmid in kompetente Mikroorganismen transformiert. Die Identifikation (Selektion) und Vermehrung (Fermentation) der Mikroorganismen, welche das rekombinante Plasmid tragen, stellt den wesentlichen Schritt der Genklonierung dar. Nach der Präparation des Plasmids aus den Mikroorganismen folgt die Analyse des klonierten Gens.

Die Genklonierung diente zur Vermehrung von DNA-Fragmenten, die z.B. für eine Sequenzierung, oder als Template für die Herstellung der dsRNA oder der Standards für die Real-time RT-PCR dienten.

3.4.8 Amplifikation und Isolierung des DNA-Fragments

In einer PCR wurde eine DNA-Teilsequenz mit den spezifischen Primern amplifiziert. Als Template diente ein bereits vorhandenes Plasmid, das einen großen Teil der AS-C, AT 2 oder β -Aktinsequenz enthielt. Für die Ligation des PCR-Produktes wurde die DNA über Gelelektion oder direkt aus der PCR-Lösung aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde über Absorptionsspektroskopie quantifiziert und in einen geeigneten Vektor ligiert.

3.4.9 Ligation

Für die Ligation wurde der Vektor pGEM®-T Easy verwendet. Dieser besitzt angefügte Thymidin-Basen am 3'-terminalen Ende, welche eine Rezirkularisierung des Vektors verhindern und so die Ligationseffizienz eines PCR-Produktes in das Plasmid steigern. Außerdem stellen sie kompatible Überhänge für die amplifizierten DNA-Fragmente dar. Diese besitzen am 3'-Ende Deoxyadenosin, welches die Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion anfügt. Vektor und DNA-Fragment besitzen also einzelsträngige Überhänge, die „sticky ends“. Diese sind komplementär und bilden über Wasserstoffbrücken schwache Basenpaarungen. Die DNA-Ligase festigt diese Verknüpfungen durch Phosphodiesterbindungen zwischen den beiden Fragmenten.

Als Anleitung für die Ligation diene das „pGEM®-T Easy Vector System“. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in der Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

| | |
|-------------------------------------|--------|
| 2x Ligationspuffer | 2,5 µl |
| pGEM®-T Easy Vector (50 ng / µl) | 0,5 µl |
| PCR Produkt (125 ng / µl) | 1,0 µl |
| T4 DNA Ligase | 0,5 µl |
| H ₂ O | 0,5 µl |
| Gesamtvolumen | 5,0 µl |

Die Reaktion erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde das ligierte Plasmid bis zur Transformation bei -20°C gelagert.

3.5 Die Genklonierung

Das Hauptaugenmerk der Genklonierung liegt in dem Einbringen des ligierten Plasmids in Mikroorganismen (Transformation) und deren Vermehrung

(Fermentation). Für die Transformation werden Zellen benötigt, die die Kompetenz besitzen, das Plasmid aufzunehmen. Durch geeignete Labormethoden kann die Kompetenz künstlich erzwungen werden.

In diesem Fall wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes JM109 verwendet, deren Kompetenz künstlich durch Inkubation in eiskalter CaCl_2 -Lösung induziert wurde. Diese Zellen sind anschließend in der Lage, nach einem kurzen Hitzeschock, zirkuläre, doppelsträngige DNA aufzunehmen.

3.5.1 Stammhaltung und Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen aus LB-Medium (Luria-Bertani-Medium). Für frische Übernachtskulturen wurde das LB-Medium jeweils mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Bei antibiotikaresistenten Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Für die Isolierung und kurzfristige Anzucht von einzelnen Kolonien bzw. Stämmen wurden feste Agarnährböden aus LB-Medium, mit 1,5 % Agar versetzt, verwendet. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C aufbewahrt. Zur langfristigen Stammhaltung wurde eine Übernachtskultur mit sterilfiltrierter Glycerinlösung vermischt und bei -70°C gelagert.

3.5.2 Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um solche Arten wirksam zu transformieren, muss man die Zellen einer physikalischen und/ oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit, DNA in ihr Inneres aufzunehmen, verstärkt. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 300 µl einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes JM109 angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler (240 rpm) inkubiert, bis eine OD_{550} von 0,45-0,55 gemessen wurde. Im Anschluss wurde die Bakterien-LB-Lösung gleichmäßig auf 2 vorgekühlte

Zentrifugenröhrchen verteilt, 10 min. auf Eis inkubiert und dann für 10 min. bei 4°C in der Kühlzentrifuge (5800 g) zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Abgießen des Überstands, wurde das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, für 10 min. auf Eis inkubiert und erneut 10 min. bei 4°C in der Kühlzentrifuge (5800 g) abzentrifugiert. *E. coli*-Zellen, die man in eine eisgekühlte Salzlösung (z. B. Calciumchlorid) bringt, können DNA wesentlich wirksamer aufnehmen. Dabei beeinflusst die CaCl₂-Behandlung nur die DNA-Bindung und nicht die eigentliche Aufnahme in die Bakterienzelle. Plasmid-DNA, die man zu den derart behandelten Zellen hinzufügt, bleibt an deren Außenseite haften. Die eigentliche Wanderung der DNA in die kompetenten Zellen hinein wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C in Gang gesetzt. Nach Abnahme des Überstands konnte das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl₂ / 15 %iger Glycerin-Lösung resuspendiert und die Suspension aliquotiert werden. Die Lagerung der Zellen bis zu deren Verwendung erfolgte bei -70°C.

Die Kompetenz der Zellen ließ sich in einer Testtransformation mittels eines zirkulären pGEM®-T Easy Vektors ohne Insert (100 ng) überprüfen. Die Kompetenz wurde anhand der Anzahl gewachsener Kolonien pro ng transformierten Plasmids gemessen.

3.5.3 Transformation: Die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen

Um ein in einem rekombinanten Plasmid inseriertes Genfragment in geeigneten Zellen zu klonieren, muss dieses zunächst in die Zielzellen eingeschleust werden. Als Transformation wird die Aufnahme von genetischem Material in einen Wirtsorganismus bezeichnet. Die meisten Plasmid-Klonierungsvektoren tragen mindestens ein Gen, das den Wirtszellen eine Antibiotikaresistenz verleiht. Zum Screenen der Transformanten plattiert man die Zellen dann auf einem Nährmedium, welches das betreffende Antibiotikum enthält. Die meisten Bakterienarten können DNA-Moleküle aus ihrem Kulturmedium aufnehmen. Oft werden solche DNA-Moleküle in den Zellen abgebaut, aber manchmal können sie auch überleben und sich in der Wirtszelle replizieren. Das geschieht, wenn es sich bei dem DNA-Molekül um ein Plasmid handelt, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt

wird. Ob ein Plasmid aufgenommen wurde und in der Zelle erhalten bleibt, erkennt man gewöhnlich an der Expression der auf dem Plasmid liegenden Gene. So sind *E. coli*-Zellen normalerweise empfindlich gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung des Antibiotikums Ampicillin.

Enthalten sie jedoch ein bestimmtes Plasmid, auf dem ein Gen liegt, das eine β -Lactamase codiert, die das Ampicillin in eine für das Bakterium ungiftige Form umwandelt, kann man sie nachweisen, weil sie von ampicillinsensitiv zu ampicillinresistent transformiert wurden. Man sollte bedenken, dass die Resistenz nicht einfach durch die Gegenwart des Plasmids in den Zellen entsteht. Das Resistenzgen muss auch exprimiert werden, so dass das Enzym synthetisiert wird, welches das Antibiotikum unschädlich macht. Man sollte die Bakterien nicht sofort nach dem Hitzeschock auf dem Selektionsmedium ausplattieren; man belässt sie zunächst in einem kleinen Volumen des Flüssigmediums ohne das Antibiotikum und inkubiert für kurze Zeit. Auf diese Weise können Plasmidreplikation und Genexpression anlaufen, und wenn man die Zellen anschließend durch Ausplattieren mit dem Antibiotikum in Kontakt bringt, haben sie bereits genügend Enzym gebildet, um zu überleben.

Für die Transformation wurden 1 μ l des zu vermehrenden Plasmids bzw. 5 μ l Ligationsansatz mit 200 μ l kompetenter Zellen des Bakterienstammes JM109 für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock der Zellen (42°C) für 2 min., erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 2 min. auf Eis. Nach Zugabe des SOC-Medium (= SOB + Glucose, 450 μ l) wurden die Zellen bei 37°C für 1 h geschüttelt (160 rpm). Im Anschluss wurden die Zellen auf zwei LB-Amp-Agarplatten, welche zuvor mit 20 μ l X-Gal (50 mg / ml in DMF) und 100 μ l IPTG (100 mM in H₂O) bestrichen worden waren, mit Hilfe eines Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Selektion: Der „Blau-weiß-Test“

Es erfolgte ein Verdünnungsausstrich einer Kolonie, welche das rekombinante Plasmid aufgenommen hat, auf einer neuen LB-Amp-Agarplatte mit X-Gal und IPTG. Dabei werden die Kolonien aufgrund ihrer Farbe unterschieden („blue/white screening“).

Es besitzen zwar alle gewachsenen Kolonien das Plasmid, da eine Selektion über die Antibiotikaresistenz gegeben ist (ampR-Gen auf Vektor codiert), allerdings besitzen nur die weißen Kolonien ein Insert. Bei der erfolgreichen Klonierung in den Vektor wurde durch das Einfügen eines Inserts in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors das LacZ Genfragment beschädigt. In dem verwendeten Vektor pGEM®-T Easy liegt das lacZ-Gen nahe der „Multiple Cloning Site“. Ein erfolgreich ligiertes Fremd-DNA-Fragment in den Vektor führt zu einer Unterbrechung des lacZ-Gens und verhindert folglich die Produktion einer funktionalen β -Galaktosidase. Da die aus dem Gen resultierende β -Galaktosidase nicht mehr in der Lage ist das auf der LB-Platte als Substrat angebotene Lactose-Analog X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid) zu spalten, kommt die aus der Spaltung resultierende Blaufärbung nicht zustande. Die Zugabe von IPTG als Induktor für die lacZ-Expression ist notwendig, da sonst nicht ausreichend Enzym für die Blaufärbung produziert wird. Allerdings kann es geschehen, dass das Produkt des LacZ-Gens trotz Insert produziert wird, wenn durch das Insert der durchgehende *LacZ*-Leserahmen nicht unterbrochen wird. Deshalb wurden auch die weniger intensiv blaugefärbten Kolonien als positive Klone angesehen und weiter bearbeitet.

Die Agarplatte mit der ausgestrichenen Bakterienkolonie wurde wiederum über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Für die weitere Fermentation wurden am nächsten Tag jeweils 3 ml LB-Amp-Medium mit einer Bakterienkolonie vom Verdünnungsausstrich angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt (260 rpm). Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Präparation aus den Zellen.

3.5.4 Plasmid-Präparation

Dieser Vorgang dient der Isolierung des vermehrten Plasmids aus den Bakterienzellen. Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, eine Präparation über alkalische Lyse, sowie die Isolierung unter Verwendung des Miniprep Kits.

Für die Plasmid-Isolierung über alkalische Lyse wurden zwei Fermentationsansätze à 3 ml zusammengeführt. Das Pellet wurde durch Zentrifugation (10000 g) für 5 min. bei RT in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und in 250 µl eiskaltem Puffer A (= Resuspensionspuffer) gelöst. Nach einer fünfminütigen Inkubation (bei RT) und der Zugabe von 250 µl des frisch angesetzten Lysepuffers folgte die alkalische Lyse der Bakterien für 10 min. auf Eis. Bei diesem Prozess findet eine Denaturierung der Proteine und der DNA statt. Nach Zugabe von 350 µl eiskalter KAc-Lösung (= Neutralisierungspuffer) renaturiert zirkuläre doppelsträngige DNA (=Plasmid) schneller als die hochkomplexe chromosomale DNA weswegen erstere in Lösung bleibt und die chromosomale DNA zusammen mit denaturierten Proteinen sowie Zellwandbestandteilen ausfällt. Nach 5 min. Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (12000 g) bei 4°C für 5 min. sedimentiert. Jeweils 800 µl der im Überstand verbliebenen Plasmid-DNA wurden mit 1 µl einer DNase-freien RNase A Lösung versetzt, um RNA-Reste in der Lösung zu verdauen. Die Lösung wurde dabei für 5 min. bei RT aufbewahrt. Anschließend wurde die Lösung mit 800 µl eines Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) versetzt, 1 min. gevortext und 2 min. bei 15000 g zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen, wässrigen Phase wurde diese mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, gevortext und für 2 min. bei 15000 g zentrifugiert. Der letzte Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurde die obere, wässrige Phase erneut abgenommen und mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol (100 %) vermischt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte über Nacht bei -70°C. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugieren (4°C / 20400 g für 3 min.) pelletiert und nach Entfernung des Überstandes mit 400 µl Ethanol (70 %) zweimal gewaschen, gevortext und bei 4°C / 20400 g für 3 min. abzentrifugiert. Nach dem Abtrocknen wurde das Pellet in 30 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Konzentration des Plasmids wurde über Absorptionsspektroskopie bestimmt.

Ist eine nachfolgende Sequenzierung des im isolierten Plasmid inserierten DNA-Fragments erforderlich, so sollte das Plasmid nicht über alkalische Lyse präpariert werden, da sich im Eluat noch Ethanol- und Phenolrückstände befinden können, welche die Sequenzierung der DNA erheblich stören würden. In diesem Fall erfolgte die Präparation mit dem „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“. Für die Präparation wurde ein Fermentationsansatz (3 ml) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Plasmid wurde mit 50 µl des entsprechenden Puffers eluiert.

Für die anschließende Sequenzierung wurden 30 µl Plasmid mit einer Konzentration von 100 ng / µl benötigt.

Die Aufbewahrung der isolierten Plasmide erfolgte bei -20°C.

3.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Um DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spalten zu können, wurde eine definierte Menge an Enzym (angegeben in der Enzymeinheit Unit) benötigt, die mit der folgenden Formel berechnet werden kann:

Benötigte Einheiten an Enzym (= eingesetzte pmol an DNA x Anzahl der Schnittstellen des Enzyms) / (0,03 x Anzahl der Schnittstellen des eingesetzten Enzymes in lambda-DNA).

Diese Berechnung basiert auf der Definition der Enzymeinheit Unit für Restriktionsendonukleasen. Eine Unit ist danach die Enzymmenge, die 1 µg lambda-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Die zu spaltende DNA wurde unter bestimmten (vom Hersteller angegebenen) Salzbedingungen geschnitten. In die enzymatische Reaktion wurden 0,2-1 µg DNA pro Unit Restriktionsendonuklease sowie 1/10 Volumenanteil des zehnfach konzentrierten Restriktionspuffers eingesetzt. Der Ansatz musste anschließend bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (z. B. 37°C) für ein bis drei Stunden inkubiert werden.

3.5.6 Identifizierung des klonierten Plasmids

Es wurden zwei Wege angewandt, um zu überprüfen, ob es sich bei dem Insert um das gewünschte DNA-Fragment handelt.

Zum einen wurde eine Test-PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Eine zweite Möglichkeit zur Identifizierung der Klone ist die Durchführung eines Restriktionsverdau. Dazu wurde ein passendes Restriktionsenzym, zumeist EcoRI verwendet, welches zwei Schnittstellen auf dem Vektor pGEM®-T Easy nahe dem inserierten Fragment aufweist. Das nach dem Verdau herausgeschnittene Stück ist nur minimal größer als das inserierte DNA-Fragment. Der Verdau wurde nach folgender Anleitung durchgeführt (Tab. 5):

Tabelle 5: Zusammensetzung des Restriktionsverdau

| | |
|-------------------------|----------------|
| H ₂ O | 43,0 µl |
| Puffer | 5,0 µl |
| Plasmid | 1,0 µl |
| Restriktionsenzym EcoRI | 1,0 µl |
| Gesamtvolumen | 50,0 µl |

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.

Die Analyse des PCR-Produkts bzw. des verdauten Plasmids erfolgte auf einem Agarose-Gel.

3.5.7 Mikromethode zur Präparation genomischer DNA aus *S. frugiperda*

Die Lepidopteren (ganze Tiere) wurden mit Hilfe eines Homogenisators in 500 µl Extraktionspuffer in einem Reagenzglas homogenisiert. Dann wurde das Homogenisat in ein Eppendorfgefäß überführt und noch zweimal mit 500 µl Extraktionspuffer nachgespült, damit auch die Rest-DNA der Präparation zu Verfügung stand. Der Ansatz wurde 20-30 min. bei 65°C inkubiert. Dann wurde

180 µl Kalium-Acetat zugefügt, kräftig geschüttelt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Bei 4°C, 13000 g wurde 15 min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurde weitere 10 min. zentrifugiert (4°C, 13000 g) und erneut der Überstand (1 ml) überführt. Die DNA wurde mit 0.5 Volumen Isopropanol gefällt und kräftig geschüttelt. Dann wurde für genau 30 min. bei 10°C und 13000 g zentrifugiert. Das Isopropanol wurde abgesaugt und es wurde 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen, dazu wurde 1 ml Ethanol zugefügt und kräftig geschüttelt. Hierbei sorgte das Verhältnis Ethanol/Wasser dafür, dass Proteine ausgewaschen wurden, aber die DNA nicht in Lösung ging. Nun wurde 10 min. bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das ganze Procedere ein zweites Mal wiederholt. Dann wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

3.6 Genexpressionsanalyse

Um die Wirkung der RNA-Interferenz auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die Expression des Allatotropin 2 und des Allatostatin-C-Gens näher analysiert. Nachdem die Tiere mit der hergestellten dsRNA bzw. Kontrollringer injiziert und die zu untersuchenden Gewebe präpariert worden waren, erfolgte die Isolierung der RNA aus den Gewebeproben. Diese wurde über RT-PCR in cDNA umgeschrieben, welche dann amplifiziert wurde.

3.6.1 RNA-Isolierung mit dem „RNeasy® Mini Kit“

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den präparierten Geweben wurde nach Anleitung des RNeasy® Mini Protokoll durchgeführt. Dabei mussten die bei -70°C gelagerten Gewebe zunächst homogenisiert werden. Für das Gehirn-Gewebe reichte die Homogenisierung für 3 min. mit einem Gewebehomogenisator (Kontes, Vineland, USA). Große Gewebe wie etwa der Darm mussten vor der Homogenisierung zusätzlich per Hand mit sterilen und vorgekühlten Mörser und Stößel in Flüssigstickstoff zerkleinert werden, bis das Gewebe pulverisiert war. Für die Isolierung wurden etwa 30 mg Gewebe pro Ansatz eingesetzt. Bei Gehirn-Proben

entsprach dies etwa 45 Tieren, für die anderen Gewebe reichten 25 Tiere. Für die Homogenisierung mit dem Homogenisator wurde das Gewebe in 600 µl RLT-Puffer (+ β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Vor dem ersten Waschschrift wurde außerdem ein DNase-Verdau auf einer oligo-dT-Säule für 1 h bei 29°C durchgeführt, um Reste von genomischer DNA zu entfernen. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration über Absorptionsspektroskopie ermittelt. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

3.6.2 RNA-Isolierung mit Trifast

Bei dieser alternativ verwendeten Methode wurde das Gewebe in 250 µl peqGold Trifast (Peqlab, Erlangen, Germany) homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 750 µl der Substanz wurde die Lösung gemischt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Lösung für 15 sec gevortext, 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 min. bei 17500 g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Mit der oberen, wässrigen Phase wurde dieser Schritt wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde erneut abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versetzt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch anschließende Zentrifugation für 10 min. (17500 g bei 4°C) gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen und 10 min. bei 17500 g / 4°C herunter zentrifugiert. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 µl RNase freiem H₂O gelöst. Nachdem die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt worden war, wurde die RNA bei -70°C aufbewahrt.

DNase Verdau

Für die RNA-Isolierung mit Trifast wurde ein nachträglicher DNase-Verdau (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt, um potentielle genomische DNA Kontamination zu verhindern, welcher sich wie folgt zusammensetzte (Tab. 6). Bei der mit dem „RNeasy® Mini Kit“ durchgeführten Isolierung war dieser Schritt nicht notwendig, da ein Verdau von DNA-Resten bereits auf der Säule stattfand.

Tabelle 6: Zusammensetzung des DNase-Verdaus

| | |
|-------------------------------|----------------|
| RNase freies H ₂ O | 7,5 µl |
| RNA | 1,0 µl |
| DNase Puffer | 1,0 µl |
| Turbo-DNase | 0,5 µl |
| Gesamtvolumen | 10,0 µl |

Der Verdau fand bei 37°C für 1 h statt. Anschließend wurde der Ansatz mit 0,5 µl EDTA (50 mM, pH 8) versetzt und die Lösung für 10 min. bei 75°C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Bis zum Einsatz für die RT-PCR wurde die RNA wieder bei -70°C aufbewahrt.

Die RNA wurde quantifiziert und die Qualität mit Hilfe des Spektrometers bestimmt.

3.7 Herstellung der dsRNA

3.7.1 Amplifizierung der T7-Template

Im Rahmen dieser Studie sollten die amplifizierten DNA-Fragmente als Template für die Herstellung der AS-C-dsRNA, AT 2-dsRNA, sowie der SK-dsRNA mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase dienen. Aus diesem Grund wurden für die PCR sequenzspezifische T7-Primer verwendet, welche am 5'-Ende um eine spezifische T7-Promotorsequenz verlängert sind. Die amplifizierten DNA-Fragmente weisen dann ebenfalls an beiden Strängen diese T7-Sequenz als Erkennungs- und Bindungsstelle für die T7-RNA-Polymerase auf.

Für die Amplifizierung des 277bp umfassenden AS-C Fragments (293bp-570bp) wurde das Plasmid Mal 2 genutzt, in welchem wiederum eine Teilsequenz der Spofr-AS-C cDNA integriert ist (siehe Anhang). Als forward- und reverse-Primer dienten T7-AS-Cf und T7-SpoAS-Cr. Als Template für die Amplifizierung des T7-AT 2 Fragments wurde das Plasmid Mal10 eingesetzt, welches (Plasmid pGEMTeasy) als Insert eine Teilsequenz der Spofr-AT 2 cDNA (siehe Anhang) trägt. Innerhalb dieser Teilsequenz befindet sich der 195bp umfassende Sequenzbereich für das zu amplifizierende AT 2 Fragment (23bp-218bp). Als Primer wurden T7- AT 2f und T7-AT 2r verwendet. Die Herstellung des 342bp langen Sulfakinin-Fragments erfolgte mit dem Template SK2 (32bp-374bp) (Insert: SK-Teilsequenz aus *G. bimaculatus*, siehe Anhang), sowie den Primern T7-SKf10 und T7-SK10. Für die Herstellung des T7-SK-Fragments wurden pro Ansatz 2,5 µl DMSO (Endkonzentration 5 %) und entsprechend weniger Wasser hinzugefügt.

Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermal Cycler mit den entsprechenden PCR-Programmen, welche im Folgenden für jedes T7-Template einzeln aufgeführt sind (Tab. 7-9).

Tabelle 7: PCR-Programm für die Herstellung des T7-AS-C Fragments

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen |
|----------------|-------------------|-------------|----------------------|
| Denaturierung | 95°C | 3 min. | 1 |
| Denaturierung | 94°C | 30 s | |
| Hybridisierung | 68°C | 45 s | 10 |
| Elongation | 68°C | 1 min. | |
| Denaturierung | 94°C | 30 s | |
| Hybridisierung | 60°C | 45 s | 40 |
| Elongation | 68°C | 90 s | |
| Elongation | 68°C | 10 min. | 1 |
| Kühlung | 4°C | - | |

Tabelle 8: PCR-Programm für die Herstellung des T7- AT 2 Fragments

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen |
|----------------|-------------------|-------------|----------------------|
| Denaturierung | 95°C | 3 min. | 1 |
| Denaturierung | 94°C | 30 s | |
| Hybridisierung | 68°C | 45 s | 10 |
| Elongation | 68°C | 1 min. | |
| Denaturierung | 94°C | 30 s | |
| Hybridisierung | 62°C | 45 s | 40 |
| Elongation | 68°C | 90 s | |
| Elongation | 68°C | 10 min. | 1 |
| Kühlung | 4°C | - | |

Tabelle 9: PCR-Programm für die Herstellung des T7-Sulfakinin-Fragments

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen |
|----------------|------------|---------|---------------|
| Denaturierung | 95°C | 4 min. | 1 |
| Denaturierung | 94°C | 30 s | |
| Hybridisierung | 67°C | 1 min. | 1 |
| Elongation | 72°C | 2 min. | |
| Denaturierung | 95°C | 45 s | |
| Hybridisierung | 64°C | 1 min. | 45 |
| Elongation | 72°C | 2 min. | |
| Elongation | 72°C | 10 min. | 1 |
| Kühlung | 4°C | - | |

Die Analytik der Amplifikate erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese.

3.7.2 *In vitro* Transkription

Als Transkription wird im Allgemeinen das Umschreiben der DNA in RNA bezeichnet, d.h. ein spezifischer DNA-Abschnitt dient als Matrize für die Synthese des RNA-Stranges. Das für die Transkription benötigte Enzym ist die DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche sich an einer Erkennungssequenz der DNA (Promotor) anheftet. Das Ablesen des DNA-Stranges erfolgt vom 3`-OH-Ende in 5`-Richtung, die Synthese des RNA-Stranges verläuft vom 5`-zum 3`-Ende. Dabei setzt das Enzym freie Nukleotide, welche komplementär zu den Basen des DNA-Stranges sind, aneinander. Diese werden über Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3`-OH-Ende des einen Nukleotids und dem 5`-Phosphatende eines anderen Nukleotids verknüpft.

Inzwischen ist die *in vitro* Transkription eine gängige Methode, um große Mengen an RNA künstlich im Labor herzustellen. So kann ausgehend von einem Vektor (z.B. Plasmid oder Bakteriophage), welcher die für die Transkription gewünschte DNA-Sequenz enthält, jede Art von RNA synthetisiert werden. Die dafür verwendeten Enzyme sind RNA-Polymerasen, die ursprünglich aus Bakteriophagen stammen. Diese Proteine weisen eine hohe Spezifität für die Promotorsequenzen auf.

Zur Herstellung der dsRNA wurden im Vorfeld die in dem Vektor pGEM®-T Easy eingebauten Template (Mal 10, Mal 2 bzw. SK 2) über PCR amplifiziert und die PCR-Produkte isoliert. Die dafür verwendeten Primer enthielten spezifische T7-Promotorsequenzen für die RNA-Polymerase. Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente, welche 5`-terminal um die entsprechenden T7-Promotorsequenzen verlängert waren, erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem „MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Enzym für die RNA-Polymerasereaktion war die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen.

Tabelle 10: Pipettierschema für den Transkriptionsansatz

| | |
|-------------------------------|----------------|
| RNase freies H ₂ O | 2,0 µl |
| ATP, CTP, GTP, UTP (100mM) | jeweils 2,0 µl |
| 10 x Reaktionspuffer | 2,0 µl |
| dsDNA | 6,0 µl (~1 µg) |
| T7-RNA-Polymerase | 2,0 µl |
| Gesamtvolumen | 20,0 µl |

Alle Komponenten (Tab. 10) wurden sanft durch Pipettieren gemischt, leicht anzentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 µl RNase freie DNase1 zugegeben, um restliche DNA-Reste bei 37°C für 15 min. zu verdauen. Durch eine Inkubation bei 65°C für weitere 15 min. wurde der Verdau gestoppt und die DNase zerstört. Nach Zugabe von 15 µl RNase freiem H₂O und 30 µl LiCl-Präzipitationslösung (7,5 M LiCl, 50 mM EDTA) erfolgte die Fällung der RNA bei -20°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die synthetisierte RNA im Ansatz durch Zentrifugation bei 4°C in der Kühlzentrifuge (15 min. bei 19000 g) pelletiert, das Pellet mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut bei 4°C (5 min. bei 19000 g) abzentrifugiert. Nach dem Trocknen (mind. 30 min.) wurde das Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Die dsRNA wurde nochmals für 5 min. bei 95°C im Thermal Cycler inkubiert, was zur Denaturierung der dsRNA führt, um unerwünschte Sekundärstrukturen, welche die RNA bei schneller Abkühlung häufig bildet, zu entfernen. Das Annealing der RNA erfolgte durch langsames Abkühlen der dsRNA bis auf Raumtemperatur über Nacht.

Die Konzentration der dsRNA wurde photometrisch bestimmt und ein Aliquot als Kontrolle über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die weitere Lagerung der dsRNA bis zur Injektion erfolgte bei -20°C.

3.8 RT-PCR

Um den Einfluss der RNA-Interferenz auf die untersuchten Gene AS-C und AT 2 festzustellen, wurde die aus den Geweben isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Für eine Quantifizierung wurde die cDNA dann mit genspezifischen Primern in einer PCR amplifiziert.

Bei der RT-PCR wird zwischen zwei Verfahren unterschieden. Die One-Step RT-PCR ermöglicht es, die gesamte Reaktion von der cDNA-Synthese bis zur PCR-Amplifikation in einem Schritt durchzuführen. Dabei wird die Taq-Polymerase erst nach der Reversen Transkription durch Freisetzung aktiviert. Die One-Step RT-PCR verringert jedoch mögliche experimentelle Variationen, da beide enzymatischen Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt werden, und bedeutet somit einen erheblichen Nachteil, wenn eine Optimierung der Reaktion notwendig ist.

Eine zweite Methode ist die Two-Step RT-PCR, welche die Reverse-Transkriptase-Reaktion von der PCR-Amplifikation trennt. Dies erlaubt die Durchführung vieler, verschiedener PCR Assays ausgehend von einer cDNA.

Um eine Expressionsanalyse beider Gene in mehreren Geweben durchführen zu können, war zunächst eine Optimierung der RT-PCR nötig. Aus diesem Grund wurde letztere Methode für die Analyse bevorzugt.

3.8.1 Optimierung der RT-PCR

Für die Optimierung wurde die Two-Step RT-PCR zunächst im Thermal Cycler durchgeführt. Für den Reverse-Transkriptase-Schritt, also die Umsetzung von RNA in cDNA, wurde die M-MLV RT (H-) (Promega) bzw. high- capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Warrington, UK) verwendet. Die Anwendung des Enzyms für eine erfolgreiche Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die zugegebene Menge der Komponenten für einen Ansatz wurde halbiert. Die Zusammensetzung des Reverse Transkriptase-Ansatzes ist in (Tab.11) dargestellt.

Tabelle 11: Zusammenstellung der Komponenten für die RT-Reaktion

| | |
|--|----------------|
| RNA | 1,0 µl |
| Oligo(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg / µl) | 0,5 µl |
| M-MLV RT 5x Reaktionspuffer | 2,5 µl |
| 10 mM dNTPs | 0,7 µl |
| RNase Inhibitor | 0,5 µl |
| RNase freies H ₂ O | 6,8 µl |
| M-MLV Reverse Transkriptase (H-) | 0,5 µl |
| Gesamtvolumen | 12,5 µl |

Für den Ansatz wurden zunächst die entsprechend verdünnte RNA (200 ng RNA aus Gehirn; 400 ng RNA aus Darm) und die Oligo(dT)'s in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, für 5 min. bei 70°C und anschließend sofort 5 min. auf Eis inkubiert, was das Annealing der Primer an das poly(A)-Ende der in der Gesamt-RNA enthaltenen mRNA bewirkt. Nach Zugabe der übrigen Komponenten erfolgte die Reverse Transkription im Thermal Cycler mit folgendem Programm (Tab. 12):

Tabelle 12: Temperaturprofil für die Reverse Transkription

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit (min.) |
|----------------------|-----------------|-------------|
| cDNA-Synthese | 50 | 60 |
| final extension step | 72 | 10 |
| Enzym-Inaktivierung | 95 | 1 |

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Die cDNA diente als Template für die anschließende PCR, in welcher die AT 2 und AS-C Fragmente für eine Untersuchung der Genexpression in den verschiedenen Geweben von *S. frugiperda* amplifiziert wurden. Gemäß der Annahme, dass die Reverse Transkriptase die RNA 1:1 in cDNA umsetzt, wurde die Konzentration der cDNA aus der eingesetzten RNA-Konzentration übernommen.

Für die Amplifizierung des AT-Fragments wurden die Primer ATf und ATr verwendet. Für die Expressionsanalyse über Real-time RT-PCR mussten Primer verwendet werden, welche nur ein Fragment amplifizieren. Werden in der PCR-Reaktion mehrere Fragmente erhalten, so ist eine spezifische Detektion der einzelnen Amplifikate nicht möglich. Das AS-C Fragment wurde mit den Primern AS-Cf und AS-Cr amplifiziert. Für die Auswertung der Daten wurde ebenfalls eine Normalisierung der Werte mittels eines Referenzgens durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus verschiedenen Geweben auch auf die Expression dieses Gens getestet. In dieser Studie wurde für die Normalisierung der Werte zusätzlich die Expression von β -Aktin gemessen. Für die Amplifikation des β -Aktin-Fragments wurden die Primer Actf und Actr verwendet. Für die Optimierung im Thermal Cycler wurde ein halber PCR-Ansatz (25 μ l) mit 1 μ l cDNA-Template pipettiert. Die eingesetzten Primer waren 5 μ M konzentriert (Endkonzentration = 100 nM).

Um eine Kontamination durch genomische DNA, welche das Resultat der Expressionsanalyse beeinflussen würde, auszuschließen, wurde für alle RNA-Proben ein Kontaminationstest durchgeführt. Dabei wurde anstelle der cDNA die ursprüngliche RNA nach entsprechender Verdünnung (analog wie cDNA in der RT-Reaktion) für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde im Thermal Cycler mit folgendem Programm durchgeführt (Tab. 13):

Tabelle 13: PCR-Programm für die Amplifizierung der Fragmente

| Schritt | Temperatur in °C | Zeit |
|---------|---|------------|
| 1 | 95 | 3 min. |
| 2 | 94 | 30 sec |
| 3 | 60 (für AS) bzw. 62 (für AT 2 und β -Actin) | 45 sec 35x |
| 4 | 68 | 90 sec |
| 5 | 68 | 10 min. |

Für die Optimierung war eine Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente (10 μ l Aliquot aus PCR-Ansatz) mittels Gelelektrophorese auf einem Agarose-Gel ausreichend.

3.8.2 Real-time RT-PCR

Um die Auswirkungen der RNA-Interferenz auf die Expression des AT-Gens und des AS-C Gens auszuwerten, wurde die PCR-Reaktion der im Thermal Cycler optimierten Two-Step RT-PCR anschließend in einer Real-time PCR-Maschine durchgeführt. Eine Auftragung der DNA auf ein Agarose-Gel und die anschließende Übertragung auf eine Membran („Southern Blot“) kombiniert mit Sondenhybridisierung und Immunodetektion, um die Expression zu bestimmen, ist bei dieser Methode nicht erforderlich. Die Real-time PCR-Methode ermöglicht eine parallel zur PCR laufende Aufzeichnung der Daten, welche im Anschluss direkt ausgewertet werden können. Während der Real-time PCR erfolgt eine kontinuierliche Messung des entstandenen PCR-Produktes.

Nach Optimierung der Real-time RT-PCR erfolgte die Durchführung der RT-Reaktion mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben. Die Zusammensetzung eines Ansatzes mit RNase Inhibitor ist nachfolgend dargestellt (Tab. 14):

Tabelle 14: Zusammensetzung eines Ansatzes für die RT-Reaktion

Zusammenstellung der Komponenten für die RT-Reaktion siehe Tab. 11

| | |
|------------------------------------|---------------|
| 10 x RT Buffer | 1,0 µl |
| 25 x dNTP Mix (100mM) | 0,4 µl |
| 10 x RT Random Primer | 1,0 µl |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 0,5 µl |
| RNase Inhibitor | 0,5 µl |
| Nuclease-free H ₂ O | 1,6 µl |
| Gesamtvolumen | 5,0 µl |

Der RT-Ansatz wurde mit 5 µl RNA versetzt, so dass sich insgesamt ein Reaktionsvolumen von 10 µl ergab. Die RT-Reaktion wurde in 0,5 ml PCR-Tubes im Thermal Cycler bei folgendem Programm durchgeführt (Tab. 15):

Tabelle 15: Temperaturprofil für die RT-Reaktion

Siehe auch Tab. 12

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit |
|---------|-----------------|----------|
| 1 | 25 | 10 min. |
| 2 | 37 | 120 min. |
| 3 | 85 | 5 sec |

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Für die anschließende PCR-Reaktion in der Real-time PCR-Maschine wurde anfangs die Taq-Polymerase von Fermentas in einem halben Ansatz verwendet. Entsprechend der Zugabe der für die Detektion in der Real-time PCR erforderlichen Menge SYBR-Green (0,5 x), wurde diese Menge an H₂O für jeden Ansatz abgerechnet.

Nach Optimierung der RT-PCR in der Real-time Maschine fand die Sammlung der Expressionsdaten mit dem MicroAmp™ PowerSYBR® Green PCR MasterMix statt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes (Tab. 16) erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 16: Zusammenstellung des Ansatzes für die Real-time PCR

| | |
|-----------------------------------|---------|
| PowerSYBR® Green PCR MasterMix | 10,0 µl |
|-----------------------------------|---------|

Methoden

| | |
|---------------------|---------|
| H ₂ O | 8,0 µl |
| 5 µM forward Primer | 0,5 µl |
| 5 µM reverse Primer | 0,5 µl |
| Template | 1,0 µl |
| Gesamtvolumen | 20,0 µl |

Als Wasser wurde entweder steriles HPLC-H₂O oder RT-PCR Grade Water (Applied Biosystems) verwendet. Neben den cDNA-Proben wurden bei jedem Lauf mindestens eine frisch hergestellte 10er Verdünnungsreihe des jeweiligen Standards mit 5 Verdünnungsstufen mit aufgetragen. Die gewählten Verdünnungsstufen für die Amplifizierung einer Standardkurve waren abhängig vom PCR-Programm.

Die Proben wurden in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Für jede PCR wurde eine NTC-Probe, welche kein Template enthielt, parallel analysiert, um Kontaminationen auszuschließen. Außerdem wurde für jede Probe eine RT-Minus Kontrolle mit auf die Platte pipettiert, welche die isolierte RNA in entsprechender Verdünnung enthielt, um die Probe auf Reste genomischer DNA zu überprüfen, welche mit amplifiziert und das Ergebnis verfälschen würde.

Für die Amplifizierung wurde folgendes PCR-Programm verwendet (Tab. 17):

Tabelle 17: Real-time PCR-Programm

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min.] | Anzahl Zyklen |
|----------------------|-----------------|-------------|---------------|
| 1 | 95 | 2:00 | 1 |
| 2 | 95 | 0:15 | 41 |
| | 60 bzw. 62 | 1:00 | |
| (Dissociation stage) | 60 | 1:00 | 1 |
| | 95 | 0:15 | |

3.8.3 Herstellung eines Standards

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt und somit dem Ct-Wert eines Reaktionsansatzes einer Startkopienzahl der mRNA zugeordnet. Anschließend wurden die Absolutwerte der Zielgenexpression normalisiert auf die des Referenzgens β -Aktin. Für eine Quantifizierung der Expressionsdaten war die Herstellung eines externen Standards notwendig, welcher die Sequenz des amplifizierten Ziel-Gens besitzt. Die Amplifizierung verschiedener Verdünnungsstufen (10er Verdünnungsreihe) mit bekannter Startkopienzahl in der Real-time PCR ermöglicht eine Auftragung der resultierenden Ct-Werte gegen den Logarithmus der Startkopienzahl (=Standardkurve).

Als Template für die Herstellung der DNA-Standards dienten Plasmide, welche DNA-Fragmente inserieren, deren Sequenz analog zur Sequenz der amplifizierten Zielgene ist. Aus diesem Grund wurde für die Expressionsanalyse des AS-C und des AT 2 Gens jeweils ein passender Standard hergestellt. Für die Herstellung des Allatostatin C-Standards wurden das Plasmid Mal 2, sowie die Primer AS-Cf und AS-Cr verwendet. Als Template für die Amplifizierung des AT 2 Standards wurde das Plasmid Mal 10 verwendet, als Primer dienten ATf und ATr. Da sowohl eine absolute Quantifizierung der Zielgene, als auch des Referenzgens durchgeführt wurde, war auch die Anfertigung eines β -Aktin-Standards notwendig. Für die PCR wurde das Plasmid Aktin-150 mit den Primern Actf und Actr verwendet.

3.8.4 Auswertung der Real-time RT-PCR

Die Basislinie, welche in der Real-time PCR von dem Gerät automatisch während der Hintergrundphase der PCR erfasst wird, wurde für alle 96-Well-Platten automatisch mit Hilfe der für die Auswertung verwendeten SDS 7300 Systems Software (Applied Biosystems) gesetzt. Der Threshold wurde manuell für jede Platte innerhalb der logarithmisch-linearen Phase auf 0,8 gesetzt. Dazu wurde die logarithmische Ansicht im Amplification Plot gewählt, in welcher ausschließlich diese Phase der PCR dargestellt ist. Aus der von dem Programm automatisch anhand der Startkopienzahl für jede Verdünnungsstufe erstellten Standardkurve wurde die Quantität in allen Proben berechnet. Die quantifizierte Expression des Zielgens wurde anschließend auf die ermittelte Quantität von β -Aktin für jede Probe bezogen. Es gibt mehrere Möglichkeiten der relativen Quantifizierung von mRNA bei der Real-time RT-PCR. Deshalb wurden die Daten zusätzlich mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet, welche die C_t -Werte nach Normalisierung mit dem Referenzgen auf eine auserwählte Kalibrator-Probe bezieht. Eine Standardkurve wird für die relative Quantifizierung mit dieser Methode nicht gebraucht. Die Auswertung erfolgte für alle Proben über die Standardkurve. Dennoch wurden beide Methoden anhand eines Beispiels miteinander verglichen. Die relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde nach folgendem Modell (Applied Biosystems, 2007) berechnet:

$$(1) C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} = \Delta C_t \text{ (für Kalibrator-Probe und andere Proben)} \quad (3.2)$$

$$(2) \Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kalibrator} = \Delta\Delta C_t \quad (3.3)$$

$$(3) \text{ Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.4)$$

C_t : cycle threshold; Zielgen: AS-C bzw. AT 2; Referenzgen: β -Aktin; Kalibrator: Ringer-Tiere; Probe: dsRNA injizierte Tiere

Bei der Berechnung der relativen Quantität mit dieser Formel wird eine möglichst gleiche Effizienz der PCR für die Amplifikation der Fragmente von Ziel- und Referenzgen vorausgesetzt. Die PCR-Effizienz lässt sich für jedes Gen aus der Steigung (= Slope) der Regressionsgeraden des Standards in halblogarithmischer Auftragung mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Slope})} \quad (3.5)$$

Da die Effizienz in der Regel nicht gleich ist, empfiehlt es sich die Ergebnisse mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode unter Berücksichtigung der Effizienz [Pfaffl, 2001a] zu verifizieren.

$$R = \frac{\epsilon_{AS-C \text{ bzw. AT } 2}^{\Delta C_t \text{ Zielgen (Kalibrator - Probe)}}}{\epsilon_{Aktin}^{\Delta C_t \beta\text{-Aktin (Kalibrator - Probe)}}$$

R: Verhältnis der Expression des Zielgens zwischen Behandelten und Kontrollen.

R=0.5 bedeutet, dass die Behandlung zu einer 50 % Reduzierung im Vergleich zu den Kontrollen führte.

ϵ : Effizienz der Amplifikation (**Ziel:** Behandlung; **Standard:** Ringer)

Kontrolle: Aktin; Ringer injizierter Tiere **Probe:** dsRNA-injizierte Tiere

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Daten zunächst auf ihre Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden dann mit dem Student's t test statistisch analysiert. Handelte es sich nicht um normal verteilte Daten oder um keine Absolutwerte, sondern prozentuale Angaben, konnte der Student's t test nicht verwendet werden. In diesem Fall erfolgte eine statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U-test, um zwei Testgruppen miteinander zu vergleichen, bzw. mit dem Kruskal-Wallis H-test, um mehrere Testgruppen untereinander zu vergleichen. Für die statistische Auswertung wurde das Programm WinSTAT für Excel verwendet. Statistische Signifikanzen sind in den Grafiken wie folgt gekennzeichnet: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,005; **** P < 0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in *Spodoptera frugiperda*

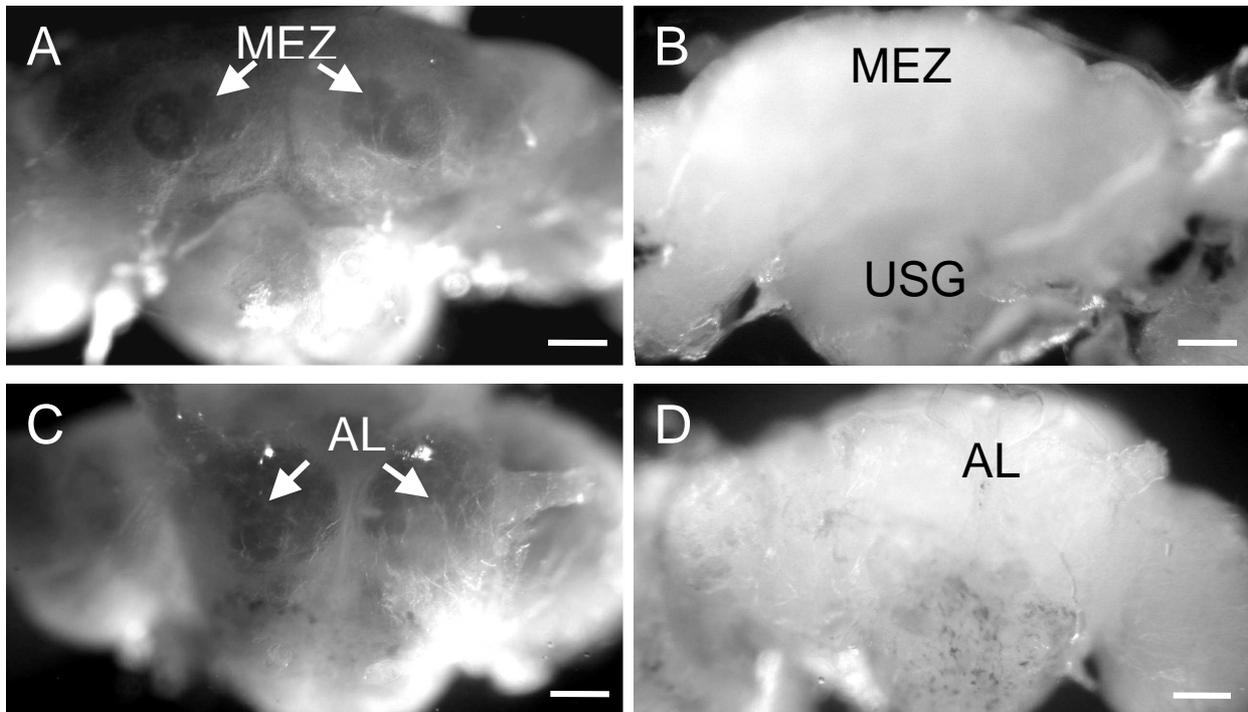
B-Typ Allatostatine zeichnen sich durch ein $W^2(X)_6W^9$ -Motiv aus. Für *G. bimaculatus* wurden fünf Peptide mit diesem typischen Sequenzmotiv aus Gehirnextrakten isoliert [Lorenz et al., 1995]. Keines dieser Peptide zeigte bei *S. frugiperda* einen signifikanten Einfluß auf die Syntheseaktivität der CA von 1-3 Tage alten adulten Weibchen [Oeh, 2000].

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es nicht gelungen, das B-Typ AS Gen aus *S. frugiperda* zu isolieren. Deshalb ist es auch nicht möglich, Expressionsstudien für dieses Präprohormon bei *Spodoptera* durchzuführen. Teil dieser Arbeit war es die B-Typ AS cDNA von *S. frugiperda* zu charakterisieren. Unterschiedliche Kombinationen von degenerierten Primern in Kombination mit Vektorprimern, aber auch mehrere degenerierte Primer gleichzeitig, sollten in verschiedenen Testsystemen mit variierenden Bedingungen getestet werden. Diese variierenden Bedingungen bezogen sich auf alle Komponenten des PCR-Systems wie die Mg^{+} Konzentration, verschiedene Puffer, Primer-Konzentrationen, unterschiedliche Taq-Polymerasen, diverse Zusätze, Oligonucleotid-Konzentrationen, Template-Konzentrationen, sowie verschiedene Annealingtemperaturen und Temperaturprofile. Da bei anderen Lepidopterenarten das B-Typ Allatostatin in verschiedenen Bereichen des Nervensystems und des Gehirns nachgewiesen wurde, sollte polyA⁺ RNA aus diesen Geweben adulter und larvaler *S. frugiperda* isoliert und als Ausgangsmaterial für die 5` und 3` RACE eingesetzt werden. Weiterhin sollte One-Step RT-PCR oder Two-Step RT-PCR zur Herstellung von DNA Fragmenten mit Primerkombinationen der degenerierten Oligonucleotide eingesetzt werden. Keiner dieser Ansätze war jedoch erfolgreich.

Um die Existenz von B-Typ Allatostatinen bei *Spodoptera* nachweisen zu können, wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Experimente mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Allatostatin B1 (Grybi-AS B1) von *G. bimaculatus* [Witek & Hoffmann, 2001] durchgeführt. Auf diese Weise gelang es, B-Typ AS Peptide in

Gewebe von *S. frugiperda* zu lokalisieren. Ein Vergleich der Primärstruktur von AS-B1 von *G. bimaculatus* mit Peptidsequenzen von verschiedenen Lepidopterenarten zeigt, dass Homologien zwischen den Peptiden bestehen (Tabelle 1). Mit Hilfe der Immunfärbungen wurde B-Typ AS immunreaktives Material in den Geweben von *S. frugiperda* detektiert, was vermutlich auf Kreuzreaktivitäten des Grybi-B-Typ AS Peptids mit den mutmaßlichen *S. frugiperda* B-Typ AS Peptiden zurückzuführen ist. In einem Kontrollexperiment mit dem MIP aus *L. migratoria* (AWQDLNAGW-NH₂) wurde eine Kreuzreaktivität von 7 % mit dem kompetitiven ELISA bestimmt [Witek et al., 1999]. Auch mit AKH wurde eine Kreuzreaktivität von 1 % festgestellt. Kontrollfärbungen sollten dazu dienen, die Spezifität der Färbungen zu gewährleisten und nicht gewünschte Kreuzreaktivitäten z. B. mit dem AKH auszuschließen. Da AKH in großen Mengen im Fettkörper detektiert werden kann, wären in diesem Organ am ehesten Färbungen zu erwarten gewesen. Dass im Fettkörper aber keine Färbung erkennbar war, ist ein Hinweis auf die Spezifität der Färbungen mit dem B-Typ Antikörper.

Spezifische Färbungen wurden in den medianen neuroendokrinen Zellen der Antennalloben (Glomeruli) im Gehirn 2 Tage alter adulter Weibchen (Abb. 1) gefunden.



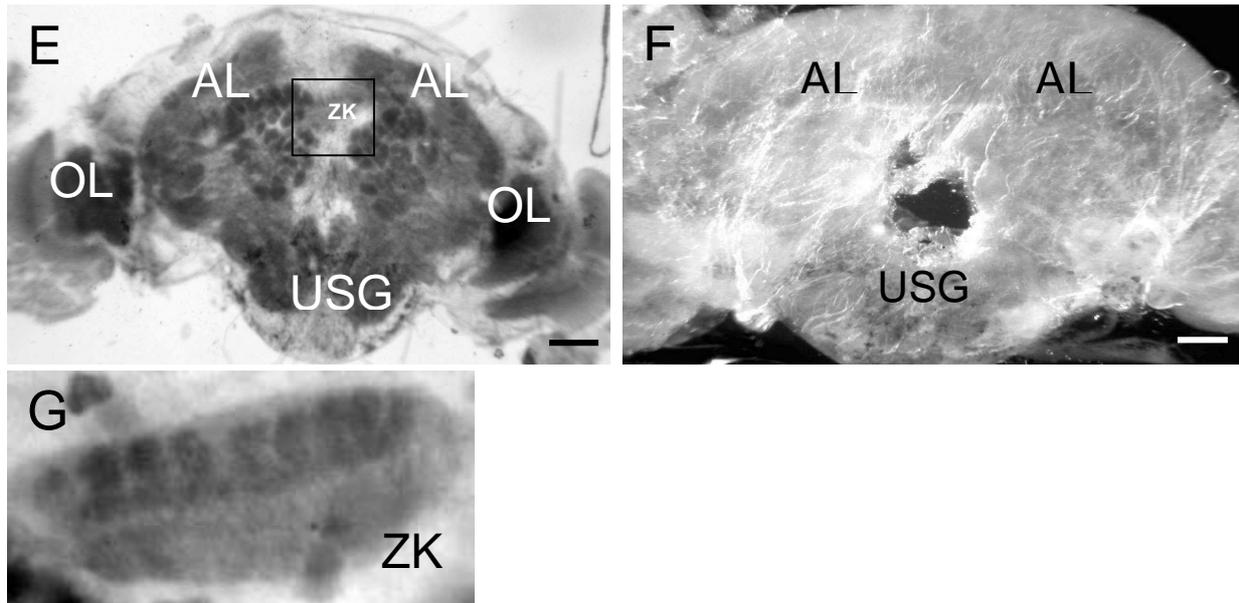


Abb. 1 Lokalisation von B-Typ Allatostatin Peptiden im Gehirn von *S. frugiperda*. Immunhistochemischer Antigen-Nachweis mit dem Antikörper gegen *G. bimaculatus* AS-B1 an Ganzkörperpräparaten. Zentrales Nervensystem 2 Tage alter adulter Weibchen von *S. frugiperda* (A-G). (A) Ventro-posteriore Ansicht auf das Gehirn und das Unterschlundganglion (USG) mit medianen neuroendokrinen Zellen (MEZ)- Pfeile; (B) Kontrolle; (C) Dorso-posteriore Ansicht auf das Gehirn mit Färbung in den Antennalloben (AL) Pfeile; (D) Kontrolle; (E) Dorso-posteriore Ansicht auf das Gehirn mit Antennalloben (AL), optischen Loben (OL) und Zentralkörper (ZK); (F) Kontrolle; (G) Vergrößerte Ansicht des Zentralkörpers aus (E). (A-F) Vergrößerung 1:10, Maßstäbe 200 µm. (G) Vergrößerung 1:50

Zusätzlich gab es starke Färbungen im Neuropil und schwache Färbungen in den neurosekretorischen Zellen der thorakalen und abdominalen Ganglien von Larven im letzten Larvenstadium (L6) (Abb. 2). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass B-Typ AS Peptide im ZNS von adulten Tieren und Larven von *S. frugiperda* zu finden sind.

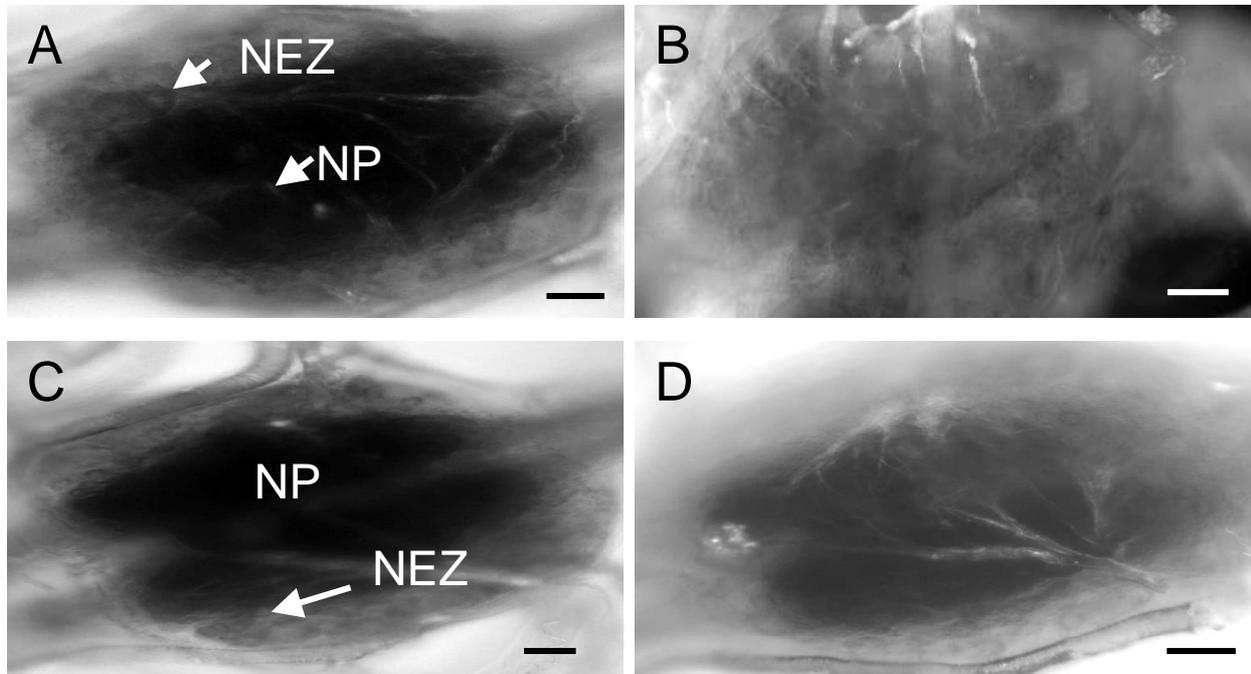


Abb. 2 Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in verschiedenen Ganglien.

Ventrale Ganglienketten von Larven im letzten Larvenstadium (L6) (A-D) von *S. frugiperda* wurden mit dem Antikörper gegen *G. bimaculatus* AS-B1 behandelt. (A) Posteriores Thorakalganglion mit gefärbten neuroendokrinen Zellen (NEZ) und Neuropil (NP); (B) Kontrolle; (C) erstes anteriores Abdominalganglion mit gefärbten neuroendokrinen Zellen (NEZ) und Neuropil (NP); (D) Kontrolle. (A-D) Vergrößerung 1:40, Maßstäbe 50 µm. Details s. Abb. 1.

Außerdem waren Färbungen in den Malpighischen Gefäßen von weiblichen Faltern zu finden. Wahrscheinlich beschränkt sich die Färbung auf die apikale Membran mit Konkrementen zwischen den Zellen (Abb. 3).

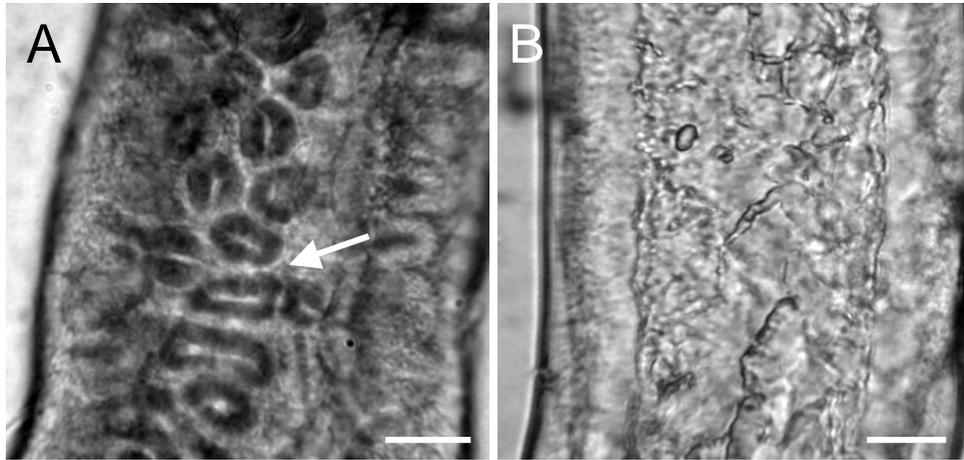


Abb. 3 *Immunhistochemischer Antigen-Nachweis von B-Typ Allatostatinen in Malpighischen Gefäßen.*

Färbungen in Geweben von 2 Tage alten adulten Weibchen von *S. frugiperda*. (A) Gefäße mit gefärbten Konkrementen in der apikalen Membran (Pfeil); (B) Kontrolle.

(A,B) Vergrößerung 1:120, Maßstab 17 µm. Details s. Abb. 1.

Zudem wurden auch Färbungen in der Reifungszone der Hoden von männlichen Larven im vorletzten Larvalstadium gefunden (Abb. 4).

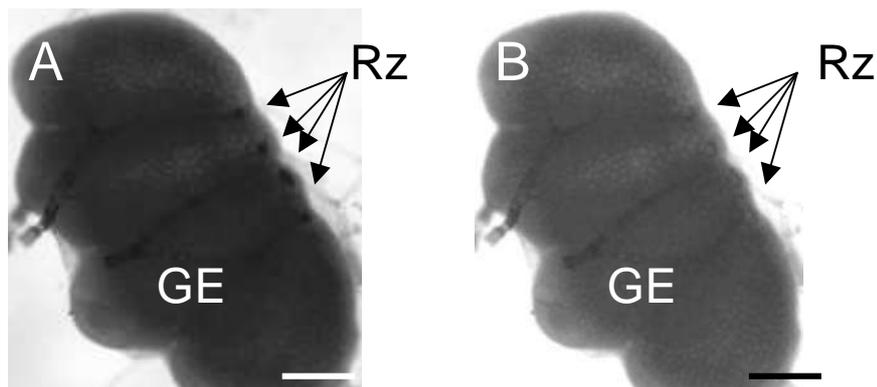


Abb. 4 *Totalpräparat der Hoden von Larven des vorletzten Larvenstadiums von S. frugiperda.*

Immunhistochemischer Antigen-Nachweis mit dem Antikörper gegen *G. bimaculatus* AS-B1. Germarium (GE) mit gefärbter Reifungszone (RZ).

Vergrößerung 1:10, Maßstäbe 300 µm. Details s. Abb. 1.

Ergebnisse

Weitere Färbungen zeigten sich im gesamten Mitteldarm (Abb. 5). Nähere Betrachtungen zeigen, dass verschiedene Zellen der Darmwand angefärbt wurden, allerdings konnten keine bestimmten Bereiche bzw. Zellen identifiziert werden. Auffallend war, dass auch das Fettgewebe am Darm ungefärbt blieb.

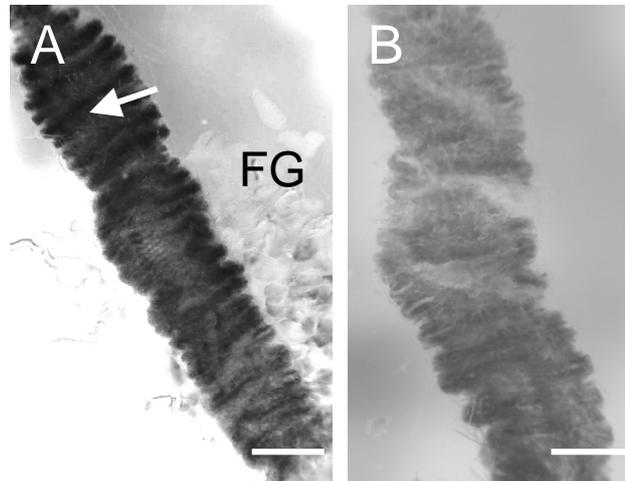


Abb. 5 Totalpräparat des Mitteldarmes eines adulten Weibchens von *S. frugiperda*.

Immunohistochemischer Antigen-Nachweis mit dem Antikörper gegen *G. bimaculatus* AS-B1. (A) Zellen der Darmwand waren gefärbt (Pfeil), anhängendes Fettgewebe (FG) war ungefärbt. Bei der Kontrolle (B) wurde das Fettgewebe entfernt. Details s. Abb. 1.

Vergrößerung 1:5, Maßstäbe 300 µm.

4.2 Mortalität nach Injektion von dsRNA bei *Spodoptera frugiperda* Larven und Adulten

Bei *in vivo* Injektionen kann es zu einer Erhöhung der Mortalität der Tiere kommen, was entweder auf Verletzungen oder auf die verabreichten Substanzen zurückzuführen ist. Deshalb wurden zunächst verschiedene Versuche durchgeführt, um die Mortalität bei *S. frugiperda* Larven und Adulten nach Injektion von dsRNA zu bestimmen und die Versuchsbedingungen gegebenenfalls so zu ändern, dass die Sterblichkeit gering blieb. Die Untersuchungen ergaben, dass die Mortalität von der Menge der injizierten dsRNA abhängt (Tab.18). 15 % der injizierten adulten Weibchen starben sechs Tage nach der Behandlung mit 2 µl Ringer, die Mortalität stieg nach Injektion von 1 µg AS-C Typ- bzw. AT 2-dsRNA nicht an, während nach einer Injektion von 2 µg dsRNA die Mortalität stark anstieg und bei 60 % nach Anwendung der AS-C Typ-dsRNA bzw. 95 % für die AT 2-dsRNA lag. Die Sterblichkeit der Männchen war im Vergleich zu den Weibchen noch höher. 17,5 % der injizierten adulten Männchen starben sechs Tage nach der Behandlung mit 2 µl Ringer, während die Mortalität nach der Injektion von 1 µg AS-C Typ-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA bei 30 % lag. Auch hier stieg die Mortalität nach der Anwendung von 2 µg AS-C Typ-dsRNA stark an, nämlich auf 70 %, und auf 90 % nach Injektion von 2 µg AT 2-dsRNA. Die Sterblichkeit von unbehandelten Larven (5. Larvenstadium bis Puppe) lag bei $10 \pm 0,4$ %. Nach der Injektion von 5 µl Ringer in Larven des vorletzten Larvenstadiums starben $12,5 \pm 1,5$ % der Tiere bis zum Präpuppenstadium, und $21,3 \pm 5,4$ % bzw. $21,6 \pm 5,0$ % nach Injektion von 3 µg AS-C Typ- bzw. AT 2-dsRNA. Diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden adulte Tiere in den folgenden Experimenten mit 1 µg dsRNA in 2 µl Ringer und Larven des vorletzten Larvenstadiums mit 3 µg dsRNA in 5 µl Ringer injiziert.

Tabelle 18: Sterblichkeit von *S. frugiperda* in verschiedenen Entwicklungsstadien

Injektion von 1 µg, 2 µg oder 3 µg doppelsträngiger RNA (dsRNA) in 2 µl oder 5 µl Ringer. Die dsRNA war vom AS-C-Typ (AS) oder dem AT 2 Gen (AT) abgeleitet; Ringerlösung (R). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bei Larven vom ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) bis zum Präpuppenstadium (PP) und bei adulten Weibchen bzw. Männchen über die ersten 6 Tage nach der Imaginalhäutung. Mittelwerte \pm Standardfehler. n = 8-20. Im Falle der Larven wurden 2 Gruppen beobachtet. Es wurde die Sterberate in % der Ausgangsgruppe angegeben.

| Behandlung (2 µl) | Stadium, Geschlecht | Sterblichkeit [%] | n |
|---------------------|------------------------|-------------------|-------|
| 2 µl R | Adulte Weibchen | 15 \pm 5,0 | 20;20 |
| 2 µl R | Adulte Männchen | 17,5 \pm 2,5 | 20;20 |
| 1 µg ds AS / 2 µl R | Adulte Weibchen | 15 | 20 |
| 2 µg ds AS / 2 µl R | Adulte Weibchen | 60 | 20 |
| 1 µg ds AT / 2 µl R | Adulte Weibchen | 20 | 20 |
| 2 µg ds AT / 2 µl R | Adulte Weibchen | 95 | 20 |
| 1 µg ds AS / 2 µl R | Adulte Männchen | 30 | 20 |
| 2 µg ds AS / 2 µl R | Adulte Männchen | 70 | 20 |
| 1 µg ds AT / 2 µl R | Adulte Männchen | 30 | 20 |
| 2 µg ds AT / 2 µl R | Adulte Männchen | 90 | 20 |
| 5 µl R | Larven | 12,5 \pm 1,5 | 12;12 |
| 3 µg ds AS / 5 µl R | Larven | 21,3 \pm 5,4 | 10;17 |
| 3 µg ds AT / 5 µl R | Larven | 21,6 \pm 5 | 8;8 |

4.3 Expressionsanalysen der Gene AS-C bzw. AT 2 von *Spodoptera frugiperda* quantifiziert mittels Real-time RT-PCR

RNA Interferenz ist ein Prozess der sequenzspezifischen post-transkriptionalen Genstilllegung in Organismen (Tuschl, 2001).

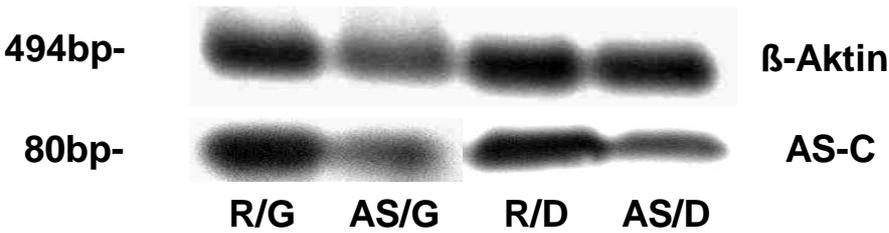
Hierbei kann genspezifische dsRNA in die Organismen injiziert werden, was zu einem gezielten Abbau der mRNA und somit zu einer Ausschaltung oder Reduktion des codierten Peptids/Proteins führt. Gelingt dieses Vorhaben, kann man den RNA-

Interferenz Effekt auf physiologischer Ebene untersuchen und Hinweise auf die Funktion der Genprodukte, in diesem Fall der AS-C bzw. AT 2 Peptide von *S. frugiperda* erhalten. In dieser Arbeit wurde eine Gensuppression durch Injektion von AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA durchgeführt, um die Peptidsynthese von AS-C bzw. des AT 2 zu reduzieren. Der Erfolg der Gensuppressionen wurde anhand von Expressionsanalysen mit Hilfe der reverse-Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) Methode bestimmt.

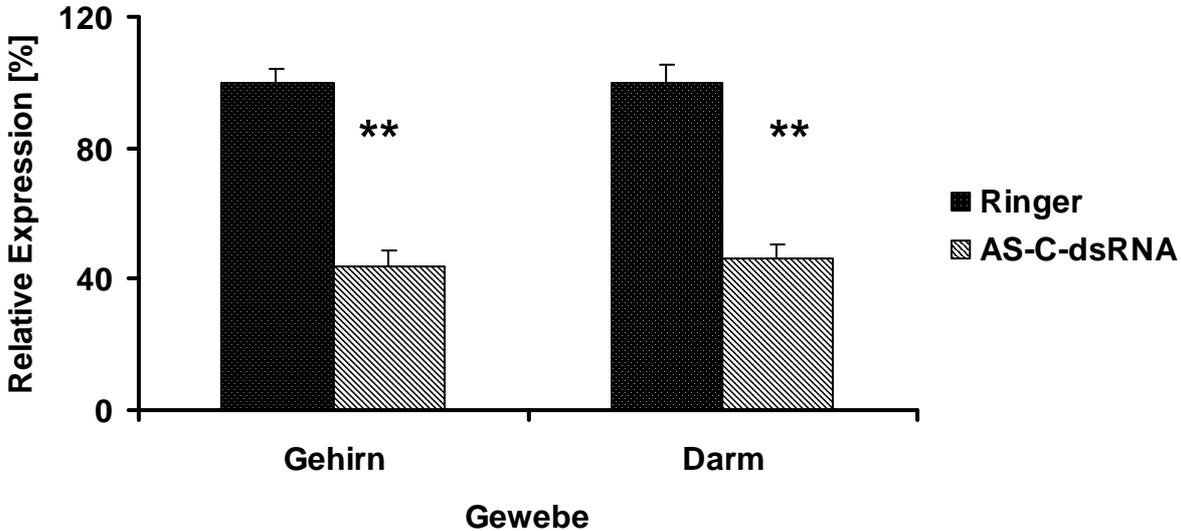
4.3.1 Vergleich verschiedener RT-PCR Analysemethoden zur Bestimmung der Genexpression von AS-C bzw. AT 2

Zunächst wurde die Expression der AS-C bzw. AT 2 Gene mittels RT-PCR und darauf folgendem Southern Blot mit Hybridisierung und Immunfärbung untersucht. Die Ergebnisse der Analysen wurden mit Genexpressionsanalysen, die mit der Real-time RT-PCR erhalten worden waren, verglichen (Abb. 6). Die Genexpressionsanalyse mittels Real-time RT-PCR ermöglicht neben einer relativen Bestimmung auch Möglichkeiten der absoluten Quantifizierung. Um die Resultate der in dieser Arbeit angewandten relativen Expressionsanalyse mittels sequenzspezifischer Standardkurven mit einer anderen Analysemethode zu vergleichen, wurden sämtliche Messdaten zusätzlich mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Somit konnten auch verschiedene Auswertungsmethoden für die Real-time PCR verglichen werden. Beispielhaft werden hier (Abb. 6 und 7) die Ergebnisse für Tiere gezeigt, die am ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) mit AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA injiziert und in L5/3 präpariert wurden.

(A)



(B)



(C)

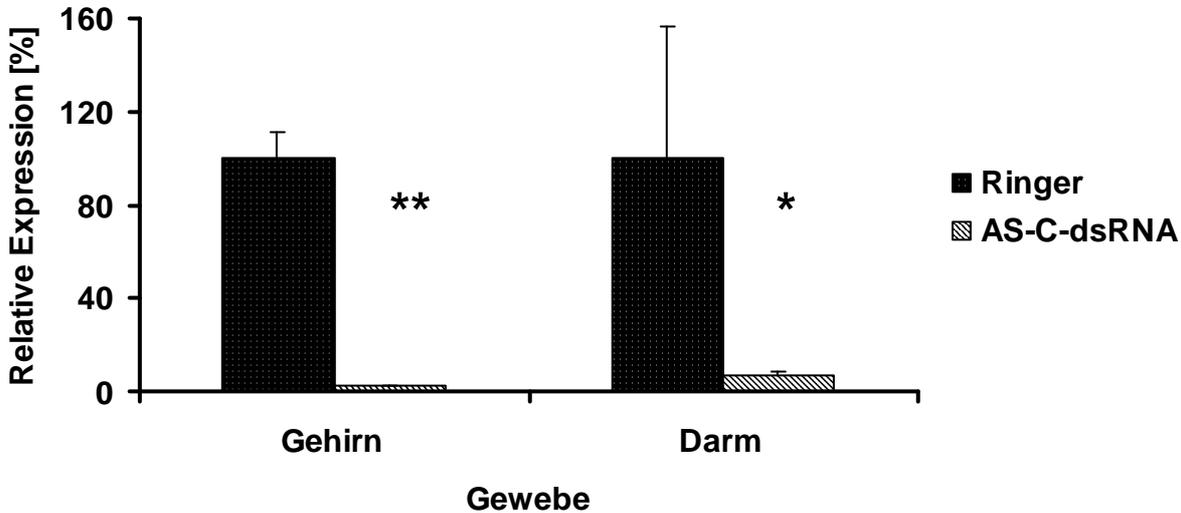
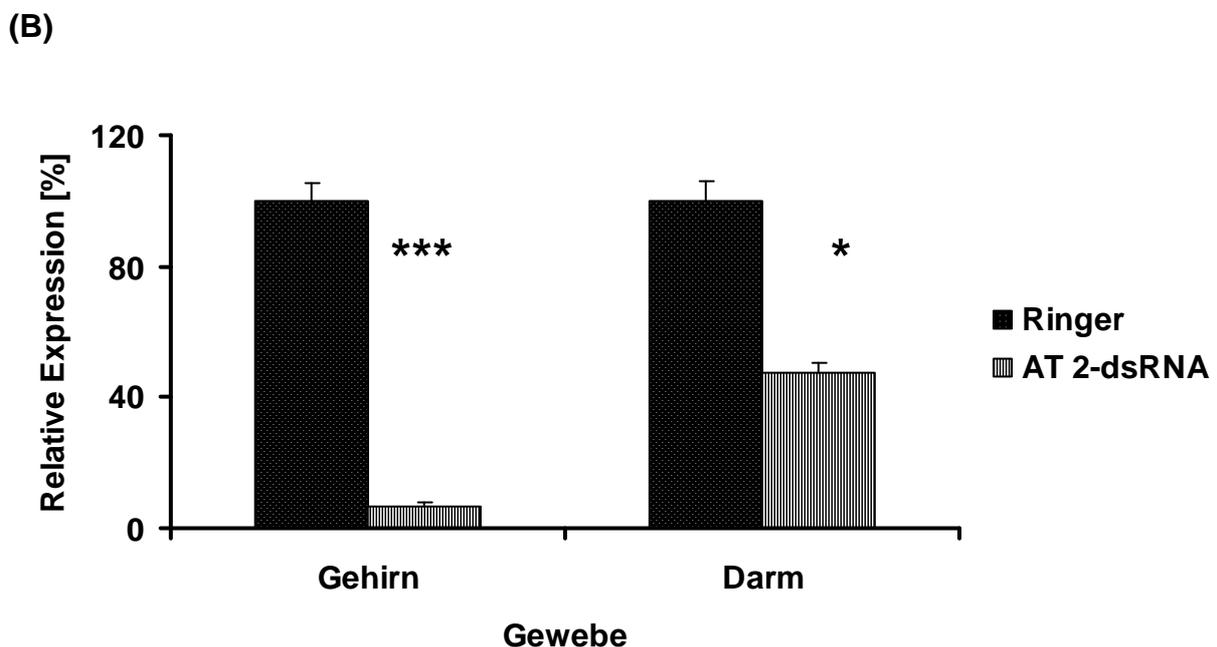
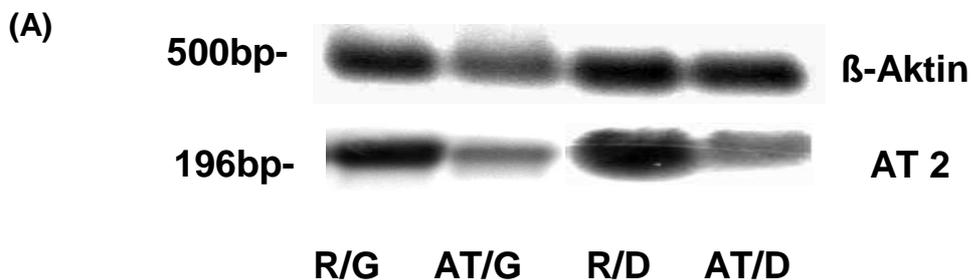


Abb. 6 Vergleich der relativen Expression des AS-C Gens bestimmt mittels RT-PCR mit Southern Blot im Gehirn bzw. Mitteldarm von *S. frugiperda* Larven (L5/3) oder mittels der Real-time RT-PCR. (vorhergehende Seite)

(A) Beispiel eines Southern Blots nach Hybridisierung und Immunfärbung. Dargestellt β -Aktin und AS-C Fragmente, amplifiziert mit RNA aus dem Gehirn und dem Darm als Template von Larven im vorletzten Larvenstadium (L5/3) mit RT-PCR. (B) Densitometrische Quantifizierung der Signale nach Normalisierung der integrierten optischen Dichte der spezifischen Fragmente gegen diejenige des β -Aktins aus (A). 100 % entspricht hierbei Gehirn: $1,4 \pm 0,06$ bzw. Darm: $0,9 \pm 0,3$ (C) Relative Expression der AS-C-mRNA im Gehirn und Darm der Larven (L5/3), ermittelt über Real-time RT-PCR. Die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die Werte der Ringer injizierten Larven wurden auf 100 % gesetzt und die entsprechenden Werte der mit dsRNA injizierten Larven relativ dazu dargestellt. Die Injektion der Larven erfolgte mit 5 μ l Noctuidenringer in L5/1 oder mit 3 μ g dsRNA in 5 μ l Ringer. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4 (B), n = 3 (C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney U-test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



(C)

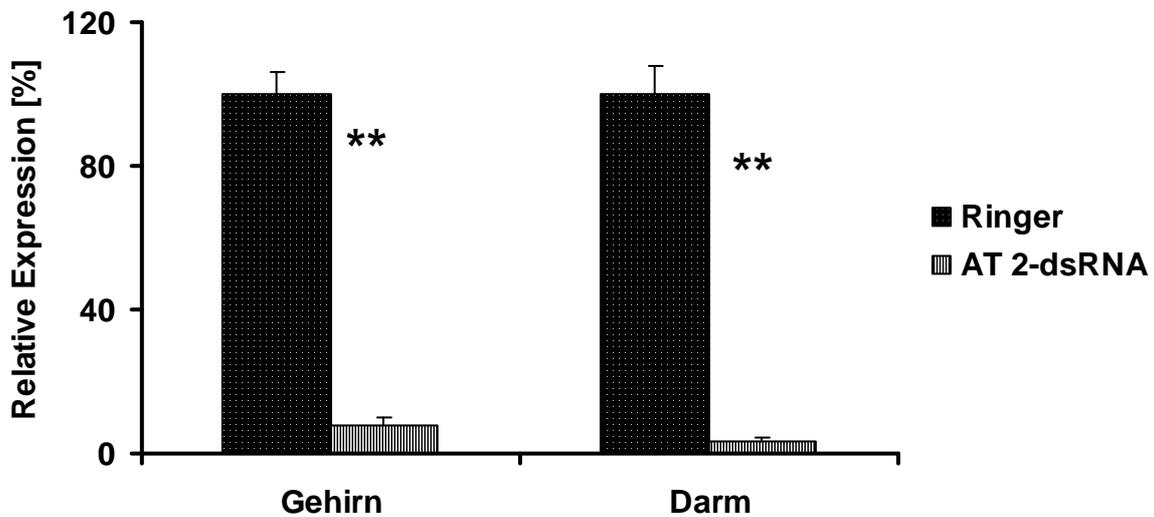


Abb. 7 Vergleich der AT2 Genexpression bestimmt mittels der RT-PCR kombiniert mit Southern Blot oder der Real-time RT-PCR im Gehirn bzw. Mitteldarm von Larven von *S. frugiperda* im vorletzten Larvenstadium (L5/3).

(A) Relative Expression ermittelt nach Southern Blot, Dig-Sonden Hybridisierung und Farbdetektion. Dargestellt sind die β -Aktin und AT 2 Fragmente, hergestellt aus RNA aus dem Gehirn und dem Darm von Tieren im vorletzten Larvenstadium (L5/3) mit RT-PCR. (B) Densitometrische Quantifizierung der Signale aus (A). 100 % entspricht hierbei Gehirn: $6,3 \pm 0,6$ bzw. Darm: $1,2 \pm 0,07$. (C) Relative Expression der AT 2-mRNA im Gehirn und Darm der Larven (L5/3), ermittelt über Real-time RT-PCR. Details siehe Abb. 6. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 4$ (B), $n = 3-6$ (C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney *U*-test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ***; $p < 0,005$.

Bei Verwendung der RT-PCR mit Southern Blot ergab sich eine Resttranskription von $43,9 \pm 5,0$ % (Abb. 6B) bzw. $7,0 \pm 1,1$ % (Abb. 7B) im Gehirn und $46,2 \pm 4,2$ % (Abb. 6B) bzw. $47,4 \pm 3,0$ % (Abb. 7B) im Darm von Larven des vorletzten Larvenstadiums 2 Tage nach Injektion von AS-C Typ-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA. Mit der Real-time RT-PCR Methode wurde nur eine Resttranskription von $2,7 \pm 0,3$ % (Abb. 6C) bzw. $7,5 \pm 2,3$ % (Abb. 7C) im Gehirn und $7,0 \pm 1,6$ % (Abb. 6C) bzw. $3,6 \pm 0,8$ % (Abb. 7C) im Darm ermittelt. Mit Hilfe beider Methoden konnte eine Suppression der Expression 2 Tage nach Injektion von AS-C Typ-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA im Gehirn bzw. Darm von Larven des vorletzten Larvenstadiums nachgewiesen werden. Auch die Auswertung mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode führte zu einer Suppression der AS-C Typ bzw. AT 2 Genexpression (Gehirn AS-C: $5,7 \pm 0,02$ % bzw. AT 2: $16,8 \pm 0,07$ %; Darm: AS-C: $24,1 \pm 0,05$ % bzw. AT 2: $17,8 \pm 0,14$ %; nicht gezeigt). Lediglich das Ausmaß der Suppression der AS-C Typ bzw. AT 2

Genexpression unterschieden sich bei den vergleichbaren Geweben. Daraus lässt sich schließen, dass alle benutzten Methoden zur Bestimmung der Genexpression geeignet sind.

4.3.2 Expressionsvergleich der AS-C bzw. AT 2 Gene in Ringer-injizierten Tieren in Abhängigkeit von Gewebe und Alter

Um einen Überblick über die Expression der AS-C bzw. AT 2 Gene in unterschiedlichen Geweben der Ringer injizierten Tiere zu bekommen, wurden die Expressionsdaten der RNA aus dem Gehirn und dem Darm der in L5/1 mit Ringer injizierten Larven am Tag L5/3 verglichen (Abb. 8).

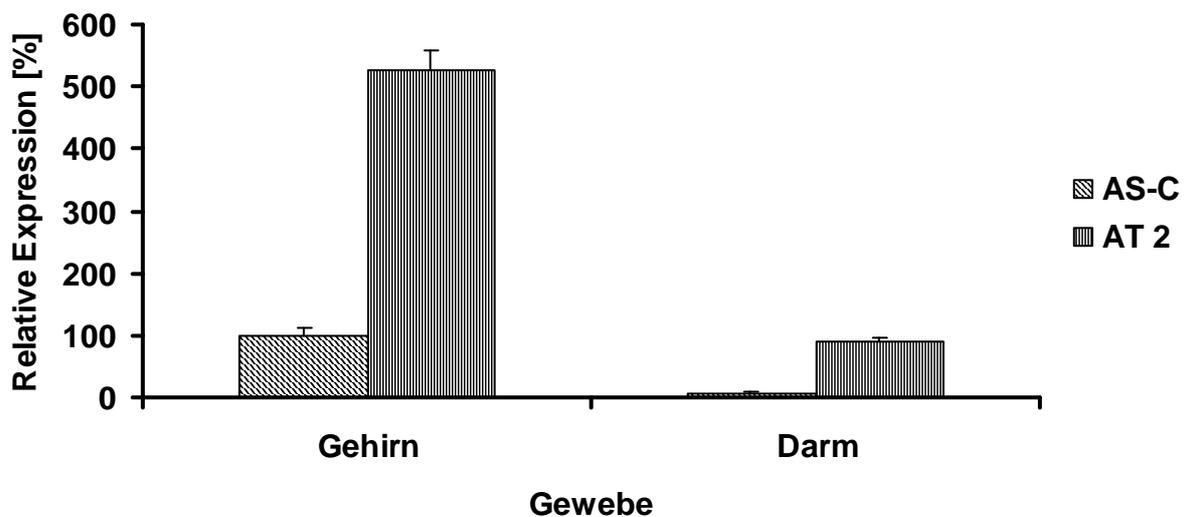


Abb. 8 Vergleich der AS-C bzw. AT 2 Genexpression im Gehirn und Mitteldarm von Larven von *S. frugiperda* im vorletzten Larvenstadium.

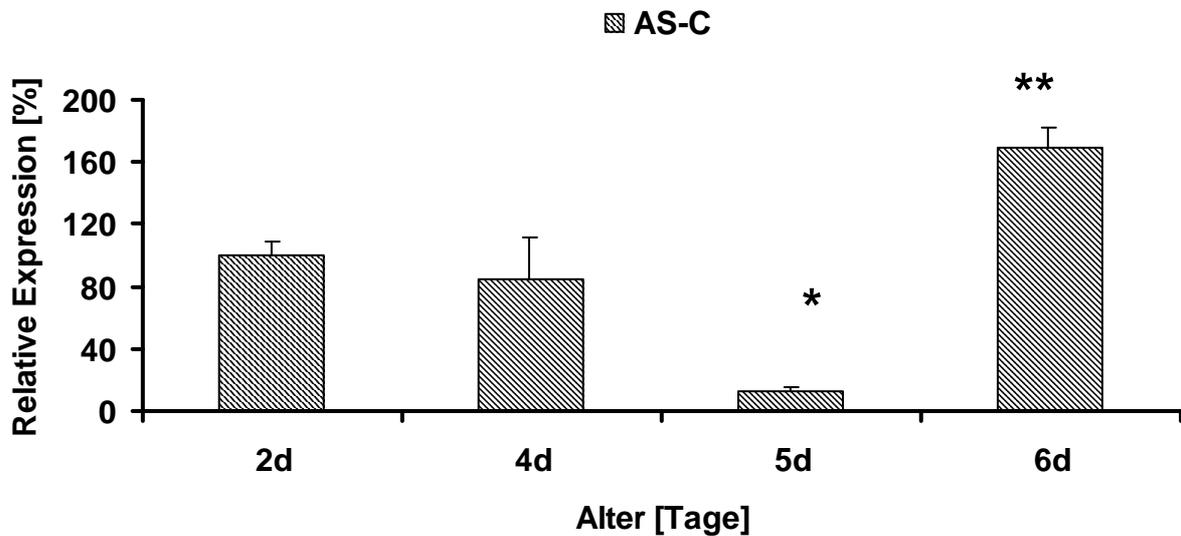
Die Menge der mRNA wurde mit Hilfe von Standardkurven bestimmt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die normalisierten Werte der AS-C Genexpression im Gehirn von Larven des vorletzten Larvenstadiums (L5/3) wurden auf 100 % gesetzt. Die Injektionen der Larven wurden kurz nach der Häutung ins vorletzte Larvenstadium (L5/1) mit 5 μ l Ringer durchgeführt. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3 (A), n = 3-6.

Außerdem wurden die Expressionen von AS-C- und AT 2-mRNA im Gehirn von mit Ringer injizierten Weibchen und Männchen an verschiedenen Tagen bestimmt und

verglichen (Abb. 9 und 10). Insgesamt ist festzustellen, dass in allen untersuchten Geweben aus *S. frugiperda* die Gene für die Neuropeptide AS-C und AT 2 exprimiert wurden.

Die Expression der Gene AS-C bzw. AT 2 war im Gehirn von mit Ringer injizierten Larven des vorletzten Larvenstadiums mit $100 \pm 11,2$ % bzw. $524,8 \pm 32,1$ % signifikant höher ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-test) als im Darm mit $7,1 \pm 4,1$ % bzw. $88,7 \pm 7,1$ % (Abb. 8), während im Gehirn und Darm der Larven (L5/3), die mit Ringer-Lösung injiziert worden waren, die relative Expression des AS-C Typ Gens mit $0,8 \pm 0,02$ bzw. $0,06 \pm 0,03$ signifikant niedriger ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-test) lag als die des AT 2 Gens ($2,9 \pm 0,2$ bzw. $0,7 \pm 0,06$).

(A)



(B)

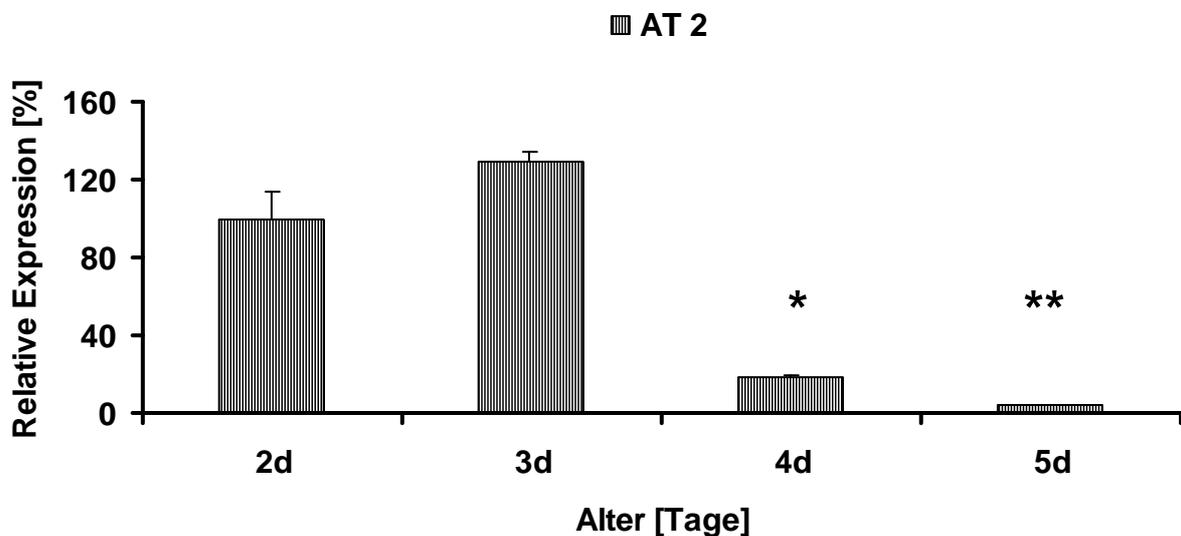


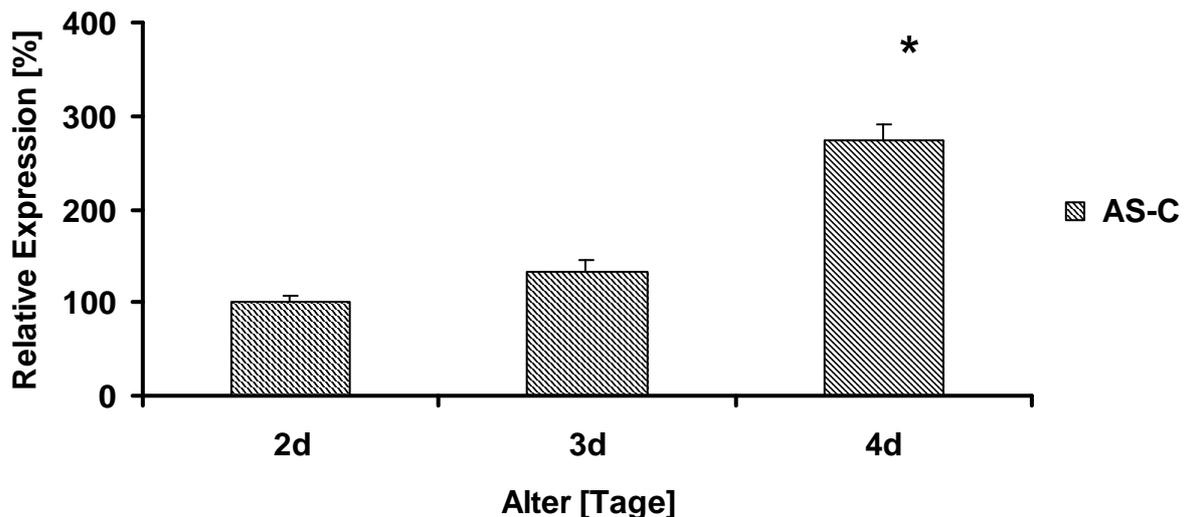
Abb. 9 Vergleich der AS-C bzw. AT2 Genexpression im Gehirn adulter Weibchen von *S. frugiperda* unterschiedlichen Alters.

Relative Expression des AS-C (A) bzw. AT 2 Gens (B) in adulten Weibchen. Die Menge des Transkripts wurde mittels Real-time PCR mit Hilfe von Standardkurven ermittelt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die normalisierten Werte der Gewebe 2 Tage alter Tiere wurden auf 100 % gesetzt. Die Injektion mit 2 μ l Noctuidenringer erfolgten kurz nach der Imaginalhäutung. (A) Relative Expression der AS-C-mRNA im Gehirn 2d, 4d, 5d und 6d alter adulter Weibchen. (B) Relative Expression der AT 2-mRNA im Gehirn 2d, 3d, 4d und 5d alter adulter Weibchen. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$ (A), $n = 3-5$ (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney *U*-test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

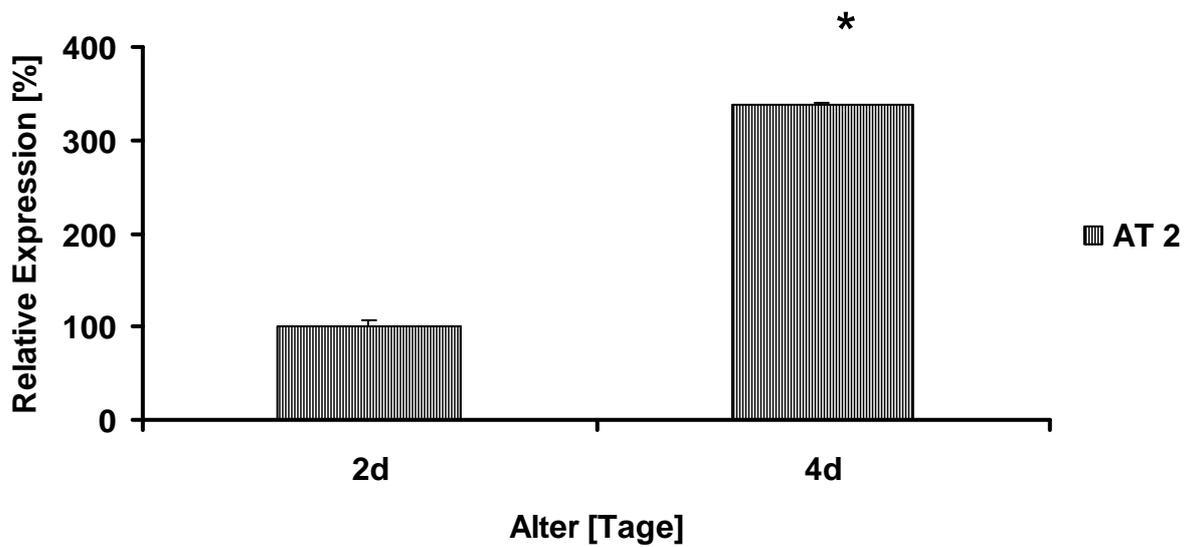
Die Expression des AS-C Gens im Gehirn von adulten mit Ringer injizierten Weibchen war am vierten Tag mit $84,4 \pm 26,7$ % nicht signifikant verschieden von der auf $100 \pm 8,9$ % gesetzten relativen Expression am zweiten Tag des Adultlebens ($129,4 \pm 5,2$ %). Am fünften Tag hingegen war die Expression mit $13,3 \pm 2,7$ % signifikant niedriger ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-test) und am sechsten Tag mit $168,9 \pm 13,3$ % signifikant höher als am zweiten Tag. Die relative Expression des AT 2 Gens am Tag 2 wurde ebenfalls auf $100 \pm 13,4$ % gesetzt. Sie war am vierten Tag mit $18,0 \pm 1,6$ % und am fünften Tag mit $3,6 \pm 0,5$ % signifikant niedriger als am zweiten Tag. Vergleicht man die Expression der Gene AS-C und AT 2 untereinander, so zeigte sich, dass sich diese am vierten und fünften Tag signifikant unterscheiden. Die AT 2 Expression lag am vierten Tag mit $0,35 \pm 0,03$ und am fünften Tag mit $0,07 \pm 0,01$ signifikant niedriger als die AS-C Expression mit $1,9 \pm 0,6$ am vierten Tag und $0,3 \pm 0,06$ am fünften Tag.

Betrachtet man die Expression der Gene AS-C und AT 2 im Gehirn der Männchen, so lag diese am vierten Tag mit $274,5 \pm 17,5$ % bzw. $339,0 \pm 0,9$ % signifikant höher als am zweiten Tag (Abb. 10).

(A)



(B)



(C)

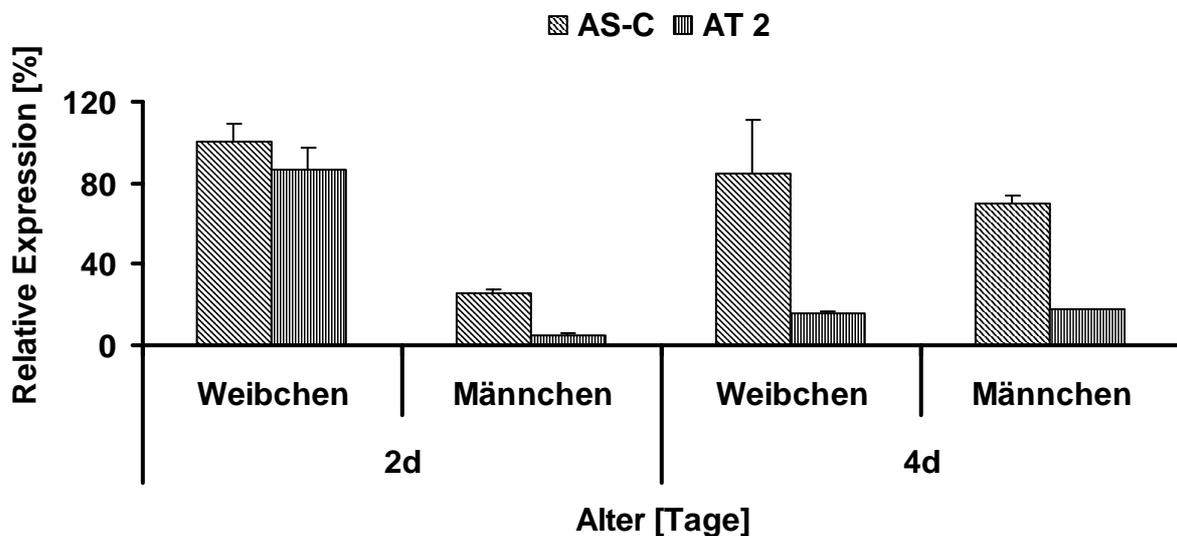


Abb. 10 Vergleich der AS-C bzw. AT 2 Genexpression im Gehirn adulter *S. frugiperda* Männchen unterschiedlichen Alters.

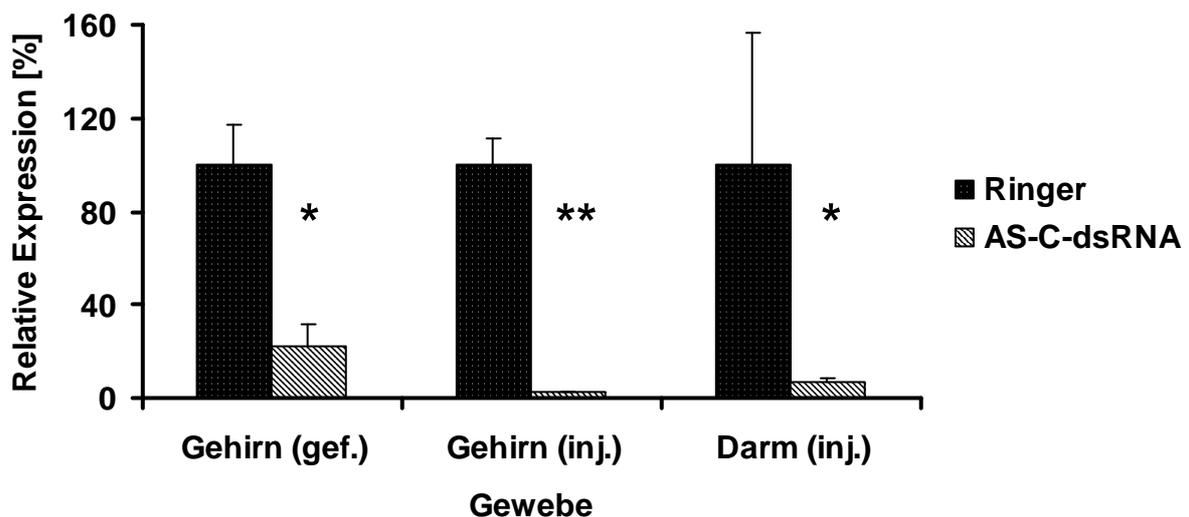
Relative Expression der AS-C- bzw. AT 2-mRNA bei adulten Männchen. Die Menge der PCR-Produkte wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode bestimmt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die Injektion mit 2 μ l Noctuidenringier erfolgte kurz nach der Imaginalhäutung. (A) Relative Expression der AS-C-mRNA im Gehirn 2d, 3d bzw. 4d alter Männchen. (B) Relative Expression der AT 2-mRNA im Gehirn 2d bzw. 4d alter Männchen. (C) Relative Expression der AS-C- bzw. AT 2-mRNA im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3-6$. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney U -test), * $p < 0,05$.

Der Vergleich der AS-C Expression zwischen Weibchen und Männchen, ausgewertet mit der Standardkurvenmethode der Real-time RT-PCR, ergab, dass der mRNA Level bei Weibchen mit $2,3 \pm 0,2$ am zweiten Tag signifikant höher war als bei Männchen mit $0,6 \pm 0,05$. Eine höhere AT 2 Genexpression bei Weibchen ($1,9 \pm 0,3$) wurde auch beim Vergleich mit der AT 2 Genexpression im Gehirn zwei Tage alter, adulter Männchen ($0,12 \pm 0,01$) festgestellt.

4.3.3 Auswirkungen der RNA-Interferenz auf die AS-C bzw. AT 2 Genexpression

Im Folgenden wurde die Auswirkung der injizierten dsRNA auf die Expression der Gene AS-C und AT 2 in verschiedenen Geweben untersucht. Es wurde erwartet, dass die Injektion von sequenzspezifischer dsRNA ein Knockdown des Zielgens durch den Abbau der komplementären mRNA verursacht. Die Folge wäre eine Unterbindung der Translation, und somit würde kein Peptid mehr produziert werden.

(A)



(B)

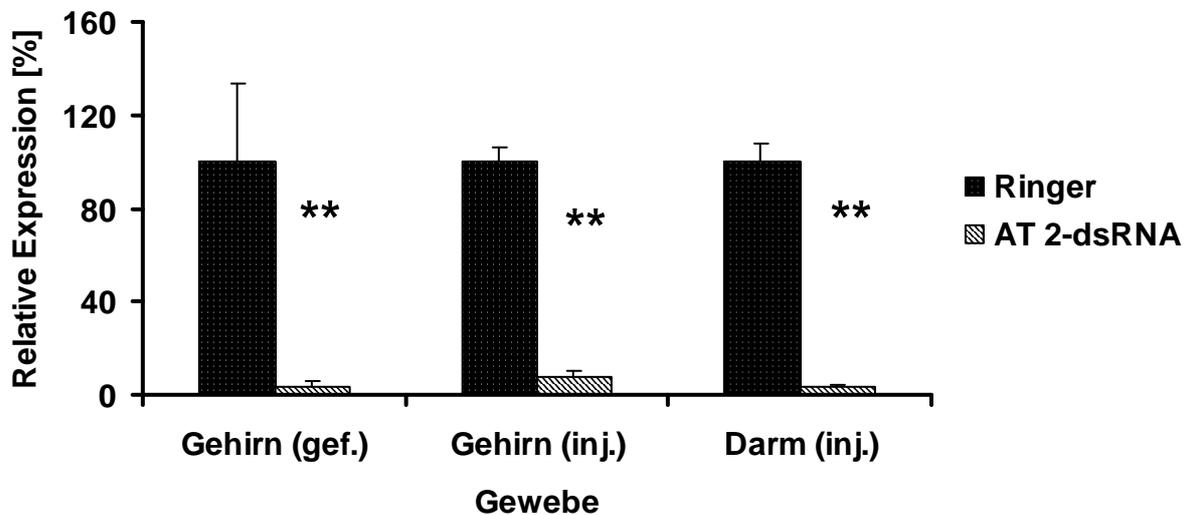


Abb. 11 *Suppression der AS-C und AT2 Genexpression im Gehirn und Mitteldarm der Larven von S. frugiperda.*

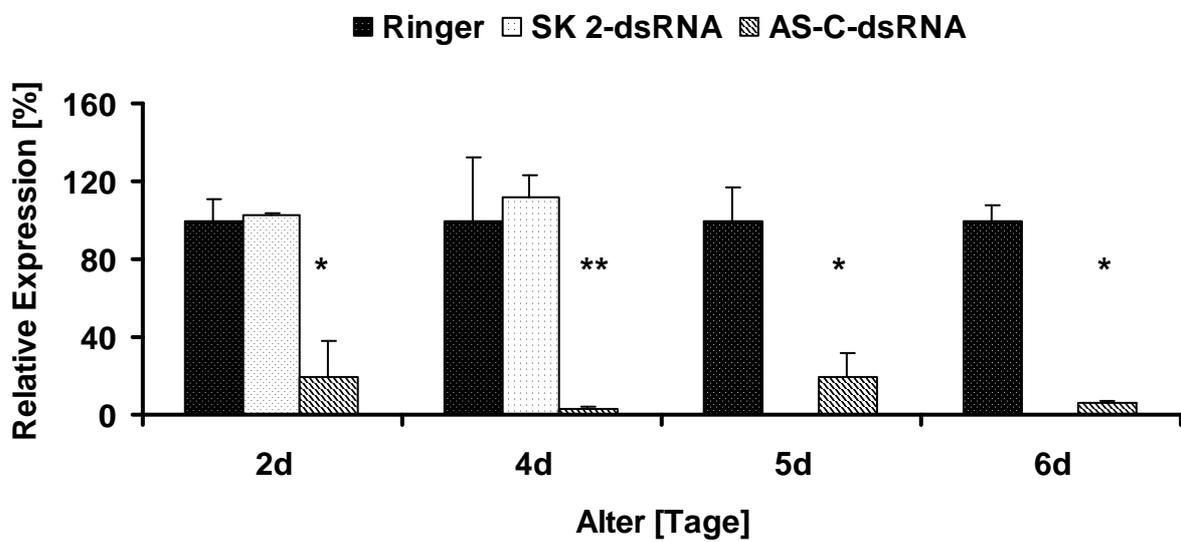
Relative Expression von AS-C- (A) bzw. AT 2-mRNA (B) im Gehirn und Darm von *S. frugiperda* Larven, detektiert mittels Real-time RT-PCR. Die Larven wurden mit 5 μ l Ringer Lösung (gepunktete Balken) bzw. 3 μ g dsRNA (gestreifte Balken) direkt nach der Häutung in das vorletzte Larvenstadium (L5/1) injiziert (inj.). Außerdem wurden Larven mit 5 μ l Sucroselösung bzw. 3 μ g dsRNA gefüttert (gef.). Die Menge der dsRNA wurde mit Hilfe von Standardkurven bestimmt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die Daten der Ringer injizierten bzw. Sucrose gefütterten Tiere wurden in jedem Experiment auf 100 % gesetzt. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3 (A), n = 3-6 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U test), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Die Real-time RT-PCR Analyse zeigte eine Resttranskription von $2,7 \pm 0,3$ % bzw. $7,5 \pm 2,3$ % im Gehirn und $7,0 \pm 1,6$ % bzw. $3,6 \pm 0,8$ % im Darm von Larven des vorletzten Larvenstadiums 2 Tage nach Injektion von AS-C-dsRNA (Abb. 11A) bzw. AT 2-dsRNA (Abb. 11B) im Vergleich zu den Transkripten in den Geweben der Kontrolltiere.

Auch die Fütterung von *S. frugiperda* Larven des vorletzten Larvenstadiums mit dsRNA führte zu einer Reduzierung der Transkription im Gehirn nach zwei Tagen. Die Restexpression betrug $22,3 \pm 9,6$ % für die AS-C- und $3,3 \pm 2,3$ % für die AT 2-mRNA (Abb. 11A, B).

Adulte Tiere wurden am Tag der Imaginalhäutung mit jeweils 2 µl injiziert und die Gewebe an verschiedenen Tagen präpariert, um den Zeitpunkt der einsetzenden Wirkung sowie die Dauer des RNAi Effektes zu beobachten. Nach einer einmaligen Injektion von dsRNA, abgeleitet vom AS-C oder AT 2 Gen, in frisch geschlüpfte *S. frugiperda* Falter war die Transkription im Gehirn der adulten Weibchen (Abb. 12) bzw. Männchen (Abb. 13) signifikant reduziert.

(A)



(B)

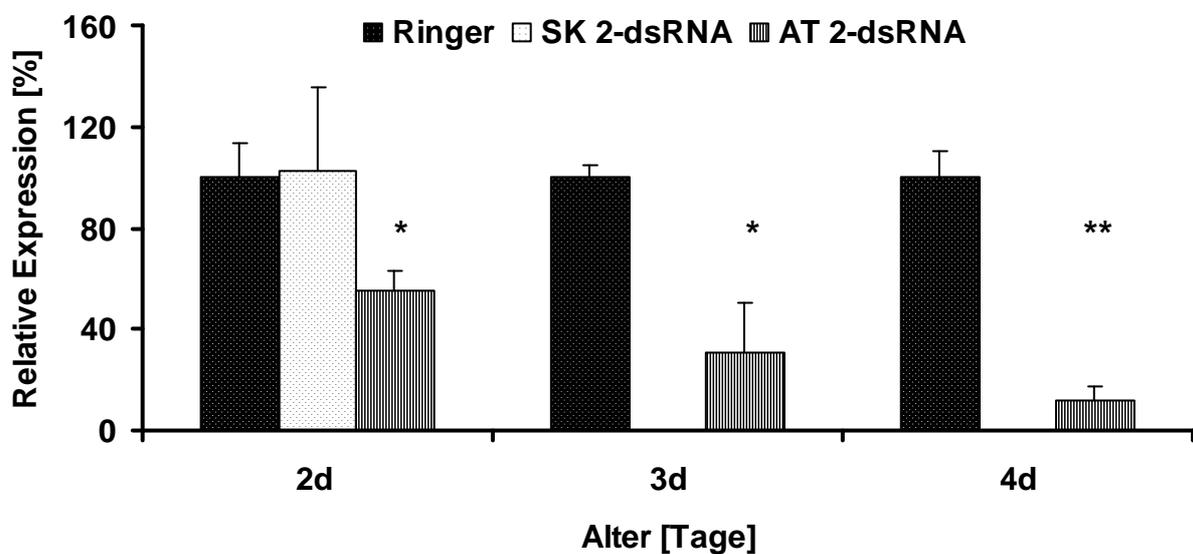
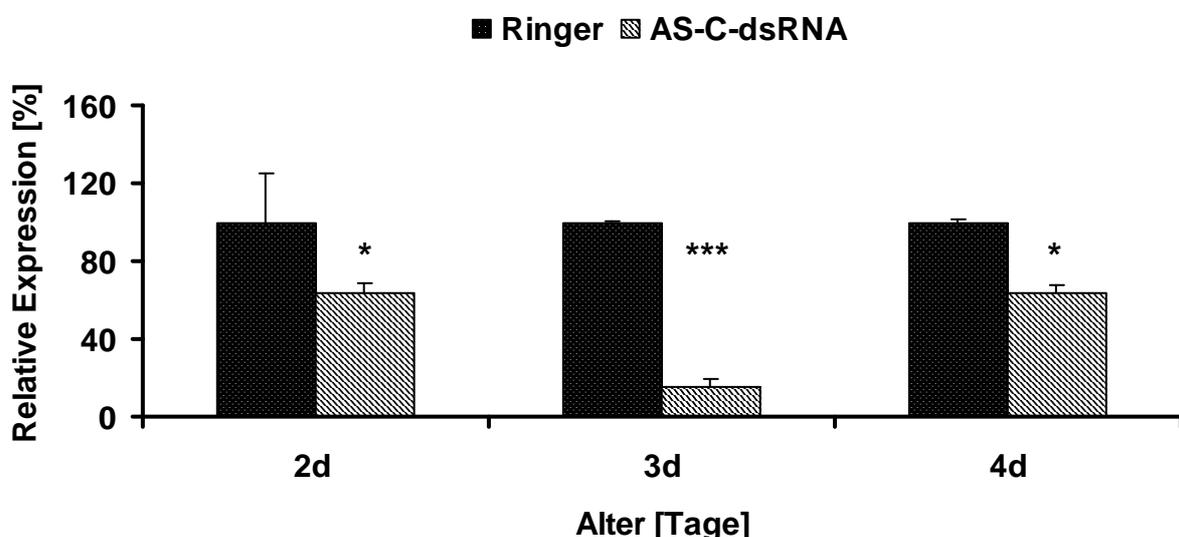


Abb. 12 *Suppression der AS-C und AT 2 Genexpression im Gehirn von adulten S. frugiperda Weibchen. Kontrollinjektionen mit Sulfakinin (SK-2)-dsRNA aus G. bimaculatus (vorhergehende Seite).*

Relative Expression von AS-C- (A) bzw. AT 2-mRNA (B) im Gehirn von *S. frugiperda* Weibchen, detektiert mittels Real-time RT-PCR. Die Weibchen wurden mit 2 μ l Ringer Lösung (gepunktete, schwarze Balken), 1 μ g unspezifischer SK-2-dsRNA (gepunktete, weiße Balken) und 1 μ g AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA (gestreifte Balken) direkt nach der Imaginalhäutung injiziert. Die Menge der PCR-Produkte wurde mit Hilfe von Standardkurven bestimmt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die Daten der Ringer injizierten Tiere wurden in jedem Experiment auf 100 % gesetzt. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3-5. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Bei adulten Tieren war die Suppression oftmals weniger ausgeprägt als bei Larven, die Unterschiede zu den Kontrollen waren aber dennoch signifikant. Im Gehirn von 2 Tage alten Weibchen war die mRNA nach Injektion von AS-C-dsRNA (Abb.12A) bzw. AT 2-dsRNA (Abb. 12B) auf $20 \pm 18,3$ % bzw. $55,2 \pm 7,7$ % reduziert, und sogar noch stärker in 4 Tage alten Tieren, nämlich auf $3,2 \pm 1,4$ % bzw. $12 \pm 5,1$ % . Die Suppression war bei den adulten Weibchen auch sechs Tage nach der Injektion von AS-C-dsRNA mit einer verbleibenden Expression von $5,7 \pm 1,3$ % noch zu beobachten. Die Spezifität der Gensuppression wurde durch eine einmalige Injektion unspezifischer Sulfakinin (SK-2)-dsRNA aus der Grille *G. bimaculatus* in frisch geschlüpfte adulte Weibchen von *S. frugiperda* überprüft. Injektionen von SK-2-dsRNA beeinflussten die Expression des AS-C (Abb. 12A) bzw. AT 2 Gens (Abb. 12B) nicht.

(A)



(B)

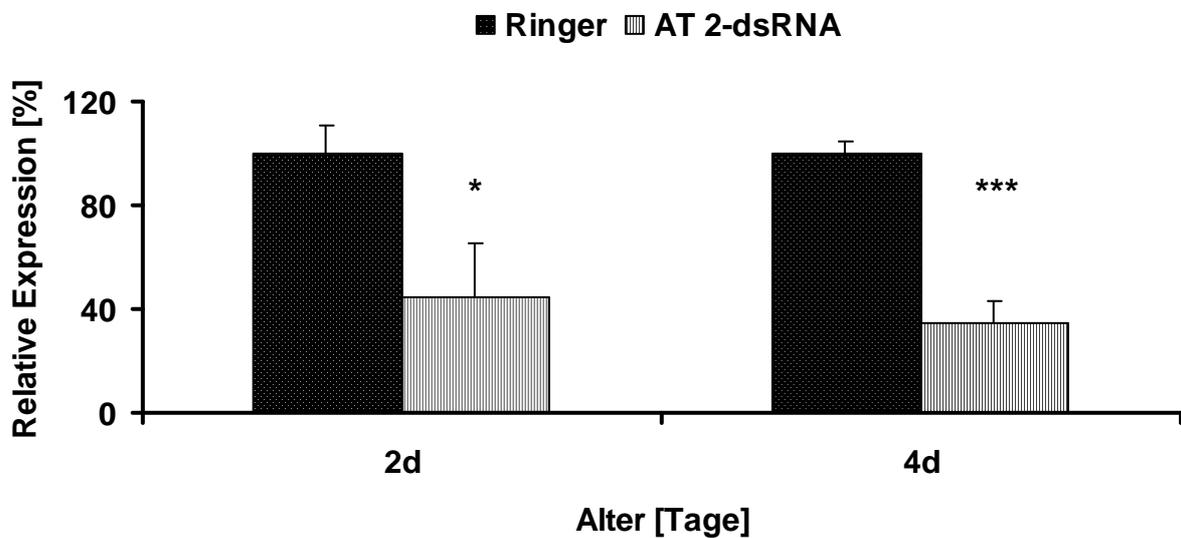


Abb. 13 Suppression der AS-C und AT 2 Genexpression im Gehirn von adulten *S. frugiperda* Männchen.

Relative Expression von AS-C- (A) bzw. AT 2-mRNA (B) im Gehirn von *S. frugiperda* Männchen, detektiert mittels Real-time RT-PCR. Die Männchen wurden mit 2 μ l Ringer Lösung (gepunktete Balken) bzw. 1 μ g dsRNA (gestreifte Balken) direkt nach der Imaginalhäutung injiziert. Die Menge der dsRNA wurde mit Hilfe von Standardkurven bestimmt und die Daten wurden relativ zu β -Aktin normalisiert. Die Daten der Ringer injizierten Tiere wurden in jedem Experiment auf 100 % gesetzt. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U test), * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$.

Die stärkste Suppression bei den mit AS-C-dsRNA (Abb. 13A) injizierten Männchen zeigte sich am dritten Tag mit $15,2 \pm 4,1$ %. An den Tagen zwei und vier sank die Expression lediglich auf 64 ± 5 % bzw. $63,3 \pm 4,9$ %, war aber immer noch signifikant verringert im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Bei den adulten Männchen war die AT 2-mRNA am zweiten Tag nach der AT 2-dsRNA Injektion (Abb. 13B) auf 45 ± 20 %, und am vierten Tag auf $34,6 \pm 8,7$ % signifikant reduziert.

4.4 Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA *in vivo* auf die Entwicklung und Reproduktion von *Spodoptera frugiperda*

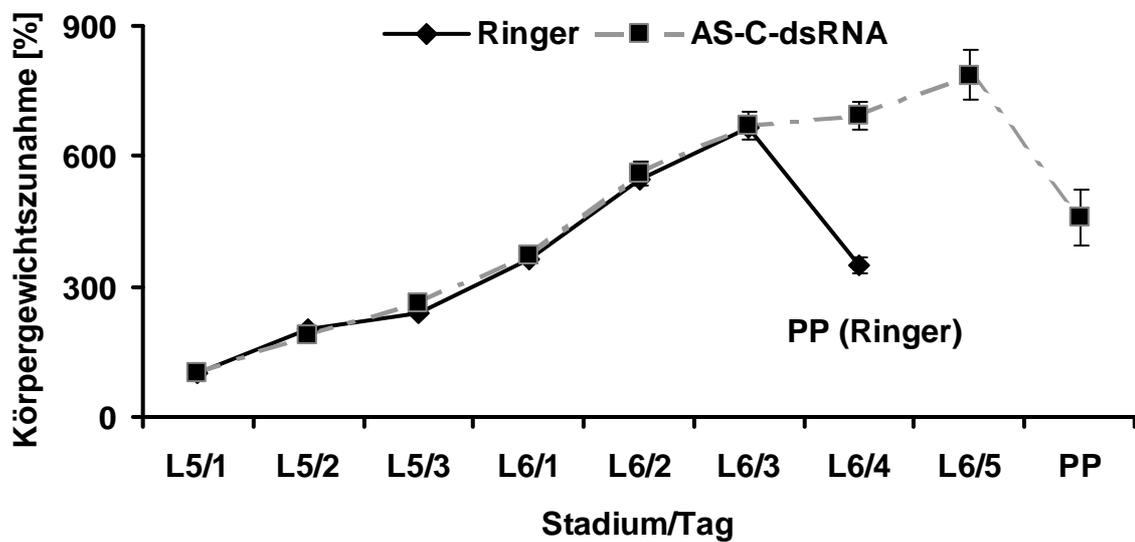
Der Erfolg der RNA Interferenz konnte mit Hilfe der Expressionsanalysen gezeigt werden. Anschließend wurden die Auswirkungen der Gensuppression von AS-C bzw. AT 2 auf Parameter der Entwicklung und Reproduktion von *S. frugiperda* untersucht.

4.4.1 Körpergewichtszunahme im Larvenstadium

Die einmalige Injektion von 5 µl Ringerlösung bzw. 3 µg dsRNA in 5 µl Ringer erfolgte bei Larven immer am ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1). Die Larven wurden jeden Tag gewogen und die Gewichtszunahme in Prozent bestimmt. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich vom ersten Tag der Injektion (L5/1) bis zur Bildung der Präpuppe (PP). Ausgangspunkt der Betrachtung der Körpergewichtszunahme war der Tag nach der Häutung in das vorletzte Larvenstadium. Das ermittelte Gewicht von $72,2 \pm 0,5$ mg für die mit Ringer injizierten Tiere wurde auf 100 % gesetzt. Die Larven nahmen in den folgenden Tagen stetig an Gewicht zu und erreichten am letzten Tag des letzten Larvenstadiums (L6/3) $665,4 \pm 6,3$ %. Der Beginn des Präpuppenstadiums war durch eine Abnahme des Körpergewichtes gekennzeichnet. Auch die mit dsRNA injizierten Tiere nahmen ab dem Tag der Injektion stetig zu. AS-C-dsRNA injizierte Larven nahmen bis zum letzten Larvenstadium in ähnlicher Weise an Gewicht zu wie die Ringer Kontrollen. Der größte Unterschied zu den Ringer Kontrollen zeigte sich beim Übergang zur Präpuppe. Während die Ringer Kontrollen nach Tag 6/3 deutlich an Gewicht verloren, fraßen AS-C-dsRNA behandelte Tiere weiter und 83 % (überlebende Tiere) von ihnen erreichten am vierten Tag des letzten Larvenstadiums (L6/4) ein Gewicht von $694 \pm 33,4$ % (n=20). Fast die Hälfte (45 %) der Larven verlängerten das letzte Larvenstadium um zwei Tage und erreichten eine relative Körpergewichtszunahme von 787 ± 56 % (L6/5; n=11) (Abb. 14A). Bei AT 2-dsRNA injizierten Larven verlief die Körpergewichtszunahme während des letzten

Larvenstadiums signifikant langsamer und die Tiere erreichten niemals das Körpergewicht der Kontrollen (Abb. 14B). Signifikante Gewichtsunterschiede ergaben sich im gesamten letzten Larvenstadium im Vergleich zu den Kontrollen. Alle überlebenden AT 2-dsRNA injizierten Larven zeigten eine Verlängerung des letzten Larvenstadiums um zwei Tage, dabei erreichten sie ein Körpergewicht von 608 ± 47 % (n=14) verglichen mit den Tieren in L5/1.

(A)



(B)

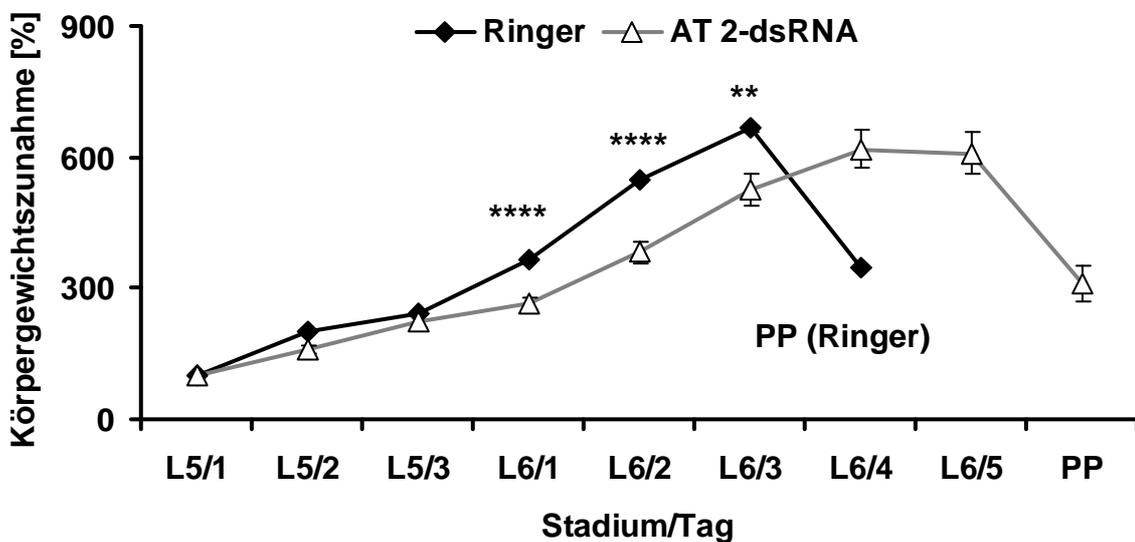


Abb. 14 *Auswirkung der Suppression der Genexpression auf die Körpergewichtszunahme bei Larven von *S. frugiperda* (vorhergehende Seite).*

Die Körpergewichtszunahme wurde vom ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) bis zum Präpuppenstadium (PP) bestimmt. Die Tiere wurden direkt nach der Häutung in das vorletzte Larvenstadium (L5/1) mit 5 µl Ringer bzw. 3 µg dsRNA in 5 µl Ringer injiziert. Das Körpergewicht direkt nach der Häutung wurde auf 100 % gesetzt ($72,2 \pm 5,3$ mg). (A) Gewichtszunahme der mit AS-C-dsRNA injizierten Larven, (B) Gewichtszunahme der mit AT 2-dsRNA injizierten Larven.

Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 24 (Ringer); n = 16 (AT 2); n = 27 (AS-C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's t-test), ** p<0,01, ****p<0,001.

4.4.2 Effekte der AS-C- und AT 2-dsRNA Injektionen auf den JH- und Ecdysteroid-Titer der Larven

Im Folgenden wurde der JH-Titer in der Hämolymphe von *S. frugiperda* mittels LC-MS bestimmt. In der Hämolymphe wurden $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ der Juvenilhormone [Westerlund & Hoffmann, 2004] im positiven Ionenmodus des MS detektiert. Die Grenzen der Detektion und Quantifizierung für das verwendete System wurden bereits veröffentlicht [Westerlund & Hoffmann, 2004].

Im ersten Experiment wurden die Larven am ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) mit 5 µl Ringer injiziert und der JH-Titer in der Hämolymphe der Tiere an den folgenden Tagen bestimmt. In den Larven des vorletzten (L5), des letzten Larvenstadiums (L6), und auch in den Präpuppen (PP) von *S. frugiperda*, war JH III das dominante JH Homolog (Abb. 15). Der Gesamt-JH-Titer war mit $31,8 \pm 8,6$ pg / µl am ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) am höchsten und am dritten Tag des letzten Larvenstadiums (L6/3) mit $0,8 \pm 0,1$ pg / µl am niedrigsten. JH I war lediglich am zweiten Tag des letzten Larvenstadiums (L6/2) mit $0,2 \pm 0,1$ pg / µl nachweisbar. Auch JH II wurde im vorletzten und letzten Larvenstadium, sowie im Präpuppenstadium in geringen Konzentrationen gemessen.

Ergebnisse

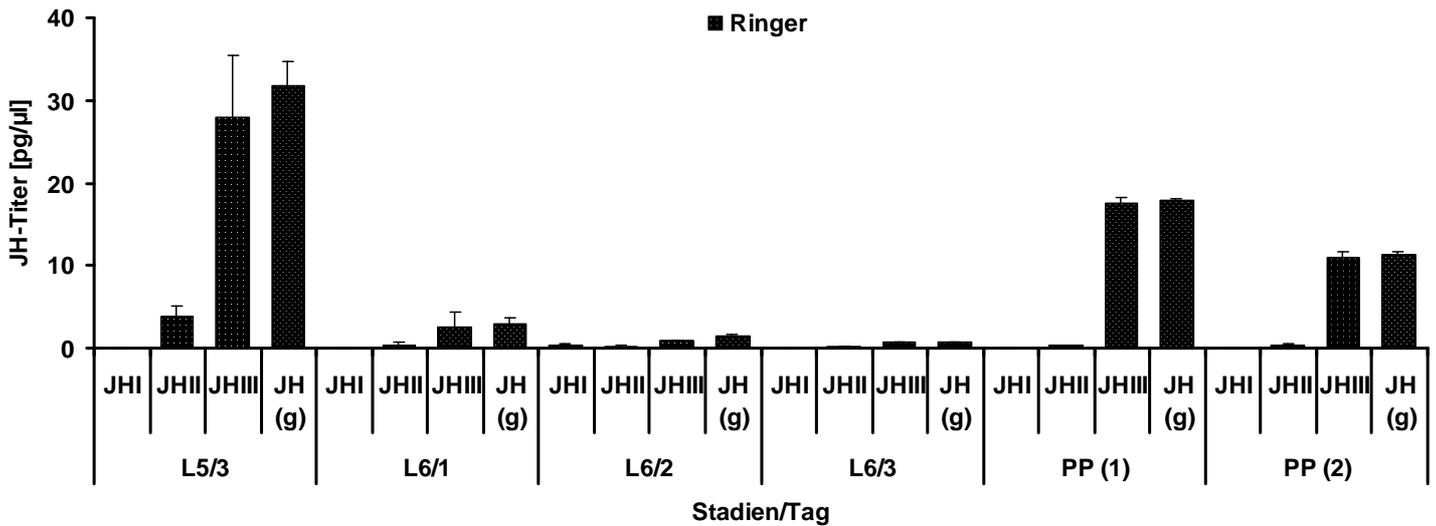
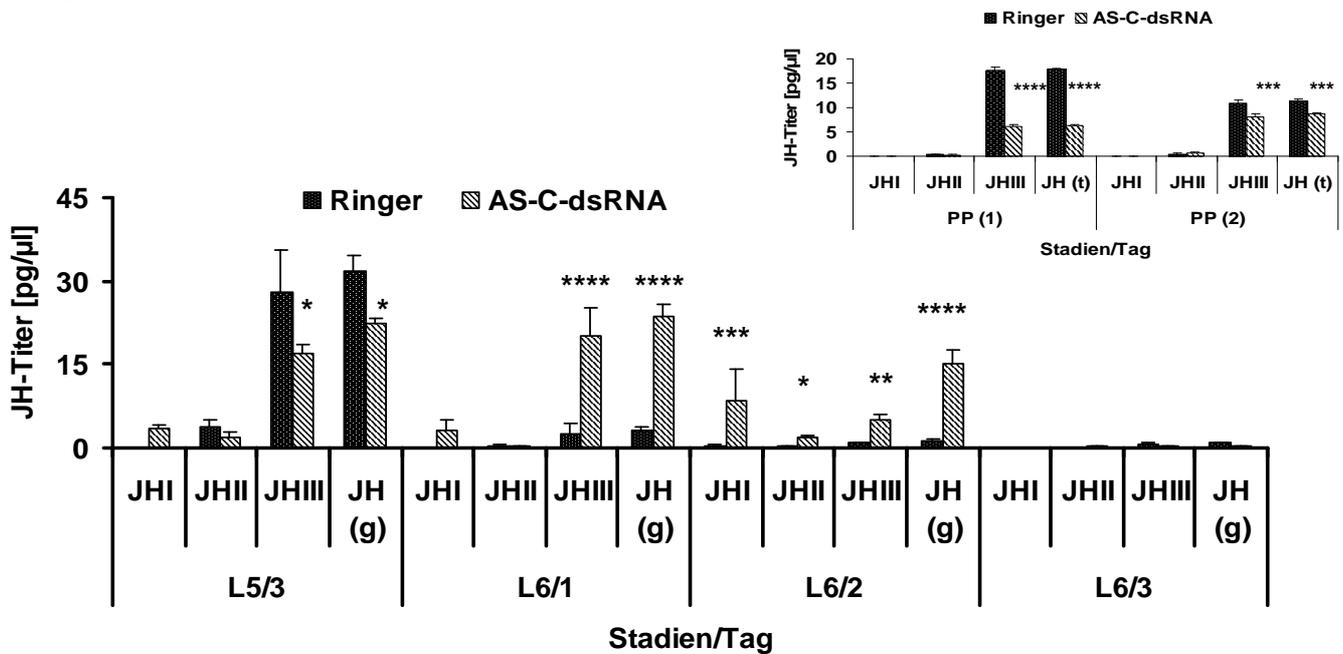


Abb. 15 JH-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von *S. frugiperda*. Bestimmung der JH I-, JH II- und JH III-Titer in der Hämolymphe von Larven mit Hilfe der LC-MS. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=10-30$. (ANOVA) JH II: $F_{5,80}=10,14$, $P < 0.001$; JH III $F_{5,80}=20,17$, $P < 0.001$. Signifikant JH III ($p > 0,005$) und JH gesamt ($p > 0,005$).

Die mit Ringerlösung injizierten Larven wurden als Kontrollen für die folgenden Gensuppressionsexperimente benutzt.

(A)



(B)

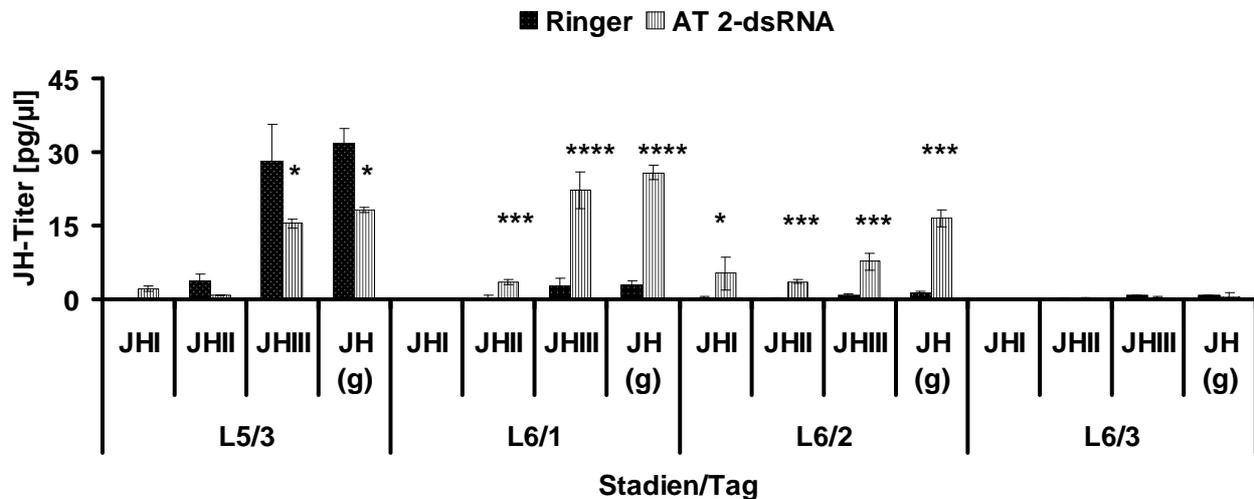


Abb. 16 JH-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von *S. frugiperda* nach Suppression der Genexpression mit AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA.

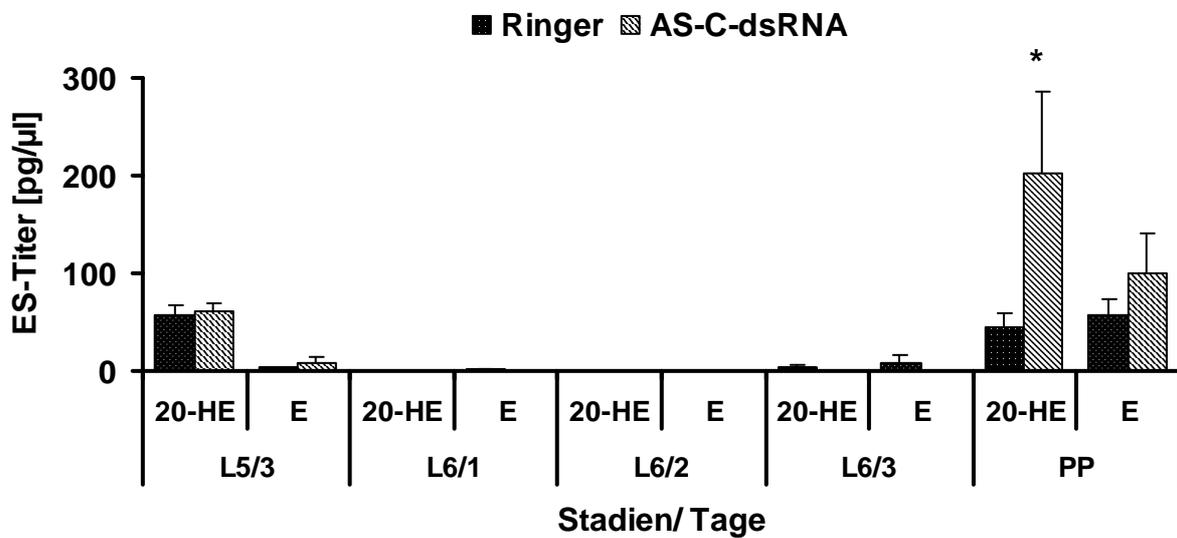
Frisch geschlüpfte Larven des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) von *S. frugiperda* wurden entweder mit 5 µl Ringer oder 3 µg AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) injiziert. JH I, II, III sowie der gesamte (g) JH-Titer wurden in der Hämolymphe der L5- und L6-Larven (Dauer jeweils 3 Tage) sowie im zwei Tage dauernde Präpuppenstadium (PP) analysiert. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-30 (A), n = 10-25 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

Die Suppression der Allatostatin-C und AT 2 Gene in *S. frugiperda*-Larven führte zu signifikanten Veränderungen der JH-Titer in der Hämolymphe. Diese waren abhängig von den jeweiligen JH-Homologen und dem Entwicklungsstadium der Tiere (Abb. 16). Insgesamt war auch in den dsRNA injizierten Larven der Beitrag des JH III am Gesamt-JH-Titer am höchsten. Bei den L5/3-Larven führte die Injektion von AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA jeweils zu einer Abnahme von JH III im Vergleich zu den Ringerkontrollen. Die Titer an JH II und I waren in allen Fällen niedrig. Der JH-Titer von Präpuppen konnte nur bei AS-C-dsRNA injizierten Larven bestimmt werden und auch hier war JH III im Vergleich zu den Ringerkontrollen erniedrigt.

Bei den ein und zwei Tage alten Larven des letzten Larvenstadiums (L6/1 und L6/2) stieg der Gesamt-JH-Titer nach beiden dsRNA Injektionen signifikant an. Dabei trugen alle drei JH-Isoformen in unterschiedlichem Ausmaß zu der Erhöhung bei (Abb. 16A, B).

Parallel zu den Juvenilhormontitern wurde auch der Ecdysteroidtiter (ES) in der Hämolymphe der Tiere bestimmt (Abb. 17).

(A)



(B)

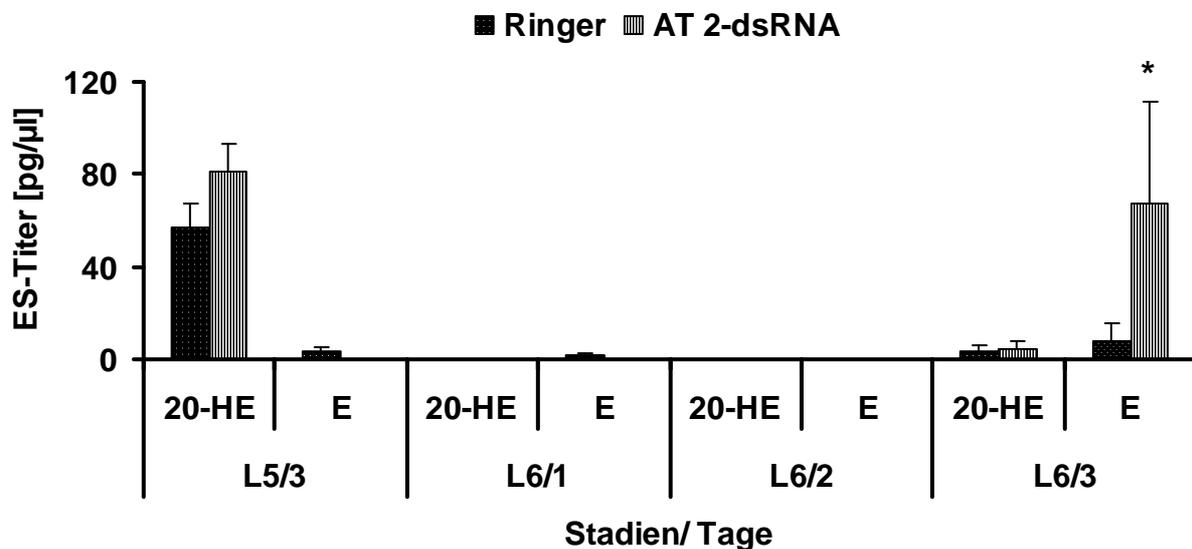


Abb. 17 ES-Hämolymphtiter in Larven und Präpuppen von *S. frugiperda* nach Suppression der Genexpression mit AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA.

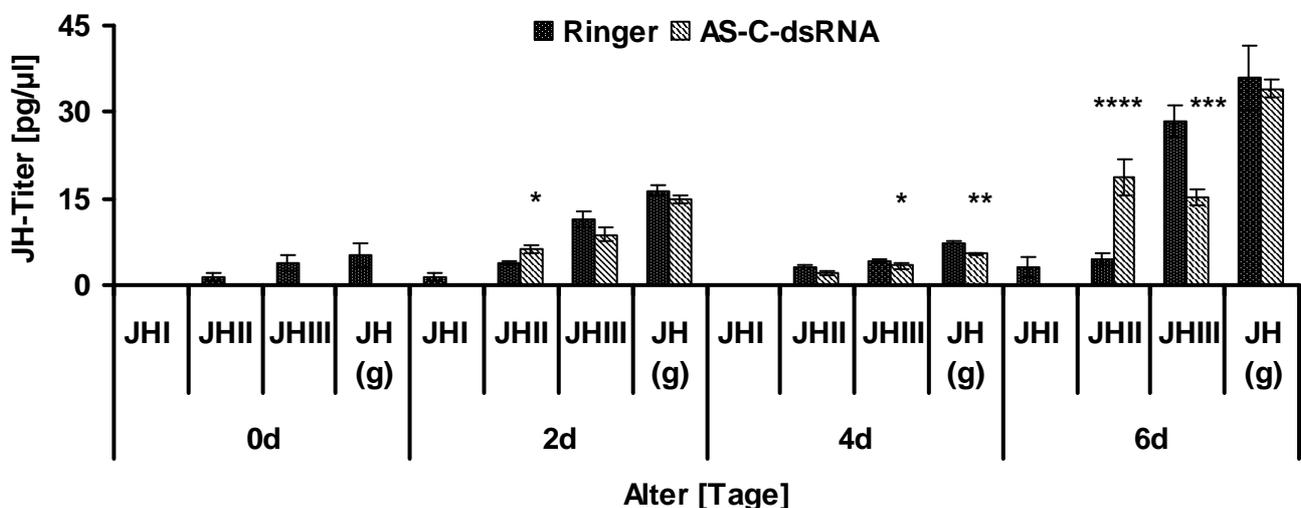
Frisch geschlüpfte Larven des vorletzten Larvenstadiums (L5/1) von *S. frugiperda* wurden entweder mit 5 μl Ringer oder 3 μg AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) injiziert. 20-Hydroxyecdysen (20-HE) und Ecdyson (E) wurden in der Hämolymphe der L5- und L6-Larven (Dauer jeweils 3 Tage) sowie im zwei Tage dauernden Präpuppenstadium (PP) analysiert. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-30 (A), n = 10-25 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * *p* < 0,05.

Bei den Ringer injizierten Kontrolltieren war der ES-Titer in Larven zum Ende des vorletzten Larvenstadiums (L5/3) und in Präpuppen am höchsten. Dabei lag der Titer der häutungsaktiven Form 20-HE am Tag vor der Häutung ins letzte Larvenstadium (L5/3) höher als der Ecdyson-Titer. Im letzten Larvenstadium war der ES-Titer generell gering. In der Präpuppenphase (bzw. am Ende von L6) stieg der ES-Titer wieder an und beide Formen waren in vergleichbaren Mengen vorhanden. Bei den AS-C-dsRNA injizierten Tieren war der 20-HE Titer im Präpuppenstadium signifikant höher als bei den Ringer injizierten Kontrolltieren (Abb. 17A). Hingegen wurde bei den AT 2-dsRNA injizierten Tieren eine Erhöhung des Ecdyson-Titers am letzten Tag des letzten Larvenstadiums (L6/3) beobachtet.

4.4.3 Effekte der AS-C- und AT 2-dsRNA Injektionen auf den JH- und Ecdysteroid-Titer adulter Weibchen

In adulten unverpaarten Weibchen von *S. frugiperda*, die mit Ringer injiziert worden waren, war der JH III Titer am sechsten Tag nach dem Schlupf mit $28 \pm 2,8 \text{ pg} / \mu\text{l}$ am höchsten (Abb. 18A, B). Ein weiterer Peak wurde am zweiten Tag des Adultlebens detektiert ($11,3 \pm 1,4 \text{ pg} / \mu\text{l}$). Die JH I und II Titer blieben über den gesamten beobachteten Zeitraum niedrig.

(A)



(B)

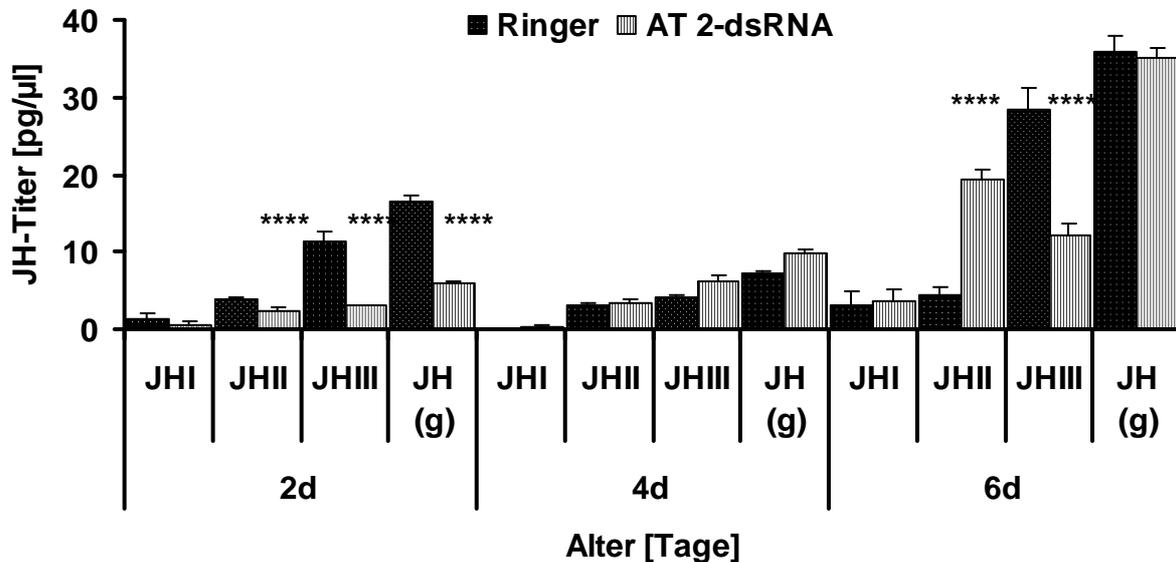


Abb. 18 JH-Hämolymphtiter in adulten unverpaarten *S. frugiperda* Weibchen nach Gensuppression mit AS-C- und AT 2-dsRNA.

Frisch geschlüpfte adulte (Tag 0) *S. frugiperda* Weibchen wurden mit 2 µl Ringer, 1 µg AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) injiziert. Für eine Probe wurde jeweils die Hämolymphe von 4-5 adulten Weibchen am Tag des Schlupfes (Tag 0) und 2, 4 und 6 Tage nach der Injektion gesammelt. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 10-12$ (A), $n = 10$ (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

In jungen adulten Weibchen führte die Injektion von AS-C-dsRNA direkt nach dem Schlupf zu einem kleinen aber signifikanten Anstieg des JH II-Titers am zweiten Tag, obwohl der gesamte JH-Titer nicht verändert war (Abb. 18A). Bei AT 2-dsRNA injizierten Tieren war der Gesamt-JH-Titer am zweiten Tag nach dem Schlupf erniedrigt, was auf eine signifikante Reduzierung des JH II-Titers von $3,8 \pm 0,3$ pg / µl auf $2,3 \pm 0,5$ pg / µl und des JH III-Titers von $11,3 \pm 1,4$ pg / µl auf $3,0 \pm 0,2$ pg / µl zurück ging (Abb. 18B).

Diese Abnahme sowohl im JH III-Titer als auch im gesamten JH-Titer wurde auch bei AS-C-dsRNA injizierten adulten Weibchen beobachtet, allerdings erst am Tag 4.

In älteren Weibchen (Tag 6) wurde der Gesamt-JH-Titer durch die RNA Interferenz nicht beeinflusst, aber es gab Unterschiede in den Mengen der Isoformen (Abb. 18A, B). Am sechsten Tag nahm der JH III-Titer von $28,4 \pm 2,8$ pg / µl in den Ringer injizierten Tieren auf $15,3 \pm 1,4$ bzw. $12,2 \pm 1,6$ pg / µl nach Suppression des AS-C bzw. AT 2 Gens stark ab. Dagegen stieg der JH II-Titer nach Suppression des AS-C bzw. AT 2 Gens signifikant von $4,4 \pm 1$ pg / µl in Ringerkontrollen auf $18,7 \pm$

3,1 pg / μ l bzw. $19,3 \pm 1,3$ pg / μ l an. Der JH I-Titer war in den adulten weiblichen unverpaarten Schmetterlingen über den gesamten Beobachtungszeitraum niedrig und wurde von der RNA Interferenz nicht beeinflusst.

Auch in adulten verpaarten Weibchen wurde der JH-Titer bestimmt. Der Gesamt-JH-Titer war in den verpaarten Tieren im Vergleich zu unverpaarten Weibchen erhöht.

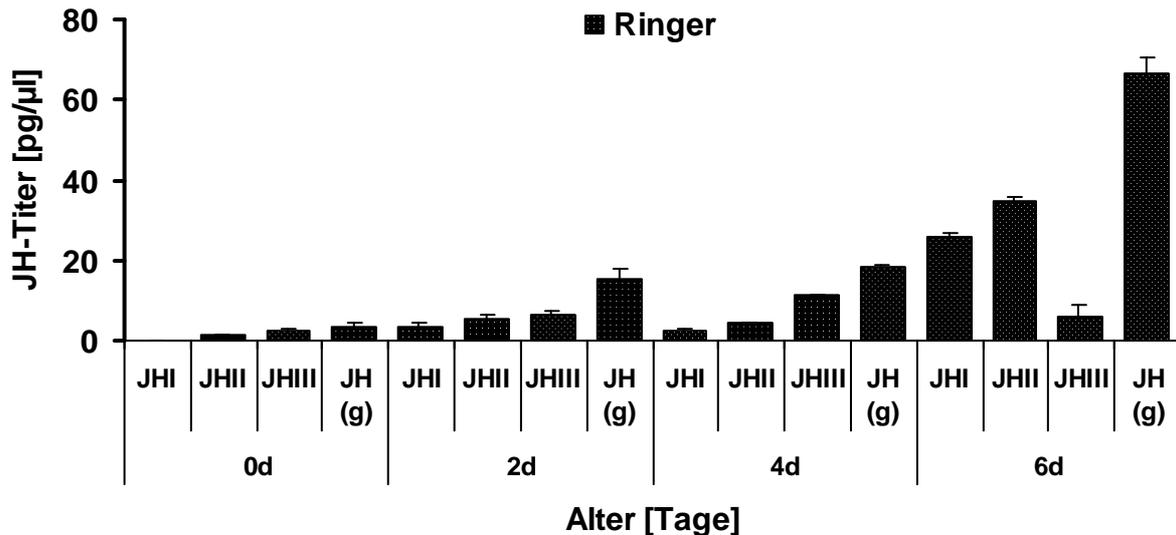


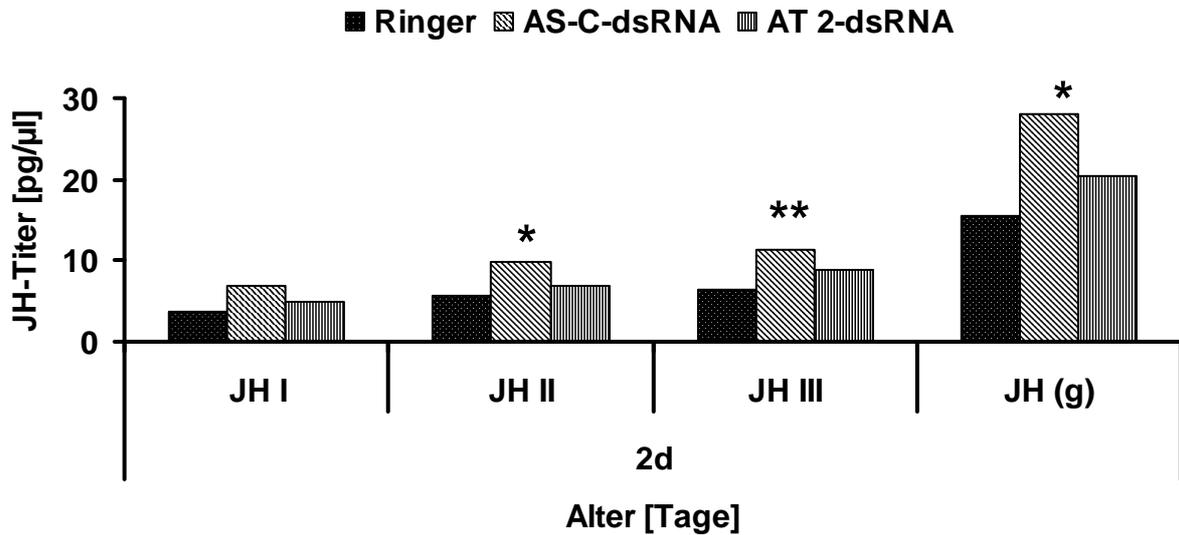
Abb. 19 JH-Hämolymphtiter in adulten verpaarten *S. frugiperda* Weibchen.

Frisch geschlüpfte adulte (Tag 0) *S. frugiperda* Weibchen wurden mit 2 μ l Ringer injiziert. Die Weibchen wurden direkt nach der Imaginalhäutung verpaart. Für eine Probe wurde jeweils die Hämolymphe von 4-5 adulten Weibchen am Tag des Schlupfes (Tag 0) sowie 2, 4 und 6 Tage nach der Injektion gesammelt. Bestimmung der JH I-, JH II- und JH III-Titer in der Hämolymphe von Weibchen mit Hilfe der LC-MS. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 11-49. (ANOVA) JH I: $F_{3,114}=2,64$, $P < 0.001$; JH II: $F_{3,114}=7,67$, $P < 0.001$; JH III: $F_{3,114}=39,39$, $P < 0.001$.

In adulten verpaarten Weibchen stieg der Gesamt-JH-Titer vom Schlupftag (Tag 0) bis zum sechsten Tag stetig an. Bis zum 4. Tag waren die Werte für verpaarte und unverpaarte Weibchen etwa gleich, während der Maximalwert für verpaarte Tiere mit $66,4 \pm 4,4$ pg / μ l im Vergleich zu unverpaarten Weibchen mit $36 \pm 1,9$ pg / μ l am sechsten Tag fast doppelt so hoch lag. Auch bei den verpaarten Weibchen hatte der JH III-Titer einen großen Anteil am Gesamt-JH-Titer, allerdings trugen auch die anderen Isoformen zu der Erhöhung bei. Besonders am sechsten Tag des Adultlebens konnten JH II und JH I in großen Mengen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von JH III am Gesamt-JH-Titer liegt bei den verpaarten Weibchen durchschnittlich bei 9 %, bei den unverpaarten Weibchen bei 79 %.

Bei den verpaarten Weibchen wurden nur 2 Tage alte Tiere nach dsRNA-Injektion im Bezug auf Veränderungen beim JH- und Ecdysteroid-Titer betrachtet (Abb. 20).

(A)



(B)

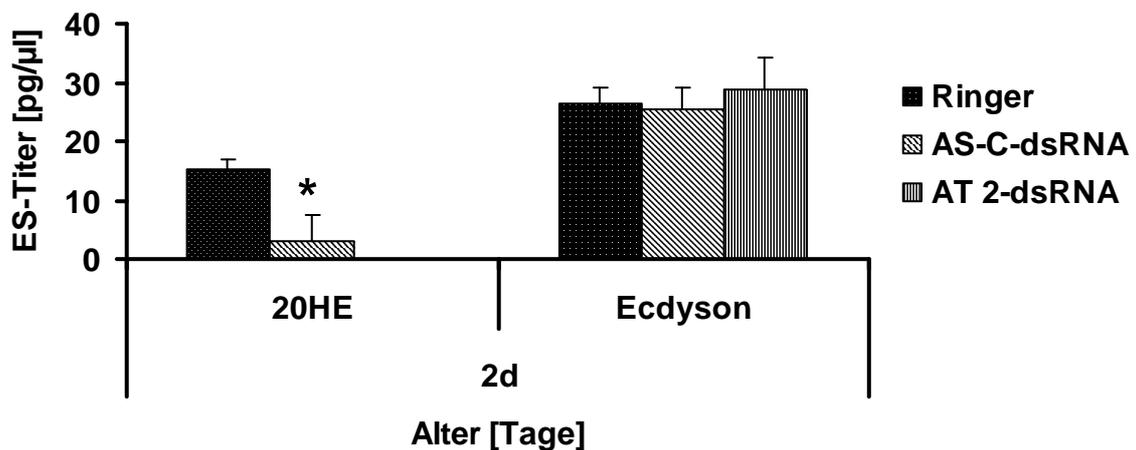


Abb. 20 JH-Hämolymphtiter und Ecdysteroid-Titer in adulten verpaarten Weibchen von *S. frugiperda* nach Gensuppression.

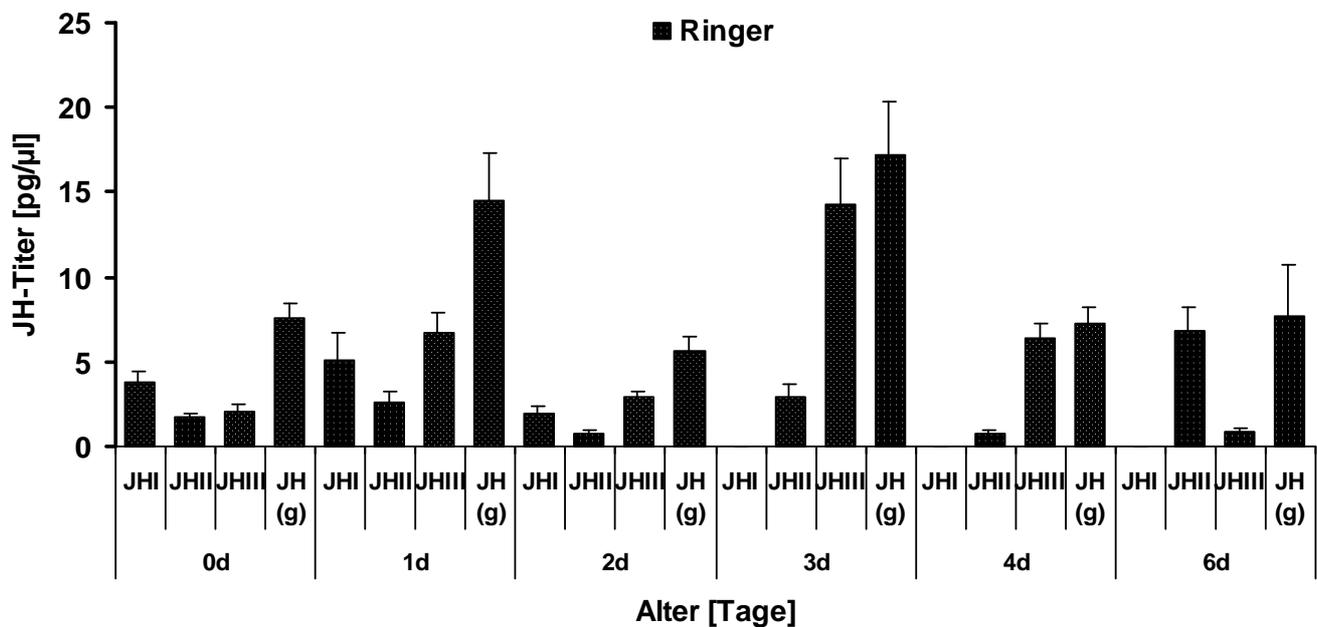
Frisch geschlüpfte adulte (Tag 0) *S. frugiperda* Weibchen wurden mit 2 μl Ringer, 1 μg AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA injiziert. Die Weibchen wurden verpaart und der JH- (A) bzw. ES-Titer (B) wurde am 2. Tag nach der Adulthäutung bestimmt. Für eine Probe wurde jeweils die Hämolymphe von 4-5 adulten Weibchen am Tag des Schlupfes (Tag 0) sowie 2 Tage nach der Injektion gesammelt. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-12 (A), n = 10 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ergebnisse

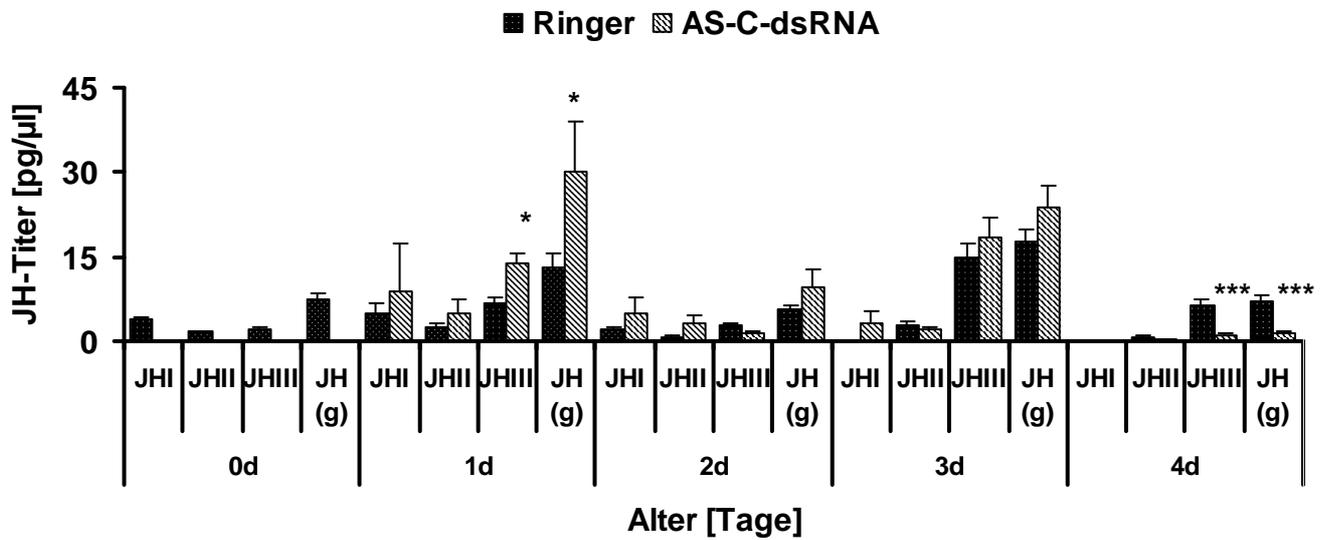
Auffällig ist, dass der Gesamt-JH-Titer bei den mit dsRNA injizierten, verpaarten Weibchen höher lag als bei den mit Ringer injizierten Tieren. Die Erhöhung war aber nur bei den mit AS-C-dsRNA injizierten Weibchen signifikant. Alle Homologe trugen zu der Erhöhung des Gesamt-JH-Titers bei. Bei den Ecdysteroiden kam es zu einer signifikanten Erniedrigung des 20-HE-Titers in der Hämolymphe, während der Ecdysontiter im Vergleich zu der Ringerkontrolle konstant blieb.

Da die Juvenilhormone auch für die Entwicklung und Fertilität der Männchen wichtig sind, wurde auch bei ihnen der JH-Titer in der Hämolymphe bestimmt (Abb. 21A).

(A)



(B)



(C)

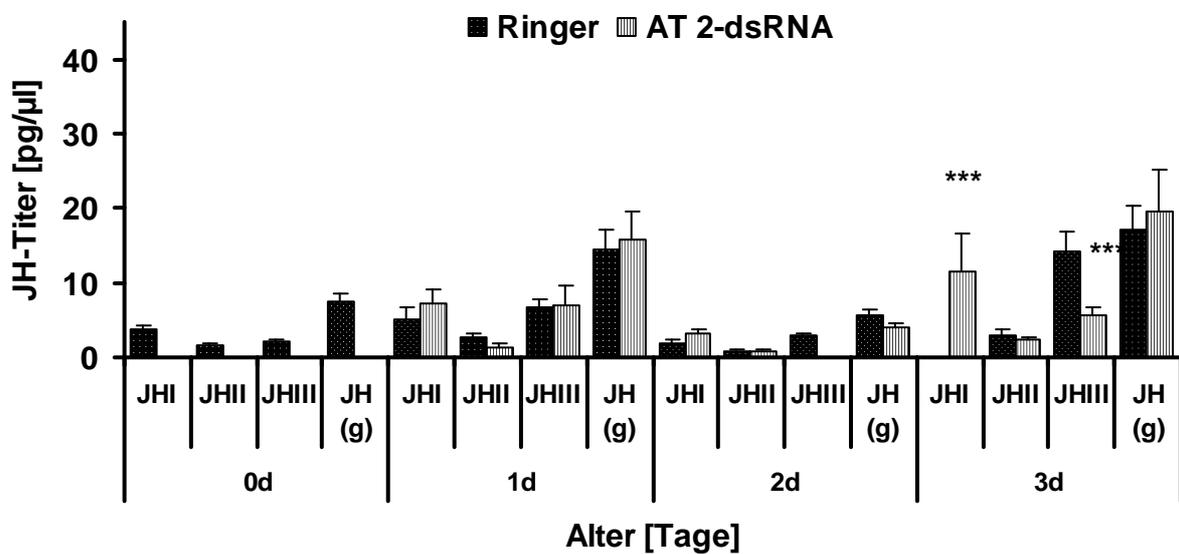


Abb. 21 *JH-Hämolymphtiter in adulten unverpaarten S. frugiperda Männchen.*
 Frisch geschlüpfte adulte männliche (Tag 0) von *S. frugiperda* wurden mit 2 µl Ringer (A), 1 µg AS-C-dsRNA (B) bzw. 1 µg AT 2-dsRNA (C) injiziert. Für eine Probe wurde jeweils die Hämolymphe von 10 adulten Männchen am Tag des Schlupfes (Tag 0) sowie 1, 2, 3, 4 und 6 Tage nach der Injektion gesammelt. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-12 (A), n = 10 (B), n = 10 (C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Bei den mit Ringer injizierten Männchen stieg der Gesamt-JH-Titer einen Tag nach der Injektion an, ein weiteres Maximum war am dritten Tag zu beobachten. Am zweiten, vierten und sechsten Tag war der JH-Titer hingegen niedriger. Bei den Männchen trugen alle Homologe zum Gesamt-JH-Titer bei. Ebenso wie bei den Weibchen, war bei den Männchen der JH III-Anteil oftmals am höchsten. Auffallend ist, dass, ebenso wie bei den verpaarten Weibchen, auch bei den Männchen der Anteil von JH II am sechsten Tag am höchsten war. Der Gesamt-JH-Titer der mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen war an den ersten drei Tagen leicht, jedoch nur an Tag 1 signifikant, erhöht. Am vierten Tag war der JH-Titer deutlich erniedrigt. Auch bei den mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen war der Gesamt-JH-Titer an den ersten drei Tagen leicht erhöht. Dabei trug am dritten Tag JH I am meisten zum Gesamt-JH-Titer bei.

Vergleicht man die JH-Titer der Weibchen mit denen der Männchen, stellt man fest, dass der Gesamt-JH-Titer bei den unverpaarten Weibchen nur am Tag 2 und Tag 6 deutlich höher lag als bei den Männchen. Verpaarte Weibchen zeigten hingegen stets einen deutlich höheren JH-Titer als Männchen und ab dem Tag 2 auch einen deutlich höheren JH-Titer als unverpaarte Weibchen (Abb. 22).

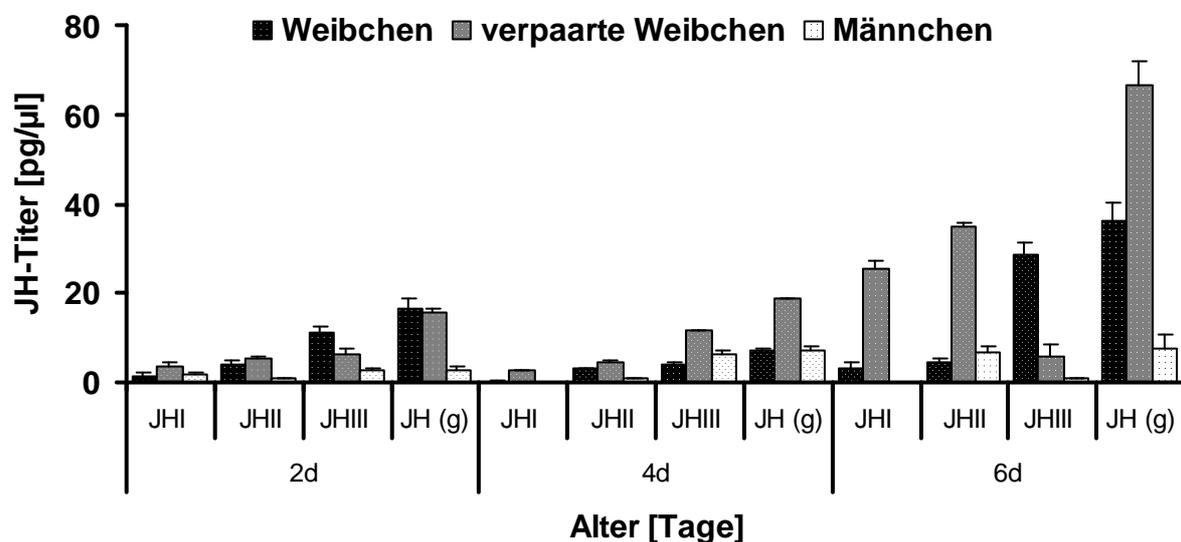
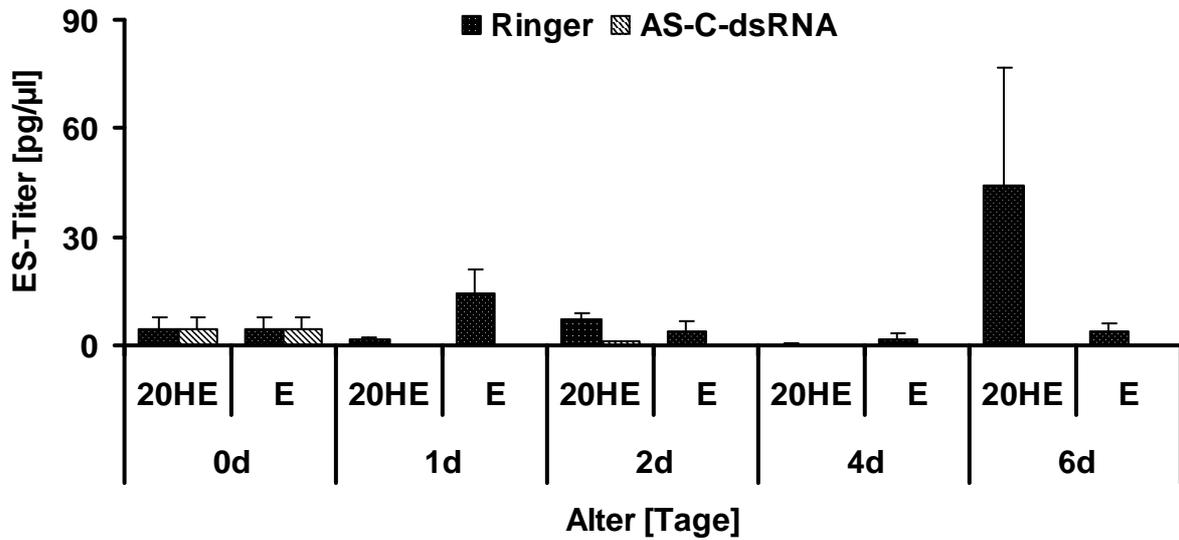


Abb. 22 Vergleich der JH-Titer in der Hämolymphe von adulten unverpaarten und verpaarten mit Ringer injizierten Weibchen mit adulten unverpaarten und mit Ringer injizierten Männchen.

Daten aus den Abbildungen 18, 19 und 21.

(A)



(B)

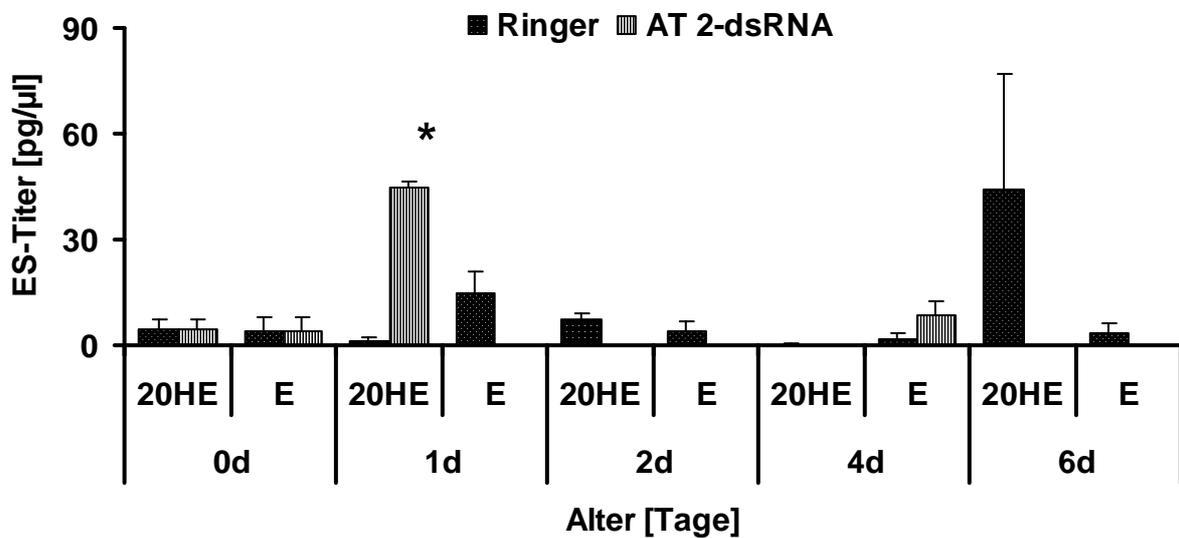


Abb. 23 Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe von adulten unverpaarten Weibchen von *S. frugiperda* nach Gensuppression.

Frisch geschlüpfte adulte Weibchen (Tag 0) von *S. frugiperda* wurden mit 2 µl Ringer (weiß gepunktete, schwarze Balken), 1 µg AS-C-dsRNA (quergestreifte Balken) (A) bzw. AT 2-dsRNA (längsgestreifte Balken) (B) injiziert. Die Hämolymphe von jeweils 4-5 adulten Weibchen wurde am Tag (d) des Schlupfes (Tag 0) und 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Injektion gesammelt. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-12 (A), n = 10 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$.

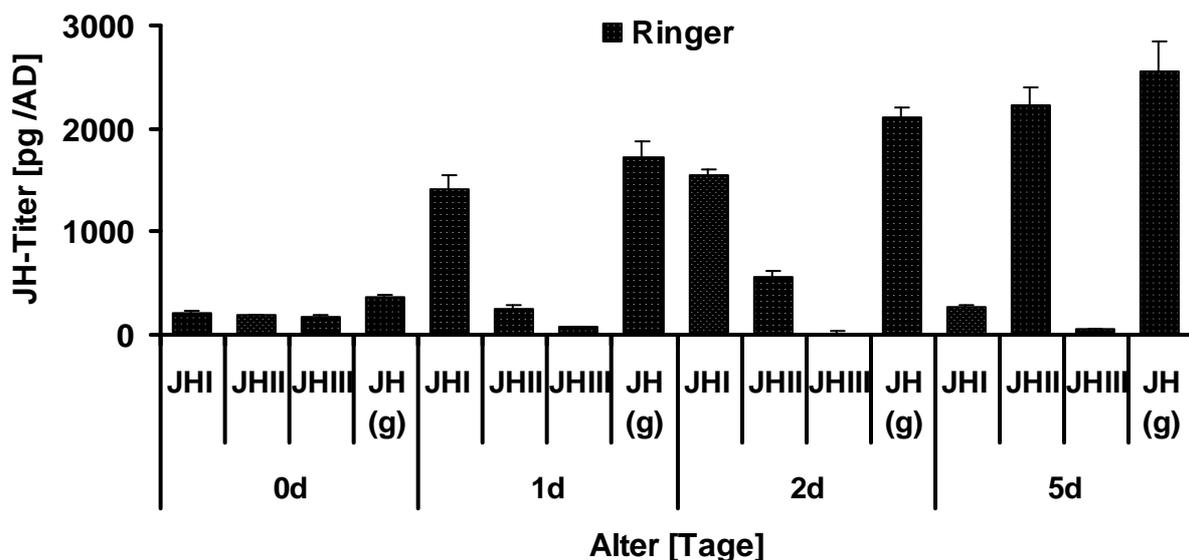
Die Ecdysteroidtiter der unverpaarten Weibchen (Abb. 23) und Männchen (Daten nicht gezeigt) unterlagen sehr starken Schwankungen. Ecdysteroide konnten bei den Männchen nur in einzelnen Proben in sehr geringen Mengen (an der Nachweisgrenze) identifiziert werden.

Bei unverpaarten adulten, Ringer injizierten Weibchen waren 20-HE und Ecdyson an allen Tagen nachweisbar. Am sechsten Tag konnten die höchsten 20-HE Werte und am ersten Tag die höchsten Ecdyson Werte gemessen werden. Durch die Injektion von AS-C-dsRNA wurde der Ecdysteroidtiter an allen Tagen erniedrigt und lag zum Teil unter der Nachweisgrenze. Dagegen war bei AT 2-dsRNA injizierten Tieren der 20-HE Titer am ersten Tag signifikant erhöht, Ecdyson war am vierten Tag leicht erhöht. Am zweiten und sechsten Tag ließen sich bei mit AT 2-dsRNA injizierten Tieren keine Ecdysteroide nachweisen.

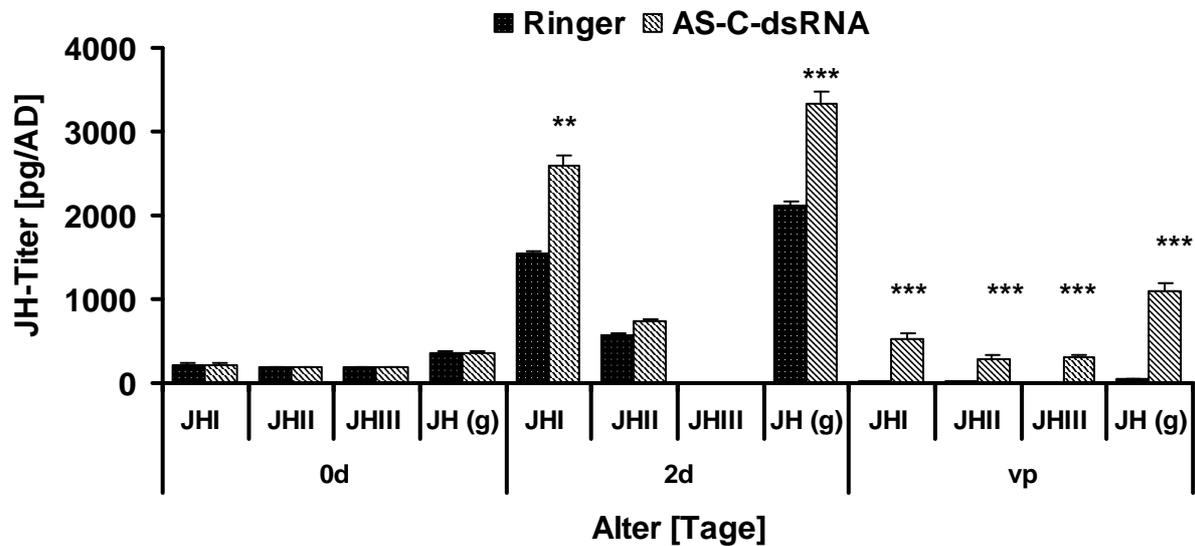
4.4.4 Ursachen für die Auswirkungen der Verpaarung von *Spodoptera frugiperda* auf den JH-Titer in der Hämolymphe

Verpaarte Weibchen wiesen einen höheren JH-Titer in der Hämolymphe auf als unverpaarte Weibchen (siehe Abb. 22). Bei der Verpaarung werden mit der Spermatophore verschiedene Substanzen vom Männchen auf das Weibchen übertragen. Eine dieser Substanzen ist Juvenilhormon [Pszczolkowski et al., 2006]. Daher erschien es sinnvoll, die Übertragung von JH auf die Weibchen bei der Verpaarung zu untersuchen. Dabei wurden die mit dsRNA injizierten Tiere im Bezug auf die JH-Übertragung mit Ringer injizierten Tieren verglichen. Es zeigte sich, dass bei *S. frugiperda*, wie bei anderen bereits untersuchten Lepidopteren, JH vom Männchen auf die Weibchen übertragen wird. In den Abb. 24 und 25 sind die gemessenen JH-Titer der akzessorischen Drüsen (AD) der Männchen und der Bursae copulatrix der Weibchen dargestellt.

(A)



(B)



(C)

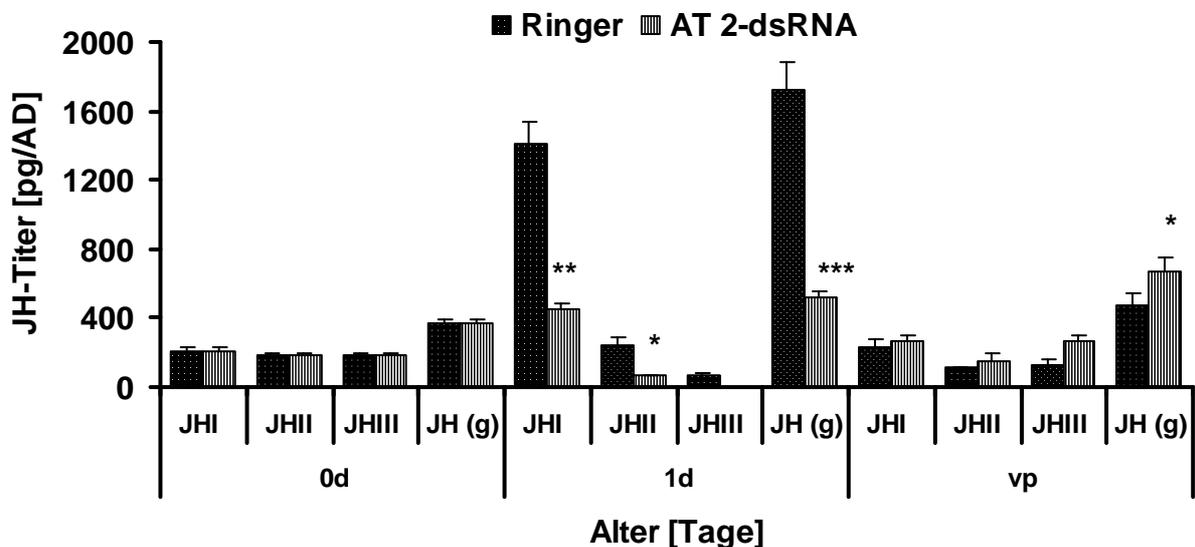


Abb. 24 JH-Titer in akzessorischen Drüsen von adulten *S. frugiperda* Männchen vor und nach Gensuppression.

Frisch geschlüpfte adulte Männchen (Tag 0) von *S. frugiperda* wurden mit 2 µl Ringer (A), 1 µg AS-C-dsRNA (B) bzw. AT 2-dsRNA (C) injiziert. Die akzessorische Drüse (AD) von unverpaarten adulten Männchen wurden am Tag der Imaginalhäutung (0d), sowie am 1d, 2d und 5d nach der Häutung präpariert und die JH-Titer bestimmt. Die Tiere wurden am Tag der Imaginalhäutung (B) bzw. am 1. Tag nach der Häutung (C) verpaart. Die akzessorischen Drüsen (AD) von verpaarten adulten Männchen wurde einen Tag nach der Verpaarung präpariert und der JH-Titer bestimmt (vp). Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-12 (A), n = 10 (B), n = 10 (C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

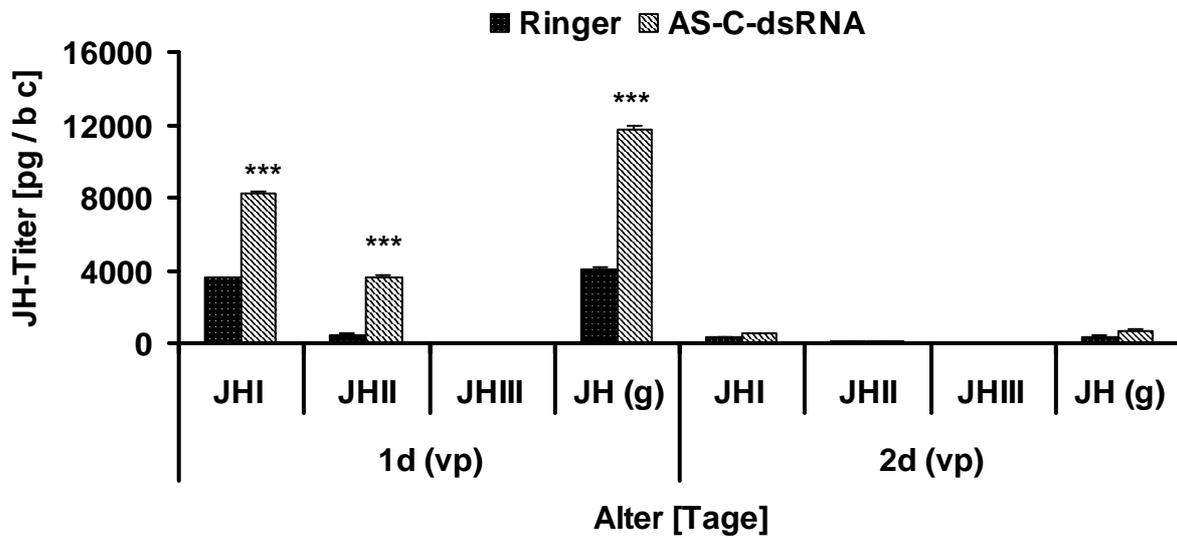
Bei unverpaarten Männchen wurde in den AD direkt nach der Imaginalhäutung ein Basiswert von $368,5 \pm 23,4$ pg / AD gefunden. Am ersten Tag nach dem Schlupf stieg der JH-Titer in unverpaarten Ringer injizierten Männchen auf $1725,4 \pm 153,7$ pg / AD an und erreicht am zweiten Tag $2112,4 \pm 5$ pg / AD (Abb. 24A); JH I ist dabei das dominante Homolog. Am fünften Tag nach der Imaginalhäutung lag der JH-Titer bei $2547,8 \pm 303,5$ pg / AD, das dominante Homolog war nun JH II. Im Falle einer Verpaarung sank der Titer einen Tag nach der Kopulation von $1725,4 \pm 153,7$ pg / AD auf $479,4 \pm 65$ pg / AD bei Ringer injizierten Tieren, die direkt nach der Imaginalhäutung verpaart worden waren bzw. von $2112,4 \pm 46$ pg / AD auf $41,6 \pm 6,1$ pg / AD bei Ringer injizierten Tieren, die am ersten Tag nach der Imaginalhäutung verpaart worden waren.

Zwei Tage alte mit AS-C-dsRNA injizierte Männchen zeigten einen deutlich höheren JH-Titer ($3064,3 \pm 202,9$ pg / AD) als mit Ringer injizierte Männchen. Dieser sank nach der Verpaarung auf $1104,8 \pm 84,6$ pg / AD, verblieb damit also auf einem höheren Niveau als bei den mit Ringer injizierten Männchen.

Ein Tag alte mit AT 2-dsRNA injizierte Männchen hatten mit $521 \pm 37,7$ pg / AD vor der Verpaarung einen signifikant niedrigeren JH-Titer als mit Ringer injizierte Kontrolltiere ($1725 \pm 153,7$ pg / AD) und dieser Titer war nach der Verpaarung nicht reduziert ($670,5 \pm 79,4$ pg / AD).

Da der JH-Titer in den akzessorischen Drüsen der mit Ringer injizierten Männchen nach der Verpaarung im Vergleich zu unverpaarten Männchen deutlich erniedrigt war, wurde die mögliche Übertragung von JH auf die beteiligten Weibchen ebenfalls untersucht.

(A)



(B)

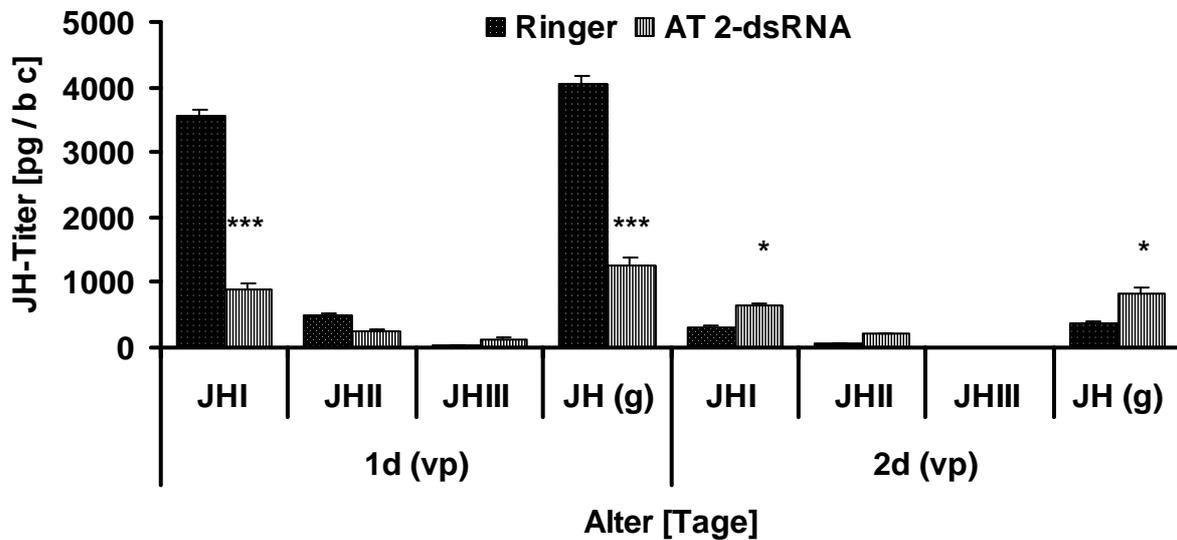


Abb. 25 JH-Titer in der Bursa copulatrix von adulten *S. frugiperda* Weibchen, die mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren.

Frisch geschlüpfte adulte Weibchen (Tag 0) von *S. frugiperda* wurden mit Männchen verpaart, die 24 Stunden vorher mit 2 μ l Ringer, 1 μ g AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) injiziert worden waren. Die Bursa copulatrix der adulten Weibchen wurde am Tag der Imaginalhäutung, 24 bzw. 48 Stunden nach dem Häutung und jeweils 24 Stunden nach der Verpaarung präpariert [1d (vp), 2d (vp)] und die JH-Titer bestimmt. Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 10-12 (A), n = 10 (B). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$.

In der Bursa copulatrix von unverpaarten Weibchen ist in den ersten beiden Tagen nach der Imaginalhäutung kein JH nachweisbar (nicht gezeigt). In der Bursa von mit Ringer injizierten Männchen verpaarten zwei Tage Weibchen [1d (vp)] war mit $4062,3 \pm 102,3$ pg JH / bc weniger JH als in der Drüse von gleichaltrigen Weibchen, die mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren ($11776,2 \pm 216,7$ pg / bc) aber mehr als in der Drüse von Weibchen die mit AT 2-dsRNA injizierten Tieren verpaart worden waren ($1250,1 \pm 123,5$ pg / bc). Dabei hatte JH I mengenmässig stets den größten Anteil am Gesamt-JH-Titer (Abb. 25). Am folgenden Tag [2d (vp)] war der Gehalt an JH in der Bursa copulatrix von Weibchen, die mit Ringer injizierten Männchen verpaart worden waren, auf $375,7 \pm 35,4$ pg / bc gesunken, bei Verpaarung mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen auf $655,3 \pm 84,3$ pg / bc und bei mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen auf $833,7 \pm 77,5$ pg / bc. Nach einer Verpaarung mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen, die einen erhöhten JH-Titer in den akzessorischen Drüsen haben, ist in den entsprechenden unbehandelten Weibchen also mehr JH zu finden als in vergleichbaren, mit Ringer injizierten Männchen verpaarter Weibchen (Abb. 25A). Wurden die Männchen dagegen mit AT 2-dsRNA injiziert, findet sich in der Bursa copulatrix von verpaarten unbehandelten Weibchen weniger JH als in den Kontrollen (Abb. 25B).

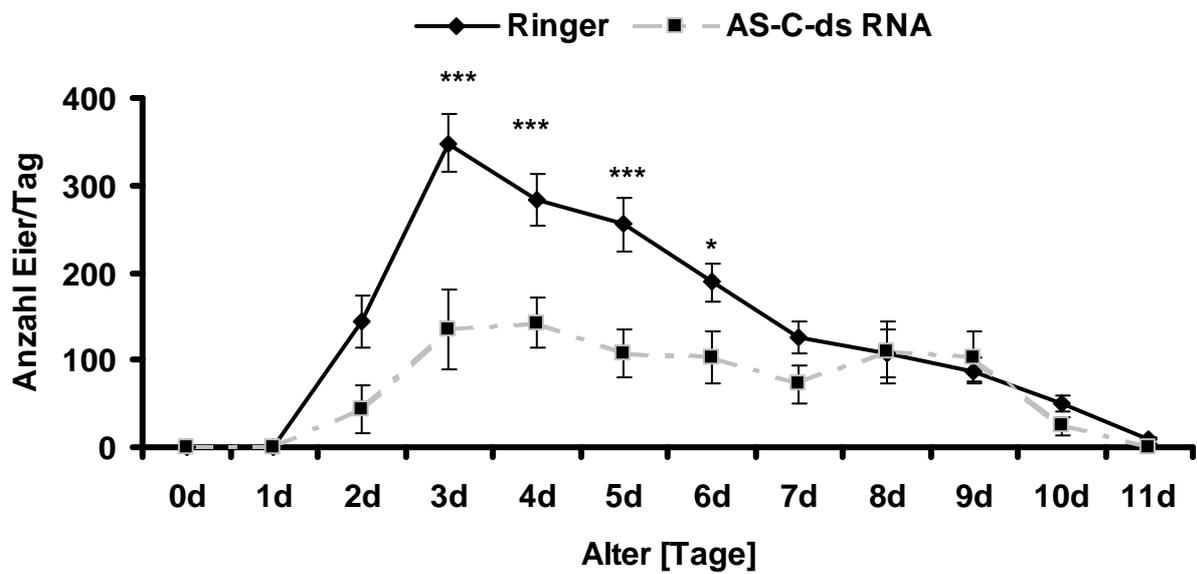
Der erniedrigte bzw. erhöhte JH-Titer ist jedoch einen Tag später wieder ausgeglichen. Weibchen, die sich mit AS-C-dsRNA behandelten Männchen verpaart hatten, haben vergleichbare JH-Titer in der Bursa copulatrix wie bei der Kontrollgruppe. Dagegen verblieb in der Bursa copulatrix der Weibchen, die mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren, 2d nach der Verpaarung mit $833,8 \pm 77,5$ pg / bc signifikant mehr JH als bei der vergleichbaren Kontrollgruppe ($375,7 \pm 35,4$ pg / bc).

4.4.5 Auswirkungen der dsRNA Injektionen auf die Oviposition der *Spodoptera frugiperda* Weibchen

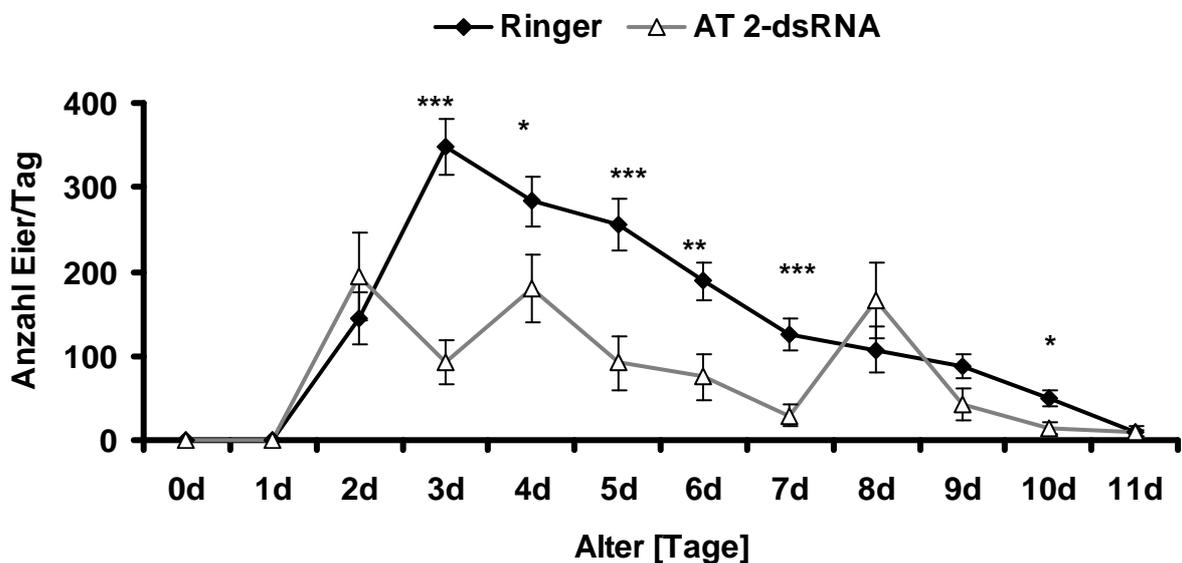
Um einen möglichen Einfluss der Neuropeptide AS-C bzw. AT 2 auf die Eiablage von *Spodoptera* Weibchen zu bestimmen, wurden frisch geschlüpfte adulte Weibchen mit 1 µg dsRNA bzw. mit Noctuidenringer injiziert. Es wurde angenommen, dass die Peptidexpression unter diesen Bedingungen reduziert war. Das Injektionsvolumen

betrug 2 μ l. Die Weibchen wurden mit jeweils einem unbehandelten Männchen verpaart. Die Oviposition wurde über 11 Tage verfolgt und die durchschnittliche Anzahl der von den Weibchen abgelegten Eier pro Tag (Abb. 26A, B), sowie die Gesamtanzahl der abgelegten Eier pro Weibchen (Abb. 26C) für alle Gruppen erfasst.

(A)



(B)



(C)

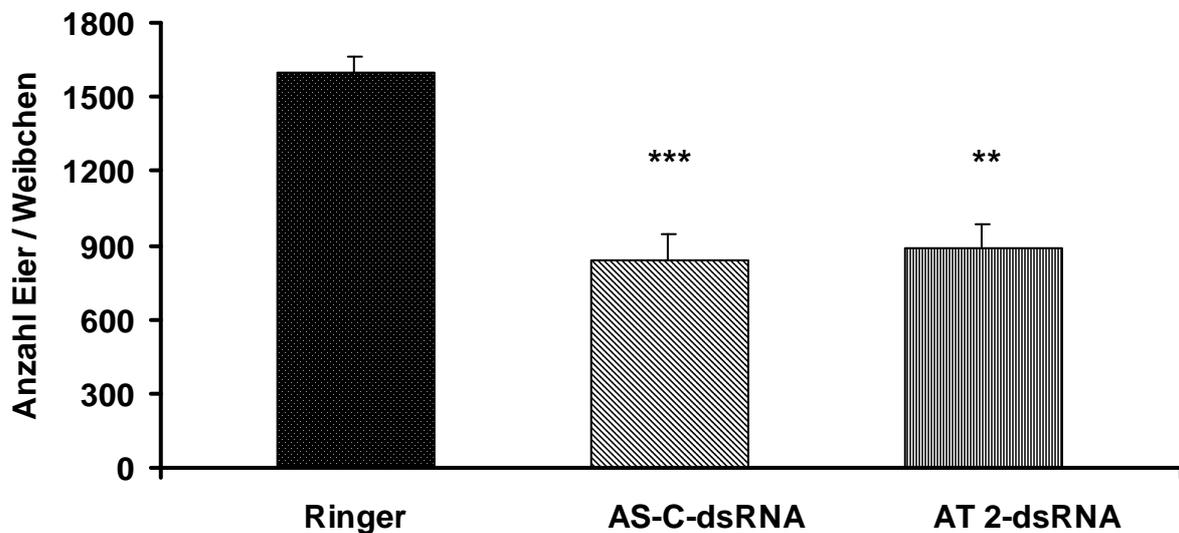


Abb. 26 Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf die Oviposition adulter *S. frugiperda* Weibchen.

Injektion frisch geschlüpfter Weibchen mit Noctuidenringer bzw. 1 µg AS-C- bzw. AT 2-dsRNA in einem Injektionsvolumen von 2 µl. Verpaarung der Weibchen mit jeweils einem unbehandelten Männchen. Durchschnittliche Anzahl der Eier pro Tag (A, B) und Anzahl der über den gesamten Zeitraum von einem Weibchen abgelegten Eier (C). Mittelwerte ± Standardfehler, n = 11 (Ringer), n = 10 (AT-dsRNA), n = 26 (AS-C). Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (Student's *t* test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Ab dem zweiten Tag nach der Imaginalhäutung legten die verpaarten Weibchen Eier auf das Filterpapier ab. Bei Ringer injizierten Weibchen stieg die Oviposition stark an und erreichte ein Maximum von 348 ± 33 Eiern / Weibchen am dritten Tag nach dem Schlupf. Danach sank die Ovipositionsrate kontinuierlich bis zum elften Tag ab; an diesem Tag endete i.d.R. die Eiablage (Abb. 26). Die Menge der insgesamt abgelegten Eier waren bei den dsRNA injizierten Weibchen im Vergleich zu den Ringerkontrolltieren signifikant reduziert. Die Kontrollweibchen legten insgesamt 1599 ± 79 Eier pro Weibchen, wogegen AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injizierte Weibchen nur 840 ± 107 bzw. 894 ± 74 Eier ablegten. Die AS-C-Typ dsRNA injizierten Tiere zeigten eine relativ konstante Ovipositionsrate zwischen den Tagen drei und neun mit einem Maximum von 142 ± 28 Eiern am vierten Tag (Abb. 26A), wogegen die Ovipositionsraten der AT 2-dsRNA injizierten Weibchen (Abb. 26B) relativ stark schwankten und Peaks am 2. Tag (194 ± 52 Eier), 4. Tag (180 ± 41 Eier) und 8. Tag (166 ± 44 Eier) aufwiesen.

Mehrere Verpaarungen fanden in den beobachteten Zeiträumen statt und wurden bestätigt durch das Zählen der Spermatophoren in der Bursa copulatrix der Kontrollen bzw. mit dsRNA behandelten Tiere.

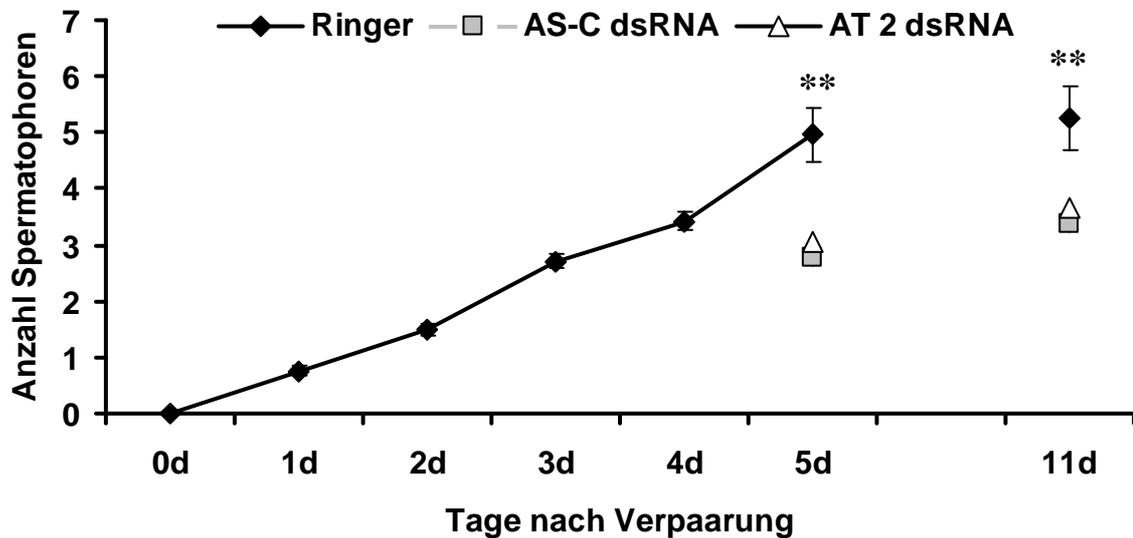


Abb. 27 Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen der Weibchen auf die Anzahl der bei den Verpaarungen aufgenommenen Spermatophoren.

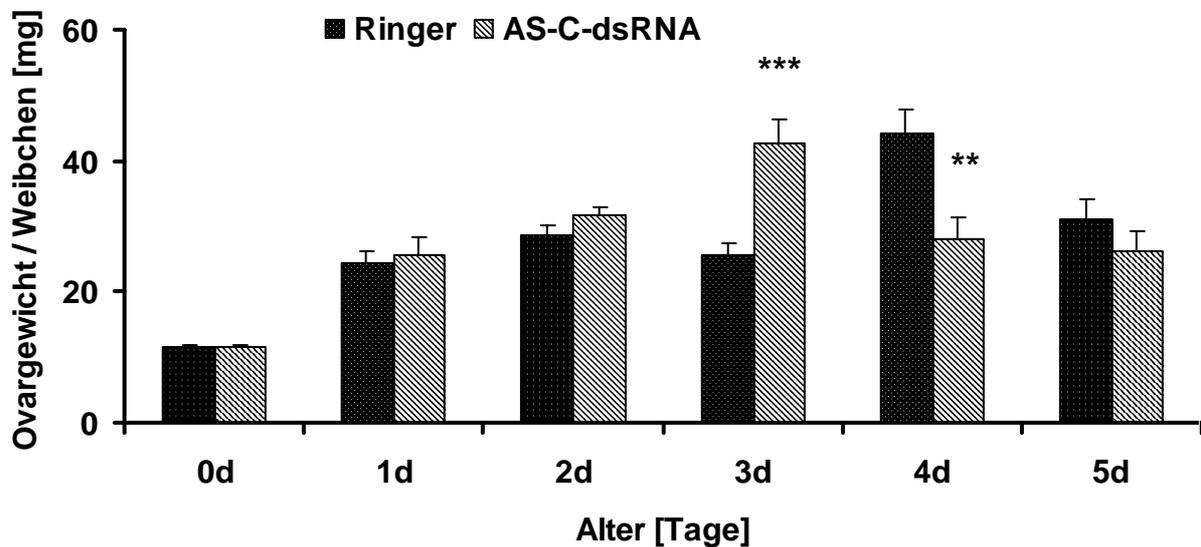
Frisch geschlüpfte Weibchen wurden mit Noctuidenringer bzw. 1 µg AS-C- bzw. AT 2-dsRNA in einem Injektionsvolumen von 2 µl injiziert. Die Verpaarung der Weibchen erfolgte mit jeweils einem Männchen. Anzahl der bis zum jeweiligen Tag aufgenommenen Spermatophoren. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 12 (Ringer), n = 12 (AT 2-dsRNA), n = 9 (AS-C). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), ** *p* < 0,01.

Pro Tag wurde in den ersten fünf Tagen durchschnittlich eine Spermatophore an ein Weibchen übertragen. Hierbei war auffällig, dass die mit AT 2- bzw. AS-C-dsRNA injizierten Weibchen am fünften Tag deutlich weniger Spermatophoren in ihrer Bursa copulatrix enthielten ($3,0 \pm 0,3$ bzw. $2,8 \pm 0,4$) als Ringerkontrollen ($5,0 \pm 0,5$). Am elften Tag war die durchschnittliche Anzahl der Spermatophoren in der Bursa copulatrix für alle Gruppen nur unwesentlich höher als am fünften Tag.

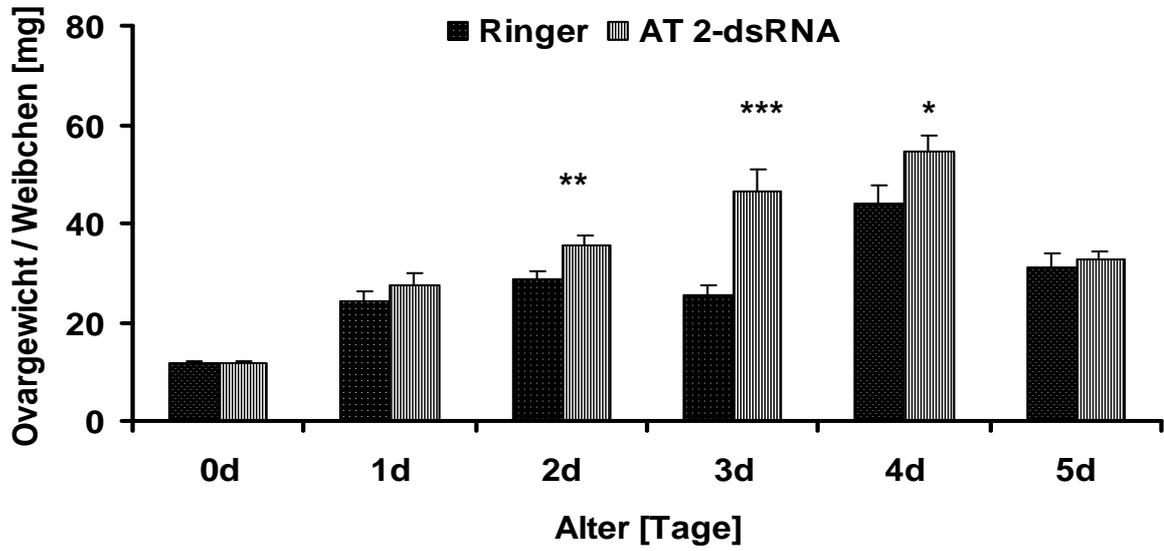
4.4.6 Auswirkungen der Suppression der AS-C und AT 2 Gene auf die Reproduktionsleistung von *Spodoptera frugiperda* Weibchen

Bei der Bestimmung der Gesamtproduktionsleistung der Weibchen ist neben der Eiablage auch die Menge der (reifenden und reifen) Eier in den Ovarien relevant. Die in den Ovarien vorhandenen Eier erhöhen das Ovargewicht, deshalb wurde zusätzlich zu den abgelegten Eiern auch das Ovargewicht der Weibchen ermittelt (Abb. 28). Auch in diesem Experiment wurden adulte *S. frugiperda* Weibchen mit 1 µg AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA am Tag nach der Imaginalhäutung injiziert. Zum Vergleich sind die Gewichte der Ovarien unverpaarter (Abb. 28A, B) und verpaarter (Abb. 28C, D) Weibchen, die mit Ringer, AS-C-dsRNA und AT 2-dsRNA injiziert worden waren, dargestellt.

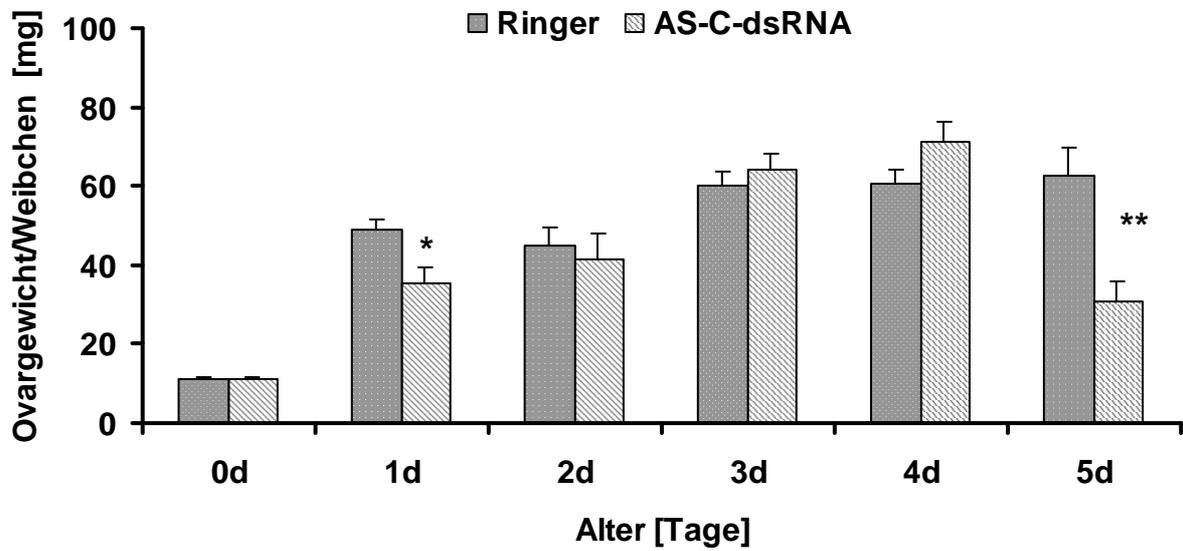
(A)



(B)



(C)



(D)

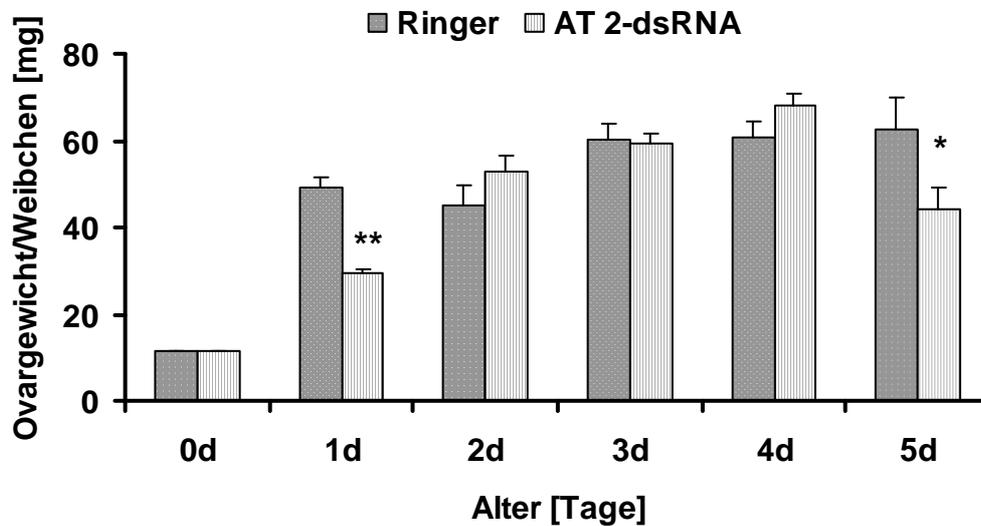


Abb. 28 Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Ovargewicht von adulten *S. frugiperda* Weibchen.

Injektion frisch geschlüpfter Weibchen mit 2 µl Noctuidenringer bzw. 1 µg AS-C- bzw. AT 2-dsRNA. Die Verpaarung der Weibchen erfolgte mit jeweils einem Männchen. Darstellung der durchschnittlichen Ovargewichte unverpaarter mit AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) injizierter Weibchen und verpaarter mit AS-C-dsRNA (C) bzw. AT 2-dsRNA injizierter Weibchen (D). Dunkle Säulen stellen die Ringerkontrollen dar. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 10-25$ (Ringer), $n = 10-37$ (AS-C-dsRNA), $n = 10-37$ (AT 2-dsRNA). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

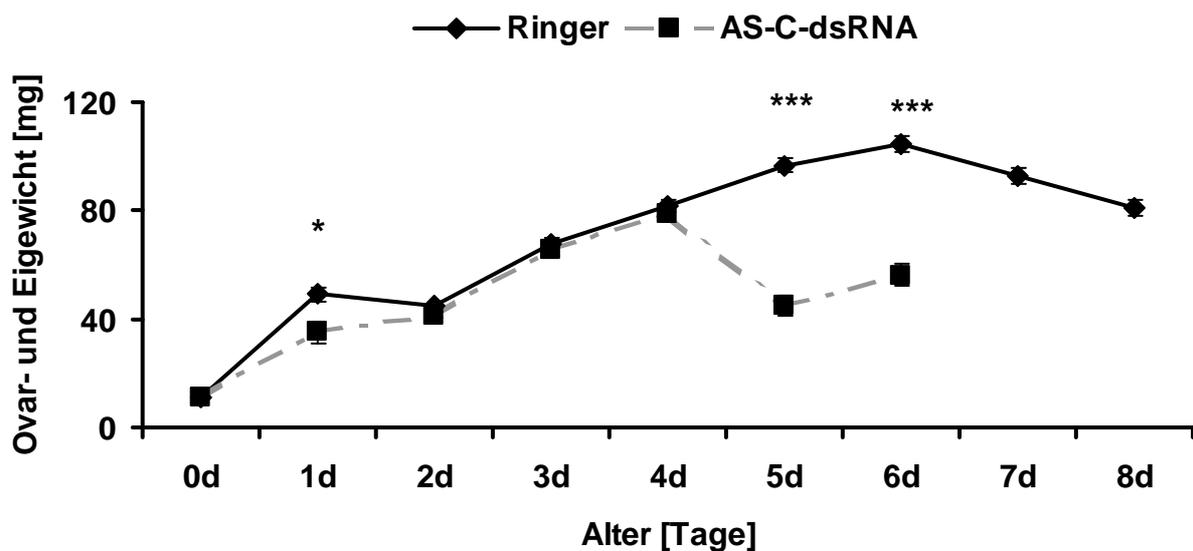
Bei unverpaarten und verpaarten Ringer injizierten *S. frugiperda* Weibchen nahmen die Ovargewichte mindestens bis zum 4. Tag zu (Abb. 28A bis C). Am 4. Tag erreichten die Ovargewichte der unverpaarten mit Ringer injizierten Tiere den höchsten Wert mit $44,2 \pm 3,5$ mg. Am 5. Tag war das Ovargewicht der unverpaarten Tiere reduziert, während die Ovarien verpaarter Weibchen nochmals schwerer wurden. Bei den verpaarten Ringer injizierten *S. frugiperda* Weibchen nahm das Ovargewicht erst am 6. Tag auf 48 ± 3 mg bzw. am 7. Tag auf $28,8 \pm 5,4$ mg ab. Die Ovargewichte der verpaarten Tiere stiegen schneller an und erreichten höhere Maximalwerte als die der unverpaarten Weibchen.

Ein Vergleich der Ovargewichtsveränderungen ergab signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Injektionsgruppen (Abb. 28). Bei den unverpaarten Weibchen zeigten die mit AS-C-dsRNA injizierten Tiere am 3. Tag einen Anstieg des Ovargewichts auf $42,6 \pm 3,7$ mg (Ringerkontrolle $25,5 \pm 1,8$ mg), aber am 4. Tag mit $28,1 \pm 3,1$ mg ein niedrigeres Ovargewicht als die Kontrolle ($44,2 \pm 3,5$ mg)

(Abb. 28A). Bei mit AT 2-dsRNA injizierten unverpaarten Weibchen wurde mit $54,4 \pm 3,6$ mg am 4. Tag der höchste Wert des Ovargewichts festgestellt (Abb. 28B). Bei den verpaarten Weibchen bewirkte die Injektion der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA am ersten Tag mit $35,1 \pm 4,2$ bzw. $29,7 \pm 0,8$ mg und am fünften Tag mit $30,8 \pm 5,3$ bzw. $44 \pm 5,2$ mg eine Verringerung des Ovargewichtes im Vergleich zu den Ringerkontrollen ($49 \pm 2,6$ bzw. $62,7 \pm 7,2$ mg).

Durch Addition des durchschnittlichen Ovargewichts und des durchschnittlichen Gewichts der abgelegten Eier am jeweiligen Tag innerhalb des Beobachtungszeitraumes konnte die Gesamtproduktionsleistung der Weibchen ermittelt werden (Abb. 29).

(A)



(B)

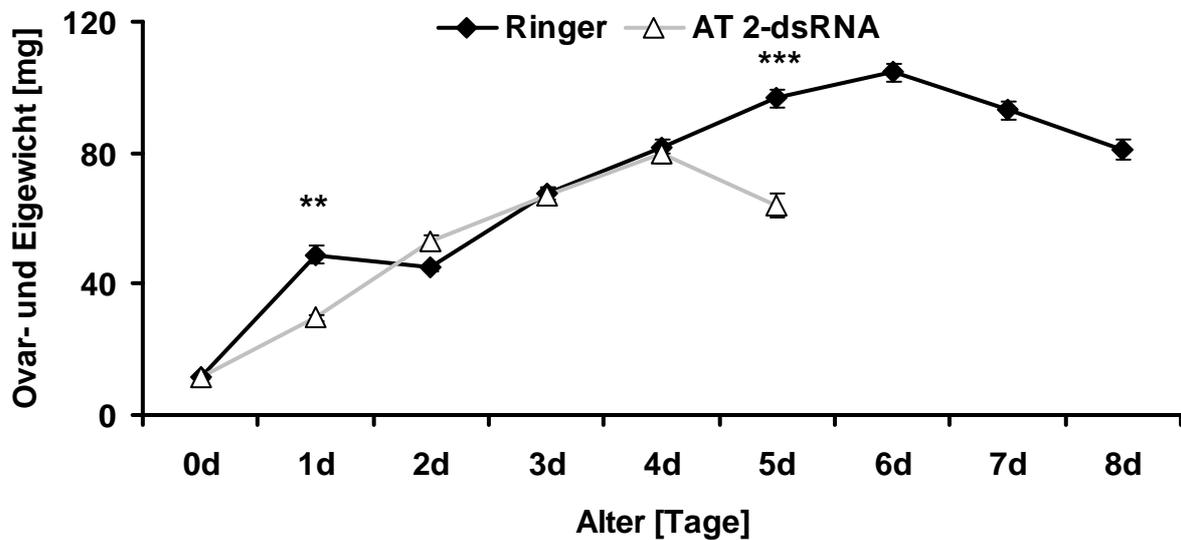


Abb. 29 Auswirkungen der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf die Gesamt-reproduktionsleistung von *S. frugiperda* Weibchen.

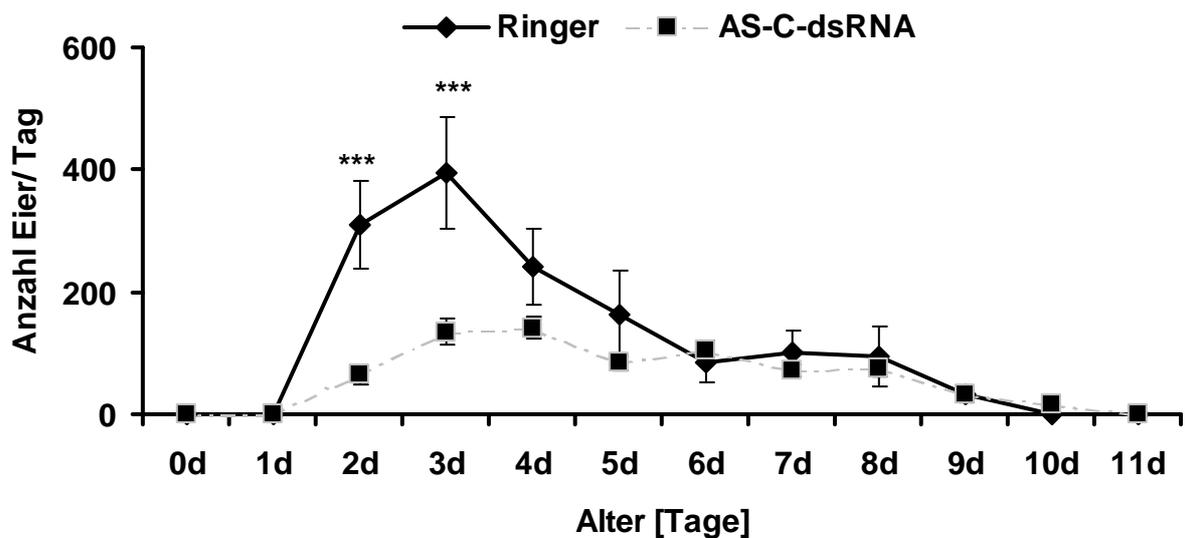
Die Injektion adulter Weibchen erfolgte mit 2 µl Noctuidenringer bzw. 1 µg AS-C- bzw. AT 2-dsRNA am Schlupftag und die Verpaarung der Weibchen mit jeweils einem Männchen. Darstellung der Reproduktionsleistung pro Weibchen als Summe von Ovargewicht und Gewicht der Eier pro Weibchen für den jeweiligen Beobachtungstag. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 5-25 (Ringer), n = 10-37 (AS-C-dsRNA), n = 5-37 (AT-dsRNA). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

Bei den mit Ringer injizierten Tieren stieg die Reproduktionsleistung bis zum 6. Tag auf $104,6 \pm 2,7$ mg an, während sie ab dem 7. Tag wieder abnahm. Am ersten Tag nach dem Schlupf war die Reproduktionsleistung der dsRNA injizierten Tiere mit $35,1 \pm 4,2$ bzw. $29,7 \pm 0,8$ mg niedriger als bei den Ringer injizierten Tieren mit $49 \pm 2,6$ mg. Bis zum 4. Tag unterschieden sich die Reproduktionsleistungen der mit dsRNA und Ringer injizierten Weibchen nicht voneinander. Erst ab dem fünften Tag war wieder eine signifikant niedrigere Reproduktionsleistung bei den dsRNA injizierten Tieren ($44,9 \pm 3,9$ mg bzw. $64,1 \pm 3,7$ mg) im Vergleich zu den mit Ringer injizierten Weibchen ($96,7 \pm 2,7$ mg) erkennbar.

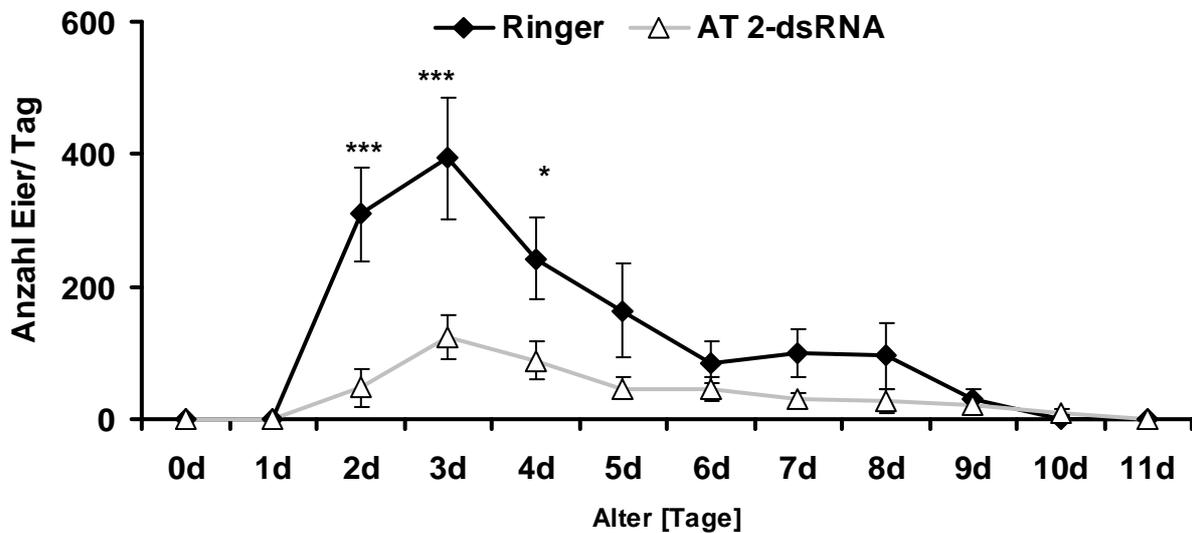
4.4.7 Effekte der RNA Interferenz mit dem AS-C und AT 2 Gen auf die Fertilität injizierter *Spodoptera frugiperda* Männchen

Auch die Fertilität der Männchen wurde untersucht. Hierzu wurden frisch geschlüpfte Männchen mit Noctuidenringer bzw. dsRNA injiziert und diese mit unbehandelten Weibchen verpaart. Die Injektion wurde erneut mit 2 μ l Ringer oder 1 μ g dsRNA in 2 μ l durchgeführt. Nach der Verpaarung wurde die Eiablage der Weibchen (Abb. 30) täglich bestimmt.

(A)



(B)



(C)

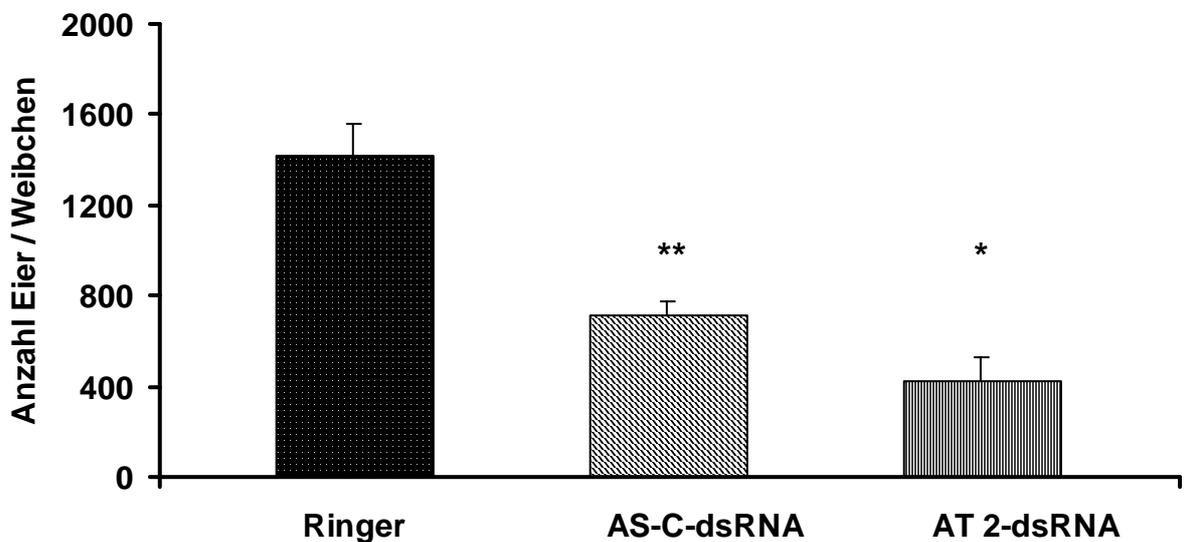


Abb. 30 Auswirkungen der Suppression der AS-C bzw. AT 2 Genexpression bei adulten *S. frugiperda* Männchen auf die Oviposition der mit diesen Männchen verpaarten Weibchen.

Injektion adulter Männchen mit Noctuidenringer, 1 µg AS-C-dsRNA (A) bzw. AT 2-dsRNA (B) in einem Injektionsvolumen von 2 µl unmittelbar nach der Imaginalhäutung. Verpaarung injizierter Männchen mit jeweils einem unbehandelten Weibchen. Eiablage der Weibchen pro Tag (A, B) und Gesamtanzahl der abgelegten Eier innerhalb von 11 Tagen (C). Mittelwerte ± Standardfehler, n = 12 (Ringer), n = 10 (AS-C-dsRNA), n = 10-12 (AT 2-dsRNA). (Student's test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

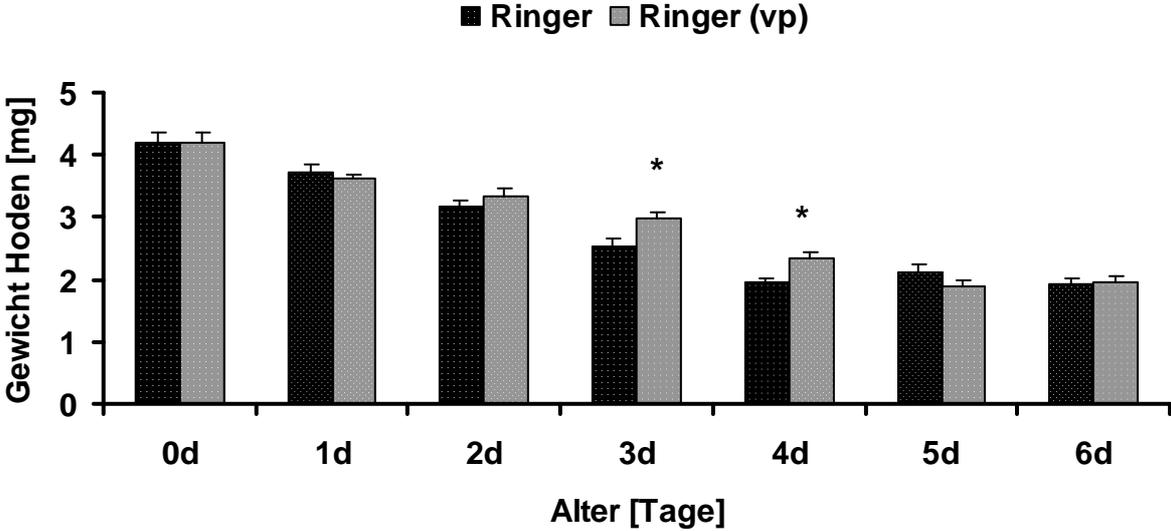
Auch in diesem Versuch legten die Weibchen ab dem zweiten Tag ab. Die Anzahl der täglich abgelegten Eier durch Weibchen, die mit dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren, lag während der Hauptphase der Eiablage deutlich niedriger als bei den Ringerkontrolltieren. Weibchen, die mit Ringer injizierten Männchen verpaart worden waren, legten schon an ihrem ersten Eiablagetag (Tag 2) mit $309,1 \pm 72,1$ Eier deutlich mehr Eier ab, als Weibchen, die sich mit AS-C-dsRNA (64 ± 14 Eier) bzw. AT 2-dsRNA (47 ± 28 Eier) injizierten Männchen verpaart hatten.

Das Maximum der Eiablage von mit Ringerkontrollmännchen verpaart Weibchen lag am dritten Tag bei $394,6 \pm 92$ Eiern während die Weibchen, die mit dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren am 3. Tag ihre maximale Anzahl von 135 ± 20 Eiern (AS-C-dsRNA) bzw. $123,7 \pm 32,4$ Eiern (AT 2-dsRNA) ablegten. Ab dem 6. Tag war die Eiablage in allen Gruppen auf einem niedrigen Niveau und wurde am 11. Tag beendet. Auch bei Betrachtung der Gesamtanzahl der abgelegten Eier (Abb. 30C) zeigte sich, dass die Injektion der Männchen mit dsRNA bzw. Ringer signifikant unterschiedliche Wirkungen hatte. Die Oviposition der Weibchen, die mit dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren, lag mit $710,6 \pm 59,9$ (AS-C-dsRNA) bzw. $439,8 \pm 94,1$ (AT 2-dsRNA) Eiern signifikant niedriger im Vergleich zu den Weibchen, die mit Kontrollmännchen verpaart worden waren ($1421,8 \pm 135,3$).

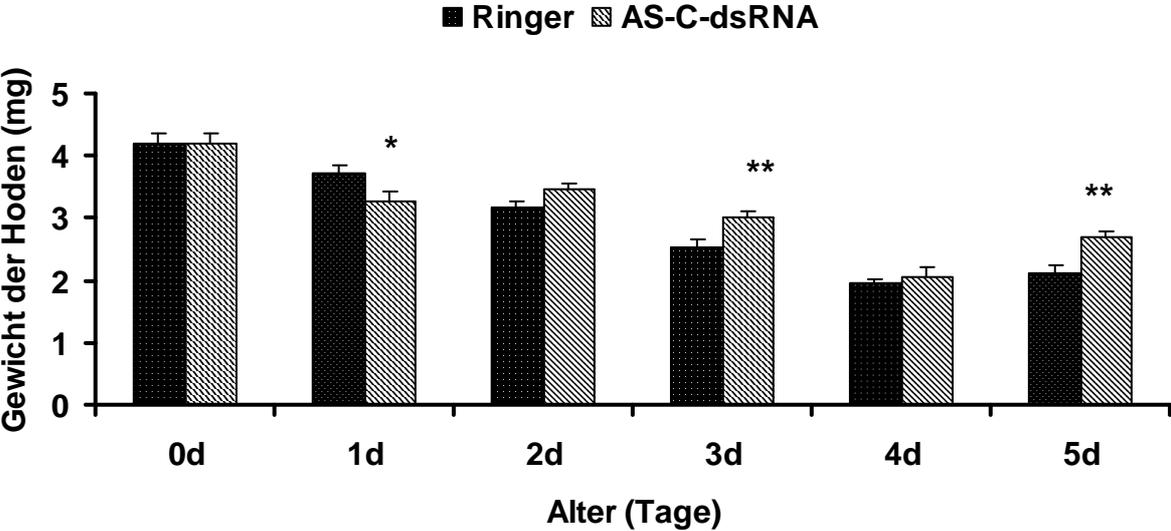
4.4.8 Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Hodengewicht von *Spodoptera frugiperda* Männchen

Die erniedrigte Eiablage der verpaarten Weibchen nach Injektion der Männchen mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA veranlasste eine Untersuchung der Entwicklung der Hoden bei behandelten Tieren. Dazu wurden den mit $2 \mu\text{l}$ Ringer bzw. $1 \mu\text{g}$ dsRNA injizierten Männchen verschiedenen Alters die Hoden entnommen und deren Gewicht erfasst (Abb. 31).

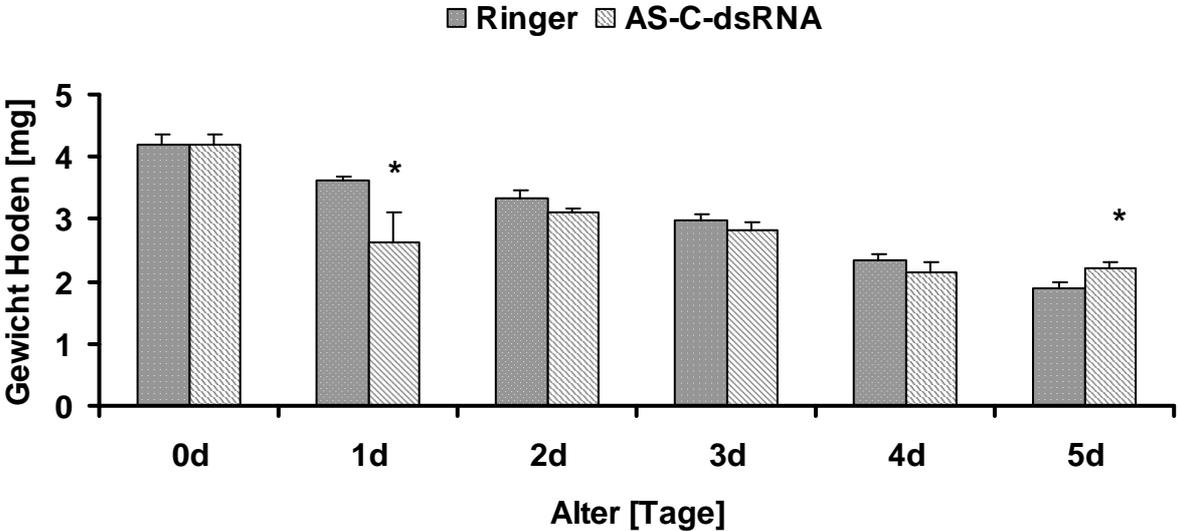
(A)



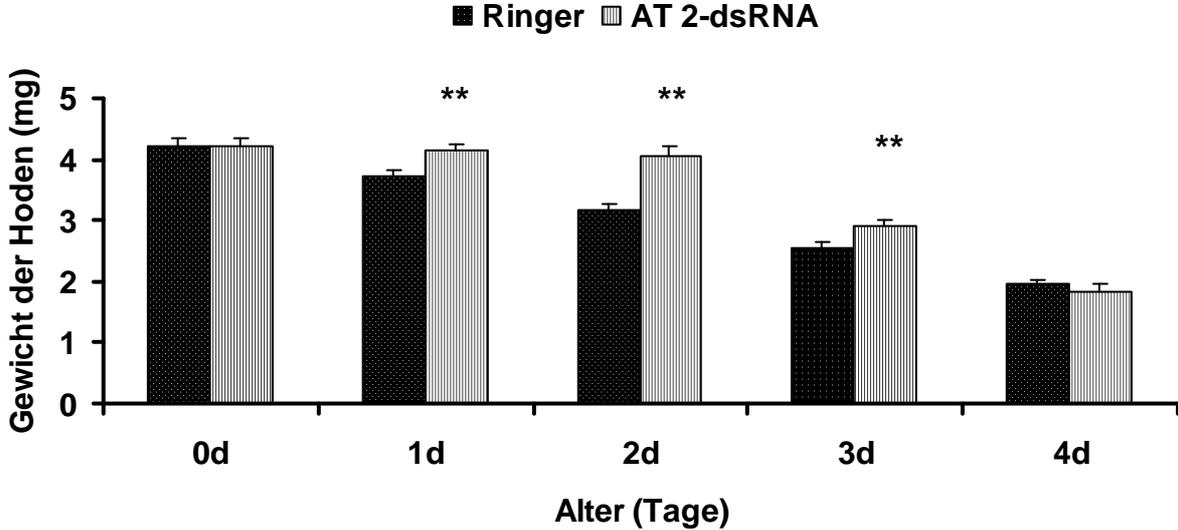
(B)



(C)



(D)



(E)

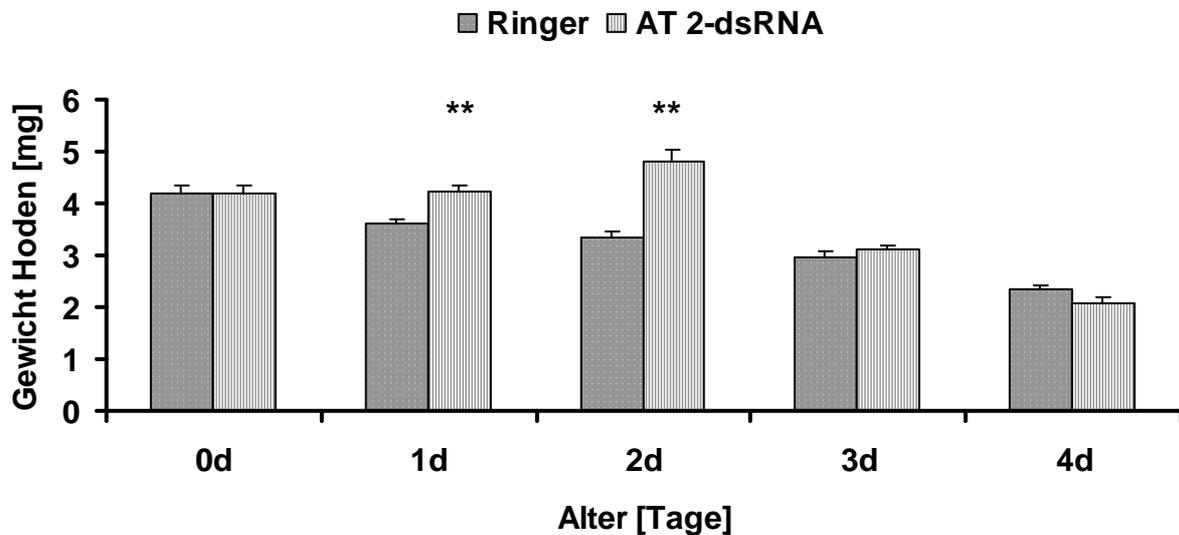


Abb. 31 Auswirkungen der AS-C-dsRNA bzw. AT 2-dsRNA Injektionen auf das Hodengewicht von unverpaarten und verpaarten *S. frugiperda* Männchen.

Adulte Männchen wurden mit Noctuidenringer bzw. 1 µg dsRNA in einem Injektionsvolumen von 2 µl am Schlupftag injiziert. In den Gruppen „verpaart“ wurden die Männchen mit einem unbehandelten Weibchen verpaart. Das Hodengewicht wurde an verschiedenen Tagen nach der Imaginalhäutung bestimmt. (A) Vergleich der Hodengewichte verpaarter und unverpaarter mit Ringer injizierter Tiere. (B) unverpaarte mit AS-C-dsRNA injizierte Männchen, (C) verpaarte mit AS-C-dsRNA injizierte Männchen, (D) unverpaarte mit AT 2-dsRNA injizierte Männchen und (E) verpaarte mit AT 2-dsRNA injizierte Männchen jeweils im Vergleich zur Ringerkontrolle. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10-20 (A), n = 12-20 (B), n = 12-20 (C), n = 10-25 (D). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Student's *t* test), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Um einen Überblick über Veränderungen des Hodengewichtes während der ersten 6 Tagen nach der Imaginalhäutung zu bekommen wurden zuerst Männchen, in die nach der Imaginalhäutung Kontrollringer injiziert worden war, betrachtet (Abb. 31A). Das Gewicht der Hoden nahm mit zunehmendem Alter stetig ab. Direkt nach der Imaginalhäutung wogen die Hoden $4,2 \pm 0,15$ mg und am sechsten Tag bei unverpaarten Tieren nur noch $1,9 \pm 0,07$ mg. Bei den verpaarten Männchen sank das Hodengewicht auf $1,5 \pm 0,1$ mg. Ab dem fünften Tag des Adultstadiums lagen die Hodengewichte der verpaarten Tiere etwas unter denjenigen der unverpaarten Männchen, wobei am sechsten Tag dieser Unterschied signifikant war. Auch bei den dsRNA injizierten Männchen war eine Abnahme des Hodengewichts über den Beobachtungszeitraum festzustellen. Bei den mit AS-C-dsRNA injizierten, unverpaarten Männchen war das Hodengewicht am 1.Tag signifikant erniedrigt, aber

tendenziell ab dem zweiten Tag im Vergleich zu den Ringer injizierten Männchen erhöht. Diese Erhöhung war am dritten Tag mit $3,0 \pm 0,1$ mg und am fünften Tag mit $2,7 \pm 0,1$ mg signifikant unterschiedlich im Vergleich zu $2,5 \pm 0,1$ mg und $2,1 \pm 0,1$ mg bei den jeweiligen Ringerkontrollen. Bei den AS-C-dsRNA injizierten verpaarten Männchen war der Gewichtsverlauf sehr ähnlich.

AT 2-dsRNA injizierte unverpaarte und verpaarte Männchen behielten ihr Hodengewicht in den ersten beiden Tagen nach der Injektion bei oder erhöhten es sogar. Die Hodengewichte nach dem Schlupf lagen bei $4,2 \pm 0,15$ mg. Ringer injizierte unverpaarte Tiere hatten am zweiten Tag nach der Injektion ein Hodengewicht von $3,1 \pm 0,1$ mg, während das Hodengewicht der AT 2-dsRNA injizierten Tiere mit $4,0 \pm 0,2$ mg signifikant erhöht war. Auch bei verpaarten, mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen war das Hodengewicht signifikant auf $4,8 \pm 0,2$ mg bis zum zweiten Tag erhöht. In den folgenden zwei Tagen nahm das Hodengewicht in allen Gruppen ab. Während bei den unverpaarten AT 2-dsRNA injizierten Tieren am 3. Tag der Hoden noch signifikant schwerer war als bei den Kontrollen, war dies bei verpaarten Männchen nicht der Fall. Ab dem 3. Tag verloren die mit AT 2-dsRNA injizierten Tiere erheblich an Hodengewicht und erreichten am 4. Tag einen vergleichbaren Wert wie die Ringerkontrollen. Bei mit Ringer injizierten unverpaarten Tieren war das Hodengewicht an diesen beiden Tagen um 40 % reduziert, bei mit AT 2-dsRNA injizierten unverpaarten Männchen dagegen um 55 %. Bei den verpaarten Tieren war der Unterschied sogar noch deutlicher. Die Ringer injizierten Männchen verloren etwa 30 % ihres Hodengewichtes und die mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen 57 %.

5 Diskussion

5.1 Molekulare Charakterisierung des B-Typ Allatostatin Gens von *Spodoptera frugiperda*

Die B-Typ Allatostatine zeigen die charakteristische Sequenz W(X₆)W-amide und wurden aus Insekten wie Heuschrecken, Grillen, Schaben, Fliegen und Schmetterlingen isoliert [Schoofs et al., 1991; Blackburn et al., 1995, 2001; Lorenz et al., 1995, 1999, 2000; Hua et al., 1999; Predel et al., 2001]. Die ersten B-Typ AS Peptide wurden aus der Heuschrecke *L. migratoria* identifiziert und als Locmi-MIP I und II (myoinhibitorisches Peptid) bezeichnet, da sie inhibitorisch auf den Enddarm und die Kontraktionen des Ovidukts *in vitro* wirkten [Schoofs et al., 1991, 1993]. Bei *G. bimaculatus* wurden B-Typ AS in verschiedenen Bereichen des Nervensystems nachgewiesen. Mit Hilfe von RT-*in situ*-PCR konnte ihre Expression unter anderem in allen drei Bereichen des Gehirns (Proto-, Deutero- und Tritocerebrum), im Unterschlundganglion, in allen Ventralganglien, sowie in endokrinen Zellen des Caecum und des Mitteldarmes detektiert werden [Wang et al., 2004 a, b]. Die erste cDNA Struktur wurde aus *D. melanogaster* beschrieben. Zudem konnte die Expression des B-Typ AS Prohormonprecursors mit Hilfe von Northern Blots in allen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* nachgewiesen werden, wobei diese in Embryonen nur schwach, aber in Larven stark ausgeprägt war. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung konnte die Expression in Neuronen des Gehirns, in den Abdominalganglien und in endokrinen Zellen des Darmes lokalisiert werden [Williamson et al., 2001]. Die cDNA Strukturen wurden von *G. bimaculatus* [Wang et al., 2004 a], *D. melanogaster* [Williamson et al., 2001] und *B. mori* [Tanaka & Hua, 2001], und vor kurzem auch von *A. mellifera* [Christie et al., 2008] sowie vom Genom von *T. castaneum* identifiziert. Außerdem wurden die Peptide bei *Tenebrio molitor* mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie [Weaver & Audsley, 2008] beschrieben.

Bei Lepidopteren wurden B-Typ AS Peptide (MIP, PTSP) aus dem Gehirn- und Gangliengewebe isoliert [Blackburn et al., 1995; Hua et al., 1999]. In allen bekannten Fällen sind mehrere mögliche B-Typ Peptide auf einem Prohormonprecursor codiert. Zur Charakterisierung des B-Typ Allatostatin Gens bei

S. frugiperda wurden viele unterschiedliche degenerierte Oligonucleotidprimer, die verschiedene homologe Bereiche der bekannten Peptidsequenzen abdeckten, abgeleitet. Als Template der PCR diente eine cDNA library aus der mRNA der Gehirne von 1-3 d alten adulten *S. frugiperda* und auch genomische DNA. Unterschiedliche Kombinationen von degenerierten Primern in Kombination mit Vektorprimern und auch mehrere degenerierte Primer gleichzeitig wurden in verschiedenen Testsystemen mit variierenden Bedingungen eingesetzt. Alle ausgewählten Primer schienen vielfältige Homologien zu Bereichen der cDNA library zu haben, was zu unspezifischen Nebenreaktionen führte. Selbst bei der Anwendung von Annealingtemperaturen bis zu 70°C liessen sich keine spezifischen Sequenzen herausfiltern. Zwar konnten mehrere Fragmente isoliert werden, aber nach der Sequenzanalyse stellten sie sich als unspezifisch heraus.

Da B-Typ AS (MIP, PTSP) auch aus dem Gehirn- und Gangliengewebe von Lepidopteren isoliert [Blackburn et al., 1995; Hua et al., 1999] werden konnten, wurde in dieser Arbeit auch polyA⁺ RNA aus den entsprechenden Geweben adulter und larvaler *S. frugiperda* isoliert und als Ausgangsmaterial für die 5` und 3` RACE Methode (SMART RACE Kit , Clontech) verwendet. Weiterhin wurde ein One-Step Titanium RT-PCR Kit (Clontech) und Two-Step RT-PCR unter Verwendung der PowerScript Reverse Transkriptase (Clontech) und dem BD Advantage two Polymerase Mix (Clontech) zur Herstellung von DNA Fragmenten mit Primerkombinationen der degenerierten Oligonucleotide eingesetzt. Vermutlich sind in der cDNA repetitive B-Typ Sequenzen vorhanden, die stark homolog und GC-reich sind, was die Amplifikation der PCR Fragmente erschwert. Alle diese Bemühungen und die Variation der Methoden führten zu keiner spezifischen Sequenz.

Auch PCR Screenings der cDNA Bank aus *S. frugiperda* mit Primergruppen, die ausschließlich aus den bekannten Peptidstrukturen von Lepidopteren (*B. mori*, *M. sexta*) (s. Tabelle 1 in 1.2.4) abgeleitet wurden und geringe Degeneration aufwiesen, wurden erfolglos durchgeführt. Ein Alignment der Nukleinsäuresequenz von *G. bimaculatus* und *B. mori* zeigte in einem Bereich, der für die B-Typ Allatostatin Peptide kodiert, eine Sequenz von 190 bp mit einer Identität der Basen von 72 %. In einem letzten Versuch zur Klärung der Struktur wurde von diesem Bereich der cDNA des B-Typ Allatostatins aus *G. bimaculatus* eine Digoxigenin markierte Sonde abgeleitet und zum Screenen der cDNA Library aus *S. frugiperda* Gehirnen verwendet. Leider führten auch diese Versuche nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

5.2 Immunolokalisation von B-Typ Allatostatin Peptiden bei *Spodoptera frugiperda*

Bei immunhistochemischen Untersuchungen konnten B-Typ AS Peptide im Gehirn/Retrocerebralkomplex, in der ventralen Nervenketten, in Nervenfasern, welche die Muskeln des Herzens, des Ovidukts und des Hinterdarms innervieren, in den Speicheldrüsen und auch in Ovarien nachgewiesen werden [Schoofs et al., 1996; Predel et al., 2001; Witek et al., 1999 & 2001; Davis et al., 2003]. Bei *L. migratoria* und *P. americana* konnten B-Typ AS Peptide in neurosekretorischen Zellen des Gehirns mit Verbindungen zu den CC und CA nachgewiesen werden, die auf allatostate Aktivität hindeuten [Schoofs et al., 1996; Predel et al., 2001]. Hingegen konnten B-Typ AS Peptide bei den Lepidopteren *B. mori* und *M. sexta* zwar in Neuronen des Gehirns, aber nicht in Verbindungen des retrocerebralen Komplexes detektiert werden [Davis et al., 2003].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass B-Typ Allatostatine weit verbreitet in verschiedenen Geweben der bisher untersuchten Insekten zu finden sind. Um die Lokalisation dieser Peptide bei *S. frugiperda* zu bestimmen, und damit auch einen Hinweis auf die möglichen Orte der Expression des Hormonprecursors zu bekommen, wurden immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers durchgeführt, der zum Nachweis des B1 Allatostatins aus *G. bimaculatus* [Witek et al., 2001] hergestellt worden war. Grybi-AS B1 (GWQDLNSAW-NH₂) weist hohe Homologie zu einigen Peptiden auf, die aus Lepidopteren isoliert wurden bzw. deren Sequenzen aus der cDNA abgeleitet wurden, wie z.B. zu dem myoinhibitorischen Peptid aus *M. sexta* (MIP2; GWQDLNSAW-NH₂) oder zu den prothoracicostaten Peptiden (PTSP1 und 3; GWQDLNSAW-NH₂, AWGDLNSAW-NH₂) aus *B. mori*, so dass Kreuzreaktivitäten mit den potentiellen analogen B-Typ Allatostatinen aus *S. frugiperda* im immunhistochemischen Experiment wahrscheinlich sind. In einem Kontrollexperiment mit dem MIP aus *L. migratoria* (AWQDLNAGW-NH₂) wurde eine Kreuzreaktivität von 7 % mit dem kompetitiven ELISA bestimmt [Witek et al., 1999]. Immunhistochemisch wurde mit diesem Antikörper eine Kreuzreaktivität mit Grb-AKH (pQVNFSTGW-NH₂) von 1 % festgestellt. In Gehirnen von adulten *S. frugiperda* Weibchen trat eine

deutliche Immunfärbung in den medianen neuroendokrinen Zellen des Protocerebrums, im oberen Bereich des Zentralkörpers und in den Antennalloben (Glomeruli) auf. Vergleichbare Färbungen wurden auch bei anderen Insekten gefunden [Davis et al., 2003; Veenstra et al., 1995; Schoofs et al., 1996; Blackburn et al., 1995, 2001; Predel et al., 2001; Kim et al., 2000]. Bei *M. sexta* inhibiert Manse-MIP die Kontraktionen des Enddarm [Blackburn et al., 1995]. Deshalb wird vermutet, dass das Ziel von MIP, welches aus medianen endokrinen Zellen des Gehirns freigesetzt wird, eventuell der Enddarm ist [Davis et al., 2003]. Zudem könnten Färbungen in den endokrinen Zellen im Gehirn auf neuroregulatorische Funktionen hinweisen. Eventuell könnte eine Funktion die Hemmung der JH-Biosynthese in den CA sein, oder auch die direkte Freisetzung von JH aus den CC in die Hämolymphe. Bei *L. migratoria* inhibiert das Lom-MIP die durch eine Erhöhung des cAMP Spiegels induzierte Freisetzung des adipokinetischen Hormons (AKH) [Schoofs et al., 1996; Vullings et al., 1999].

In den Thorakal- und Abdominalganglien von Larven des letzten Larvenstadiums führte die Immunreaktivität zu einer intensiven Färbung im Bereich des Neuropils und zu einer schwächeren Immunreaktion im Bereich der lateral gelegenen neuroendokrinen Zellen. Diese Färbungen der Ganglien zusätzlich zu den Färbungen im Gehirn verstärken die Vermutung, dass die B-Typ AS Peptide myoregulatorisch bzw. neuromodulatorisch auf mit ihnen über Neuronen verbundene Gewebe wirken könnten. Mit Hilfe der Immunlokalisation bei larvalen abdominalen Ganglien von *M. sexta* und *B. mori* konnte darüber hinaus eine mögliche Funktion von MIP bei der Ecdysis aufgezeigt werden [Ewer et al., 1998; Davis et al., 2003; Gammie & Truman, 1997].

Starke Färbung war auch in den Malpighischen Gefäßen sichtbar, die wahrscheinlich der apikalen Membran zwischen den Hauptzellen zuzuordnen ist. Immunlokalisationsstudien lassen auf Funktionen der AS-C Peptide bei *L. oleracea* [Audsley et al., 1998] in den Malpighischen Gefäßen schließen. Die Expression des AS-A Rezeptors in den Malpighischen Gefäßen von *D. melanogaster* weist auf eine Funktion als anti-diuretisches Hormon hin, das direkt an den Malpighischen Gefäßen wirkt [Veenstra et al., 2008]. Über eine mögliche Funktion von B-Typ Allatostatinen auf die Malpighischen Gefäße von *Spodoptera* ist bisher nichts bekannt.

Starke Färbungen im Darm weisen auf myotrope Funktionen hin. Das erste B-Typ AS (MIP) Peptid wurde aus *L. migratoria* isoliert und wirkte inhibitorisch auf die Kontraktionen des Enddarms von *L. maderae*. Zudem inhibierte es die Kontraktionen des Enddarms und des Ovidukts von *L. migratoria* [Schoofs et al. 1991]. Auch bei Lepidopteren zeigte sich eine inhibitorische Wirkung auf die Kontraktionen des Enddarms [Blackburn et al., 1995, 2001]. Bei *D. melanogaster* [Veenstra et al., 2008] wurden A-Typ AS und B-Typ AS immunreaktive endokrine Zellen im Bereich des Mitteldarms gefunden, in dem auch Axone von Neuronen der thorakalen und abdominalen Ganglien detektiert wurden [Yoon & Stay, 1995].

B-Typ AS Rezeptoren wurden im Gehirn, im Mitteldarm, in Malpighischen Gefäßen und in Ganglien von *D. melanogaster* nachgewiesen [Veenstra et al., 2008], was darauf hindeutet, dass B-Typ AS Peptide in all diesen Geweben aktiv sind.

Die Lokalisation in den Hoden von Larven des vorletzten Larvenstadiums in dieser Arbeit weist auf weitere Bioaktivitäten hin und unterstreicht die pleiotrope Rolle der Allatostatine allgemein. Die Hoden der Lepidopteren *H. virescens*, *Lymantria dispar* [Loeb et al., 1982, 1988], *Ostrinia nubilalis* [Gelman et al., 1989], *Mamestra brassicae* [Shimizu et al., 1985], *Leucania separata* [Shimizu et al., 1989], und *S. littoralis* [Jarvis et al., 1994] synthetisieren Ecdysteroide am Ende des letzten Larvenstadiums und während der Entwicklung der Puppe. Wenn in larvalen Hoden der Ecdysteroidtiter niedrig bleibt, fusionieren diese nicht. Das bedeutet das die Fusion der larvalen Hoden sensitiv auf den Ecdysteroidtiter reagiert [Nowock, 1972, 1973]. Über einen Zusammenhang zwischen Häutungshormonsynthese und Allatostatinen in den Hoden von *Spodoptera* kann aber nur spekuliert werden.

Im Fettkörper wurde keine Färbung festgestellt, was die Spezifität der Immunfärbung unterstreicht, da an dieser Stelle eine Kreuzreaktion mit AKH wahrscheinlich gewesen wäre.

5.3 Vorteile der RNA-Interferenz bei der Aufklärung von Funktionen allatoregulierender Neuropeptide

Zur Aufklärung der Funktionen allatoregulierender Neuropeptide wurden bereits *in vitro* und *in vivo* Bioaktivitätstests durchgeführt. Jedoch gibt es einige Probleme bei Peptidinjektionen *in vivo*. Die Peptide in der Hämolymphe werden sehr schnell abgebaut, was wiederholte Injektionen erfordert, um erhöhte Hämolymphtiter zu erreichen [Woodhead et al. 1993; Weaver et al. 1995; Girardie et al., 1996; Garside et al., 1997 a, b; Lorenz et al., 1998; Oeh et al., 2000; Peralta et al., 2000]. Eine mögliche Lösung des Problems scheint die Ausschaltung spezifischer Gene *in vivo* zu sein. Mit Hilfe der RNA Interferenz (RNAi) gelingt die spezifische Suppression der Genexpression sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten [Fire et al., 1998; Elbashire et al., 2001; Meister & Tuschl, 2004; Mello & Conte, 2004, Maestro & Belles, 2006].

Der Mechanismus der RNA Interferenz beruht auf der Tatsache, dass doppelsträngige RNA sequenzspezifisch durch die Degradation ihrer korrespondierenden mRNA die Expression des homologen Gens verhindert. Dazu wird eine dsRNA vom Zielgen abgeleitet und durch Injektionen [Cavener, 1987; Lam & Thummel, 2000; Nishikawa & Natori, 2001; Dzitoyeva et al., 2001; Rajagopal et al., 2002; Aljamali et al., 2003; Amdam et al., 2003; Goto et al., 2003; Tabunoki et al., 2004; Tanaka & Suzuki, 2005; Meyering-Vos et al., 2006] oder, wie erst in wenigen Fällen gezeigt, durch Fütterung in den Organismus eingebracht [Soares et al., 2005; Araujo et al., 2006; Turner et al., 2006; Meyering-Vos & Müller, 2007; Griebler et al., 2008; Zhou et al., 2008]. Dabei ist es von Vorteil, dass bei Invertebraten im Gegensatz zu Vertebraten lange dsRNA-Fragmente eingesetzt werden können, die die Spezifität erhöhen. Die Suppression der Expression ist in der Regel nicht vollständig, was auf den posttranskriptionellen Mechanismus der RNA Interferenz zurückzuführen ist [Montgomery et al., 1998]. Die Peptid- oder Proteinproduktion kann dennoch mehr oder weniger vollständig reduziert sein [Zeng et al., 2003].

5.3.1 Real-time PCR und Southern Blot

Es wurden zwei Methoden verwendet, um die Expression zu bestimmen. Zuerst wurden semiquantitative Analysen mit Hilfe von One-Step bzw. Two-Step RT PCR mit anschließendem Southern Blot durchgeführt, gefolgt von Hybridisierung und Immuno-Farbdetektion. Später folgten Analysen mit der Real-time PCR.

Die in der Real-time PCR aufgezeichneten Expressionsdaten wurden mit verschiedenen Methoden zum Vergleich ausgewertet. Die Real-time RT-PCR hat den Vorteil, dass sie über eine Standardkurve eine absolute Quantifizierung erlaubt. In der Regel sollte eine Normalisierung mit einem internen Standard durchgeführt werden. Diese unveränderliche interne Kontrolle kann die Zuverlässigkeit der relativen RT-PCR erhöhen, indem es Unterschiede von Probe zu Probe aufgrund der RT-PCR Effizienz und Fehler in der Quantifizierung ausgleicht. Dies ist besonders wichtig, wenn man Proben von verschiedenen Individuen, verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeiten vergleicht. Mögliche Fehler bei der Bewertung der Expression, die durch einen Abbau der RNA, durch falsche Konzentrationsbestimmung oder Pipettierungenauigkeiten entstehen können, werden durch Normalisierung der Daten mit der Expression des Standardgens ausgeglichen.

Generell kann die Normalisierung entweder gegen ein endogenes nicht reguliertes Referenzgen oder gegen die gesamte zelluläre DNA bzw. RNA ausgeführt werden. Um die absolute Quantifizierung mit einem Referenzgen zu normalisieren, müssen alle PCR Reaktionen auch für die endogene Kontrolle durchgeführt werden und die relative Häufigkeit für die interne Kontrolle und das Zielgen bestimmt werden. Bei jedem Zielgen wird der Wert der relativen Häufigkeit durch den Wert geteilt, den man von der Kontrolle desselben Zielgens erhalten hat. Die Schwierigkeit besteht in der Entscheidung, welches Gen als endogene Kontrolle verwendet werden soll. Dabei sollte beachtet werden, dass die mRNA Synthese des Gens in den verschiedenen Geweben unter den experimentellen Bedingungen stabil ist. Außerdem sollte die endogene Kontrolle in etwa den gleichen Cp haben wie das Zielgen. Wird die Normalisierung mit z. B. β -Aktin nicht angewendet, sind deshalb Messgenauigkeit am Fotometer sowie exaktes Pipettieren wichtig, um zuverlässige Daten zu erhalten und Unregelmäßigkeiten zwischen den einzelnen RNA-Proben zu vermeiden. Da diese

Fehlerquellen schwer auszuschließen sind, sind Messungen ohne Normalisierung nicht zu empfehlen.

Die Real-time-Daten erlaubten zudem einen Vergleich verschiedener Auswertungsmethoden, und zwar zwischen der relativen Quantifizierung mittels einer Standardkurve und der relativen Quantifizierung mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Bei allen in dieser Arbeit verglichenen Versuchen war die mit verschiedenen Methoden bestimmte relative Expression annähernd gleich. Für die Genexpressionsanalysen wurde schließlich die Quantifizierung anhand einer genspezifischen Standardkurve gewählt, wobei die Werte relativ zu einem Kalibrator (meistens Ringer injizierte Tiere), der als Vergleichsprobe dient, dargestellt wurden. Eine Anwendung der Standardkurve erlaubt darüber hinaus noch eine absolute Quantifizierung der mRNA Menge.

Zusammenfassend kann festhalten werden, dass sowohl die Methode des Southern Blots als auch die Methode der Real-time PCR sehr zuverlässige Ergebnisse bringt, wenn man dabei die für die jeweilige Methode unverzichtbaren Kontrollen durchführt und sich innerhalb der Grenzen, die für jede Methode charakteristisch sind, bewegt.

5.3.2 Hemmung der Genexpression

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Berichte über erfolgreiche Unterdrückung verschiedener Gene bei Lepidopteren und anderen Insekten mittels RNAi [Dzitoyeva et al., 2001; Rajagopal et al., 2002; Amdam et al., 2003; Gvakharia et al., 2003; Farooqui et al., 2004; Dong & Friedrich, 2005; Tanaka & Suzuki, 2005; Cruz et al., 2006; Maestro & Bellés, 2006; Martín et al., 2006]. Bei den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass nach der Injektion der AS-C- bzw. AT 2-dsRNA in Larven und Adulte von *S. frugiperda* die Ziel-mRNA sichtbar reduziert wurde und dieser Effekt mehrere Tage anhielt. Eine einzelne abdominale Injektion der dsRNA löste die Reduktion der AS-C und AT 2 Genexpression nach ca. 48 Stunden im Gehirn und Darm der Larven, sowie im Gehirn der Adulten aus. Das lässt darauf schließen, dass der Effekt der RNA Interferenz bei *S. frugiperda* nicht lokal begrenzt ist. Die Spezifität der Methode und die Verbreitung des RNAi-Effekts über verschiedene Gewebe von *S. frugiperda* konnte auch bei Genexpressionsstudien mit dem AS-A Typ Gen gezeigt werden [Meyering-Vos et al., 2006]; auch hier gab es

eine effektive systemische Suppression, ebenso wie bei *S. litura* [Rajagopal et al., 2002]. Die hohe Sequenzspezifität der RNA Interferenz wurde auch bei anderen Insekten gezeigt [Yang et al., 2000; Meyering-Vos & Müller, 2007 b]. Die Dauer des Effektes der RNA Interferenz wurde ebenfalls schon untersucht. Amdam et al. (2003) zeigten bei *A. mellifera* mit Hilfe von Northern Blots, dass der Effekt der RNA Interferenz bis zu 15 Tage anhalten kann. Auch bei anderen Insekten, behandelt im larvalen oder adulten Stadium, konnte ein langanhaltender Effekt der RNA Interferenz beobachtet werden [Goto et al., 2003; Amdam et al., 2003; Meyering-Vos et al., 2006].

Bei *S. frugiperda* Larven konnte der RNA Interferenz-Effekt auch durch das Fressen der dsRNA ausgelöst werden, was zur Reduktion des Transkriptniveaus im Gehirn der Tiere führte, vergleichbar mit dem nach Injektion von dsRNA. Die Hemmung der Genexpression durch das Fressen von dsRNA wurde auch bei *Epiphyas postvittana* [Turner et al., 2006], *Rhodnius prolixus* [Araujo et al., 2006], *Ixodes scapularis* [Soares et al., 2005] und *G. bimaculatus* [Meyering-Vos & Müller, 2007 b], sowie bei *Reticulitermes flavipes* [Zhou et al., 2008] beobachtet.

Insgesamt war zu sehen, dass die Effizienz der RNA-Interferenz bei Larven meistens höher als bei adulten Tieren war. Auch die beiden Transkripte, AS-C Typ und AT 2, unterschieden sich in ihrer Effizienz, was auf eine sequenzspezifische Unterdrückung hinweist. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt, sondern wurde z.B. auch bei *D. melanogaster* [Goto et al., 2003] festgestellt.

Der Mechanismus der RNA-Interferenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb ist es wichtig, unspezifische Nebeneffekte infolge der RNA-Interferenz auszuschließen. Daher wurden Kontrolltiere mit einer artfremden dsRNA, nämlich mit der Teilsequenz des Sulfakinin (SK)-Gens aus *G. bimaculatus* injiziert, was keine Auswirkung auf die AS-C Expression hatte. Die Spezifität der RNA Interferenz konnte damit bestätigt werden und wurde auch dadurch sichtbar, dass die β -Aktin Expression nicht beeinflusst wurde. Aus nicht geklärten Gründen ist festzustellen, dass sich das RNA-Interferenz-System nicht auf alle Gewebe gleichermaßen auswirkt [Meyering-Vos et al, 2006]. Bei den Expressionsanalysen war immer eine Restexpression vorhanden, was bedeutet, dass dieser posttranskriptionelle Prozess nicht vollständig war [Montgomery, 1998]. Dies wurde auch nach dsRNA Behandlung bei vielen anderen Insekten wie z. B. bei adulten *D. melanogaster* [Goto et al., 2003],

diversen Lepidopteren und *A. mellifera* [Gvakharia et al., 2003; Karim et al., 2004; Farooqui et al., 2004] beobachtet.

Aufgrund einer inhibierten Translation könnte eine stärkere Reduktion der Peptidsynthese vorhanden sein als es die Ergebnisse zur Unterdrückung der mRNA Expression vermuten lassen. Eine Studie von [Zeng et al., 2003] zeigte, dass synthetische siRNAs die mRNA Funktion ohne eine detektierbare mRNA-Spaltung oder eine Reduktion der mRNA Expression inhibieren. Dabei wurden Fehlpaarungen zwischen siRNA und Ziel-mRNA beobachtet, die eventuell zu einer Blockade des RISC führen, da die Ziel-mRNA aus dem RISC nicht mehr freigesetzt werden kann. Die ansteigende RNA-Menge könnte somit zur Blockade der Translation führen.

Einen Beweis für die Reduktion des Peptides kann letztendlich nur die Quantifizierung des Peptides mittels spezifischer Antikörper liefern [Maestro & Belles, 2006]. Allerdings macht eine Reduktion der mRNA eine Verminderung der Peptide wahrscheinlich, da diese aus der mRNA gebildet werden.

5.3.3 Entdeckung, Expression und bekannte Funktionen von AS-C Peptiden

Allatostatine sind strukturell unterschiedliche Peptide, die ursprünglich als Inhibitoren der JH-Biosynthese in den CA bei Insekten entdeckt wurden [Bendena et al., 1999; Gäde et al., 1997, 2002; Weaver et al., 1998; Hoffmann et al., 1999; Stay, 2000]. Die Einteilung in drei Peptidfamilien entstand aufgrund struktureller Homologien in A-Typ (FGL-Typ), B-Typ [W(X)₆W-Typ] und C-Typ (PISCF-Typ).

Das nicht amidierete Allatostatin C-Typ mit dem C-terminalen Motiv PISCF-OH wurde als erstes aus Köpfen von adulten *M. sexta* isoliert und durch die inhibitorische Wirkung auf die JH-Biosynthese *in vitro* charakterisiert [Kramer et al., 1991]. Auch aus anderen Lepidopteren, wie *L. oleracea* und *S. littoralis*, konnten nahezu identische Peptide isoliert werden [Audsley & Weaver, 2003 b; Audsley et al., 2005]. Mit Hilfe von cDNA Banken konnten weitere AS-C Typ Präprohormone von *P. unipuncta* [Jansons et al., 1996] und *S. cynthia ricini* [Sheng et al., 2007] abgeleitet werden. Außerdem konnte bei *S. frugiperda* ein AS-C-Typ Gen kloniert werden, dessen abgeleitete Peptidsequenz mit der des Manse-AS-C Typ identisch ist [Abdel-latif et al., 2003].

Lange Zeit wurde angenommen, dass AS-C Peptide auf Lepidopteren beschränkt sind, da es zunächst nur bei adulten Weibchen [Kramer et al., 1991; Jansons et al., 1996; Audsley et al., 1999] und Larven [Kramer et al., 1991; Li et al., 2004] von Lepidopteren gefunden wurde und keine inhibierende Wirkung auf die JH-Biosynthese der CA *in vitro* bei Käfern, Schaben und Heuschrecken zeigte [Kramer et al., 1991]. Widerlegt wurde diese Annahme mit der Entdeckung eines AS-C Präprohormons bei *D. melanogaster* [Williamson et al., 2001 b; Price et al., 2002] und *A. gambiae*, beide abgeleitet vom Genom [Riehle et al., 2002]. Das Manse-AS C-Typ Peptid wirkte zudem hemmend auf die JH-Biosynthese in den CA von *A. aegypti* [Li et al., 2004, 2006]. Vor kurzem wurde ein AS-C Peptid auch bei *T. castaneum* und *T. melitor* (Coleoptera) nachgewiesen [Weaver & Audsley, 2008]. Bei *L. oleracea* konnte mit Hilfe eines Manse-AS Antiserums ein AS-C Peptid im Gehirn und Retrocerebralkomplex nachgewiesen werden, wobei reaktive Neuronen zu den CA zogen. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass Manse-AS eine inhibierende Wirkung auf die JH-Biosynthese in den CA der Larven und Adulten von *L. oleracea* hat [Audsley et al., 1999 a, b, 2000].

Viele Expressionsstudien zeigten Transkripte von AS-C im Gehirn von verschiedenen Lepidopteren [Audsley et al., 1998; Truesdell et al., 2000; Abdel-latif et al., 2004 a; Berg et al., 2006; Nässel & Homberg, 2006]. Bei *D. melanogaster* wurde ebenfalls eine Expression im Gehirn und ZNS detektiert [Williamson et al., 2001 b; Merte & Nichols, 2002; Price et al., 2002]. Immunolokalisationsstudien lassen auf Funktionen der AS-C Peptide bei *L. oleracea* [Audsley et al., 1998] in den Malpighischen Gefäßen schließen.

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass synthetisches Manse-AS die JH-Biosynthese der CA von adulten Weibchen von *S. frugiperda* hemmt, nachdem diese vorher durch Manse-AT angeregt worden waren [Oeh et al., 2000]. Dieser inhibitorische Effekt von Manse-AS auf die durch AT aktivierten Drüsen ist dosisabhängig und reversibel. Solch ein dualer regulierender Mechanismus erlaubt eine genauere Kontrolle der Hormonproduktion als ein einzelner „on-off“ Mechanismus [McNeil & Tobe, 2001]. Injektionen von Manse-AT und Manse-AS in adulte Weibchen von *S. frugiperda* führten zu einem verkürzten Leben und verringerter Eiablage (nicht bei Manse-AS allein) [Oeh et al., 2001]. Die Ergebnisse deuten auf komplexe Funktionen von beiden Hormonen bei der adulten Entwicklung und Reproduktion von *S. frugiperda* hin.

5.3.4 Auswirkung der Gensuppression auf die Körpergewichtszunahme bei Larven

Die Expressionsanalysen zeigten, dass die AS-C- bzw. AT 2-mRNA sowohl nach Injektion der dsRNA, als auch nach Fressen der dsRNA reduziert war. Larven im letzten Larvalstadium stellen ihre Nahrungsaufnahme bei einem hohen Titer an Ecdysteroiden und niedrigen Konzentrationen von JH ein, was zur Häutung und Verpuppung führt [Sehnal, 1989]. Allerdings gibt es ein so genanntes kritisches Gewicht, das die Larven erreichen müssen, um zur Verpuppung zu gelangen [Nijhout & Williams, 1974]. Konstantes oder abnehmendes Gewicht bei Larven des letzten Larvenstadiums dient als Indikator für die Häutung oder den Beginn der Präpuppenphase. Die Abwesenheit von JH am Beginn des letzten Larvenstadiums induziert die Verpuppung; diese Metamorphose führt zu einem Wechsel des genetischen Entwicklungsprogramms.

Der Transkriptionsfaktor *broad* wurde zuerst bei *D. melanogaster* als wichtiger Faktor für die Transformation vom Larven zum Puppenstadium entdeckt [Kiss et al., 1978; Bayer et al., 1996]. Die ectopische Expression von *broad* kann bei einer Larvalhäutung zur Ausbildung von Puppenmerkmalen führen [Zhou & Riddiford, 2002]. Bei *M. sexta* erscheint der *broad* Transkriptionsfaktor in der Epidermis von Larven des letzten Larvenstadiums, um die Bildung der Puppenkutikula einzuleiten [Truman & Riddiford, 2007]. Die Expression von *broad* wird durch JH in physiologischen Konzentrationen verhindert [Zhou et al., 1998].

Eine Reduktion der AS-C und AT 2 Expression resultierte in erhöhten JH I-, JH II- und JH III-Titern während der ersten zwei Tage des letzten Larvenstadiums von *S. frugiperda*, am dritten Tag nahm der JH Titer dann wieder ab. Der für zwei Tage erhöhte JH-Titer könnte erklären, warum das letzte Larvenstadium von *S. frugiperda* nach der Injektion von dsRNA um zwei Tage verlängert wurde, wenn man davon ausgeht, dass auch bei *S. frugiperda* der *broad* Transkriptionsfaktor in der gleichen Weise wie bei *M. sexta* reguliert wird. Eine Verabreichung von JH oder JH-Analogen während des letzten Larvenstadiums von *P. apterus* führte zu zusätzlichen Larvalhäutungen [Slama & Williams, 1966], wogegen bei *S. littoralis* diese Behandlung zu einer Verlängerung des letzten Larvenstadiums [Cymborowski & Stolarz, 1979] führte. Auch bei den Überlebenden, mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA

injizierten *S. frugiperda* Larven führte der erhöhte JH-Titer zu einer Verzögerung beim Eintritt in das Präpuppen- und Puppenstadium. Somit stimmt diese Beobachtung mit der Wirkung des applizierten JH bei *S. littoralis* überein.

Ein Ausbleiben von zusätzlichen Larvalhäutungen läßt sich eventuell durch die Abnahme des JH-Titers am dritten Tag des letzten Larvenstadiums erklären. Dies könnte auf eine erhöhte Aktivität JH-abbauender Enzyme, wie der JH-Esterase, zurückzuführen sein. Das AT 2 Peptid von *S. frugiperda* wurde ursprünglich als Allatotropin bestimmt, da es bei 2d alten adulten Weibchen eine Aktivierung der CA *in vitro* zeigte [Abdel-latif et al., 2004 c]. Bei Larven entspricht die Wirkung nach den hier vorliegenden Untersuchungen mehr der eines Allatostatins. Die Reduktion des AT 2 Transkriptionslevels führte nicht nur zu einer Verlängerung des letzten Larvenstadiums, sondern darüber hinaus zu einer reduzierten Gewichtszunahme. Außerdem erreichten diese Larven nie das Endgewicht der Kontrollen. Das läßt vermuten, dass AT 2 wahrscheinlich einen Effekt auf das Verdauungssystem oder das Fraßverhalten der Tiere hat. Scheinbar erreichten diese Larven das kritische Gewicht zu einem späteren Zeitpunkt, was zu einer Verzögerung der Verpuppung führte.

5.3.5 JH-Hämolymphtiter vor und nach Suppression der allatoregulierenden Gene bei Larven

Der Juvenilhormontiter in der Hämolymphe ist ein wichtiger Faktor für die Kontrolle der Entwicklung und Reproduktion der Insekten und kann sich innerhalb kürzester Zeit dramatisch ändern. Zuerst wurde der JH-Titer von Ringer injizierten Tieren bestimmt und mit den JH-Titern unbehandelter Tiere verglichen [Westerlund, 2004]. Es gab kleine Unterschiede zwischen diesen Gruppen, die eventuell auf die Behandlung der Larven mit Ringer-Lösung oder auf saisonale Schwankungen zurückzuführen sind.

Vergleichbare JH-Titer wurden auch für den nahe verwandten Nachtfalter *S. littoralis* [Steiner et al., 1999] gefunden. Obwohl die JH-Gesamtiter in der Hämolymphe des vorletzten und letzten Larvenstadiums von *S. frugiperda* sehr ähnlich zu denen von *S. littoralis* waren, gab es Unterschiede im Verhältnis der JH-Homologen zueinander. Am ersten Tag des vorletzten Larvenstadiums wurden bei *S. littoralis* Larven ein

hoher JH II- und ein niedriger JH III-Titer beobachtet, die beide bis zur nächsten Häutung abnahmen. Auch bei *S. frugiperda* waren JH II und JH III die dominierenden JH-Homologe während des vorletzten Larvenstadiums, aber hier war die JH III-Konzentration höher als die des JH II. JH I wurde während der ersten zwei Tagen des fünften Larvenstadium von *S. frugiperda* gefunden, während bei *S. littoralis* JH I nur bis zum Ende des dritten Larvenstadiums nachzuweisen war. Die JH II- und JH III-Titer blieben bei *S. littoralis* bis zum Ende des sechsten Larvenstadiums niedrig, dagegen zeigte sich bei *S. frugiperda* ein leichter Anstieg von JH III am Ende dieses Stadiums und auch in der Präpuppe waren JH II und JH III zu finden (Tag 1 und 2). Ein derartiger Anstieg des JH-Titers ist generell in Präpuppen von Lepidopteren zu beobachten, wobei die Funktion nicht ganz klar ist.

Larvale Häutung der Insekten werden nur dann fortgesetzt, wenn der JH-Titer hoch ist. Nimmt der JH-Titer ab und steigt der Ecdysteroidtiter an, wird die Metamorphose eingeleitet [Riddiford, 1994]. Die Stilllegung der AS-C Typ Genexpression führte zu einem signifikanten Anstieg des JH-Titers in der Hämolymphe der Larven im letzten Larvenstadium (L6). Geht man davon aus, dass die Peptidmenge nach der Suppression der Genexpression reduziert ist, weist die Erhöhung des JH-Titers Übereinstimmung mit einer allatostaten Aktivität von AS-C auf. AT 2 Peptide stimulierten die JH-Biosynthese *in vitro* in den CA von zwei Tage alten Weibchen von *S. frugiperda* [Abdel-latif et al., 2004], was eine Einordnung dieses Peptids als Allatotropin bewirkte. Ein Anstieg des JH-Titers, der bei *Spodoptera* Larven nach dem Knockdown des AT 2 Gens beobachtet wurde, bestätigt diese Bioaktivität allerdings nicht. AT 2 Peptide zeigen C-terminal Sequenzhomologien zu den Peptiden des AS-C Typs, die in Larven von Lepidopteren die JH-Biosynthese hemmen [Kramer et al., 1991; Jansons et al., 1996; Audsley et al., 2000; Li et al., 2002]. Bei den Larven scheint AT 2 also einen ähnlichen Effekt zu haben wie das AS-C Allatostatin. Effekte des AS-C oder AT 2 Peptids auf die JH-Biosynthese *in vitro* in den CA von *S. frugiperda* Larven wurden bisher noch nicht untersucht.

Bei Larven im vorletzten Larvenstadium und bei Präpuppen war der JH-Titer nach Gensuppression erhöht und somit der Effekt der Suppression beider Gene umgekehrt im Vergleich zu denen des letzten Larvenstadiums. Dies spricht für eine andere regulierende Rolle der Peptide zu diesem Zeitpunkt, z.B. für einen eventuellen Einfluß auf die Aktivität JH-abbauender Enzyme.

5.3.6 JH-Hämolymphtiter vor und nach Suppression der allatoregulierenden Gene bei adulten Weibchen

Bei adulten Insekten wird erneut JH produziert und fungiert als Gonadotropin, das viele Aspekte der Reproduktion wie z. B. die Aufnahme von Vitellogenin in wachsende Oozyten fördert. 20-HE reguliert die Induktion der Vitellogeninsynthese und JH unterstützt die Vitellogeninproduktion durch Regulierung der 20-HE Biosynthese [Engelmann, 1970; Koeppe et al., 1985]. Beide Hormone sind wichtig für die Eireifung bei *S. frugiperda*. Bei adulten unverpaarten Weibchen von *S. frugiperda* ändert sich der JH III-Titer altersabhängig mit einem relativ niedrigem Wert nach dem Schlupf und zwei deutlichen Spitzen an den Tagen zwei und sechs. Auch JH I und JH II wurden mit relativ niedrigen Titern über den gesamten beobachteten Zeitraum gefunden. Der gemessene JH-Titer in der Hämolymphe korrelierte mit der JH-Freisetzung aus den CA adulter *S. frugiperda* Weibchen [Range et al., 2002]. Der JH-Titer in der Hämolymphe der Insekten wird hauptsächlich durch die JH-Syntheserate der CA beeinflusst, aber man sollte den Einfluß des enzymatischen Abbau des JH nicht vernachlässigen [Nijhout & Reed, 2007]. Das vorherrschende Homolog in der Hämolymphe adulter *S. frugiperda* ist das JH III. Die Dominanz des JH III in adulten *S. frugiperda* ist ungewöhnlich, da bei anderen Arten der Lepidopteren in erster Linie JH I und JH II gefunden wurden, allerdings wurde auch bei einigen Lepidopteren JH III in größeren Mengen detektiert [Edwards et al., 1995; Steiner et al., 1999].

Ein Knockdown der Expression allatoregulierender Gene kann zum Ausfall der Peptide führen, wie bei der Schabe *B. germanica* [Maestro & Bellés, 2006] gezeigt wurde. Geht man davon aus, dass die Abnahme des Transkriptionsniveaus von AS-C und AT 2 in *S. frugiperda* von einer Reduktion der Peptidmenge begleitet wird, sollte die JH-Biosyntheserate *in vivo* beeinflusst werden.

Jungfräuliche weibliche Lepidopteren zeigen einen viel niedrigeren Gesamt-JH-Titer als verpaarte Weibchen [Edwards et al., 1995; Ramaswamy et al., 1997]. Es wäre zu erwarten, dass die AS-C Peptide, die eine allatostate Wirkung auf die JH-Biosynthese *in vitro* auf aktivierte CA haben, den JH-Titer reduzieren. Wird die Genexpression ausgeschaltet, sollte somit der JH-Titer erhöht sein. In jungen adulten unverpaarten Weibchen von *S. frugiperda* (Tag 2) wurde der Gesamt-JH-Titer jedoch nicht durch die Suppression des AS-C Gens beeinflusst. Dies zeigt, dass

Spofr/Manse-AS scheinbar nicht zu der Regulation der JH-Biosynthese beiträgt. Ein Grund für die Unwirksamkeit der Suppression der Genexpression könnte ein hoher AS-C-mRNA Level in adulten Tieren im Vergleich zu Larven sein. Bei mit AS-C-dsRNA injizierten verpaarten Weibchen ist der JH-Titer erhöht. Dagegen zeigten 2 Tage alte AT 2-dsRNA injizierte Weibchen einen unveränderten JH-Titer im Vergleich zu Kontrollen. Diese Beobachtung scheint für eine stimulierende Wirkung des AT 2 in der JH-Biosynthese bei jungen adulten Weibchen zu sprechen, was im Einklang steht mit der beobachteten Stimulierung der JH-Freisetzung *in vitro* bei 2 Tage alten adulten unverpaarten AT 2 Weibchen [Abdel-latif et al., 2004], aber im Kontrast zu den Effekten bei Larven. Expressionstudien zeigten hohe Transkriptionsraten für das AT 2 Gen am Tag 2 nach der Häutung [Abdel-latif et al., 2004], und auch die JH-Biosynthese *in vitro* war an diesem Tag am höchsten [Range et al., 2002].

Abweichende Effekte des JH-Titers zeigten sich bei älteren adulten unverpaarten Weibchen (Tag 6). Eine Reduktion des Expressionslevel von AS-C und AT 2 bewirkten eine Abnahme des JH III-Titers, aber einen Anstieg von JH II. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Peptide unterschiedliche Effekte auf verschiedene JH-Homologe in spezifischen Stadien der Entwicklung haben können. Ein entwicklungsabhängige Sensitivität von allatogulierenden Peptiden auf die CA wurde auch bei A-Typ Allatostatin (Dippu-AS 7) in Embryonen der Schabe *D. punctata* beobachtet [Stay et al., 2002]. Bei Embryonen in frühen Entwicklungsstadien hat A-Typ AS einen stimulierenden Einfluss auf die Sesquiterpenoidproduktion, dagegen wirkt es in mittleren und späten Entwicklungsstadien inhibitorisch.

5.3.7 Der JH-Hämolymphtiter bei den Männchen

Bei *S. frugiperda* schlüpfen die adulten Männchen 1-2 Tage nach den Weibchen. Vermutlich lässt sich diese Verzögerung dadurch begründen, dass die Produktion von Spermien in den Hoden, wie bei vielen anderen Schmetterlingsarten, bereits vor dem Schlupf der adulten Falter erfolgt. Männchen haben bereits am Schlupftag weitestgehend fertig ausgebildete Gonaden und sind reproduktionsfähig [Wyatt & Davey, 1996; Seth et al., 2002].

Das dominante JH-Homolog in der Hämolymphe von unverpaarten Männchen war JH III. Der JH-Titer der unverpaarten Männchen war am Tag des Schlupfes und am Tag danach etwa gleich. Tendenziell nahm der JH-Titer bis zum fünften Tag zu, unterlag aber starken Schwankungen. Am siebten Tag stieg der JH-Titer nicht mehr in dem Maße an, wie an den vorangegangenen Tagen. Diese Veränderungen im JH-Titer der Hämolymphe könnten in Verbindung mit der Paarungsbereitschaft stehen, da die Weibchen nach der Verpaarung eine gewisse Refraktärzeit haben. Bei *H. virescens* dauert diese ca. 48 Stunden [Pszczolkowski et al., 2006]. Die Änderungen im JH-Titer der Männchen verliefen etwa entgegengesetzt zu den regelmäßigen Schwankungen im JH-Titer der Weibchen.

Betrachtet man den JH-Titer der akzessorischen Drüsen (AD) der Männchen, so zeigte sich bei diesen ein Wechsel im dominanten Homolog (JH I) am fünften Tag, da nun statt JH I eine hohe Konzentration von JH II zu finden war. Bei der Verpaarung werden Proteine und JH vom Männchen auf das Weibchen übertragen. Dies wiederum könnte sich negativ auf den JH-Titer der Weibchen auswirken. Bei verpaarten Ringer injizierten Weibchen kommt es zu einer starken Reduktion des JH III-Titers am Tag 6. Zudem werden bis zum fünften Tag fast alle Spermatophoren auf das Weibchen übertragen. Vermutlich wirken sich all diese Veränderungen auf die Oviposition der Weibchen aus. Eventuell könnte der erhöhte JH III-Titer in der Hämolymphe verpaarter im Vergleich zu unverpaarten Weibchen eine Reaktion auf das bei der Verpaarung übertragenen JH I sein. In mit einem Männchen verpaarten Weibchen gibt es am Tag 6 (eventuell bereits früher) eine starke Reduktion des JH III-Titers. Ab dem Tag 5 scheint die Reproduktion beim Männchen abgeschlossen zu sein. Verpaart man Weibchen am vierten Tag mit einem neuen 1d alten Männchen, kommt es zu einem erneuten Peak bei der Ovipositionsrate am Tag 7 (Daten nicht gezeigt).

5.4 Funktionen der JH-Übertragung bei der Verpaarung

Untersuchungen zeigten, dass bei der Verpaarung viele Substanzen wie anorganische Ionen, Proteine, Ecdysteroide und JH [Shirk et al., 1980], aber auch Pheromone an die Weibchen übergeben werden und in diesen physiologische Effekte auslösen [Gillott, 2003]. Die Übertragung von Pheromonen auf die Weibchen wurde bei *D. melanogaster* untersucht. Diese bewirkt eine Stimulierung der CA der Weibchen, die zur Synthese und Freisetzung von JH führt und über eine Reihe von endokrinen Prozessen, an denen auch Ecdysteroide und JH beteiligt sind, die Reifung der Oozyten fördert [Richard et al., 1998]. Vermutlich wird das JH, welches sich ursprünglich in den AD der Männchen befindet, bei der Verpaarung mit den Weibchen in die Bursa copulatrix übertragen [Park et al., 1998 a; Pszczolkowski et al., 2006].

Auch bei *S. frugiperda* scheint dies der Fall zu sein, da die JH-Menge in den AD der Männchen am selben Tag bei unverpaarten Männchen deutlich höher war als bei verpaarten. Außerdem findet man bei den mit ihnen verpaarten Weibchen sehr große Mengen desselben JH-Homologs, das bereits vor der Verpaarung in den AD der Männchen zu finden war. Auffallend ist ebenfalls, dass ein Tag nach der Verpaarung nahezu kein JH mehr in der Bursa zu finden war. Hinweise für die Übertragung von JH vom Männchen auf die Weibchen bei der Verpaarung gibt es seit einigen Jahren bei Lepidopteren. Bei *Hyalophora cecropia* wurde JH I in den AD gefunden, in denen es aus JH-Säure, die aus den CA freigesetzt wird, synthetisiert und bei der Verpaarung an die Weibchen übertragen wird [Shirk et al., 1980]. Auch bei *H. virescens* wurde der Transfer beobachtet [Park et al., 1998 a].

Vergleicht man den JH-Titer verpaarter und unverpaarter Weibchen bei *S. frugiperda*, zeigt sich, dass dieser in älteren verpaarten Weibchen erhöht ist. Auch bei verpaarten Weibchen von *H. virescens* wurde ein erhöhter JH-Titer in der Hämolymphe gemessen [Shu et al., 1998]. Der mögliche Zusammenhang der Abnahme des JH aus der Bursa copulatrix einen Tag nach der Verpaarung und des erhöhten JH-Titers bei verpaarten älteren Weibchen wurde an *H. virescens* gezeigt [Pszczolkowski et al., 2006]. Radioaktiv markiertes JH I wurde vor der Verpaarung in den AD unverpaarter Männchen gelagert. Nach der Verpaarung nahm die

Konzentration in den AD signifikant ab und erschien in der Bursa copulatrix und der Hämolymphe der Weibchen, die mit den injizierten Männchen verpaart worden waren. Im Unterschied dazu war bei *S. frugiperda* JH III das dominante JH-Homolog in der Hämolymphe der Weibchen, während in der Bursa copulatrix große Mengen JH I zu finden waren. Allerdings wurde die JH-Menge bei *H. virescens* kurz nach der Verpaarung und bei *S. frugiperda* erst einige Stunden später detektiert. Es könnte spekuliert werden, dass bei *H. virescens* der direkte Übergang in die Hämolymphe gezeigt wurde, bei *S. frugiperda* aber eine indirekte Folge, da das verschwundene JH I vielleicht schon sekundär eine Reaktion bewirkt hat, die zur Erhöhung des JH III-Titers in der Hämolymphe geführt hat. Ein Indiz für diese These könnte sein, dass die Membran der Follikelzellen von *R. prolixus* nur JH I, nicht aber JH II oder JH III bindet [Ilenchuk & Davey, 1987]. Vielleicht wirkt das übertragene JH I auf die Reproduktionsorgane, die die JH III Produktion anregen. Es wurden Faktoren bei der Schabe *D. punctata* entdeckt, die die JH-Biosynthese stimulieren [Rankin & Stay, 1984].

Vorstellbar wäre auch, dass direkt im Ovar JH III gebildet und dieses in die Hämolymphe abgegeben wird. Die Biosynthese von JH III im Ovar wurde bei *A. aegypti* gezeigt [Borovsky et al., 1994]. Um die Wirkung der beiden Peptide AS-C und AT 2 auf die JH-Übertragung zu klären, wurden Injektionen mit dsRNA durchgeführt. Dabei war bei mit AS-C-dsRNA unverpaarten injizierten Männchen zu beobachten, dass in den AD der Männchen mehr JH I zu finden war als in vergleichbaren Ringer injizierten Tieren, in AT 2-dsRNA injizierten Männchen dagegen weniger. Da durch die AS-C-dsRNA die inhibierende Wirkung des AS-C Peptids auf den JH-Titer aufgehoben wird, scheint AS-C eine inhibierende Wirkung auf den JH-Titer in den AD zu haben, dagegen wirkt AT 2 scheinbar allatotrop. Nach der Verpaarung nahm der JH-Titer in den AD sowohl bei Ringer injizierten als auch bei mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen signifikant ab, dagegen war das bei mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen nicht zu beobachten. Da bei den untersuchten verpaarten Weibchen immer eine signifikante Zunahme des JH-Titers in den Bursa copulatrix zu messen war, scheinen die Männchen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, JH I bzw. andere Faktoren, die den JH-Titer in der Bursa copulatrix erhöhen, an die Weibchen übertragen zu haben. Da in der Bursa copulatrix mehr JH I zu finden war, als vorher in den AD der Männchen, wird vermutlich von den Weibchen ebenfalls in Reaktion auf die Verpaarung zusätzlich JH gebildet. Der

gleichbleibende JH I-Titer in den AD der mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen vor und nach der Verpaarung deutet darauf hin, dass eine gewisse Menge JH gebildet werden muß, damit JH auf die Weibchen übertragen werden kann. Von mit AS-C-dsRNA injizierten Männchen wird genauso viel JH an die Weibchen übertragen, wie von Ringer injizierten Tieren und dieses wird von den Weibchen nahezu vollständig aus der Bursa copulatrix entfernt, da 2 Tage nach der Verpaarung fast kein JH mehr vorhanden war. Dagegen wird von AT 2 injizierten Männchen nur wenig bzw. kein JH übertragen und es verbleibt signifikant mehr JH in der Bursa copulatrix als bei den Kontrollen.

5.5 Wirkungen der Gensuppression auf die Oviposition und die Ovarentwicklung adulter Weibchen

Bei den polyandrischen Noctuidae, zu denen auch *S. frugiperda* gehört, wird die Vitellogenese und Choriongenese nach dem adulten Schlupf eingeleitet und vollendet, gezeigt unter anderem für *H. virescens* [Ramaswamy et al., 1990; Ramaswamy & Cohen, 1991; Zeng et al., 1996], *H. zea* [Satyanarayana et al., 1991, 1992], und *P. unipuncta* [Cusson et al., 1994]. Die Weibchen sind protogyn, d. h. die Weibchen schlüpfen oftmals 24 h vor den Männchen. Sie entwickeln in dieser Zeit die Eier und die Fähigkeit Sexpheromone zu produzieren [Mbata & Ramaswamy, 1990]. Bei diesen Arten ist JH nötig für die Vitellogenin (Vg)-Synthese im Fettkörper, die Aufnahme von Vg in die Ovariolen und die Choriongenese.

Eine Zunahme der Ovargewichte bei unverpaarten und verpaarten mit Ringer bzw. dsRNA injizierten *S. frugiperda* Weibchen wurde in den ersten Tagen nach der Imaginalhäutung beobachtet. Auch der JH-Titer stieg bei unverpaarten mit Ringer bzw. dsRNA-injizierten Weibchen an den ersten Tagen an. 20-HE inhibiert bei *M. sexta* und *H. zea* die gonadotrope Aktivität von JH [Satyanarayana et al., 1992]. Bei *S. frugiperda* war 20-HE nur in geringen Mengen bei mit Ringer und dsRNA injizierten unverpaarten Weibchen nachweisbar, außer bei mit AT 2-dsRNA injizierten unverpaarten Weibchen am ersten Tag nach dem Schlupf. Bei Weibchen, die lange Zeit unverpaart sind, wird die Produktion der JH-Biosynthese in den CA gestoppt,

dabei können die CA durch Verpaarung reaktiviert werden [Herman & Barker, 1977]. Die Anwesenheit von Eiern in unverpaarten Weibchen führt dazu, dass ein allatostates Signal zu den CA gesendet wird, um die Produktion von JH zu stoppen [Loher et al., 1987]. In unverpaarten Weibchen wird die Eiproduktion signifikant reduziert und die JH-Titer nehmen z.B. bei *H. virescens* nach einem anfänglichen Anstieg wieder ab [Ramaswamy et al., 1997]. Dieses allatostate Signal könnte bei mit dsRNA injizierten Weibchen von *S. frugiperda* ausgeschaltet worden sein, da das Ovargewicht dieser Weibchen im Vergleich mit Ringer injizierten Tieren am dritten Tag signifikant erhöht war.

Der JH-Titer wird durch zwei Prozesse reguliert: Synthese und Abbau [Gilbert et al., 2000]. Eine Möglichkeit des JH-Abbaus ist die Hydrolyse der Methylester durch spezifische JHE [Hammock, 1985; Roe & Venkatesh, 1990; de Kort & Granger, 1996; Gilbert et al., 2000]. Die Aktivität der JHE bleibt in unverpaarten Weibchen von *H. virescens* erhöht und unterstützt den niedrigen JH-Titer [Ramaswamy et al., 2000]. In den Ovarien unverpaarter Weibchen wurde eine höhere JHE-Aktivität gemessen als in verpaarten [Khalil et al., 2006]. Obwohl die JHE-Aktivität den JH-Titer niedrig halten sollte, stieg der JH-Titer bei unverpaarten mit Ringer injizierten *S. frugiperda* Weibchen am 6. Tag nach dem Schlupf an. Der 20-HE-Titer schwankte in diesem Zeitraum sehr und war deshalb am 6. Tag nicht signifikant höher als an den vorhergehenden Tagen. Dennoch nahm das Ovargewicht bei allen betrachteten Weibchen bereits am fünften Tag ab. Vermutlich bewirkt ein anderer Mechanismus in älteren unverpaarten Weibchen, dass die produzierten Eier resorbiert werden, um die enthaltene Energie zu verwerten.

Verpaarte *H. virescens* Weibchen zeigten einen Anstieg des JH-Titers und begleitend einen Anstieg des Vg-Titers und der Eiproduktion [Zeng et al., 1996]. Außerdem konnte bei unverpaarten Weibchen die Eireifung gesteigert werden, wenn sie mit JH injiziert wurden. Auch bei verpaarten *S. frugiperda* Weibchen waren sowohl die Ovargewichte als auch die JH-Titer in der Hämolymphe im Vergleich zu unverpaarten Tieren erhöht. Ein Regulator hierfür könnte die Abnahme der JHE-Aktivität nach der Verpaarung sein [Roe et al., 1993]. Zudem wurde gezeigt, dass bei der Verpaarung Substanzen vom Männchen auf das Weibchen übertragen werden, die dazu beitragen, den JH-Titer in der Hämolymphe der Weibchen zu erhöhen [Shu et al., 1998].

Bei mit dsRNA injizierten verpaarten Weibchen waren die Ovargewichte am ersten Tag signifikant niedriger als bei mit Ringer injizierten verpaarten Weibchen. Das bedeutet, dass die Produktion von Vitellogenin im Fettkörper und/ oder dessen Einbau in die Eizellen vermutlich verzögert ist. Die Stimulierung der Eiproduktion und Eiablage hängen von der Verpaarung in Verbindung mit einem erhöhten JH-Titer [Edwards et al., 1995; Ramaswamy et al., 1997; Shu et al., 1998] ab. Neuropeptide regen die Ovulation, also die Freisetzung der reifen Eier aus dem Ovar in das Ovidukt, aber auch die Oviposition selbst an [Gullan & Cranston, 2000]. Für AT 2 wurde bei jungen *S. frugiperda* Weibchen eine allatotrope Wirkung auf die JH-Biosynthese der CA nachgewiesen. Die verminderte Oviposition nach der Behandlung der Weibchen mit dsRNA würde diese Beobachtung bestätigen.

Auffallend war, dass bei den mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injizierten Tieren weniger Eier pro Tag abgelegt wurden, und dass es auch mehr Weibchen gab, die gar keine Eier ablegten. Der Grund für diese Beobachtung könnte die verringerte Übertragung von Spermatophoren der unbehandelten Männchen auf die mit dsRNA-injizierten Weibchen sein. Das wiederum lässt vermuten, dass die allgemeine Paarungsbereitschaft der dsRNA-injizierten Weibchen reduziert ist. Nach der Verpaarung kann ein Verhalten, das als Pheromonostasis bezeichnet wird, beobachtet werden. Es bewirkt, dass sich die Weibchen nicht sofort wieder verpaaren und lässt nach 48 h wieder nach [Mbata & Ramaswamy, 1990]. Eine Verpaarung führt zur Erhöhung der Oviposition während der Phase der Pheromonostasis [Pszczolkowski et al., 2006].

Bei *H. virescens* wurde gezeigt, dass das Signal, das diese Pheromonostasis bei Weibchen auslöst, in den Hoden oder anderen Teilen des Reproduktionssystems der Männchen gebildet, bei der Verpaarung übertragen und dadurch die Sexpheromonproduktion der Weibchen inhibiert wird [Ramaswamy et al., 1996]. Es wurde zudem gezeigt, dass 20-HE der Faktor ist, der an die Weibchen übertragen wird und dieses die Sexpheromonproduktion inhibiert [Ramaswamy et al., 1994; Ramaswamy & Cohen, 1992].

Betrachtet man den Ecdysteroidtiter von 1 d alten unverpaarten AT 2-dsRNA injizierten *S. frugiperda* Weibchen, stellt man fest, dass dieser im Vergleich zu Ringer injizierten Tieren signifikant erhöht ist, was zumindest bei mit AT 2-dsRNA injizierten Tieren eine Erklärung für eine potentiell verminderte Paarungsbereitschaft sein könnte. In alten Weibchen wurde eine zusätzliche Wirkung der AT 2-dsRNA auf die Oviposition beobachtet, da bei AT 2-dsRNA behandelten älteren Weibchen die

Eiablage gegenüber der Kontrolle leicht erhöht war und den Peak erst am Tag 8 erreichte. Diese Ergebnisse verleiten zur Spekulation, dass der inverse JH II- und JH III-Titer nach der AT 2-dsRNA Behandlung am Tag 6 bei den adulten Weibchen zu einer zusätzlichen Erhöhung der Oviposition führte.

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, die eine negative Auswirkung auf die Oviposition der Weibchen haben können. JH ist bekannt für seinen negativen Effekt auf die Reproduktion bei einigen Insektenarten. Oozytenproduktion, Oviposition und Embryogenese reagieren sehr sensitiv auf geringe Mengen von exogenem JH und seinen Analoga [Cole et al., 2002; Gelbic & Sehnal, 1973; Matolín & Gelbic, 1975; Masner et al., 1987]. Applikation von 300 pg Pyriproxyfen auf Weibchen von *S. litura* führte zu normaler Anzahl reifer Oozyten, aber die Oviposition war reduziert [Hatakoshi, 1992]. Bei 2 d alten verpaarten *S. frugiperda* Weibchen war der JH III-Titer nach AT 2- und AS-C-dsRNA Injektion erhöht. Auch diese Erhöhung könnte sich negativ auf die Oviposition auswirken.

Bei der Betrachtung der Eiablage von Ringer injizierten Weibchen, die mit dsRNA-injizierten Männchen verpaart worden waren, zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Oviposition. Auch die Behandlung von Männchen mit Juvenoiden kann sich, wie bei *C. pomonella* gezeigt, nachteilig auf die Oviposition der Weibchen auswirken [Hatakoshi, 1992]. Vielleicht induziert JH die Reduktion eines Faktors, der die Oviposition stimuliert, wie bei *S. litura* beobachtet [Hatakoshi, 1992]. Bei 1d alten unverpaarten mit dsRNA injizierten Männchen war der JH-Titer im Vergleich zu Ringer injizierten Tieren erhöht. Allerdings ist es auch vorstellbar, dass nicht das JH insgesamt eine negative Wirkung auf die Oviposition ausübt, sondern Veränderungen im Anteil der verschiedenen JH-Homologen dafür verantwortlich sind. Vermutlich wirkt sich das Zusammenspiel vieler Faktoren zusammen negativ auf die Oviposition aus.

5.6 Ausblick

Um die grundlegenden Wirkungsmechanismen allatoregulierender Neuropeptide besser zu verstehen, sind weitere Studien notwendig. Kolokalisationsstudien mit verschiedenen Allatostatinen und Allatotropinen könnten Hinweise auf Interaktionen der Neuropeptide in verschiedenen Entwicklungsstadien geben.

Die Methode der RNA Interferenz kann auch bei Kombinationsexperimenten mit verschiedenen Neuropeptiden wirksam eingesetzt werden und führt sicherlich in Kombination mit physiologischen Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Mechanismen allatoregulierender Peptide. Dafür ist es aber notwendig zu bestimmen, inwieweit die Injektion spezifischer dsRNA tatsächlich zu einer Reduktion der Peptide geführt hat.

Auch die Bestimmung der JH-Titer insbesondere bei den mit dsRNA injizierten Tieren, führte zu interessanten Einblicken beim lebenden Tier. Da der JH-Titer jedoch großen zeitlichen Schwankungen unterliegt, erscheint es sinnvoll bei verschiedenen physiologischen Experimenten die JH-Titer Bestimmungen in kürzeren Intervallen (z.B. 12-Stunden Rhythmus) durchzuführen. Auch die Markierung der JH-Homologe könnte sinnvoll sein, um den Weg der verschiedenen JH-Homologe ausgehend vom Männchen bei der Verpaarung detektieren zu können. In Kombination mit der Bestimmung der JH-Titer sollte auch das Paarungsverhalten der Tiere näher untersucht werden.

Da ein wichtiger Bestandteil der Regulation des JH-Titers auch der Abbau ist, empfiehlt es sich, auch Studien zur JH-Esteraseaktivität durchzuführen. Letztendlich dienen alle Experimente zu den allatoregulierenden Neuropeptiden bei *S. frugiperda* der Bekämpfung dieses Agrarschädling mit spezifischen und ökologisch verträglichen Mitteln. Mit der Expression von spezifischen dsRNAs in Pflanzen, könnte nicht nur für *S. frugiperda* eine spezifische Bekämpfung einzelner Schadinsekten erreicht werden.

6 Zusammenfassung

Bei Insekten regulieren Peptidhormone (Neuropeptide) viele physiologische und entwicklungsrelevante Prozesse, wie Wachstum, Häutung, Metamorphose, Reproduktion, Diapause, Fressverhalten und den Metabolismus. Allatoregulierende Neuropeptide hemmen (Allatostatine, AS) oder fördern (Allatotropine, AT) die Juvenilhormonbiosynthese in den Corpora allata, können aber auch andere Funktionen aufweisen, wie z.B. eine myoregulatorische Aktivität.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Lokalisation der B-Typ Allatostatine [W(X)₆W-amide] aus *Spodoptera frugiperda* immunologisch untersucht. In Gehirnen adulter, 2 Tage alter Weibchen trat eine deutliche Immunfärbung in medianen neurosekretorischen Zellen des Protocerebrums, im oberen Bereich des Zentralkörpers und in den Antennalloben (Glomeruli) auf. In den Thorakal- und Abdominalganglien von Larven des letzten Larvenstadiums wurde eine intensive Färbung im Bereich des Neuropils und eine schwächere Immunreaktion im Bereich der lateral gelegenen neurosekretorischen Zellen beobachtet. Starke Färbung war auch in den Malpighischen Gefäßen sichtbar, die wahrscheinlich der apikalen Membran zwischen den Hauptzellen zuzuordnen ist, sowie im Mitteldarm und in larvalen Hoden. Die Lokalisation diente zur Bestimmung möglicher Expressionsorte für die B-Typ Allatostatine, um eine Isolation der cDNA-Sequenz für das Präprohormon zu erleichtern. Verschiedenste Ansätze zur Identifikation der Gensequenz führten jedoch nicht zum Erfolg.

Anschließend wurden die physiologischen Funktionen der bereits charakterisierten allatoregulierenden Neuropeptide AT 2 und AS-C-Typ aus *S. frugiperda* nach einer Hemmung der Genexpression mittels der RNA-Interferenz Methode untersucht. Es wurden Expressionsstudien durchgeführt, um die Wirksamkeit und die Spezifität der RNA-Interferenz in verschiedenen Geweben zu überprüfen. Zudem wurden die Auswirkungen der RNA-Interferenz auf verschiedene physiologische Parameter untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt der Experimente auf der Regulierung der Juvenilhormonbiosynthese, der Reproduktion, der Verpaarung und der Metamorphose.

Nach Injektion und auch nach Fütterung von AS-C- bzw. AT 2-doppelsträngiger RNA (dsRNA) war die Expression der mRNA im Gehirn und Darm von Larven reduziert. Zudem führte die Injektion von AS-C- bzw. AT 2-dsRNA auch

bei adulten Weibchen und Männchen unterschiedlicher Altersstufen zu einer Reduktion der Expression im Gehirn. Die Reduktion der Transkription bei Larven ging mit einem erhöhten Juvenilhormon(JH)-Titer in der Hämolymphe der Tiere einher. Dies lässt eine allatostate Aktivität der beiden Peptide zu diesem Zeitpunkt vermuten. Die Folge des erhöhten JH-Titers war eine Verlängerung des letzten Larvenstadiums. Bei adulten Weibchen war der Effekt der Injektion von AS-C- bzw. AT 2-dsRNA auf den JH-Titer vom Alter der Tiere abhängig und variierte innerhalb der JH-Homologen (JH I bis JH III). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Peptide bei adulten Weibchen unterschiedliche Wirkungen auf unterschiedliche JH-Homologe in spezifischen Stadien der Entwicklung haben. Adulte Männchen hatten nach einer Injektion von AS-C- bzw. AT 2-dsRNA an bestimmten Tagen einen erhöhten JH-Titer.

Bei der Verpaarung werden mit der Spermatophore verschiedene Substanzen, darunter auch JH, vom Männchen auf das Weibchen übertragen. Bei mit Ringer injizierten Männchen konnte vor der Verpaarung JH in den akzessorischen Drüsen (AD) detektiert werden. Nach der Verpaarung nahm der JH-Titer in den männlichen AD stark ab. Bei unverpaarten Weibchen war kein JH in der Bursa copulatrix nachweisbar. Wurden die Weibchen jedoch verpaart, konnten große Mengen JH in der Bursa copulatrix gefunden werden. Mit AS-C-dsRNA injizierte Männchen zeigten vor der Verpaarung einen erhöhten JH-Titer in ihren AD, der nach der Verpaarung wieder niedriger war. Die mit diesen Männchen verpaarten Weibchen hatten einen erhöhten JH-Titer in der Bursa copulatrix im Vergleich zu mit Ringer injizierten verpaarten Weibchen. Die Ergebnisse lassen auf eine allatostate Wirkung der AS-C-Peptide auf den JH-Titer in den AD schließen. Bei mit AT 2-dsRNA injizierten Männchen war der JH-Titer in den AD, im Vergleich zu den Kontrollen, sowohl vor als auch nach der Verpaarung erniedrigt, ebenso wie in der Bursa copulatrix der mit diesen Männchen verpaarten Weibchen.

Weibchen, die mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injiziert worden waren, zeigten eine reduzierte Eiablage (Oviposition), ebenso wie Ringer injizierte Weibchen, die mit AS-C- bzw. AT 2-dsRNA injizierten Männchen verpaart worden waren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Fertilität der Männchen und Weibchen durch Neuropeptide unterschiedlich beeinflusst wird, und damit auch die Eiproduktion und Eiablage der Weibchen.

Insektenneuropeptide eignen sich als (Bio)Insektizide, da sie die Physiologie und das Verhalten der Insekten während der Entwicklung und Reproduktion beeinflussen bzw. regulieren. Eine Expression von spezifischen dsRNAs in transgenen Pflanzen, gerichtet gegen allatoregulierende Neuropeptidgene, könnte die gezielte Bekämpfung von Schadinsekten, wie z. B. des Agrarschädling *S. frugiperda*, ermöglichen.

7 Summary

Insect neuropeptides regulate most of the key functions in insects such as development, molting, metamorphosis, reproduction, diapause, feeding and energy metabolism. Allatoregulating neuropeptides are known to inhibit (allatostatins, AS) or activate (allatotropins, AT) the juvenile hormone (JH) biosynthesis in the corpora allata, but they occupy several other functions such as myoregulatory activity, too.

At first, the localisation of B-type allatostatins [W(X)₆W-amide] in *Spodoptera frugiperda* was investigated by immunostaining. Immunoreactive material was detected in the brain of 2-day old adult females especially in the median neurosecretory cells of the protocerebrum, in the central body and in the antennal lobes (glomeruli). Additionally, strong immunostaining was detected in the neuropil. At lower extent, immunoreactivity was found in lateral neurosecretory cells of the thoracic and abdominal ganglia of last instar larvae. Immunoreactive material was also localised in the Malpighian tubules, probably restricted to the apical membrane with concrements located between the cells, in the midgut and in the maturation zone of the testes. Immunostaining experiments were carried out to better find the expression sites for the respective preprohormone. However, various experiments to identify the gene sequence of B-type AS were unsuccessful.

Next, the physiological functions of the known allatoregulating neuropeptides allatotropin AT 2 and allatostatin AS-C-type from *S. frugiperda* were studied after gene silencing using the RNA interference method. Expression studies were performed to proof the potency and specificity of the RNA interference in different tissues. Additionally, the effect of the RNA interference on various physiological parameters was determined. Experiments were focused on the regulation of juvenile hormone biosynthesis, reproduction, mating and metamorphosis.

After injection or feeding of either the AS-C-type or the AT 2 dsRNA the transcript levels were reduced in the brain and gut of last instar larvae. Moreover, injection of AS-C-type or AT 2 dsRNA led to an age-specific suppression of expression in the brains of adult females and males. Suppression of the transcript level in larvae went ahead with an increased JH titer in the haemolymph of the animals, suggesting an allatostatic activity of both peptides at this stage. As a result, the last larval stage was prolonged. In adult females the effect of AS-C or AT 2 dsRNA injections on the JH titer depended on the age of the moths and varied

among the JH homologs (JH I to JH III), indicating that the peptides in adult females act either allatostatic or allatotropic on different JH homologs at specific developmental stages. In adult males the JH titer increased at distinct days after injection of AS-C or AT 2 dsRNA, respectively.

In addition to the sperm, the males transfer various other substances, including JH, during copulation into the females. In unmated males, injected with Ringer solution, JH was detectable in the accessory sex glands (ASG). After mating, the JH titer strongly decreased in the ASG of males. In the bursa copulatrix of unmated females no JH was detectable, whereas in mated moths, a lot of JH was detectable. AS-C dsRNA injected males showed a high JH titer in the ASG before mating, which decreased after mating. Females mated with such males revealed an increased JH titer in the bursa copulatrix compared to females mated with Ringer controls. The results suggest an allatostatic activity of the AS-C peptides on the JH titer in the ASG. AT 2 dsRNA injected males showed a reduced JH titer in the ASG before and after mating, compared to the controls, and the same was true for the bursa copulatrix of females mated with such males.

Oviposition rates were reduced in females, which had been injected with AS-C or AT 2 dsRNA, but also in Ringer injected females which had been mated with AS-C or AT 2 injected males. This suggests, that fertility of males and females is influenced by neuropeptides, and as a consequence egg production and oviposition of females are affected.

Insect neuropeptides are qualified for insect control agents, since they regulate physiology and behaviour of insects during development and reproduction. Expression of specific dsRNA directed against suitable genes of allatoregulating neuropeptides in transgenic plants could give protection against pests, like *S. frugiperda*.

8 Anhang

8.1 Sequenzen

8.1.1 cDNA-Teilsequenz des β -Aktins aus *S. frugiperda*

5' – AGT CGA CAA TGG CTC CGG CAT GTG GAA GGC CGG TTT CGC CGG 42
 V D N G S G M W K A G F A G

CGA CGA CGC GCC CCG CGC CGT CTT CCC GTC CAT CGT AGG TCG 84
 D D A P R A V F P S I V G R

CCC TCG TCA CCA GGG TGT GAT GGT TGG TAT GGG TCA GAA GGA 126
 P R H Q G V M V G M G Q K D

CTC CTA CGT AGG CGA TGA GGC CCA GAG CAA GAG AGG TAT CCT 168
 S Y V G D E A Q S K R G I L

CAC CCT GAA GTA CCC CAT CGA GCA CGG TAT CAT CAC CAA CTG 210
 T L K Y P I E H G I I T N W

GGA CGA CAT GGA GAA GAT CTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA CGA 252
 D D M E K I W H H T F Y N E

GCT GCG CGT CGC CCC TGA GGA ACA CCC AGT CCT CCT GAC TGA 294
 L R V A P E E H P V L L T E

sfActf

GGC TCC **CCT CAA CCC TAA GGC CAA CAG GGA** GAA GAT GAC CCA 336
 A P L N P K A N R E K M T Q

GAT CAT GTT TGA AAC CTT CAA CTC CCC CGC CAT GTA CGT CGC 378
 I M F E T F N S P A M Y V A

CAT CCA GGC TGT GCT CTC TCT GTA CGC CTC TGG TCG TAC CAC 420
 I Q A V L S L Y A S G R T T

sfActR

CGG TAT **CGT CTT GGA CTC CGG TGA TGG** TGT CTC CCA CAC CGT 462
 G I V L D S G D G V S H T V

CCC CAT **GTA** CGA AGG TTA CGC **ICT** GCC CCA C – 3' 493
 P M Y E G Y A L P H

Abbildung: Darstellung eines Teilfragments der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des β -Aktin-Gens aus *Spodoptera frugiperda*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die für die Amplifizierung verwendeten Primer sfActf und sfActR sind grau hervorgehoben.

8.1.2 cDNA-Teilsequenz des Sulfakinins aus *G. bimaculatus*

Skf10

5' – GAC GAC GCC GGC GGC AGC GCA GCT CAC GCG GAA GCG CCC CTG CAC TCG CAC 51

GTG GAA GGC ATG GGC TGC AGC ATG CTG ACG GCG GCG TTC TTC GTG GTG AGC 102
M G C S M L T A A F F V V S 14

GTC TAC CTC CTC GTA CAC CAC CAG CAC CAC GCG GTG AGC GGG CAC GCG CTG 153
 V Y L L V H H Q H H A V S G H A L 31

CCG CTG CCG CCT TCG GAG GGC GGC GCG GGG GGC GGC GCC GGG GGC GGT GCC 204
 P L P P S E G G A G G G A G G G A 48

GGG GGC GCG CTG CGG GGC CGG GCC CTC GTG CTG GGG CGA CGC GCG CCG CCC 255
 G G A L R G R A L V L G **R R** A P P 65

GTG GCT CCG CAG CTG CTC CGC GCC CGC CTC GCA GTC GCC GAC GAC GCT ACC 306
 V A P Q L L R A R L A V A D D A T 82

GTC CAA GGC CTC CTG GGA GAC TTC GTC GTC GAC GAC GAG GAG CTC GGC GAG 357
 V Q G L L G D F V V D D E E L G E 99

SKr10

ATG AGC AAG AGG CAG TCG GAC GAC TAC GGC CAC ATG AGG TTC GGG AAG CGG 408
 M S **K R** Q S D D Y G H M R F G **K R** 116

GAG CCC TTC GAC GAC TAC GGA CAC ATG CGG TTT GGG CGC AGC GCG GAA TAA 459
 E P F D D Y G H M R F G **R** S A E * 133

CGA CGC TTC CAG TGT CAA TTT AAT GAA TTT AAA ATA AAA TAA AGT GAA – 3' 507

Abbildung: Darstellung eines Teilfragments der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der SK-cDNA aus der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die verwendeten Primer SKf10 und SKr10 sind grau hervorgehoben. Die basischen Spaltstellen sind grau unterlegt, die potentiellen Sulfakinin-Peptide grau geschrieben und die Aminosäure des Startkodons (Methionin) ist unterstrichen.

8.1.3 cDNA-Teilsequenz des AS-C aus *S. frugiperda*

| | | |
|----|--|-----|
| 5' | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGG | 51 |
| | GGTCATTTGCTTTCAAAAACCTTCGAGGGAGACCACGGAAGCACCAACTAC | 102 |
| | AACCTTCCGTAGTTACTAGTAAAAGTGATCCGTACTTTATTTACGTAAAC | 153 |
| | GAAACTCAGTTAGCTGCTGAATTTATTTTCGACGTGCAGATTTATAAAGTTC | 204 |
| | GAAGGATCACAATGAAAACGAGCGCGTACAACGTGTACCTGGGAGTCGTGG | 256 |
| | <u>M</u> K T S A Y N V Y L G V V | 13 |
| | CCGCCATGTTGGCTCTACTGTTTCGTACAATTAATGCTGCGCCAATGGAGG | 307 |
| | A A M L A L L F V T I N A ↓ A P M E | 30 |
| | CGGACGATGAGACGGCTGAGAACCCTCGTGGCGCATCCCGATGGTGACA | 358 |
| | A D D E T A E N T L V A H P D G D | 47 |
| | TGGAGCTCTCAGGCCCTGGGATGCTATCAACACTGCCGCTCTACGCAAAC | 409 |
| | M E L S G P W D A I N T A A L R K | 64 |
| | TGCTGCTGCAACTTGATGCAGAGGACAGGATGGGCGGGGTGACCCGCTCGT | 460 |
| | L L L Q L D A E D R M G G V T R S | 81 |
| | GGCCCAAGCTGAGCCCCGCGGTTGGGGTCTGCGGGCGTTGGACAGCCGTC | 511 |
| | W P Q A E P R G W G L R A L D S R | 98 |
| | TGGCGCGGCAGTGGAGGGCAGACAAGCGGCAGGTGCGATTCCGCCAGTGCT | 562 |
| | L A R Q W R A D K R Q V R F R Q C | 115 |
| | ACTTCAACCAATTTCTGCTTCCGCAAGTGAAAACAGCACCAACTCAACG | 613 |
| | Y F N <u>P I S C F</u> R K --- | 125 |
| | ACGCATCGACCTTTGACCTAGGGTAGCAAGAACGAATAAAACGTCGCCAT | 664 |
| | AATCTCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA '3 | 699 |

Abbildung: Darstellung eines Teilfragments der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der AS-C cDNA aus *Spodoptera frugiperda*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die basischen Spaltstellen sind grau unterlegt, das potentielle AS-C Peptid grau geschrieben. Die Aminosäure des Startkodons (Methionin) und das potentielle Polyadenylierungssignal sind unterstrichen.

8.1.4 cDNA-Teilsequenz des AT 2 aus *S. frugiperda*

5'TAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTC 51
 M H P T R W E L S H M V 12
 GACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATTCTAATACGACTCACTATA 102
 D L Q A A A N S L V I L I R L T I 29

GGGCAAGCAGTGGTAAAACGCAGAGTACGCGGGAACCCAATTCCTGCTTC15
3

G Q A V V **K R** R V R G N P I S C F 46
 CGCAAGAAGAAGCTGAAGGATTAAATTATTCTATTTCTTTCAATTGCATAG 204
 R K K K L K D----

CATTACCAATTTACCATCTTACATTTTGCTATTCATTTAATTAAGATGACA 255

AAATTAAATAAAAATGTAACAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 306

A`3

307

Abbildung: Darstellung eines Teilfragments der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der AT 2 cDNA aus *Spodoptera frugiperda*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die basischen Spaltstellen sind grau unterlegt, die potentiellen AT 2 Peptide grau geschrieben. Die Aminosäure des Startkodons (Methionin) und das potentielle Polyadenylierungssignal sind unterstrichen.

Literaturverzeichnis

- Abdel-latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2003**.
Molecular characterisation of cDNAs from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* encoding *Manduca sexta* allatotropin and allatostatin preprohormone peptides.
Insect Biochem. Mol. Biol. **33**, 467-476.
- Abdel-latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2004a**.
Expression and localization of the *Spodoptera frugiperda* allatotropin (Spofr-AT) and allatostatin (Spofr-As) genes.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **55**, 188-199.
- Abdel-latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2004b**.
Type-A allatostatins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: molecular cloning, expression and tissue-specific localization.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **56**, 120-132.
- Abdel-latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2004c**.
Characterization of a novel peptide with allatotropic activity in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*.
Regul. Peptides **122**, 69-78.
- Aguilar, R., Maestro, J.L., Vilaplana, L., Pascual, N., Piulachs, M.D., Bellés, X., **2003**.
Allatostatin gene expression in brain and midgut, and activity of synthetic allatostatins on feeding-related processes in the cockroach *Blattella germanica*.
Regul. Peptides **115**, 171-177.
- Aljamali, M.N., Bior, A.D., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., **2003**.
RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **12**, 299-305.
- Altstein, M., Ben-Aziz, O., Scheffler, I., Zeltser, I., Gilon, C., **2000**.
Advances in the application of neuropeptides in insect control.
Crop Protection **19**, 547-555.
- Amdam, G.V., Simoes, Z.L.P., Guidugli, K.R., Norberg, K., Omholt, S.W., **2003**.
Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA.
BMC Biotechnology **3**, 1-8.
- Araujo, R.N., Santos, A., Pinto, F.S., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., **2006**.
RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection.
Insect Biochem. Mol. Biol. **36**, 683-693.
- Audsley, N., Weaver, R.J., Edwards, J.P., **1998**.
Enzyme linked immunosorbent assay for *Manduca sexta* allatostatin (Mas-AS), isolation and measurement of Mas-AS immunoreactive peptide in *Lacanobia oleracea*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **28**, 775-784.
- Audsley, N., Weaver, R.J., Edwards, J.P., **1999**.
Juvenile hormone synthesis by corpora allata of tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae), and the effects of allatostatins and allatotropin *in vitro*.
Eur. J. Entomol. **96**, 287-293.

- Audsley, N., Weaver, R.J., Edwards, J.P., **2000a**.
Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 681–689.
- Audsley, N., Duve, H., Thorpe, A., Weaver, R.J., **2000b**.
Morphological and physiological comparisons of two types of allatostatin in the brain and retrocerebral complex of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae).
J. Comp. Neurol. **424**, 37-46.
- Audsley, N., Weaver, R.J., **2003a**.
A comparison of the neuropeptides from the retrocerebral complex of adult male and female *Manduca sexta* using MALDI-TOF mass spectrometry.
Regul. Peptides. **116**, 127-137.
- Audsley, N., Weaver, R.J., **2003b**.
Identification of neuropeptides from brains of larval *Manduca sexta* and *Lacanobia oleracea* using MALDI-TOF mass spectrometry and post-source decay.
Peptides **24**, 1465-1474.
- Audsley, N., Matthews, J., Weaver, R.J., **2005**.
Neuropeptides associated with the frontal ganglion of larval Lepidoptera.
Peptides **26**, 11-21.
- Audsley, N., Matthews, H.J., Price N.R., Weaver, R.J., **2008**
Allatostatin peptides in Lepidoptera, structures, distribution and functions.
J. Insect Physiol. **54**, 969-980.
- Auerswald, L., Birgül, N., Gäde, G., Kreienkamp, H.J., Richter, D., **2001**.
Structural, functional, and evolutionary characterization of novel members of the allatostatin receptor family from insects.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **282**, 904-909.
- Bayer, C., von Kalm, L., Fristrom, J.W., **1996**.
Gene regulation in imaginal disc and salivary gland development during *Drosophila*.
Metamorphosis **44a**, 321–361
- Bellés, X., Graham, L., Bendena, W.G., Ding, Q., Edwards, J.P., Weaver, R.J., Tobe, S.S., **1999**.
The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches.
Peptides. **20**, 11-22.
- Bellés, X., Maestro, J.L., **2005**.
Endocrine peptides and insect reproduction.
Invert. Reprod. Develop. **47**, 23-37.
- Bendena, W.G., Donly, B.C., Tobe, S.S., **1999**.
Allatostatins: a growing family of neuropeptides with structural and functional diversity.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **897**, 311-329.
- Berg, B.G., Schachtner, J., Utz, S., Homberg, U., **2006**.
Distribution of neuropeptides in the primary olfactory center of the heliothine moth *Heliothis virescens*.
Cell Tissue Res. **327**, 385-398.
- Birgersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., **1988**.
Chemie und Gesundheit.
VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Birgül, N., Weise, C., Kreienkamp, H.J., Richter, D., **1999**.
Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin like-neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/ galanin/opioid/ receptor family.
EMBO J. **18**, 5892–5900.

Blackburn, M.B., Wagner, R.M., Kochansky, J.P., Harrison, D.J., Thomas-Laemont, P., Raina, A.K., **1995**.

The identification of two myoinhibitory peptides, with sequence similarities to the galanins, isolated from the ventral nerve cord of *Manduca sexta*.

Regul. Peptides. **57**, 213–219.

Blackburn, M.B., Jaffe, H., Kochansky, J., Raina, A.K., **2001**.

Identification of four additional myoinhibitory peptides (MIPs) from the ventral nerve cord of *Manduca sexta*.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **48**, 121-128.

Bogus, M., Scheller, K., **1996**.

Allatotropin released by the brain controls larval moulting in *Galleria mellonella* by affecting juvenile hormone synthesis.

Int. J. Dev. Biol. **40**, 205-210.

Borovsky, D., Carlson, D.A., Hancock, R.G., Rembold, H., and Handel, E., **1994**.

De novo synthesis of juvenile hormone III and I by the accessory glands of the male mosquito.

Insect Biochem. Molec. Biol. **24**, 437-444.

Borovsky, D., Carlson, A., Ujvary, I., Prestwich, G.D., **1994**.

Biosynthesis of (10R)-juvenile hormone III from farnesoic acid by *Aedes aegypti* ovary.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **27**, 11-25.

Broeck, J.V., **2001**.

Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*.

Peptides **22**, 241–254

Browder, M.H., D'Amico, L.J., Nijhout, H.F., **2001**.

The role of low levels of juvenile hormone esterase in the metamorphosis of *Manduca sexta*.

J. Insect Sci. **11**, 5pp.

Buszczak, M., Freeman, M.R., Carlson, J.R., Bender, M., Cooley, L., Segraves, W.A., **1999**.

Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*.

Development **126**, 4581–4589.

Butenandt, A., Karlson, P., **1954**.

Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form.

Zeitschr.f. Naturforsch., Bd. **9b**, H.6, 389-391.

Cavener, R.D. **1987**.

Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates.

Nucl. Acid Res. **15**, 1353-1361.

Chintapalli, V.R., Wang, J., Dow, J.A.T., **2007**.

Using Fly Atlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease.

Nature Gen. **39**, 715-720.

Christie, A.E., **2008**.

In silico analyses of peptide paracrines/hormones in Aphidoidea.

Gen. Comp. Endocrinol. **159**, 67-79.

Cole, T.J., Ramaswamy, S.B., Srinivasan, A., Dorn, S., **2002**.

Juvenile hormone catabolism and oviposition in the codling moth, *Cydia pomonella*, as functions of age, mating status, and hormone treatment.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **49**, 10-21.

Cusson, M., Yu, C.G., Carruthers, K., Wyatt, G.R., Tobe, S.S., McNeil, J.N., **1994**.

Regulation of vitellogenin production in armyworm moths, *Pseudaletia unipuncta*.

J. Insect Physiol. **40**, 129–136.

Cusson, M., Palli, S.R., **2000**.

Can juvenile hormone research help rejuvenate integrated pest management ?
Can. Entomol. **132**, 263-280.

Cruz, J., Mane-Padros, D., Belles, X., Martin, D., **2006**.

Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi *in vivo*.
Dev. Biol. **297**, 158-171.

Cymborowski, B., Stolarz, G., **1979**.

The role of juvenile hormone during larval-pupal transformation of *Spodoptera littoralis* switch over in the sensitivity of the prothoracic gland to juvenile hormone.
J. Insect Physiol. **25**, 939- 942.

Davey, M., Duve, H., Thorpe, A., East, P., **1999**.

Characterization of the helicostatin peptide precursor gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).
Insect Biochem. Molec. Biol. **29**, 1119-1127.

Davis, N.T., Veenstra, J.A., Feyereisen, R., Hildebrand, J.G. **1997**.

Allatostatin-like-immunoreactive neurons of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and isolation and identification of a new neuropeptide related to cockroach allatostatins.
J. Comp. Neurol. **385**, 265-284.

Davis, N.T., Blackburn, M.B., Golubeva, E.G., Hildebrand, J.G., **2003**.

Localization of myoinhibitory peptide immunoreactivity in *Manduca sexta* and *Bombyx mori*, with indications that the peptide has a role in molting and ecdysis.
J. Exp. Biol. **206**, 1449-1460.

De Kort, C.A.D., Granger, N.A. **1996**.

Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **33**, 1-26.

DeLoof, A., Baggerman, G., Breuer, M., Claeys, I., Cerstiaens, A., Clynen, E., Janssen, T., Schoofs, L., Vanden Broeck, J., **2001**.

Gonadotropins in insects: An overview.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **47**, 129-138.

Denlinger, D.L., **1985**.

Hormonal control of diapause. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.)
Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol., **8**. Pergamon, Oxford. pp. 353-412.

Ding, Q., Donly, B.C., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **1995**.

Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach, *Periplaneta americana*.
Eur. J. Biochem. **234**, 737-746.

Dirksen, H., Skiebe, P., Abel, B., Agricola, H., Buchner, K., Muren, J.E., Nässel, D., **1999**.

Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*.
Peptides **20**, 695-712.

Dong, Y., Friedrich, M., **2005**.

Nymphal RNAi: Systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper.
BMC Biotechnol **5**:25.

Donly, B.C., Ding, Q., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **1993**.

Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach, *Diploptera punctata*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8807-8811.

- Duve, H., Johnsen, A.H., Scott, A. G., Yu, C.G., Yagi, K.J., Tobe, S.S., Thorpe, A. **1993**.
Callatostatins: neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 2456-2460.
- Duve, H., Johnsen, A.H., Maestro, J.L., Scott, A.G., Jaros, P.P., Thorpe, A., **1997b**.
Isolation and identification of multiple neuropeptides of the allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas*.
Eur. J. Biochem. **250**, 727–734.
- Duve, H., East, P., Thorpe, A., **1999**.
Regulation of Lepidopteran foregut movement by allatostatins and allatotropin from the frontal ganglion.
J. Comp. Neurol. **413**, 405-416.
- Duve, H., Johnsen, A.H., Scott, A.G., Thorpe, A., **2002**.
Allatostatins of the tiger prawn, *Penaeus monodon* (Crustacea: Penaeidea).
Peptides **23**, 1039–1051.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., Manev, H., **2001**.
Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system.
Molec. Psych. **6**, 665-670.
- East, P.D., Tregenza, K., Duve, H., Thorpe, A., **1996**.
Identification of the dipteran leu-callatostatin peptide family: characterization of the prohormone gene from *Calliphora vomitoria* und *Lucilia cuprina*.
Regul. Peptides **67**, 1-9.
- Edwards, J.P., Corbitt, T.S., McArdle, H.F., Short, J.E., Weaver, R.J., **1995**.
Endogenous levels of insects juvenile hormones in larval, pupal and adult stages of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*.
J. Insect Physiol. **41**, 641–651.
- Edwards, J.P., Audsley, N., Marris, G.C., Cusson, M., Weaver, R.J., **2001**.
The role of allatostatic and allatotropic neuropeptides in the regulation of juvenile hormone biosynthesis in *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae).
Peptides **22**, 225–261.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., **2001**.
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
Nature **411**, 494–498.
- Elekonich, M.M., Horodysky, F.M., **2003**.
Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla.
Peptides **24**, 1623-1632.
- Engelmann, F., **1970**.
The physiology of insect reproduction.
Pergamon Press, Oxford.
- Ewer, J., Wang, C.M., Klukas, K.A., Mesce, K.A., Truman, J.W. and Fahrbach, S.E. **1998**.
Programmed cell death of identified peptidergic neurons involved in ecdysis behavior in the moth, *Manduca sexta*.
J. Neurobiol. **37**, 265-280.
- Farooqui, T., Vaessin, H., Smith, B.H., **2004**.
Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference.
J. Insect Physiol. **50**, 701–713.

Feyereisen, R., **1985**.

Regulation of juvenile hormone titer: synthesis. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I.(Eds). *Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* Vol. 7. Pergamon Press, Oxford, pp. 391–403.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., **1998**.

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.

Fu, Q., Kutz, K.K., Schmidt, J.J., Hsu, Y.W.A., Messinger, D.I., Cain, S.D., De la Iglesia, H.O., Christie, A.E., Li, L.J., **2005**.

Hormone complement of the *Cancer productus* sinus gland and pericardial organ: An anatomical and mass spectrometric investigation. *J. Comp. Neurol.* **493**, 607-626.

Fusé, M., Zhang, J.R., Partridge, E., Nachman, R.J., Orchard, I., Bendena, W.G., Tobe, S.S., **1999**.

Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. *Peptides* **20**, 1285–1293.

Gäde, G., Hoffmann, K.H., Spring, J., **1997**.

Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol. Rev.* **77**, 963–1032.

Gäde, G., **2002**.

Allateregulatory peptides: molecules with multiple functions. *Invertebr. Reprod. Dev.* **41**, 127–135.

Gäde, G., Goldsworthy, G.J., **2003**.

Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag. Sci.* **59**, 1063-1075.

Gäde, G., Hoffmann, K.H., **2005**.

Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.* **30**, 103–121.

Gammie, S.C., Truman, J.W., **1997**.

Neuropeptide hierarchies and the activation of sequential motor behaviors in the hawkmoth, *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* **17**, 4389-4397.

Garside, C.S., Hayes, T.K., Tobe, S.S., **1997a**.

Degradation of dip-allatostatins by hemolymph from the cockroach, *Diploptera punctata*. *Peptides* **18**, 17-25.

Garside, C.S., Hayes, T.K., Tobe, S.S., **1997b**.

Inactivation of dip-allatostatin 5 by membrane preparations from the cockroach *Diploptera punctata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**, 258-270.

Gelbic, I., Sehna, F., **1973**.

Effects of juvenile hormone mimics on the codling moth, *Cydia pomonella* (L) (Lep., Olethreutidae). *Bulletin of Entomological Research* **63**, 7–16.

Gelman, D.B., Woods, C.W., Loeb, M.J., Borkovec, A.B., **1989**.

Ecdysteroid synthesis by testes of 5th instars and pupae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *Invert. Reprod. Develop.* **15**, 177–184.

- Gilbert, L.I., Rybczynski, R., Song, Q., **2000a**.
Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 1079-1089.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., **2000b**.
The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 617-644.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R., Warren, J.T., **2002**.
Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway.
Ann. Rev. Entomol. **47**, 883-916.
- Gillott, C., **2003**.
Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior.
Ann. Rev. Entomol. **48**, 163–84.
- Girardie, J., Richard, O., Girardie, A., **1996**.
Detection of vitellogenin in the haemolymph of larval female locusts (*Locusta migratoria*) treated with the neurohormone, Lom OMP.
J. Insect Physiol. **42**, 107-113.
- Goodman, W.G., Granger, N.A., **2005**.
The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I., Latrou, K., Gill, S.S.(Eds.)
Comp. Molec. Insect Sci., **3**. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 319-408.
- Goto, A., Blandin, S., Royet, J., Reichhart, J.-M., Levashina, E.A., **2003**.
Silencing of Toll pathway components by direct injection of doublestranded RNA into *Drosophila* adult flies.
Nucl. Acids Res. **31**, 6619–6623.
- Griebler, M., Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H., Meyering-Vos, M., **2008**.
RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph.
J. Insect Physiol. **54**, 997– 1007.
- Grieneisen, M.L., **1994**.
Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans.
Insect Biochem. Molec. Biol. **24**, 115-132.
- Gullan, P.J. , Cranston, P.S., **2000**.
The Insects: An Outline of Entomology, second edition, pages 58, 135. Blackwell Science Ltd, USA.
- Gvakharia, B.O., Bebas, P., Cymborowski, B., Giebultowicz, J.M., **2003**.
Disruption of sperm release from insect testes by cytochalasin an β -actin mRNA mediated interference.
Cell. Mol. Life Sci. **60**, 1744–1751.
- Hagedorn, H.H., **1985**.
The role of ecdysteroids in reproduction.
In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comprehensive Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **8**. Pergamon, Oxford, pp. 205-262.
- Hammock, B.D., **1985**.
The role of juvenile hormone titer: degradation.
Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol. Eds. Kerkut GA and Gilbert LI. Vol. 8, Pergamon Press, Oxford
- Hatakoshi, M., **1992**.
An inhibitory mechanism over oviposition in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* by juvenile hormone analogue pyriproxyfen.
J. Insect Physiol. **38**, 793–801.

Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Y., Li, B., Tanaka, Y., Predel, R., Neupert, S., Schachtner, J., Verleyen, P., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2008**.
A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*.
Front. Neuroend. **29**, 142–165.

Herman, W.S., Barker, J.F., **1977**.
Effect of mating on monarch butterfly oogenesis.
Experientia **33**, 688-689.

Hewes, R.S., Taghert, P.H., **2001**.
Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome.
Genome Res. **11**, 1126-1142.

Hodkova, M., Okuda, T., Wagner, R., **1996**.
Stimulation of corpora allata by extract from neuroendocrine complex; comparison of reproducing and diapausing *Pyrrhocoris apterus* (Homoptera: Pyrrhocoridae).
Eur. J. Entomol. **93**, 535-543.

Hoffmann, K.H., Lorenz, M.W., **1998**.
Recent advances in hormones in insect pest control.
Phytoparasitica **26**, 323-330.

Hoffmann, K.H., Meyering-Vos, B., Lorenz, M.W., **1999**.
Allatostatins and allatotropins: is the regulation of corpora allata activity their primary function?
Eur. J. Entomol. **96**, 255–266.

Hoffmann, K.H., Gerstenlauer, M., **1999**.
Effects of Ovariectomy and allatectomy on ecdysteroid synthesis and ecdysteroid titres during larval-adult development of *Gryllus bimaculatus de Geer* (Ensifera: Gryllidae).
Arch. Insect Biochem. Physiol. **35**, 149-158.

Horodyski, F.M., Bhatt, S.R., Lee, K.Y., **2001**.
Alternative splicing of transcripts by *Manduca sexta* allatotropin (Mas-AT) gene is regulated in a tissue-specific manner.
Peptides **22**, 263-269.

Hua, Y.J., Tanaka, Y., Nakamura, K., Sakakibara, M., Nagata, S., Kataoka, H., **1999**.
Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*.
J. Biol. Chem. **274**, 31169–31173.

Hummon, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E., Sweedler, J.V., **2006**.
From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain.
Science **314**, 647-649.

Ilenchuk, T.T., Davey, K.G., **1987**.
The binding of juvenile hormone to membranes of follicle cells in the insect *Rhodnius prolixus*.
Can. J. Biochem. Cell. Biol. **63**, 102-106.

Jansons, I.S., Cusson, M., McNeil, J.N., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **1996**.
Molecular characterization of a cDNA from *Pseudaletia unipuncta* encoding the *Manduca sexta* allatostatin peptide (Mas-AST).
Insect Biochem. Molec. Biol. **26**, 767–773.

Jarvis, T.D., Earley, F.G.P., Rees, H.H., **1994**.
Ecdysteroid biosynthesis in larval testes of *Spodoptera littoralis*.
Insect Biochem. Molec. Biol. **24**, 531-537.

Johnson, E.C., Bohn, L.M., Barak, L.S., Birse, R.T., Nässel, D.R., Caron, M.G., Taghert, P.H., **2003**.
Identification of *Drosophila* neuropeptide receptors by G protein-coupled receptors-beta-arrestin 2 interactions.
J. Biol. Chem. **278**, 52172-52178.

- Karim, S., Ramakrishnan, V.G, Tucker, J.S., Essenberg, R.C., Sauer, J.R., **2004**.
Amblyomma americanum salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE(2) stimulated protein secretion.
Insect Biochem. Mol. Biol. **34**, 407–413.
- Kataoka, H., Toschi, A., Li, J.P., Carney, R.L., Schooley, D.A., Kramer, S.J., **1989**.
Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*.
Science **243**, 1481–1483.
- Khalil, S.M.S., Anspaugh, D.D., Roe, R.M., **2006**.
Role of juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase in reproduction of the cotton bollworm, *Helicoverpa zea*.
J. Insect Physiol. **52**, 669–678.
- Kim, M.H., Joo, C.H., Cho, M.Y., Kwon, T.H., Lee, K.M., Natori, S., Lee, T.H., Lee, B.L., **2000**.
Bacterial-injection-induced syntheses of *N*-alanyldopamine and dopa decarboxylase in the hemolymph of coleopteran insect, *Tenebrio molitor*, larvae.
Eur. J. Biochem. **267**, 2599–2608.
- Kiss, I., Szabad, J., Major, J., **1978**.
Genetic and developmental analysis of puparium formation in *Drosophila*.
Mol. Gen. Genet. **164**, 77-83.
- Koepppe, J.K., Fuchs, M., Chen, T.T., Hunt, L.M., Kovalick, G.E., Briers, T., **1985**.
The role of juvenile hormone in reproduction. In: Kerkut, G.A., Gilbert, I. (Eds.)
Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol., **8**. Pergamon, Oxford, pp. 166–203.
- Koladich, P.M., Cusson, M., Bendena, W.G., Tobe, S.S., McNeil, J.N., **2002**.
Cardio-acceleratory effects of *Manduca sexta* allatotropin in the true armyworm moth *Pseudaletia unipuncta*.
Peptides **23**, 645–651.
- Koolman, J., Scheller, K., Bodenstein, D., **1979**.
Ecdysteroids in the adult male blowfly, *Calliphora vicina*.
Experientia **35**, 134-135.
- Koolman, J., **1982**.
Ecdysone in metabolism.
Insect Biochem. **12**, 225-250.
- Kramer, S.J., Toschi, A., Miller, C.A., Kataoka, H., Quistad, G.B., Li, J.P., Carney R.L., Schooley D.A., **1991**.
Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 9458–9462.
- Kreienkamp, H.J., Larusson, H.J., Witte, I., Roeder, T., Birgul, N., Honck, H.H., Harder, S., Ellinghausen, G., Buck, F., Richter, D., **2002**.
Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, Drostar1 and -2, from *Drosophila melanogaster* and their ligands by reverse pharmacology.
J. Biol. Chem. **277**, 39937-39943.
- Lafont, R., Horn, D.H.S., **1989**.
Phytoecdysteroids: Structures and occurrence. In Koolman, J. (Ed) Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action. Stuttgart; Georg Thieme Verlag, pp. 39-64.
- Lam, G., Thummel, C.S., **2000**.
Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*.
Curr. Biol. **10**, 957-963.

- Larsen, M.J., Burton, K.J., Zantello, M.R., Smith, V.G., Lowery, D.L., Kubiak, T.M., **2001**.
Type A allatostatins from *Drosophila melanogaster* and *Diptera punctata* activate two *Drosophila* allatostatin receptors, DAR-1 and DAR-2, expressed in CHO cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **286**, 895-901.
- LaTreille, P., Sellyes, L., Elliot, G., **1997**.
The sequence of *C. elegans* cosmid T23E7. Genbank accession nr. AFO26205, unpublished.
- Lee, K.Y., Horodyski, F.M., Chamberlin, M.E., **1998**.
Inhibition of midgut ion transport by allatotropin (Mas-AT) and *Manduca* FLRFamides in the tobacco hornworm *Manduca sexta*.
J. Exp. Biol. **201**, 3067–3074.
- Lee, K.Y., Horodyski, F.M., **2002**.
Restriction of nutrient intake results in the increase of a specific *Manduca sexta* allatotropin (Manse-AT) mRNA in the larval nerve cord.
Peptides **23**, 653-661.
- Lehmberg, E., Ferenz, H.J., Applebaum, S.W., **1992**.
Maturation and responsiveness to extracts of corpora allata from male *Locusta migratoria* containing allatotrophic factors.
Z. Naturforsch. **47**, 191-196.
- Lenz, C., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2000a**.
Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **273**, 1126–1131.
- Lenz, C., Sondergaard, L., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2000b**.
Molecular cloning and genomic organization of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to mammalian galanin receptors.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **269**, 91-96.
- Lenz, C., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2000c**.
Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **273**, 571-577.
- Lenz, C.; Williamson, M.; Hansen, G.N.; Grimmelikhuijzen, C.J. **2001**.
Identification of four *Drosophila* allatostatins as the cognate ligands for the *Drosophila* orphan receptor DAR-2.
Biophys. Res. Commun. **286**, 1117-1122.
- Li, S., Jiang, R.-J., Cao, M.-X., **2002a**.
Developmental changes in the ability to synthesize juvenile hormone *in vitro* by corpora allata from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae).
Eur. J. Entomol. **99**, 413-419.
- Li, S., Jiang, R.-J., Cao, M.-X., **2002b**.
Allatotrophic and allatostatic activities in extracts of brain and the effects of *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin on juvenile hormone synthesis *in vitro* by corpora allata from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.
Physiol. Entomol. **27**, 322-329.
- Li, Y.P., Unnithan, G.C., Veenstra, J.A., Feyereisen, R., Noriega, F.G., **2003**.
Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti in vitro*: effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin.
J. Exp. Biol. **206**, 1825-1832.

Li, Y., Hernández-Martínez, S., Noriega, F.G., **2004**.

Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes: effect of allatostatic head factors, PISCF- and YXFGL-amide allatostatins.

Regul. Peptides **118**, 175-182.

Li, Y., Hernandez-Martinez, S., Fernandez, F., Mayoral, J.G., Topalis, P., Priestap, H, Perez, M., Navare, A., Noriega, F. G., **2006**.

Biochemical, molecular, and functional characterization of PISCF-allatostatin, a regulator of juvenile hormone biosynthesis in the mosquito *Aedes aegypti*.

J. Biol. Chem. **281**, 34048-34055.

Li, B., Predel, R., Neupert, S., Hauser, F., Tanaka, Y., Cazzamali, G., Williamson, M.,

Arakane, Y., Verleyen, P., Schoofs, L., Schachtner, J., Grimmeliikhuijzen, C.J.P., Park, Y. **2008**.

Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*.

Genome Res. **18**, 113-122.

Loeb, M.J., Brandt, E.P., Birnbaum, M.J., **1984**.

Ecdysteroid production by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, from last larval instar to adult.

J. Insect Physiol. **30**, 375-381.

Loeb, M.J., Brandt, E.P., Woods, C.W., Bell, R.A., **1988**.

Secretion of ecdysteroid by sheaths of testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and its regulation by testis ecdysiotropin.

J. Exp. Zool. **248**, 94–100.

Loeb, M.J., Woods, C.W., Brandt, E.P., Borkovec, A.B., **1982**.

Larval testes of the Tobacco Budworm: a new source of insect ecdysteroids.

Science **218**, 896-898.

Loeb, M.J., DeLoof, A., Gelman, D.B., Hakim, R.S., Jaffe, H., Kochamnsky, J.P., Meola, S.M., Schoofs, L., Steel, C., Vafopoulou, X., Wagner, R.M., Woods, C.W., **2001**.

Testis ecdysiotropin, an insect gonadotropin that induces synthesis of ecdysteroid.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **47**, 181-188.

Loher, W., Schooley, D.A., Baker, F.C., **1987**.

Influence of the ovaries on JH titer in *Teleogryllus commodus*.

Insect Biochem. **17**, 1099-1102.

Lorenz, M.W., Hoffmann, K.H., **1995**.

Allatotrophic activity in the subesophageal ganglia of crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Acheta domesticus* (Ensifera: Gryllidae).

J. Insect Physiol. **41**, 191–196.

Lorenz, M.W., Kellner, R., Hoffmann, K.H., **1995a**.

Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera: Gryllidae): additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis.

Regul. Peptides **57**, 227–236.

Lorenz, M.W., Kellner, R., Hoffmann, K.H., **1995b**.

A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*.

J. Biol. Chem. **270**, 21103–21108.

Lorenz, J.I., Lorenz, M.W., Hoffmann, K.H., **1997**.

Factors regulating juvenile hormone biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae).

Eur. J. Entomol. **94**, 369–379.

Lorenz, M.W., Lorenz, J.I., Treiblmayr, K., Hoffmann, K.H., **1998**.

In vivo effects of allatostatins in crickets, *Gryllus bimaculatus*.

Arch. Insect Biochem. Physiol. **38**, 32–43.

- Lorenz, M.W., Kellner, R., Hoffmann, K.H., **1999**.
Cricket allatostatins: new structures and physiological properties.
Eur. J. Entomol. **96**, 267–274.
- Lorenz, M.W., Kellner, R., Hoffmann, K.G., Gäde, G., **2000**.
Identification of multiple peptides homologous to cockroach and cricket allatostatins in the stick insect *Carausius morosus*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 711–718.
- Lungchukiet, P., Donly, B.C., Zhang, J., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **2008**.
Molecular cloning and characterization of an allatostatin-like receptor in the cockroach *Diploptera punctata*.
Peptides **29**, 276–285.
- Maestro, J.L., Bellés, X., **2006**.
Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **62**, 73–79.
- Martín, D., Piulachs, M.D., Bellés, X., **1996**.
Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach.
Mol. Cell. Endocrinol. **121**, 191–196.
- Martín, D., Piulachs, M.D., Bellés, X., **1998**.
Allatostatin inhibits vitellogenin release in a cockroach.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **839**, 341–342.
- Martin D., Maestro O., Cruz J., Mané-Padrós D., Bellés X., **2006**.
RNAi studies reveal a conserved role for PXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*.
J. Insect Physiol. **52**: 410-416.
- Masner, P., Angst, P., Dorn, S., **1987**.
Fenoxycarb, an insect growth regulator with juvenile hormone activity: A candidate for *Heliothis virescens* (F.) control on cotton.
Pestic. Sci. **18**, 89–94.
- Matolín S, Gelbic I., **1975**.
The ovicidal and sterilant effects of juvenoids on the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera, Tortricidae).
Acta Ent. Bohemoslov. **72**, 360–369.
- Mbata, G.N., Ramaswamy, S.B., **1990**.
Rhythmicity of sex pheromone content in female *Heliothis virescens*: impact of mating. *Physiological Entomology* **15**, 423–432.
- McNeil, J.N., Tobe, S.S., **2001**.
Flights of fancy: possible roles of allatostatin and allatotropin in migration and reproductive success of *Pseudaletia unipuncta*.
Peptides **22**, 271–277.
- Meister, G., Tuschl, T., **2004**.
Mechanism of gene silencing by doublestranded RNA.
Nature **431**, 343–349.
- Mello, C.C., Conte Jr., D., **2004**.
Revealing the world of RNA interference.
Nature **431**, 338–342.
- Merte, J., Nichols, R., **2002**.
Drosophila melanogaster myotropins have unique functions and signaling pathways.
Peptides **23**, 757-763.

- Meyering-Vos, M., Xionghua, W., Huang, J., Jindra, M., Hoffmann, K.H., Sehnal, F., **2001**.
The allatostatin gene of the cricket *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae).
Mol. Cell. Endocrinol. **184**, 103-114.
- Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2003**.
Expression of allatostatins in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae).
Comp. Biochem. Physiol. B **136**, 207-215.
- Meyering-Vos, M., Merz, S., Sertkol, M., Hoffmann, K.H., **2006**.
Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **36**, 492-504.
- Meyering-Vos, M., Müller, A., **2007b**.
RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*.
J. Insect Physiol. **53**, 840–848.
- Montgomery, M.K., Xu, S.Q., Fire, A., **1998**.
RNA as a target of double stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 15502-15507.
- Nässel, D.R., **1999**.
Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review.
Peptides **20**, 141-158.
- Nässel, D.R., **2002**.
Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones.
Prog. Neurobiol. **68**, 1-84.
- Nässel, D.R., Homberg, U., **2006**.
Neuropeptides in interneurons of the insect brain.
Cell Tissue Res. **326**, 1-24.
- Nijhout, H.F., Reed, M. C., **2007**.
A mathematical model for the regulation of juvenile hormone titers.
J. Insect Physiol. **54**, 255-264.
- Nijhout, H.F., Williams, C.M., **1974**.
Control of molting and metamorphosis in tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L)—cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation.
J. Exp. Biol. **61**, 493–501.
- Nijhout, H.F., **1994**.
Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton, N.J. 280 p.
- Nijhout, H.F., **1998**.
Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Nishikawa, T., Natori, S., **2001**.
Targeted disruption of a pupal hemocyte protein of *Sarcophaga* by RNA interference.
Eur. J. Biochem. **268**, 5295-5299.
- Nowock, J., **1972**.
Induction of imaginal differentiation by ecdysone in the testes of *Ephestia kuhniella*.
J. Insect Physiol. **18**, 1699-1704.
- Nowock, J., **1973**.
Growth and metamorphosis in the testes of *Ephestia kuhniella* *in vitro*.
J. Insect Physiol. **19**, 941-949.

O'Connor, J.D., **1985**.

Ecdysteroid action at the molecular level. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **2**, Pergamon, Oxford, pp. 85-98.

Oeh, U., Lorenz, M.W., Dyker, H., Lösel, P., Hoffmann, K.H., **2000**.

Interaction between *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 719–727.

Oeh, U., Dyker, H., Lösel, P., Hoffmann, K.H., **2001**.

In vivo effects of *Manduca sexta* allatotropin and allatostatin on the development and reproduction in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).
Invertebr. Reprod. Dev. **39**, 239–247.

Oeh, U., Antonicek, H., Nauen, R., **2003**.

Myotropic effect of helicokinins, tachykinin-related peptides and *Manduca sexta* allatotropin on the gut of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae).
J. Insect Physiol. **49**, 323–337.

Orchard, I., Lange, A.B., Bendena, W.G., **2001**.

FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects.
Adv. Insect Physiol. **28**, 267-329.

Oster, A., Leah, J.D., Baggerman, G., Dirksen, H., **2002**.

Allatostatin-like immunoreactive peptides in the rat brain: Evidence from purified extracts and immunohistochemistry.
Meeting report, 21st Conf. of Europ. Comp. Endocrinol., Bonn, p. 154.

Paemen, L., Tips, A., Schoofs, L., Proost, P., VanDamme, J., DeLoof, A., **1991**.

Lom-AG-myotropin: a novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*.
Peptides **12**, 7–10.

Park, Y.I., Ramaswamy, S.B., **1998**.

Role of brain, ventral nerve cord, and corpora cardiaca corpora allata complex in the reproductive behavior of female tobacco budworm (Lepidoptera, Noctuidae).
Ann. Entomol. Soc. Amer. **91**; 329-334.

Park, Y.I., Ramaswamy, S.B., Srinivasan, A., **1998**.

Spermatophore formation and regulation of egg maturation and oviposition in female *Heliothis virescens* by the male.
J. Insect Physiol. **44**; 903-908.

Park, J.Y., Shu, S., Ramaswamy, S.B., Srinivasan, A., **1998**.

Mating in *Heliothis virescens*: Transfer of juvenile hormone during copulation by male to female and stimulation of biosynthesis of endogenous juvenile hormone.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **38**, 100–107.

Park, C., Hwang, J.S., Kang, S.W., Lee, B.H., **2002**.

Molecular characterization of a cDNA from the silk moth *Bombyx mori* encoding *Manduca sexta* allatotropin peptide.
Zool. Sci. **19**, 287-292.

Pitre, H.N., Hogg, D.B., **1983**.

Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn.
J. Georgia Entomol. Soc. **18**, 187-194.

Peralta, E., Vilaplana, L., Pascual, N., Carreno, C., Piulachs, M.D., Andreu, D., Bellés, X., **2000**.

A microdialysis study of allatostatin degradation in *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae).
Physiol. Entomol. **25**, 254-259.

- Persson, M.G.B., Nässel, D.R., **1999**.
Neuropeptides in insect sensory neurones: Tachykinin-, FMRFamide- and allatotropin-related peptides in terminals of locust thoracic sensory afferents.
Brain Res. **816**, 131-141.
- Pfaffl, M.W., **2001**.
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucl. Acids Res. **29**, 2002-2007.
- Predel, R., Eckert, M., **2000**.
Neurosecretion: peptidergic systems in insects.
Naturwissenschaften **87**, 343-350.
- Predel, R., Rapus, J., Eckert, M., **2001**.
Myoinhibitory neuropeptides in the American cockroach.
Peptides **22**, 199–208.
- Price, M.D., Merte, J., Nichols, R., Koladich, P.M., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **2002**.
Drosophila melanogaster flatline encodes a myotropin orthologue to *Manduca sexta* allatostatin.
Peptides **23**, 787-794.
- Pszczolkowski, M.A., Tucker, A., Srinivasan, A., B. Ramaswamy, S.B., **2006**.
On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*.
J. Insect Physiol. **52**, 786-794.
- Rachinsky, A., Tobe, S.S., Feldlaufer, M.F., **2000**.
Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): developmental changes in sensitivity to JH precursor and allatotropin.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 729-737.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, K., **2002**.
Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor.
J. Biol. Chem. **49**, 46849-46851.
- Ramaswamy, S.B., Mbata, G.N., Cohen, N.E., **1990**.
Necessity of juvenile hormone for choriogenesis in the moth *Heliothis virescens* (Noctuidae).
Invertebr. Reprod. Dev. **17**, 57–63.
- Ramaswamy, S.B., Cohen, N.E., **1990**.
Comparative activity of juvenile hormone I, II and III in promoting egg maturation in the moth *Heliothis virescens* (Noctuidae).
Zool. Sci. **8**, 747-750.
- Ramaswamy, S.B., Cohen, N.E., **1992**.
Ecdysone: an inhibitor of receptivity in the moth, *Heliothis virescens* ?
Naturwissenschaften **79**, 29–31.
- Ramaswamy, S.B., Mbata, G.N., Cohen, N.E., Moore, A., Cox, N.M., **1994**.
Pheromonotropic and pheromonostatic activity in moths.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **25**, 301-315.
- Ramaswamy, S.B., Qiu, Y., Park, Y.I., **1996**.
Neuronal control of postcoital pheromone production in the moth *Heliothis virescens*.
J. Exp. Biol. **274**, 255–263.
- Ramaswamy, S.B., Shu, S., Mbata, G.N., Rachinsky, A., Park, Y.I., Crigler, L., Donald, S., Srinivasan, A., **2000**.
Role of juvenile hormone esterase in mating-stimulated egg development in the moth *Heliothis virescens*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 785–791.

- Ramaswamy, S.B., Shu, S.Q., Park, Y.I., Zeng, F.R., **1997**.
Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **35**, 539–558.
- Range, S., Oeh, U., Lorenz, M.W., Etzel, W., Nauen, R., Hoffmann, K.H., **2002**.
Juvenile hormone biosynthesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).
Comp. Biochem. Physiol. **132** B, 191–202.
- Rankin, S.M., Stay, B., **1984**.
The changing effect of the ovary on rates of juvenile hormone synthesis in *Diploptera punctata*.
Gen. Comp. Endocrinol. **54**, 382–388.
- Rees, H.H., **1989**.
Pathways of biosynthesis of ecdysone. In: Koolman, J. (Ed) Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action. Thieme, Stuttgart, pp. 152-160.
- Richard, D.S., Watkins, N.L., Serafin, R.B., Gilbert, L.I., **1998**.
Ecdysteroids regulate yolk protein uptake in *Drosophila melanogaster* oocytes.
J. Insect Physiol. **44**, 637-644.
- Riddiford, L.M., **1985**.
Hormone action at the cellular level. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **8**. Pergamon, Oxford, pp. 37-84.
- Riddiford, L.M., **1994**.
Cellular and molecular actions of the juvenile hormones. I. General considerations and premetamorphic actions.
Adv. Insect Physiol. **224**, 213-274.
- Riddiford, L.M., **1996**.
Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In: Gilbert, L.I., Tata, J.R., Atkinson, B.G. (Eds) *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells*. Academic Press, San Diego, pp. 223-251.
- Riehle, M.A., Garczynski, S.F., Crim, J.W., Hill, C.A., Brown, M.R., **2002**.
Neuropeptides and peptide hormones in *Anopheles gambiae*.
Science **298**, 172-175.
- Roe, R.M., Venkatesh, K. **1990**.
Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. Ed. Gupta AP. Vol. 1, Rutgers University Press, New Brunswick
- Roe, R.M., Jesudason, P., Venkatesh, K., Kallapur, V.L., Anspaugh, D.D., Majumder, C., **1993**.
Developmental role of juvenile hormone metabolism in lepidoptera.
Amer. Zool. **33**, 375-383.
- Romaña, I., Pascal, N., Bellés, X., **1995**.
The ovary is a source of circulating ecdysteroids in *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae).
Eur. J. Entomol. **92**, 93-103.
- Rudwall, A.J., Sliwowska, J., Nässel, D.R., **2000**.
Allatotropin-like neuropeptide in the cockroach abdominal nervous system: myotropic actions, sexually dimorphic distribution and colocalization with serotonin.
J. Comp. Neurol. **428**, 159-173.
- Sakai, T., Satake, H., Takeda, M., **2006**.
Nutrient-induced α -amylase and protease activity is regulated by crustacean cardioactive peptide (CCAP) in the cockroach midgut.
Peptides, **27**, 2157-2164.

- Satyanarayana, K., Yu, J.H., Bhaskaran, G., Dahm, K.H., Meola, R., **1991**.
Hormonal control of egg maturation in the corn earworm, *Heliothis zea*.
Entomol. Exp. Appl. **59**, 135-143.
- Satyanarayana, K., Yu, J.H., Bhaskaran, G., Dahm, K.H., Meola, R., **1992**.
Regulation of vitellogenin synthesis by juvenile hormone in the corn earworm, *Heliothis zea*.
Invert. Reprod. Develop. **21**, 169-178.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Nachman, R.J., DeLoof, A., **1991**.
Isolation, identification and synthesis of locustamyoinhibiting peptide (Lom-MIP), a novel biologically active neuropeptide from *Locusta migratoria*.
Regul. Pept. **36**, 111-119.
- Schoofs, L., Vanden Broeck, J., DeLoof, A., **1993**.
The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: Structures, distribution and receptors.
Insect Biochem. Mol. Biol. **23**, 859-881.
- Schoofs, L., Veelaert, D., Vanden Broeck, J, DeLoof, A., **1996**.
Immunocytochemical distribution of locustamyoinhibiting peptide (Lom-MIP) in the nervous system of *Locusta migratoria*.
Regul. Pept. **63**, 171-179.
- Secher, T., Lenz, C., Cazzamali, G., Sorensen, G., Williamson, M., Hansen, G.N., Svane, P., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2001**.
Molecular cloning of a functional allatostatin gut/brain receptor and an allatostatin preprohormone from the silkworm *Bombyx mori*.
J. Biol. Chem. **276**, 47052-47060.
- Sehnal, F., Shinyaeva, L.I., Kozhanova, N.I., Pralja, I.I., Burov, V.N., **1989**.
The blocking of early gametogenesis in *Hyphantria cunea* by juvenoid application to larvae.
Regulation of Insect Reproduction IV; Academia Publ. House Praha; pp. 209-220.
- Sekul, A.A., Sparks, A.N., **1976**.
Sex attractant of the fall armyworm moth.
USDA Tech. Bull. 1542 6p
- Sparks, A.N., **1979**.
A review of the biology of the fall armyworm.
Florida Entomol. **62**, 82-86.
- Seth, R.K., Rao, D.K., Reynolds, S.E., **2002**.
Movement of spermatozoa in the reproductive tract of adult male *Spodoptera litura*: daily rhythm of sperm descent and the effect of light regime on male reproduction.
J. Insect Physiol. **48**, 119-131.
- Seth, R.K., Kaur, J.J., Rao, D.K., Reynolds, S.E., **2002**.
Sperm transfer during mating, movement of sperm in the female reproductive tract, and sperm precedence in the common cutworm *Spodoptera litura*.
Physiol. Entomol. **27**, 1-14.
- Sheng, Z., Ma, L., Cao, M.-X., Li, S., Jiang, R.-J., **2007**.
Biochemical and molecular characterization of allatotropin and allatostatin from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.
Insect Biochem. Mol. Biol. **37**, 90-96.
- Shimizu, T., Moribayashi, A., Agui, N., **1985**.
In vitro analysis of spermiogenesis and testicular ecdysteroids in the cabbage army worm, *Mamestra brassicae*.
L. Appl Ent Zool. **20**, 56-61.

Shimizu T, Yagi S, Agui N. **1989.**

The relationship of testicular and hemolymph ecdysteroid titer to spermiogenesis in the common armyworm, *Leucania separata*.
Entomol. Exp. Appl. **50**, 195–198.

Shirk, P.D., Bhaskaran, G., Röller, H., **1980.**

The transfer of juvenile hormone from male to female during mating in the *Cecropia* silkworm.
Experientia **36**, 682-683.

Shirk, P.D., Minoo, P., Postlethwait, J.H., **1983.**

20-Hydroxyecdysone stimulates the accumulation of translatable yolk polypeptide gene transcript in adult male *Drosophila melanogaster*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 186-190.

Shu, S., Park, Y.I., Ramaswamy, S.B., Srinivasan, A., **1998.**

Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae).
J. Insect Physiol. **44**, 1111–1117.

Simonet, G., Poels, J., Claeys, I., Van Loy, T., Franssens, V., DeLoof, A., Vanden Broeck, J., **2004.**

Neuroendocrinological and molecular aspects of insect reproduction.
J. Neuroendocrinol. **16**, 649–659.

Slama, K., Williams, C.M., **1966.**

The juvenile hormone. V. The sensitivity of the bug, *Pyrrhocoris apterus*, to a hormonally active factor in American paper-pulp.
Biol. Bull. **130**, 235–246.

Smart, D., Johnston, C.F., Curry, W.J., Williamson, R., Maule, A.G., Skuce, P.J., Shaw, C., Halton, D.W., Buchanan, K.D., **1994.**

Peptides related to the *Diploptera punctata* allatostatins in nonarthropod invertebrates: An immunocytochemical survey.
J. Comp. Neurol. **347**, 426-432.

Smart, D., Johnston, C.F., Maule, A.G., Halton, D.W., Hrcckova, G., Shaw, C., Buchanan, K.D., **1995.**

Localization of *Diploptera punctata* allatostatin-like immunoreactivity in helminths: An immunocytochemical study.
Parasitology **110**, 87-96.

Soares, C.A.G., Lima, C.M.R., Dolan, M.C., Piesman, J., Beard, C.B., Zeidner, N.S., **2005.**

Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks.
Insect Mol. Biol. **14**, 443–452.

Spittaels, K., Van Keerberghen, A., Schoofs, L., Proost, P., VanDamme, J., DeLoof, A., **1996.**

Isolation and characterization of *Locusta migratoria* accessory gland myotropin I (Lom-Ag-MT-I) from the brain of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **31**, 149–155.

Stay, B., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **1994.**

Allatostatins: identification, primary structures, functions and distribution.
Adv. Insect Physiol. **25**, 267–337.

Stay, B., **2000.**

A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 653-662.

Stay, B., Zhang, J.R., Tobe, S.S., **2002.**

Methyl farnesoate and juvenile hormone production in embryos of *Diploptera punctata* in relation to innervation of corpora allata and their sensitivity to allatostatin.
Peptides, **23**, 1981-1990.

Stay, B., Tobe, S.S., **2007**.

The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans.
Annu. Rev. Entomol. **52**, 277-299.

Steel, C.G.H., Davey, K.G., **1985**.

Integration in the insect endocrine system. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds) *Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **8**. Pergamon, Oxford, pp. 1-35.

Steiner B., Pfister-Wilhelm R., Grossniklaus-Burgin C., Rembold H., Treiblmayr K., Lanzrein B., **1999**.

Titres of juvenile hormone I, II and III in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) from the egg to the pupal moult and their modification by the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae).
J. Insect Physiol. **45**, 401-413.

Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Sato, R., **2004**.

A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. FEBS
Letters **567**, 175–178.

Tanaka, Y., Hua, Y.J., **2001**.

Bombyx mori PTSP mRNA for prothoracicostatic peptide precursor. GeneBank, accession nr. AB073553, unpublished.

Tanaka H., Suzuki K., **2005**.

Expression profiling of a diapause-specific peptide (DSP) of the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea* and silencing of DSP by double-strand RNA.
J. Insect Physiol. **51**, 701-707.

Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A, Driscoll, M., **2000**.

Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes.
Nat. Genet. **24**, 180-183.

Taylor, P.A., Bhatt, T.R., Horodyski, F.M., **1996**.

Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin.
Eur. J. Biochem. **239**, 588-596.

Teal, P.E.A., **2002**.

Effects of allatotropin and allatostatin on in vitro production of juvenile hormones by the corpora allata of virgin females of the moths of *Heliothis virescens* and *Manduca sexta*.
Peptides **23**, 663-669.

Truesdell, P.F., Koladich, P.M., Kataoka, H., Kojima, K., Suzuki, A., McNeil, J.N., Mizoguchi, A., Tobe, S.S., Bendena, W.G., **2000**.

Molecular characterization of a cDNA from the true armyworm *Pseudaletia unipuncta* encoding *Manduca sexta* allatotropin peptide.
Insect Biochem. Mol. Biol. **30**, 691–702.

Truman, J.W., **1985**.

Hormonal control of ecdysis. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds)
Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol., **8**. Pergamon, Oxford, pp. 413-440.

Truman J.W., Riddiford L.M., **2007**.

The morphostatic actions of juvenile hormone.
Insect Biochem. Mol. Biol., **37**, 761-770.

Tu, M.P., Kou, R., Wang, Z.S., Stoffolano, J.G., Yin, C.M., **2001**.

Immunolocalization and possible effect of a moth allatotropin-like substance in a fly, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae).
J. Insect Physiol. **47**, 233–244.

- Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P., Newcomb, R.D., **2006**.
RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding.
Insect Mol. Biol. **15**, 383–391.
- Unnithan, G.C., Sutherland, T.D., Cromey, D.W., Feyereisen, R., **1998**.
A factor causing stable stimulation of juvenile hormone synthesis by *Diploptera punctata* corpora allata *in vitro*.
J. Insect Physiol. **44**, 1027-1037.
- Vanden Broeck, J., Veelaert, D., Bendena, W.G., Tobe, S.S., DeLoof, A., **1996**.
Molecular cloning of the precursor cDNA for schistostatins, locust allatostatin-like peptides with myoinhibiting properties.
Molec. Cell. Endocrinol. **122**, 191-198.
- Vanden Broeck, V.J., **2001**.
Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*.
Peptides **22**, 241-254.
- Veelaert, D., Devreese, B., Schoofs, L., VanBeeumen, J., Vanden Broeck, J., Tobe, S.S., DeLoof, A., **1996**.
Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family.
Molec. Cell. Endocrinol. **122**, 183-190.
- Veenstra, J.A., Hagedorn, H.H., **1993**.
A sensitive enzyme immunoassay for *Manduca* allatotropin and the existence of an allatotropin-immunoreactive peptide in *Periplaneta americana*.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **23**, 99-109.
- Veenstra, J.A., Lehman, H.K., Davis, N.T., **1994**.
Allatotropin is a cardioacceleratory peptide in *Manduca sexta*.
J. Exp. Biol. **188**, 347–354.
- Veenstra, J.A., Noriega, F.G., Graf, R., Feyereisen, R., **1997**.
Identification of three allatostatins and their cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*.
Peptides **20**, 1145-1151.
- Veenstra, J.A., Costes, L., **1999**.
Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin.
Peptides **20**, 1145–1151.
- Veenstra, J.A., **2008**.
Allatostatin C and its paralog allatostatin double C: The arthropod somatostatins.
Insect Biochem. Mol. Biol. doi:10.1016/j.ibmb.2008.10.014.
- Vilaplana, L., Maestro, J.L., Piulachs, M.D., Bellés, X., **1999**.
Determination of allatostatin content in relation to gonadotropic cycle in the female of *Blattella germanica* (L.)(Dictyoptera, Blattellidae).
Physiol. Entomol. **24**, 213-219.
- Vullings, H.G.B., Diederer, J.H.B., Veelaert, D., Van der Horst, D.J., **1999**.
Multifactorial control of the release of hormones from the locust retrocerebral complex.
Microsc. Res. Tech. **45**, 142-153.
- Wang, J., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2004a**.
Cloning and tissue-specific localization of cricket-type allatostatins from *Gryllus bimaculatus*.
Molec. Cell. Endocrinol. **227**, 41-51.

- Wang, J., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H., **2004b**.
Multilocal expression of B-type allatostatins in crickets (*Gryllus bimaculatus*).
Int. Congr. Ser. **1275**, 141-148.
- Weaver, R.J., Paterson, Z.A., Short, J.E., Edwards, J.P., **1995**.
Effects of *Diploptera punctata* allatostatins on juvenile hormone biosynthesis and endogenous juvenile hormone III levels in virgin and mated female *Periplaneta americana*.
J. Insect Physiol. **41**, 117-125.
- Weaver, R.J., Edwards, J.P., Bendena, W.G., Tobe, S.S., **1998**.
Structures, functions and occurrence of insect allatostatic peptides. In: Coast, G.M., Webster, S.G. (Eds.) Recent Advances in Arthropod Endocrinology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3–32.
- Weaver, R.J., Audsley, N., **2008**.
Neuropeptides of the beetle, *Tenebrio molitor* identified using MALDI-TOF mass spectrometry and deduced sequences from the *Tribolium castaneum* genome.
Peptides **29**, 168–178.
- Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H., **2004**.
Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).
Anal. Bioanal. Chem. **379**, 540–543.
- Williamson, M., Lenz, C., Winther, M.E., Nässel, D.R., Grimmelikhuijzen, C.J.P., **2001a**.
Molecular cloning, genomic organization, and expression of a B-type (cricket-type) allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **281**, 544–550.
- Williamson, M., Lenz, C., Winther, A.M., Nässel, D.R., Grimmelikhuijzen, C.J., **2001b**.
Molecular cloning, genomic organization, and expression of a C-type (*Manduca sexta*-type) allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **282**, 124–130.
- Witek, G., Verhaert, P., Lorenz, M.W., Hoffmann, K.H., **1999**.
Immunolocalization of two types of allatostatins in the central nervous system of the cricket *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae).
Eur. J. Entomol. **96**, 279–285.
- Witek, G., Hoffmann, K.H., **2001**.
Immunological evidence for FGLamide- and W₂W₉-allatostatins in the ovary of *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae).
Physiol. Entomol. **26**, 49–57.
- Woodhead, A.P., Stay, B., Seidel, S.L., Khan, M.A., Tobe, S.S., **1989**.
Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 5997-6001.
- Woodhead, A.P., Asano, W.Y., Stay, B., **1993**.
Allatostatins in the haemolymph of *Diploptera punctata* and their effect *in vivo*.
J. Insect Physiol. **39**, 1001–1005.
- Wyatt, G.R., Davey, K.G., **1996**.
Cellular and molecular actions of juvenile hormone. 2. Roles of juvenile hormone in adult insects.
Adv. Insect Physiol. **26**, 1–155.
- Yagi, K.J., Kwok, R., Chan, K.K., Setter, R.R., Myles, T.G., Tobe, S.S., Stay, B., **2005**.
Phe–Gly–Leu-amide allatostatine in the termite *Reticulotermes flaviceps*: Content in brain and corpus allatum and effect on juvenile hormone synthesis.
J. Insect Physiol. **51**, 357–365.

- Yamanaka, N., Yamamoto, S., Žitňan, D., Watanabe, K., Kawada, T., Satake, H., Kaneko, Y., Hiruma, K., Tanaka, Y., Shinoda, T., Kataoka, H., **2008**.
Neuropeptide Receptor Transcriptome Reveals Unidentified Neuroendocrine Pathways. *PLoS ONE* 3(8): e3048.
doi:10.1371/journal.pone.0003048
- Yang, D., Lu, H., Erickson, J.W., **2000**.
Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos.
Curr. Biol. **10**,1191–1200.
- Yin, G.-L., Yang, J.-S., Cao, J.-X., Yang, W.-J., **2006**.
Molecular cloning and characterization of FGLamide allatostatin gene from the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.
Peptides **27**, 1241-1250.
- Yoon, J.G., Stay, B., **1995**.
Immunocytochemical localization of *Diploptera punctata* allatostatin-like peptide in *Drosophila melanogaster*.
J. Comp. Neurol. **363**, 475-488.
- Zeng, F., Shu, S., Park, Y.I., Ramaswamy, S.B., **1996**.
Vitellogenin and egg production in the moth, *Heliothis virescens*.
Arch. Insect Biochem. Physiol. **34**, 287-300.
- Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R., **2003**.
MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 9779–9784.
- Zhou, B.H., Hiruma, K., Shinoda, T., Riddiford, L.M., **1998**.
Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.
Dev. Biol. **203**, 233-244.
- Zhou, X., Riddiford, L.M., **2002**.
Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*.
Development **129**, 2259–2269.
- Zhou, Xuguo, Wheeler, M.M., Oi, F.M., Scharf, E., **2008**.
RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA.
Insect Biochem. Mol. Biol. **38**, 805-615.
- Zitnan, D., Sehnal, F., Bryant, P.J., **1993**.
Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*.
Dev. Biol. **156**, 117-135.
- Zitnan, D., Kingan, T., Krame, S., Beckage, N., **1995**.
Accumulation of neuropeptides in the cerebral neurosecretory system of *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*.
J. Comp. Neurol. **365**, 85-100.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann möchte ich mich bedanken, für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Martina Meyering-Vos für die sehr gute Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit. Außerdem auch für ihre zwischenmenschliche Kompetenz.

Bei Marion Preiß möchte ich mich für ihre Hilfe in allen Lebenslagen bedanken.

Bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls und besonders den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, Sabrina Immecke, Sylvia Schmid, Franziska Wende, Marion Preiß, Dorothea Wiesner, Ruth Bauer, Mandy Rose, Carola Göbel, Sandra Merz, Mehriye Sertkol, , möchte ich mich für ein äußerst angenehmes Arbeitsklima bedanken. Bei Thorin Geister und Franziska Wende möchte ich mich für die Beratung zur statistischen Auswertung bedanken und für Diskussionen zur praktischen Vorgehensweise und Auswertung der Daten bei der LC-MS.

Ich danke meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten, besonders meinem Freund Holger Grötzner, für den wichtigen privaten Ausgleich.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern, Ute Griebler[†] und Ernest Griebler und meiner Schwester Stephanie Griebler bedanken, die mich in allen Lagen unterstützen, mir Rückhalt geben und mir mein Studium ermöglichten.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, mit oder ohne Erfolg, diese oder eine gleichartige Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Manuela Griebler

Bayreuth, den 02.02.2009