

**Endokrine Signale in der Kastendetermination
der ursprünglichen Termiten
Mastotermes darwiniensis Froggatt
(Isoptera: Mastotermitidae)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biol. Franziska Wende

aus Leipzig

Bayreuth, August 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2006 bis August 2012 am Lehrstuhl Tierökologie I der Universität Bayreuth unter Anleitung von Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann, PD Dr. Martina Meyering-Vos und Dr. Manfred Kaib angefertigt.

Zum Teil gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 678: „Ökologische Bedeutung von Wirk- und Signalstoffen bei Insekten – von der Struktur zur Funktion“.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	09.08.2012
Zulassung durch die Prüfungskommission:	22.08.2012
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums:	09.04.2013

Amtierende Dekanin: *Prof. Dr. Beate Lohnert*

Prüfungsausschuss:

<i>Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann</i>	(Erstgutachter)
<i>PD Dr. Stefan Heidmann</i>	(Zweitgutachter)
<i>Prof. Dr. Konrad Dettner</i>	(Vorsitz)
<i>Prof. Dr. Gerrit Begemann</i>	
<i>Prof. Dr. Angelika Mustroph</i>	

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Termiten.....	1
1.2 Kasten bei Termiten	3
1.3 Endokrines System der Insekten	8
1.3.1 Ecdysteroide	8
1.3.2 Juvenilhormone	10
1.3.3 Regulation der Juvenilhormonbiosynthese	11
1.3.3.1 Allatostatine	11
1.3.3.2 Allatotropine.....	16
1.3.3.3 Weitere regulatorische Substanzen	17
1.3.4 Funktionen von Juvenilhormonen.....	18
1.4 Juvenilhormon und Kastendifferenzierung	18
1.5 Phylogenie der Dictyoptera.....	24
2 Zielsetzung und Fragestellungen	30
3 Material	31
3.1 Oligodesoxyribonukleotide (Primer).....	31
3.1.1 Oligonukleotide für die Amplifikation von DNA-Fragmenten bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	31
3.1.2 Oligonukleotide für die Amplifikation von Allatostatin A bei <i>Cryptocercus darwini</i>	33
3.1.3 Weitere Oligonukleotide	34
3.2 Gebrauchsfertige Chemikaliensätze	35
3.3 Chemikalien, Lösungen und Medien	36
3.4 Verbrauchsmaterialien	43
3.5 Geräte	44
3.6 Software	47

4	Methoden und Durchführung	49
4.1	Verwendete Versuchstiere	49
4.1.1	Tierhaltung von <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Gryllus bimaculatus</i>	49
4.1.2	Einordnung der Termiten in Entwicklungsstadien	50
4.1.3	<i>Cryptocercus darwini</i>	53
4.2	Allgemein verwendete Methoden	54
4.2.1	Gewebepräparation	54
4.2.2	RNA-Isolation	55
4.2.3	DNA-Isolation	57
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	59
4.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	60
4.2.6	Agarosegel-Elektrophorese	61
4.2.7	Aufreinigung von Nukleinsäuren	62
4.2.8	Klonierung	63
4.2.8.1	Ligation	63
4.2.8.2	Herstellung kompetenter Zellen	65
4.2.8.3	Transformation	65
4.2.8.4	Selektion der transformierten Zellen	66
4.2.8.5	Fermentation	67
4.2.8.6	Plasmidpräparation	68
4.2.8.7	Analyse der isolierten Plasmide	69
4.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) zur Bestimmung des Hormongehalts	70
4.3.1	Probennahme	70
4.3.1.1	Hämolympfproben von <i>Gryllus bimaculatus</i>	70
4.3.1.2	Hämolympfproben und Ganztierextrakte von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	71
4.3.2	Aufarbeitung der Proben	72
4.3.3	Messung der Proben	72
4.3.4	Analyse	74
4.3.5	Zusammenfassung durchgeführter Experimente	74
4.4	Identifikation der Sequenzen verschiedener Gene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Cryptocercus darwini</i>	75
4.4.1	Identifikation des Allatostatin A-Gens bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	75
4.4.1.1	SMART cDNA Library Construction	76

4.4.1.2	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	77
4.4.1.3	Analyse der genomischen DNA.....	78
4.4.2	Identifikation des Allatostatin A-Gens von <i>Cryptocercus darwini</i>	80
4.4.3	Identifikation von Referenzgenen bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	80
4.4.3.1	Identifikation von β -Aktin.....	81
4.4.3.2	Identifikation von NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 und 4.....	82
4.4.4	Sequenzierung amplifizierter DNA-Fragmente.....	83
4.5	Phylogenetische Sequenzanalyse.....	83
4.5.1	Alignment der Allatostatin A-Sequenzen.....	85
4.5.2	Identifikation des passenden Substitutionsmodells.....	85
4.5.3	Stammbaumberechnungen.....	86
4.5.3.1	Stammbaumberechnungen mit Nukleinsäuresequenzen.....	86
4.5.3.2	Stammbaumberechnungen mit Aminosäuresequenzen.....	88
4.6	Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	88
4.6.1	Vorteile der quantitativen real-time PCR.....	88
4.6.2	Normalisierung von Expressionsdaten.....	90
4.6.3	Durchführung der qPCR.....	91
4.6.3.1	DNase-Verdau und Reverse Transkription.....	91
4.6.3.2	Herstellung eines externen Standards zur Quantifizierung der Expression.....	92
4.6.3.3	Kontrollreaktionen.....	94
4.6.3.4	qPCR-Reaktion.....	95
4.6.3.5	Auswertung.....	96
4.7	RNA-Interferenz.....	98
4.7.1	Herstellung von doppelsträngiger RNA.....	98
4.7.1.1	Amplifikation der T7-Matrize.....	98
4.7.1.2	<i>In vitro</i> Transkription.....	100
4.7.2	Injektion.....	101
4.7.3	Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz.....	102
4.7.4	Experimente zur Suppression der Allatostatin A-Expression durch RNA-Interferenz.....	103
4.8	Statistische Datenanalyse.....	105
5	Ergebnisse.....	106
5.1	Hormongehalt von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	106
5.1.1	Juvenilhormongehalt.....	106

5.1.1.1	Juvenilhormon III-Gehalt in Hämolympfproben.....	106
5.1.1.2	Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten	109
5.1.2	Ecdysteroidgehalt	113
5.1.2.1	Ecdysteroidgehalt in Hämolympfproben.....	113
5.1.2.2	Ecdysteroidgehalt in Ganzkörperextrakten	115
5.2	Identifikation der Sequenzen verschiedener Gene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Cryptocercus darwini</i>	122
5.2.1	Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	122
5.2.2	Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Cryptocercus darwini</i>	128
5.2.3	Sequenz verschiedener Referenzgene von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	134
5.3	Phylogenetische Sequenzanalyse	136
5.3.1	Vergleich der Sequenzen des Allatostatin A-Prohormonvorläufers innerhalb der Dictyoptera.....	136
5.3.2	Phylogenetische Sequenzanalyse anhand von Stammbaumberechnungen	139
5.4	Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	145
5.4.1	Expression von Allatostatin A in verschiedenen Geweben von <i>Mastotermes darwiniensis</i> -Arbeitem.....	145
5.4.2	Expression von Allatostatin A in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	147
5.4.3	Expression verschiedener Referenzgene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	150
5.5	Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	154
5.5.1	Vergleich der Expression von Allatostatin A mit dem Hämolymphtiter von Juvenilhormon III.....	154
5.5.2	Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens mittels RNA-Interferenz	156
5.5.2.1	Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz.....	156
5.5.2.2	Experimente zur Suppression der Allatostatin A-Expression durch RNA-Interferenz	162
6	Diskussion.....	171
6.1	Angewendete Methoden.....	171
6.1.1	Identifikation eines geeigneten Referenzgens.....	171
6.1.2	RNA-Interferenz.....	172
6.2	Identifikation des Allatostatin A-Gens.....	174
6.2.1	Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	175
6.2.2	Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Cryptocercus darwini</i>	178

6.3	Phylogenetische Sequenzanalyse des Allatostatin A-Gens.....	179
6.4	Hormongehalt und Expression des Allatostatin A-Gens während der Kastendifferenzierung von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	183
6.4.1	Hormongehalt von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	183
6.4.1.1	Juvenilhormon.....	183
6.4.1.2	Ecdysteroide	192
6.4.2	Allatostatin A-Expression bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	195
6.4.2.1	Allatostatin A-Expression in verschiedenen Geweben von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	195
6.4.2.2	Allatostatin A-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	197
6.4.3	Zusammenhang zwischen Juvenilhormon III-Gehalt und Allatostatin A- Expression	198
6.4.3.1	Juvenilhormon III und Allatostatin A in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	198
6.4.3.2	Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens mittels RNA-Interferenz	200
7	Ausblick	205
8	Zusammenfassung	207
9	Summary	209
10	Literatur	211
11	Anhang	254
11.1	Flussdiagramme zur Experimentübersicht	254
11.2	Identifikation verschiedener Gene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Cryptocercus darwini</i>	260
11.3	Phylogenetische Sequenzanalyse von Allatostatin A.....	263
11.4	Validierung der Referenzgene.....	266
11.5	Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz	267
11.6	Gewichtsbestimmung verschiedener Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	268
11.7	Messungen zur Bestimmung des Hormongehaltes bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) ...	269
11.8	Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens in verschiedenen Geweben von Ringer- injizierten Kontrolltieren	273

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verbreitung von <i>Mastotermes darwiniensis</i> Froggatt in Nord-Australien und Papua-Neuguinea.....	3
Abb. 2: Ontogenetische Entwicklungswege bei Termiten.	7
Abb. 3: Struktur von Juvenilhormon III und der Ecdysteroide 20-Hydroxyecdyson und Ecdyson.	9
Abb. 4: Modell über den Einfluss des Juvenilhormontiters auf die Kastendifferenzierung bei Termiten mit linearem Entwicklungsweg.	20
Abb. 5: Möglicher Stammbaum der Dictyoptera.	28
Abb. 6: Schematische Darstellung einer Geißelantenne der Insekten.	51
Abb. 7: Fotos verschiedener Entwicklungsstadien und Kasten von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	52
Abb. 8: Verbreitungsgebiete von vier verschiedenen <i>Cryptocercus</i> -Arten in den Appalachen im Osten der USA.	54
Abb. 9: Schematisierte Darstellung eines Termitendarms.	55
Abb. 10: Beispiel für eine Schmelzkurvenanalyse.....	90
Abb. 11: Juvenilhormon III-Gehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	107
Abb. 12: Juvenilhormon III-Hämolymphtiter in verschiedenen „Adultstadien“ von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	108
Abb. 13: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).	109
Abb. 14: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung der Einzelwerte).	110
Abb. 15: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	111
Abb. 16: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener „adulter“ Stadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	112

Abb. 17: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Kombination Messreihe 1 und 2).	113
Abb. 18: 20-Hydroxyecdysen-Gehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	114
Abb. 19: Gehalt an 20-Hydroxyecdysen in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).	115
Abb. 20: Gehalt an 20-Hydroxyecdysen in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung der Einzelwerte).	116
Abb. 21: Gehalt an 20-Hydroxyecdysen in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	117
Abb. 22: Gehalt an 20-Hydroxyecdysen in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> . (Kombination Messreihe 1 und 2).	118
Abb. 23: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).	119
Abb. 24: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Darstellung der Einzelwerte).	119
Abb. 25: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	120
Abb. 26: Gehalt an Ecdysen in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Kombination Messung 1 und 2).	121
Abb. 27: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	123
Abb. 28: Schematische Darstellung eines Signalpeptids.	124
Abb. 29: Grafische Darstellung des Ergebnisses des SignalP v3.0-Programms zur Analyse der Aminosäuren der N-terminalen Region des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Algorithmus: Neural Network).	125
Abb. 30: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fett gedruckt) des Allatostatin A-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	127

Abb. 31: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz des Allatostatin A-Gens von <i>Cryptocercus darwini</i>	129
Abb. 32: Grafische Darstellung des Ergebnisses des SignalP v3.0-Programms zur Analyse der Aminosäuren der N-terminalen Region des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von <i>Cryptocercus darwini</i>	131
Abb. 33: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fett gedruckt) des Allatostatin A-Gens von <i>Cryptocercus darwini</i>	133
Abb. 34: Alignment der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers von sieben Schaben-, zwei Termiten- und einer Grillenart.	139
Abb. 35: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Nukleinsäuresequenz des Allatostatin A-Gens von sieben Schaben- und zwei Termitenarten.	140
Abb. 36: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Aminosäuresequenz des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von sieben Schaben- und zwei Termitenarten. ...	141
Abb. 37: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Nukleinsäuresequenz des Allatostatin A-Gens von 42 Vertretern der Ordnungen Diptera, Lepidoptera, Blattaria, Ensifera, Caelifera, Hymenoptera, Hemiptera und Isoptera.	143
Abb. 38: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Aminosäuresequenz des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von 42 Vertretern der Ordnungen Diptera, Lepidoptera, Blattaria, Ensifera, Caelifera, Hymenoptera, Hemiptera und Isoptera.	144
Abb. 39: Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	146
Abb. 40: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	147
Abb. 41: Expression des Referenzgens β -Aktin im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	148
Abb. 42: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	149
Abb. 43: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion „adulter“ Stadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	150
Abb. 44: Expression der Referenzgene (A) β -Aktin und (B) NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3) in verschiedenen Geweben weiblicher (weiß) und männlicher (schwarz) Arbeiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	151

- Abb. 45: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher (weiß) und männlicher (schwarz) Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* nach Normalisierung mit der Expression von (A) β -Aktin oder (B) NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3)..... 152
- Abb. 46: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* nach Normalisierung mit β -Aktin und NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3)..... 153
- Abb. 47: Korrelation der Expression von Allatostatin A (AST-A) im Gehirn und dem Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren und nymphalen Linie von *Mastotermes darwiniensis*..... 155
- Abb. 48: Korrelation zwischen der relativen Expression von Allatostatin A (AST-A) im Gehirn und dem Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren und nymphalen Linie von *Mastotermes darwiniensis*.
..... 156
- Abb. 49: Verteilung von grüner Lebensmittelfarbe gelöst in 2 μ l sterilem Wasser nach Injektion in einen Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis*. 157
- Abb. 50: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern zwei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer im Vergleich zu unbehandelten Arbeitern. 158
- Abb. 51: Mortalität von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von Ringerlösung oder verschiedenen Mengen doppelsträngiger RNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen (AST-A dsRNA)..... 159
- Abb. 52: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von Ringerlösung oder verschiedenen Mengen doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom AST-A Gen. 160
- Abb. 53: Nachweis der Amplifikation von Allatostatin A (AST-A)-RNA nach Umschreibung in cDNA mittels quantitativer real-time PCR. 162
- Abb. 54: Mortalität weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* drei Tage nach Injektion von Termitenringer oder doppelsträngiger RNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen (AST-A dsRNA)..... 163
- Abb. 55: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Termitenringer (1. RNAi-Experiment). 165

Abb. 56: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i> drei Tage nach Injektion von 2 µl Termitenringer oder 1 µg AST-A dsRNA gelöst in 2 µl Termitenringer (2. RNAi-Experiment).	166
Abb. 57: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von <i>Mastotermes darwiniensis</i> -Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 µl Termitenringer oder 1 µg AST-A dsRNA gelöst in 2 µl Termitenringer (Zusammenfassung 1. und 2. RNAi-Experiment).	167
Abb. 58: Relativer Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in weiblichen und männlichen Arbeitern von <i>Mastotermes darwiniensis</i> drei Tage nach Injektion von 2 µl Termitenringer oder 1 µg AST-A dsRNA gelöst in 2 µl Termitenringer.	168
Abb. 59: Juvenilhormon III-Hämolymphtiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i> -Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 µl Termitenringer oder 1 µg AST-A dsRNA gelöst in 2 µl Termitenringer in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Experiments.....	169
Abb. 60: 20-Hydroxyecdysen (20-HE)-Hämolymphtiter weiblicher und männlicher Arbeiter von <i>Mastotermes darwiniensis</i> drei Tage nach Injektion von Termitenringer oder AST-A dsRNA (RNAi-Experimente 3 und 4).	170
Abb. 61: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Bestimmung des Hormongehaltes bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Fragestellung 1).	254
Abb. 62: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Identifikation des Allatostatin A-Gens und Prohormonvorläufers von <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Cryptocercus darwini</i> sowie zur Identifikation von „Housekeeping“-Genen bei <i>M. darwiniensis</i> (Fragestellungen 2 und 7.1).	255
Abb. 63: Flussdiagramm über durchgeführte Berechnungen zur Phylogenie der Dictyoptera und „aller“ Insekten mit Sequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Gens und Prohormonvorläufers (Fragestellung 3).	256
Abb. 64: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Bestimmung der Expression des Allatostatin A-Gens in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sowie zweier Referenzgene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Fragestellungen 4 und 7.2).	257
Abb. 65: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Analyse eines potentiellen Zusammenhangs zwischen dem Juvenilhormon III-Gehalt der Hämolymphe und der Expression des Allatostatin A-Gens im Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Fragestellung 5).	258

Abb. 66: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Auslösung der RNA-Interferenz (RNAi) durch Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom Allatostatin A (AST-A)-Gen bei <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Fragestellung 6).	259
Abb. 67: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fettgedruckt) eines Teilfragments des β -Aktin Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i> . ..	260
Abb. 68: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe; fettgedruckt) eines Teilfragments des Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	261
Abb. 69: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe; fettgedruckt) eines Teilfragments des Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 4-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	261
Abb. 70: Körpergewicht (Frischgewicht) der untersuchten Entwicklungsstadien der apteren Linie von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	268
Abb. 71: Zusammenfassung der Probenaufarbeitung der Messreihen 1 und 2 zur Bestimmung des Hormongehaltes bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	269
Abb. 72: Juvenilhormon III-Gehalt der Hämolymphe von <i>Mastotermes darwiniensis</i> -Arbeitern nach Zugabe von Soldaten-Wehrsekret oder HPLC-Wasser.	270
Abb. 73: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von <i>Mastotermes darwiniensis</i> -Arbeitern zwei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer.	273

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Degenerierte Oligonukleotide für Allatostatin A bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	31
Tab. 2: Sequenzspezifische Oligonukleotide für Allatostatin A bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	31
Tab. 3: Oligonukleotide für „Genome Walking“ bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	32
Tab. 4: Oligonukleotide für die Identifikation von Referenzgenen bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	32
Tab. 5: Oligonukleotide für die quantitative real-time PCR bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	33
Tab. 6: Oligonukleotide zur Herstellung von doppelsträngiger RNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (T7-Sequenz fettgedruckt).....	33
Tab. 7: Sequenzspezifische Oligonukleotide für Allatostatin A bei <i>Cryptocercus darwini</i>	34
Tab. 8: Oligonukleotide für „Genome Walking“ bei <i>Cryptocercus darwini</i>	34
Tab. 9: Oligonukleotide für „Genome Walking“ und RACE zur Identifikation des Allatostatin A-Gens von <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Cryptocercus darwini</i>	34
Tab. 10: Verwendete gebrauchsfertige Chemikaliensätze („Kits“).	35
Tab. 11: Allgemeine Chemikalien, die in verschiedenen Versuchen verwendet wurden.....	36
Tab. 12: Substanzen für Tierhaltung, Injektion und Präparation.	37
Tab. 13: Chemikalien für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS).	37
Tab. 14: Chemikalien für DNA-Isolation mit „Genomic-tip 500/G“ von QIAGEN.	38
Tab. 15: Chemikalien für cDNA-Herstellung.	38
Tab. 16: Chemikalien, Lösungen, Substanzen und Medien für „SMART cDNA Library Construction“.	39
Tab. 17: Chemikalien und Lösungen für Polymerasekettenreaktion und Gelelektrophorese..	40
Tab. 18: Chemikalien, Substanzen, Lösungen und Medien für Transformation, Fermentation, Plasmidpräparation.....	41
Tab. 19: Chemikalien, Lösungen und Enzyme für die quantitative real-time PCR (qPCR)....	42
Tab. 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien, deren genaue Typbezeichnung und Hersteller.	43
Tab. 21: Verwendete Geräte, deren genaue Typbezeichnung und Hersteller.....	44
Tab. 22: Für die Datenaufnahme und -analyse verwendete Software.....	47

Tab. 23: Einteilung der für die Untersuchungen verwendeten Entwicklungsstadien der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> nach Entwicklungslinie (aptere oder nymphale), Alter und Anzahl der Antennensegmente.....	53
Tab. 24: Beispiel für ein PCR-Programm, das während dieser Studie für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet wurde.	60
Tab. 25: Zusammensetzung des Ligationsansatzes und Ablauf der Ligationsreaktion.	64
Tab. 26: Zusammenfassung der eingesetzten Chemikalien, Volumina und Inkubationszeiten des Restriktionsenzymverdaus.	70
Tab. 27: Zusammensetzung des Methanol/Wasser-Gemisches während des HPLC-Laufs. ...	73
Tab. 28: Durch Elektrospray-Ionisierung gebildete Addukte der untersuchten Hormone (Ecdyesteroide und Juvenilhormone) und ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis.	73
Tab. 29: Temperaturprofil für die erste PCR-Reaktion mit der „RACE-Ready cDNA“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	78
Tab. 30: Temperaturprofil für die erste PCR-Reaktion des „Genome Walking“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	79
Tab. 31: Temperaturprofil für die zweite und dritte PCR-Reaktion des „Genome Walking“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	79
Tab. 32: Temperaturprofil für die Amplifikation eines β -Aktin Fragments von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	81
Tab. 33: Zusammenfassung aller für die Stammbaumberechnung verwendeten Allatostatin A-Sequenzen verschiedener Insektenarten und einer Crustacea-Art (Außengruppe).	84
Tab. 34: Temperaturprofil für die Reverse Transkription mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“.....	92
Tab. 35: Für die Herstellung der externen Standards für die qPCR verwendete Plasmide, Identität und Länge des eingebauten DNA-Fragments und des Vektors, verwendete Restriktionsenzyme und Puffer.	93
Tab. 36: Temperaturprofil für die quantitative real-time PCR zur Bestimmung der Expression mit dem 7300 Real-Time PCR System.	96
Tab. 37: Zusammensetzung der verschiedenen PCR-Ansätze zur Herstellung der T7-dsDNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen von <i>Mastotermes darwiniensis</i> (Gesamtvolumen: 50 μ l).	98
Tab. 38: PCR-Programm für die Herstellung der T7-dsDNA mit den Primern T7Mda_AS8F und T7Mda_AS13R.	99

Tab. 39: PCR-Programm für die Herstellung der T7-dsDNA mit den Primern T7Mda_AS140F und T7Mda_AS9R.	99
Tab. 40: Zusammenfassung der Experimente zur Suppression der Expression von Allatostatin A (AST-A) durch RNA-Interferenz.	104
Tab. 41: Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers der Schaben <i>Cryptocercus darwini</i> , <i>Blatta orientalis</i> und <i>Periplaneta americana</i> sowie der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> und <i>Reticulitermes flavipes</i>	137
Tab. 42: Sequenzierte Einzelfragmente des Allatostatin A-Gens (AST-A) von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	262
Tab. 43: Sequenzierte Einzelfragmente potentieller Referenzgene bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	262
Tab. 44: Sequenzierte Einzelfragmente des Allatostatin A-Gens (AST-A) von <i>Cryptocercus darwini</i>	263
Tab. 45: Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers von Schaben, Termiten und der Mittelmeerfeldgrille.	263
Tab. 46: Spezifikation der Parameter der Substitutionsmodelle für die Stammbaumberechnung mit Sequenzen des Allatostatin A-Gens innerhalb der Dictyoptera (Abb. 35) und mit allen bisher bekannten Allatostatin A-Gensequenzen von Insekten (Abb. 37).	264
Tab. 47: Substitutionsmodelle für die Stammbaumberechnung mit Sequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers innerhalb der Dictyoptera (Abb. 36) und mit Sequenzen des AST-A Prohormonvorläufers acht verschiedener Insektenordnungen (Abb. 38).	265
Tab. 48: Allgemein verwendete Parameter für die Stammbaumberechnung mit MrBayes v3.1.2 und MEGA v4.0.2.	265
Tab. 49: Analyse der Stabilität der Expression der potentiellen Referenzgene β -Aktin und Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3) sowie des Zielgens Allatostatin A (AST-A) bei <i>Mastotermes darwiniensis</i>	266
Tab. 50: Zusammenfassung der für die HPLC-MS Messungen verwendeten Entwicklungsstadien von <i>Mastotermes darwiniensis</i> nach Entwicklungslinie (aptere oder nymphale), Alter und Anzahl der Antennensegmente.	271

Abkürzungsverzeichnis

20-HE	20-Hydroxyecdysen
A	Absorption
A	Arbeiter
AIC	Akaike Informationskriterium
Ala	Alate, primäres Geschlechtstier
<i>Apa</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
AS	Aminosäure
AST	Allatostatin
AT	Allatotropin
B	Breite
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung Berlin
BI	Bayesian Inference, Bayesianische Statistik
Bommo-PTSP	<i>Bombyx mori</i> prothorakostates Peptid
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderalbumin
CA	Corpus allatum, Corpora allata
CC	Corpus cardiacum, Corpora cardiaca
CDL	„curved desolvation line“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	„colony forming units“, koloniebildende Einheiten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E</i>	Effizienz der qPCR-Reaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 alpha
ESI	Elektrospray-Ionisierung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GTR	„General time reversible model“
GTR+G	GTR mit Gamma-Verteilung
GTR+I+G	GTR mit Gamma-Verteilung und Anteil invariabler Positionen
H	Höhe
HD	Hinterdarm
HMM	Hidden Markov Modell
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
HPSF®	„High Purity Salt Free“

HSP	„heat shock protein“, Hitzeschockprotein
IGR	„insect growth regulators“, Insektenwachstumsregulatoren
JH	Juvenilhormon
JHA	Juvenilhormonanalogen, -analoge
JHB ₃	Juvenilhormon III-Bisepoxid
JHBP	Juvenilhormon-bindendes Protein
JHE	Juvenilhormon-Esterase
JHEH	Juvenilhormon-Epoxidhydrolase
JHSB ₃	Juvenilhormon III „skipped“ Bisepoxid
JTT	Modell nach Jones, Taylor und Thornton
Kalium-DS	Kaliumdodecylsulfat
KG	Körpergewicht
L	Länge
LB	Luria-Bertani
lg	dekadischer Logarithmus
L _n	n. Larvenstadium
Locmi-MIP	<i>Locusta migratoria</i> myoinhibierendes Peptid
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
Manse-MIP	<i>Manduca sexta</i> myoinhibierendes Peptid
MCS	„multiple cloning site“, multiple Klonierungsstelle
MD	Mitteldarm
MIG	Methanol-Isooktan-Gemisch
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	Stichprobengröße
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCA	Nervi corporis allati
NCC	Nervi corporis cardiaci
ND3	Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3
ND4	Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 4
Neb-TMOF	„ <i>Neobellieria bullata</i> Trypsin Modulating Oostatic Factor“
Neo	Neotenic, sekundäres/tertiäres Geschlechtstier
NJ	Neighbor-Joining
NN	Neural Network
N _n	n. Nymphenstadium
<i>Not</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
nt	Nukleotidposition
NTC	„no template control“, Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
OSG	Oberschlundganglion
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Pseudergat, „falscher“ Arbeiter
PTTH	prothorakotropes Hormon
qPCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA-Interferenz
S	Soldat
<i>Sca</i>	<i>Streptomyces caespitosus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sfi</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>
SID	„systemic RNAi defective“
siRNA	„small interfering RNA“
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“
ssRNA	einzelsträngige RNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet	Tetracyclin
TN	Tamura-Nei-Modell
TN+G	TN mit Gamma-Verteilung
UV	ultraviolett
v/v	„volume per volume“, Volumen pro Volumen
VD	Vorderdarm
VIS	visuelles Spektrum, sichtbares Licht
VS	Vorsoldat
vs.	versus
w/v	„weight per volume“, Gewicht pro Volumen
w/w	„weight per weight“, Gewicht pro Gewicht
x g	mal Erdschwerebeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Termiten

Termiten spielen vorwiegend in tropischen und subtropischen Ökosystemen eine wichtige ökologische Rolle und werden auch als „ecosystem engineers“ bezeichnet (Lavelle 1997; Bignell & Eggleton 2000; Eggleton 2001). Durch ihre Fraß- und Bauaktivitäten kommt es zu einer Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens (Bignell & Eggleton 2000). Termiten sorgen u. a. für verbesserte Porosität, Wasserversickerung und Belüftung des Bodens (Lavelle 1997). Weiterhin kommt es durch Termiten zur Erhöhung der Konzentration von austauschbaren Kationen sowie zur Erhöhung der Verfügbarkeit von Stickstoff, Phosphor, organischem Kohlenstoff und Wasser (Wood *et al.* 1983; Wood 1988; Donovan *et al.* 2001). Dadurch haben Termiten einen positiven Einfluss auf das Pflanzenwachstum (Bignell & Eggleton 2000; Kaib 2000; Mando 2000). Ihre wichtigste Rolle in tropischen Ökosystemen ist allerdings die als Hauptkonsument von Zellulose, des am häufigsten vorkommenden Biomoleküls an Land (Lee & Wood 1971; Li *et al.* 2003a; Ohkuma 2003; Engel *et al.* 2009). Es wird vermutet, dass die Termiten – in Abhängigkeit des jeweiligen Habitats – einen enorm hohen Anteil des abgestorbenen Pflanzenmaterials verwerten und damit maßgeblich die Mineralisierung und Humusbildung beeinflussen (Bignell & Eggleton 2000; Grimaldi & Engel 2005). Lignozellulose wird zudem aufgrund des hohen Vorkommens als potentielle neue Quelle für die Gewinnung von Biokraftstoffen gesehen (Todaka *et al.* 2010). Die Verwertung ist schwierig (Mosier *et al.* 2005; Chen & Dixon 2007), Termiten erreichen jedoch aufgrund eines komplexen Zusammenspiels aus endogenen Enzymen und einer reichen Hinterdarmfauna eine Verwertungseffizienz von bis zu 90% (Ohkuma 2003; Todaka *et al.* 2010). Da die industrielle Verwertung mit hohen Kosten und einem hohen Energieaufwand verbunden ist (Scharf & Boucias 2010), rückt der biologische Abbau von Lignozellulose im Termitendarm in den Mittelpunkt aktueller Untersuchungen (Scharf & Tartar 2008; Ke *et al.* 2010; Scharf & Boucias 2010; Todaka *et al.* 2010).

Neben der ökologischen Bedeutung der Termiten und ihrer potentiellen Rolle als Biokatalysatoren für die Gewinnung von Biokraftstoffen, gelten Termiten als bekannte Schädlinge, die auf allen Kontinenten verbreitet sind. Aufgrund ihrer holzfressenden Lebensweise befallen sie vorwiegend Bauholz, sind jedoch auch als Agrarschädlinge von Bäumen wie Kokosnuss, Mango, Cashew oder Zitruspflanzen bekannt (Hill 1942; Lenz

2000). Termiten verursachen weltweit Kosten von mehr als 22 Milliarden US-Dollar pro Jahr (Fuchs *et al.* 2004) und sind daher von enormer ökonomischer Bedeutung. Weltweit gibt es über 2900 Termitenarten (Engel *et al.* 2009), von denen jedoch nur ca. 10% als Schädlinge gelten (Wood 1996). Zur Bekämpfung der Termiten werden verschiedene Methoden eingesetzt, wie z. B. physikalische Barrieren, Behandlung von Holz und Böden mit Insektiziden (wie Organophosphate oder Pyrethroide), Verwendung Termiten-resistenter Baumaterialien oder Populationskontrolle durch behandelte Köder (Su & Scheffrahn 1998; Forschler 2000; Lenz 2000). Biologische Methoden wie die Verwendung pathogener Pilze und Nematoden oder von sogenannten „insect growth regulators“ (IGR) wie z. B. Juvenilhormonanaloga (JHA) zeigten bisher nicht die gewünschte Wirkung (Review in Su & Scheffrahn 1998).

In Australien gibt es 16 Termitenarten, die als Schädlinge gelten (Lenz 2000). Als eine der wichtigsten und destruktivsten Termitenarten gilt *Mastotermes darwiniensis* Froggatt, auch „Giant Northern Termite“ oder Darwin-Termite genannt (Haritos *et al.* 1994; Lenz 2000; Grimaldi & Engel 2005). *M. darwiniensis* ist die einzige rezente Art der Familie Mastotermitidae, die – wie Fossilienfunde belegen – früher eine weltweite Verbreitung aufwies (Emerson 1965; Krishna & Emerson 1983). Heute ist die Verbreitung von *M. darwiniensis* auf Australien nördlich des südlichen Wendekreises beschränkt. Während des Zweiten Weltkriegs wurde die Art auch in Papua-Neuguinea eingeführt, wo sie bis heute zu finden ist (Abb. 1; Emerson 1965; Gay 1969; Grimaldi & Engel 2005; Thistleton *et al.* 2007). Der Status als Schädling ist berechtigt, da *M. darwiniensis* nahezu jede Form von Zellulose, aber auch andere Materialien wie z. B. Ummantelungen von Elektrokabeln, Knochen, Leder, Autoreifen, Bitumen oder Asbest zerstört. Kolonien befinden sich u. a. in abgestorbenen Holzstämmen, Zaunpfählen, Strommasten, Eisenbahnschwellen, Holzhäusern, Zier- oder Obstbäumen (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Grimaldi & Engel 2005; Thistleton *et al.* 2007). *M. darwiniensis* kann riesige Kolonien bilden, die mehrere Millionen Individuen umfassen können (Hill 1942; Gay & Calaby 1970).

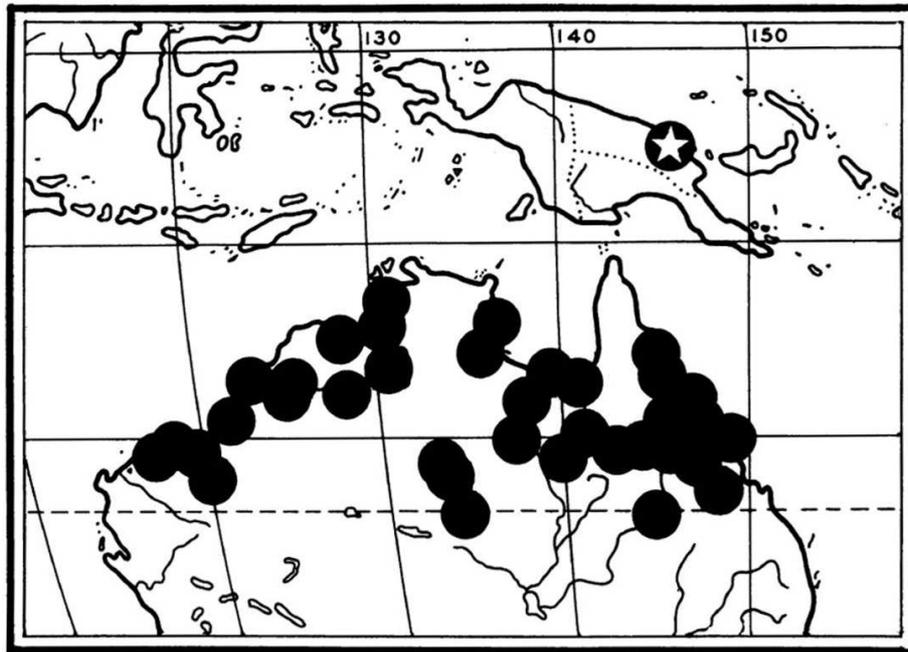


Abb. 1: Verbreitung von *Mastotermes darwiniensis* Froggatt in Nord-Australien und Papua-Neuguinea.

Punkte: Fundstellen von Kolonien in Nord-Australien; Stern: von Menschen eingeführte Kolonie in Lae, Papua-Neuguinea. (Aus: Emerson 1965).

1.2 Kasten bei Termiten

Termiten gehören wie viele Arten der Hymenoptera zu den sozialen Insekten. Während bei den Hymenoptera jedoch alle Formen der Sozialität vorkommen – von solitären Arten wie der Roten Mauerbiene *Osmia bicornis* bis zu hochgradig sozialen Arten wie der Europäischen Honigbiene *Apis mellifera* – gelten alle Termitenarten als eusozial. Die klassische Definition der Eusozialität beinhaltet drei Kriterien – kooperative Brutpflege, überlappende Generationen und reproduktive Arbeitsteilung (Michener 1969; Thorne 1997). Mit ihrem komplexen Kastensystem erfüllen alle Termitenarten diese drei Kriterien. Als Schlüsselement der Eusozialität gilt dabei besonders die reproduktive Arbeitsteilung, bei der nur ein Teil der Individuen fertil ist und Nachkommen erzeugt, während der größte Teil der Individuen reproduktiv eingeschränkt oder vollkommen steril ist (Thorne 1997). Generell erfolgt die Einteilung der Individuen in drei verschiedene Kasten, die sich aufgrund ihres Verhaltens und ihrer morphologischen Merkmale deutlich voneinander unterscheiden (Review in Korb & Hartfelder 2008). Diese drei Kasten werden Arbeiter, Soldaten und Geschlechtstiere genannt. Alle Kasten haben verschiedene Funktionen wie Futtersuche, Nestbau, Brutpflege (Arbeiter), Verteidigung (Soldaten) oder die Erzeugung von Nachkommen (Geschlechtstiere) (Zhou *et al.* 2006c; Korb & Hartfelder 2008). Bei juvenilen

Tieren wird unterschieden zwischen Individuen ohne Flügelanlagen (Larven) und mit Flügelanlagen (Nymphen) (Lüscher 1952; Korb & Hartfelder 2008). Im Gegensatz zu den Hymenoptera können bei den Termiten die Mitglieder aller Kasten männlich und weiblich sein. In einigen Arten der Familien Hodotermitidae, Rhinotermitidae und Termitidae kommt es aber auch zu geschlechtsspezifischen Kastendifferenzierungen (Roisin 2000). So sind z. B. bei *Macrotermes bellicosus* alle Soldaten weiblich, bei *Nasutitermes arborum* dagegen alle männlich (Noirot 1969b; Lüscher 1976).

Bei den Geschlechtstieren wird unterschieden zwischen primären und sekundären (manchmal auch tertiären) Geschlechtstieren. Unter primären Geschlechtstieren (Alaten) versteht man die klassischen adulten Individuen, die denen anderer hemimetaboler Insekten ähneln. Sie besitzen gut ausgebildete Flügel und Komplexaugen, der Körper ist meist pigmentiert und sklerotisiert. Die Entwicklung erfolgt über mehrere Nymphenstadien. Neben den Alaten gibt es auch noch sogenannte neotene Geschlechtstiere (Neotenicis), die als Ersatzgeschlechtstiere nach dem Tod der Alaten oder als zusätzliche Geschlechtstiere neben den funktionellen Alaten fungieren können. Diese haben ein juveniles Aussehen und besitzen meistens keine Flügel oder Komplexaugen. Die Entwicklung erfolgt über eine einzige Häutung entweder aus Nymphen (brachypteres/sekundäres Geschlechtstier; Nymphoid) oder aus Larven/Arbeitern (apteres/tertiäres Geschlechtstier; Ergatoid) (Review in Korb & Hartfelder 2008). Für die Gründung neuer Kolonien sind meist die Alaten verantwortlich, die zu bestimmten Jahreszeiten in großen Schwärmen die Kolonie verlassen. Nach der Landung kommt es zum Abwurf der Flügel, zur Bildung von Paaren und nach dem Fund eines geeigneten Nistplatzes zur Kopulation (Nutting 1969; Stuart 1969). Während der Koloniegründungsphase kommt es zu zahlreichen physiologischen Veränderungen des Königspaares. Am auffälligsten ist dabei die enorme Vergrößerung des Abdomens einiger Königinnen (Physogastrie), welche mit der Entwicklung der Ovarien korreliert ist und durch Ausdehnung der Intersegmentalmembranen hervorgerufen wird. In der Unterfamilie Macrotermitinae kann es so bis zu einer achtfachen Vergrößerung des Abdomens der Königinnen kommen (Noirot 1969b; Myles 1999). Durch diese extreme Spezialisierung können physogastrische Termitenköniginnen mehrere Zehntausend Eier pro Tag legen (Nutting 1969). Physogastrie kommt auch bei den Ersatzgeschlechtstieren vor, ist jedoch nicht so stark ausgeprägt (Myles 1999). Bei *M. darwiniensis* kommt es – neben der Koloniegründung durch geflügelte Alaten – ebenfalls zur Neugründung von Tochterkolonien durch Neotenicis (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Goodisman & Crozier 2003). Auch in Feldkolonien wurden bei *M. darwiniensis* bisher

ausschließlich neotene Königinnen und Könige beobachtet (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Watson & Abbey 1985; Goodisman & Crozier 2003).

Die Soldaten sind für die aktive Verteidigung der Kolonie gegen Räuber wie z. B. Ameisen verantwortlich. Dazu gehören die Warnung und Rekrutierung anderer Termiten sowie die eigentliche Verteidigung (Review in Šobotník *et al.* 2010). Die Abwehr erfolgt je nach Art entweder mechanisch, chemisch oder durch eine Kombination aus beiden (Deligne *et al.* 1981; Prestwich 1984). Zu diesem Zweck gibt es besonders im Kopfbereich verschiedene morphologische Anpassungen. Soldaten haben meist einen stark sklerotisierten, vergrößerten Kopf und/oder ebenso vergrößerte, stark sklerotisierte Mandibeln. Der Kopf kann dabei zum Verschluss von Kolonieeingängen genutzt werden (Phragmosis), die Mandibeln zum Angriff der Fraßfeinde (Prestwich 1984). Zur chemischen Verteidigung werden verschiedene abstoßende oder giftige Substanzen ausgestoßen, die meistens in der Frontaldrüse gebildet werden (Prestwich 1979). Eine besondere Spezialisierung dafür tritt bei den Soldaten der Unterfamilie Nasutitermitinae auf. Diese besitzen einen spitz zulaufenden Fortsatz am Kopf, der „Nasus“ genannt wird und an dessen Ende das Sekret durch die Frontalpore ausgestoßen wird (Prestwich 1979, 1984; Hojo *et al.* 2011). Die Frontaldrüse kommt nur in den Familien Rhinotermitidae, Serritermitidae und Termitidae vor (Prestwich 1979). *M. darwiniensis* zeigt ein kombiniertes Abwehrverhalten (Prestwich 1984). Zusätzlich zu den schneidenden Mandibeln kommt es zur Abgabe eines stark riechenden, flüssigen und farblosen Sekrets, welches in den Speicheldrüsen (Labialdrüsen) gebildet wird. Das Sekret enthält Benzoquinon und Toluquinon und dient der Immobilisierung des Gegners (Moore 1968; Šobotník *et al.* 2010). Aufgrund der spezialisierten Mundwerkzeuge sind Soldaten meist nicht mehr in der Lage, selbst Nahrung aufzunehmen, und müssen gefüttert werden (McMahan 1969; Lüscher 1974b; Suárez & Thorne 2000).

Die vielfältigsten Funktionen in der Termitenkolonie übernehmen die Arbeiter. Zu ihren Aufgaben gehören Nestbau und -reparatur, Brutpflege, Nahrungsbeschaffung sowie die Fütterung der Geschlechtstiere und Soldaten (McMahan 1969; Stuart 1969; Lüscher 1974b). In der Koloniegründungsphase erfolgt die Ernährung frisch geschlüpfter Larven durch das Königspaar (Nutting 1969). Später wird dies – und auch andere Aspekte der Brutpflege wie das Stapeln der Eier sowie das Ablecken zur Bedeckung mit antimikrobiellen Substanzen – von den Arbeitern übernommen (Watson & Abbey 1987; Matsuura *et al.* 2000, 2010). Die Fütterung der Larven, Soldaten und Geschlechtstiere erfolgt durch Trophallaxis. Der Begriff Trophallaxis steht für den Transfer von Flüssigkeit aus dem Mund eines Tieres zum Mund des anderen (stomodeal) bzw. vom Rektum eines Tiers zum Mund des anderen (proctodeal)

(McMahan 1969). Verschiedene Tiere können als Arbeiter fungieren. Aufgrund ihrer hemimetabolen Entwicklung ähneln die Larven und Nymphen den adulten Tieren im Körperbau. Die Arbeiterfunktionen werden daher meist von großen Larven und Nymphen übernommen (Lüscher 1974b; Thorne 1997; Korb & Hartfelder 2008). „Echte“ Arbeiter mit eingeschränktem Entwicklungspotential findet man nur in den Familien Mastotermitidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Termitidae und in den meisten Arten der Rhinotermitidae (Thorne 1997). „Falsche“ Arbeiter gibt es in den Familien Termopsidae, Kalotermitidae und bei einigen Arten der Rhinotermitidae (Gattung *Proprhinotermes*) (Thorne 1997; Korb & Hartfelder 2008). Dabei handelt es sich um totipotente Larven, die das Potential haben, sich in primäre Geschlechtstiere umzuwandeln (Korb & Hartfelder 2008). Sie werden häufig auch als Pseudergaten bezeichnet, ein Begriff, der nach Grassé & Noirot (1947) ursprünglich für Nymphen mit zurückgebildeten Flügelanlagen nach einer regressiven Häutung verwendet wurde (Thorne 1997; Korb & Hartfelder 2008). Das Vorkommen „echter“ Arbeiter ist korreliert mit der Lebensweise („nesting type“) nach Abe (1987) – so kommen „echte“ Arbeiter bei Termitenarten vor, die außerhalb des Nestes fouragieren („separate-piece nesting“ und „intermediate-type nesting“; auch „multiple-pieces nesting“), nicht jedoch bei Termitenarten, die innerhalb ihres Futters leben („single-piece nesting“) (Abe 1987, 1990; Higashi *et al.* 1991; Inward *et al.* 2007b; Korb & Hartfelder 2008).

Obwohl sich die ontogenetischen Entwicklungswege zwischen den verschiedenen Termitenarten unterscheiden, können sie in zwei Gruppen eingeteilt werden – den linearen und den zweiästigen Entwicklungsweg (Watson & Sewell 1985; Korb & Hartfelder 2008). Im linearen Weg sind die erwähnten „falschen“ Arbeiter zu finden, die ein totipotentes Zwischenstadium mit vier verschiedenen Entwicklungsmöglichkeiten bilden. Sie können sich durch eine einzige Häutung zum Neotenic entwickeln, über ein oder mehrere Nymphenstadien zum primären Geschlechtstier oder über ein Zwischenstadium – den Vorsoldaten – zum Soldaten. Außerdem kommen stationäre Häutungen vor, die gekennzeichnet sind durch geringes Wachstum und fehlende Differenzierung und vermutlich durch Abnutzung der Mandibeln hervorgerufen werden (Abb. 2A; Korb & Hartfelder 2008; Roisin & Korb 2011). Beim zweiästigen Entwicklungsweg kommt es bereits in einem frühen Stadium zur irreversiblen Trennung in eine geflügelte (nymphale) und eine ungeflügelte (aptere) Entwicklungslinie (Roisin 2000). Individuen der nymphalen Linie entwickeln sich über mehrere Nymphenstadien zum geflügelten Geschlechtstier oder häuten sich zum nymphoiden Neotenic. Individuen der apteren Linie werden zu den erwähnten „echten“

Arbeitern, die sich weiter zum ergatoiden Neotenic differenzieren können. Soldaten entwickeln sich über das Zwischenstadium des Vorsoldaten ebenfalls aus Larven der apteren Linie (Abb. 2B; Korb & Hartfelder 2008). Der Entwicklungsweg ist korreliert mit der Lebensweise. Termitenarten der „multiple-piece nesting“-Lebensweise leben meist in großen Kolonien unter relativ stabilen Bedingungen und weisen den zweiästigen Entwicklungsweg auf. Die „one-piece nesting“-Arten benötigen aufgrund der kleineren Kolonien und geringerer Stabilität der Umweltbedingungen eine höhere Flexibilität. Daher findet man hier häufig den linearen Entwicklungsweg (Watson & Sewell 1985; Korb & Hartfelder 2008). Bei *M. darwiniensis* folgt die ontogenetische Entwicklung dem zweiästigen Weg (Abb. 2C; Watson *et al.* 1977b). Anders als bei anderen Arten entwickeln sich jedoch hier die Neotenic ausschließlich aus den Arbeitern, es kommen keine nymphoiden Neotenic vor. Diese Neotenic haben ein hohes reproduktives Potential, da sie nicht nur als Ersatzgeschlechtstiere in der Mutterkolonie fungieren, sondern auch eigene Tochterkolonien durch Knospung gründen können (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Korb & Hartfelder 2008).

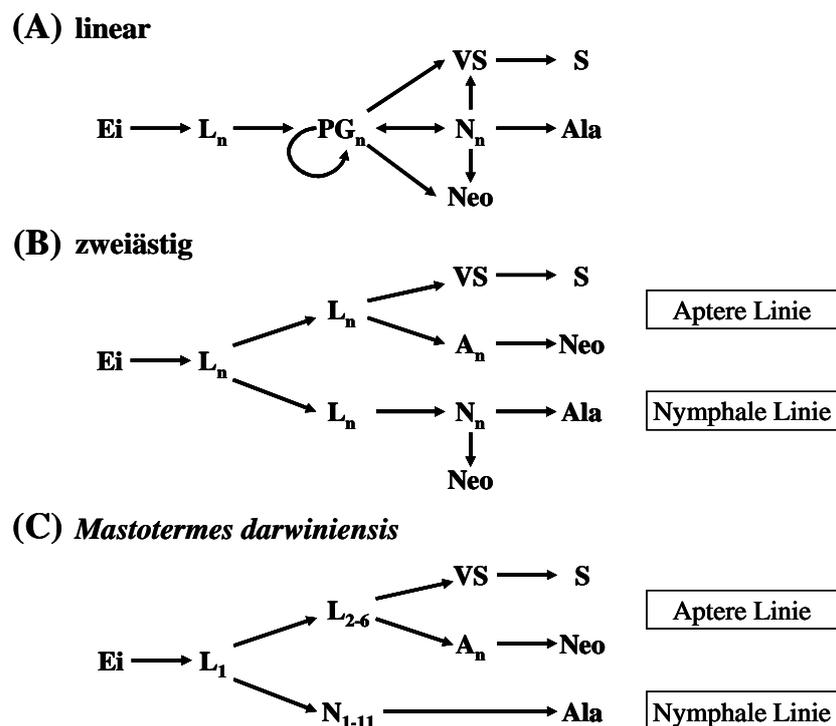


Abb. 2: Ontogenetische Entwicklungswege bei Termiten.

(A) linearer Entwicklungsweg, (B) zweiästiger Entwicklungsweg, (C) Entwicklung bei *Mastotermes darwiniensis*. A = „echter“ Arbeiter, Ala = geflügeltes primäres Geschlechtstier (Alate), L = juveniles Tier ohne Flügelansätze (Larve), N = juveniles Tier mit Flügelansätzen (Nymphe), Neo = sekundäres/tertiäres Geschlechtstier (Neotenic), PG = „falscher“ Arbeiter (Pseudergat), S = Soldat, VS = Vorsoldat, X_n = Anzahl der Stadien. (Nach: Watson *et al.* 1977b; Korb & Hartfelder 2008).

Obwohl der Einfluss einer genetischen Komponente auf die Kastendifferenzierung bei Termiten nicht ausgeschlossen werden kann (Goodisman & Crozier 2003; Hayashi *et al.* 2007; Lo *et al.* 2009), sind sich die meisten Autoren einig, dass die beschriebene Kastendifferenzierung ein typisches Beispiel für Polyphänismus darstellt – der Ausbildung verschiedener Phänotypen bei gleichem genetischen Hintergrund. Polyphänismus bei Insekten ist ein komplexes Phänomen, bei dem das Genom mit Umweltfaktoren interagiert, wobei durch Hormonantwort verschiedene Änderungen der Entwicklung induziert werden (Nijhout 1999, 2003; Evans & Wheeler 2001). Demnach spielt das endokrine System der Termiten eine wichtige Rolle bei der Kastendifferenzierung.

1.3 Endokrines System der Insekten

Zu den wichtigsten Hormonen im endokrinen System der Insekten zählen die Ecdysteroide und die Juvenilhormone (JH). Sie spielen eine Rolle bei der Regulation fast aller Prozesse hinsichtlich der Entwicklung und Reproduktion (Review in Nijhout 1994).

1.3.1 Ecdysteroide

Ecdysteroide werden auch als Häutungshormone bezeichnet, da sie bei Insekten und Krebsen in Prozesse der Häutung involviert sind (Chang 1993). Das erste Ecdysteroid – Ecdyson – wurde von Butenandt & Karlson (1954) isoliert, die Bestimmung der Struktur erfolgte parallel durch Karlson *et al.* (1965) und Huber & Hoppe (1965). Ecdyson ist ein klassisches Steroidhormon mit einem Kern aus vier Ringen und einer Cholesterol-Seitenkette (Abb. 3; Karlson *et al.* 1963, 1965). Die Biosynthese erfolgt aus mit der Nahrung aufgenommenem Cholesterol in den Prothoraxdrüsen (Ringdrüse bei Diptera, Ventraldrüsen bei ursprünglicheren Insektenarten) (Review in Gäde *et al.* 1997b; Spindler 2003). Das Ecdyson wird in den Drüsen nicht gespeichert, sondern in Protein-gebundener Form freigesetzt und in die biologisch aktive Form 20-Hydroxyecdyson (20-HE) umgewandelt (Moriyama *et al.* 1970; King & Marks 1974; Gäde *et al.* 1997b; Spindler 2003). Die Umwandlung findet hauptsächlich im Fettkörper, im Mitteldarm und in den Malpighischen Gefäßen statt (Rees 1995; Gäde *et al.* 1997b). In adulten Tieren übernehmen andere Gewebe die Ecdysteroidbiosynthese, da die Prothoraxdrüsen bei vielen Insektenarten nach der letzten Häutung degenerieren. Ecdysteroide werden dann hauptsächlich im Ovar, aber auch in Hoden, abdominalen Oozyten und in der Epidermis gebildet (Review in Gäde *et al.* 1997b;

Spindler 2003). Die Biosynthese wird durch das prothorakotrope Hormon (PTTH) aus lateralen neurosekretorischen Zellen des Gehirns stimuliert (Review in Gäde *et al.* 1997b; Marchal *et al.* 2010). Ein ecdysiostat wirkendes Peptid konnte beim Seidenspinner *Bombyx mori* isoliert werden (Bommo-PTSP; *Bombyx mori* prothorakostates Peptid). Es inhibiert die Ecdysteroidbiosynthese larvaler Prothoraxdrüsen *in vitro* (Hua *et al.* 1999). Strukturverwandte Peptide konnten auch aus der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* isoliert werden, welche dort die Ecdysteroidbiosynthese des Ovars hemmen (Lorenz *et al.* 1995b, 1997). An der Regulation der Ecdysteroidbiosynthese sind noch weitere Faktoren beteiligt wie z. B. das Peptid Neb-TMOF („*Neobellieria bullata* Trypsin Modulating Oostatic Factor“) (Hua *et al.* 1994).

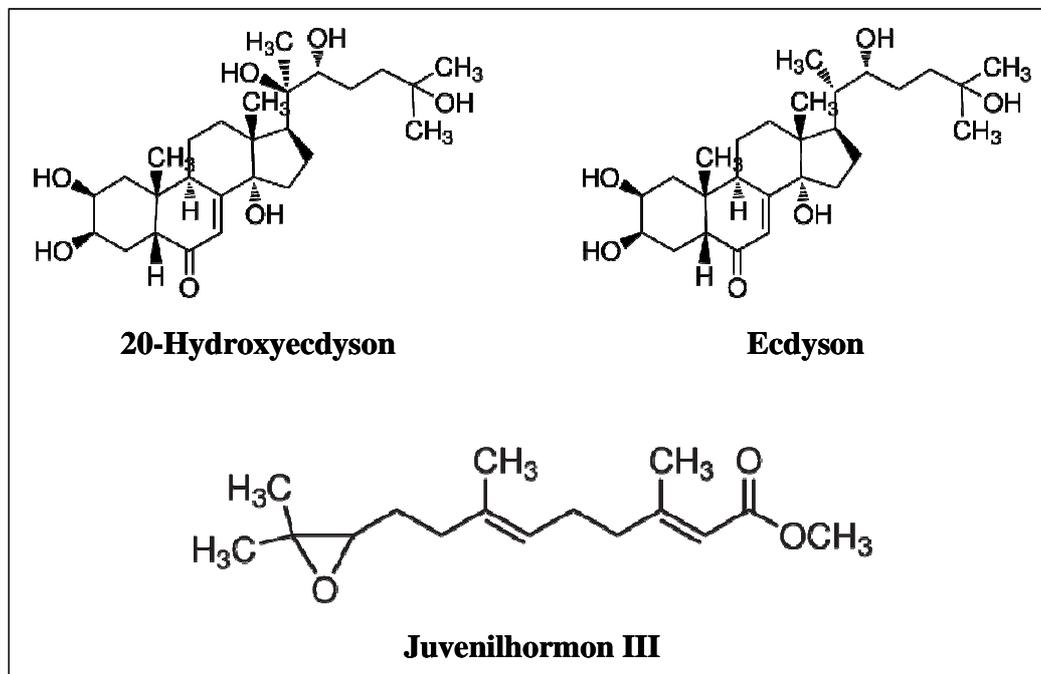


Abb. 3: Struktur von Juvenilhormon III und der Ecdysteroide 20-Hydroxyecdysone und Ecdysone.

Neben der Rolle als Häutungshormon haben Ecdysteroide noch zahlreiche weitere Funktionen. Sie sind beispielsweise verantwortlich für die Stimulation der Vitellogenese und die Aufnahme von Vitellogenin in die Oozyten der Diptera (Fallon *et al.* 1974; Hagedorn *et al.* 1975; Richard *et al.* 1998, 2001), sind beteiligt an der Kutikulabildung in Embryos (Lagueux *et al.* 1979), an der Choriogenese (Bellés *et al.* 1993), an der Spermatogenese und an der Entwicklung der männlichen akzessorischen Drüsen (Review in Happ 1992). Außerdem werden Ecdysteroide häufig von reifenden Eiern aufgenommen und in diesen gespeichert (Gäde *et al.* 1997b).

1.3.2 Juvenilhormone

Die Juvenilhormone (JH) werden hauptsächlich in den Corpora allata (CA) gebildet, paarigen Drüsen ektodermaler Herkunft, die posterior im Insektenkopf lokalisiert sind (Tobe & Stay 1985; Nijhout 1994; Spindler 2003). Die endokrine Funktion der CA wurde erstmals bei der Wanze *Rhodnius prolixus* nachgewiesen (Wigglesworth 1934, 1936). Weitere Syntheseorte können die männlichen akzessorischen Drüsen bei Lepidoptera oder das Ovar bei Diptera sein (Review in Gilbert *et al.* 2000; Goodman & Granger 2005). Juvenilhormone sind Sesquiterpenoide mit einer Epoxid- und einer Methylestergruppe (Abb. 3; Nijhout 1994; Goodman & Granger 2005). Ihre chemische Struktur wurde erstmals durch Rölller *et al.* (1967) bestimmt. Sie identifizierten ein JH mit 18 Kohlenstoffatomen aus dem Nachtfalter *Hyalophora cecropia* (Rölller *et al.* 1967), welches später als JH I (C₁₈JH) bezeichnet wurde (Tobe & Stay 1985; Nijhout 1994). Ebenfalls bei *H. cecropia* konnte kurz darauf die Struktur von JH II (C₁₇JH) bestimmt werden (Meyer *et al.* 1968), bei *Manduca sexta* die Struktur von JH III (C₁₆JH) (Judy *et al.* 1973). Inzwischen sind noch weitere natürlich vorkommende JH-Homologe bekannt, wie das JH 0, das 4-Methyl JH I und das JH III-Bisepoxid (JHB₃) (Review in Goodman & Granger 2005). Zudem wurde bei Vertretern der Heteroptera kürzlich ein weiteres Bisepoxid gefunden (JHSB₃) (Kotaki *et al.* 2009, 2011). JH III scheint bei den meisten Insekten das dominante JH-Homolog zu sein (Nijhout 1994).

Nach der Biosynthese von JH in den CA wird dieses an die Hämolymphe abgegeben. In der Hämolymphe wird das JH mittels Juvenilhormon-bindender Proteine (JHBP) transportiert (Whitmore & Gilbert 1972). Diese Proteine mit einem hohen Molekulargewicht und einer hohen Affinität für JH gehören zu den Lipophorinen und Hexamerinen. Durch die Bindung von JH an JHBP wird der Transport des Lipidmoleküls durch die wässrige Umgebung der Hämolymphe zu den Zielgeweben gewährleistet. Weiterhin verhindert die Bindung von JH an JHBP die unspezifische Adsorption an Membranen und den Abbau durch unspezifische Esterasen (Nijhout 1994; de Kort & Granger 1996; Gilbert *et al.* 2000; Goodman & Granger 2005).

Da keine Speicherung von JH in den Corpora allata erfolgt (Nijhout 1994; Gäde *et al.* 1997b), hängt der JH-Hämolymphtiter direkt von der JH-Biosyntheserate und dem Abbau des JHs ab. Am Abbau des JHs sind zwei verschiedene Enzyme beteiligt – die JH-Esterase (JHE) und die JH-Epoxidhydrolase (JHEH) (Slade & Zibitt 1971, 1972). Die beiden Enzyme haben je nach Insektenart einen unterschiedlichen Anteil am JH-Abbau, bei den meisten Insekten spielt die JH-Esterase die Hauptrolle (Hammock 1985). Der Abbau von JH zu JH-Säure durch JHE

erfolgt in der Hämolymphe und in verschiedenen Geweben wie dem Fettkörper, dem Mitteldarm und dem Integument (Hammock 1985; Jesudason *et al.* 1992). Diese JH-spezifische Esterase kann dabei auch an JHBP gebundenes JH abbauen (Touhara *et al.* 1995). JHEH kommt ausschließlich im Gewebe vor und baut JH zu JH-Diol ab (Hammock 1985; Jesudason *et al.* 1992).

1.3.3 Regulation der Juvenilhormonbiosynthese

Die JH-Biosynthese wird durch neurosekretorisches Material aus dem Gehirn reguliert. Erste Anzeichen für inhibitorische Substanzen produziert in Zellen des Pars intercerebralis des Protocerebrums zeigten sich in Experimenten mit der Schabe *Leucophaea maderae*. Die einseitige Durchtrennung der Nervi corporis cardiaci (NCC) führte zu einer Akkumulation von neurosekretorischem Material vor der Schnittstelle und dem Verschwinden desselben hinter der Schnittstelle. Weiterhin kam es zu einer Vergrößerung des Corpus allatum der operierten Seite (Scharrer 1952). Die beidseitige Durchtrennung der NCC führte zu überzähligen Larvalhäutungen des letzten Larvalstadiums von *L. maderae* (Scharrer 1946). Beide Experimente deuteten auf eine verstärkte Aktivität der CA hin. Später stellte sich heraus, dass die inhibitorischen Substanzen Peptidcharakter haben und die CA zusätzlich zur erwähnten nervösen Verbindung ebenfalls über die Hämolymphe (humoral) erreichen können (Rankin *et al.* 1986). Zahlreiche weitere Experimente ließen vermuten, dass die Regulation der CA-Aktivität über Neuropeptide aus verschiedenen neurosekretorischen Zellen des Gehirns erfolgt (Review in Tobe & Stay 1985). Diese allatoregulierenden Neuropeptide werden anhand ihrer Funktion als Allatostatine (AST; inhibierend) oder Allatotropine (AT; stimulierend) bezeichnet.

1.3.3.1 Allatostatine

Die Allatostatine (AST) können aufgrund struktureller Merkmale in drei Gruppen eingeteilt werden – Allatostatin Typ A, B und C. Allatostatine des A-Typs wurden erstmals aus Gehirnen der Pazifischen Käferschabe *Diploptera punctata* isoliert (Pratt *et al.* 1989, 1991; Woodhead *et al.* 1989) und werden daher auch als Schaben-AST bezeichnet. Sie zeichnen sich aus durch die carboxyterminale Pentapeptidsequenz Y/FXFGL/I/V-amid. Diese ist essentiell für die inhibitorische Wirkung auf die JH-Biosynthese (Hayes *et al.* 1994; Kai *et al.* 2011). Bis heute sind weitere AST-A Peptide aus Vertretern der Ordnungen Blattaria (Belles

et al. 1994; Weaver *et al.* 1994; Predel *et al.* 1999), Caelifera (Veelaert *et al.* 1996a), Diptera (Duve *et al.* 1993; Veenstra *et al.* 1997; Birgül *et al.* 1999), Ensifera (Lorenz *et al.* 1995a), Hymenoptera (Bendena *et al.* 1999), Isoptera (Yagi *et al.* 2008), Lepidoptera (Davis *et al.* 1997; Duve *et al.* 1997a, c) und Phasmatodea (Lorenz *et al.* 2000) isoliert worden. Aus vier Vertretern der Crustacea konnten ebenfalls verschiedene AST-A Peptide isoliert werden (Duve *et al.* 1997b, 2002; Dircksen *et al.* 1999; Fu *et al.* 2005). Auch in Invertebraten außerhalb der Arthropoden scheinen AST-A ähnliche Peptide vorzukommen. Durch immunozytochemische Untersuchungen konnte AST-A ähnliche Immunoreaktivität in den Gruppen Hydrozoa, Cestoda, Trematoda, Turbellaria, Nematoda, Oligochaeta, Gastropoda und Cephalopoda nachgewiesen werden (Review in Bendena *et al.* 1999).

Die AST-A Peptide sind 5 bis 27 Aminosäuren lang (Duve *et al.* 1997b; Bendena *et al.* 1999). Sie sind auf einem einzelnen Gen kodiert und werden in Form eines Polypeptid-Vorläufers exprimiert. Das erste AST-A Gen wurde – wie auch schon das erste AST-A Peptid – bei *D. punctata* identifiziert (Donly *et al.* 1993). Auf diesem sind 13 potentielle AST-A Peptide kodiert. Diese werden von dibasischen endoproteolytischen Schnittstellen (Lys-Arg bzw. Arg-Arg) flankiert, die die Freisetzung der Peptide aus dem Prohormonvorläufer ermöglichen (Veenstra 2000). In den letzten 20 Jahren konnte das AST-A Gen in zahlreichen Insektenordnungen identifiziert werden. Dazu gehören verschiedene Vertreter der Blattaria (Ding *et al.* 1995; Belles *et al.* 1999), Caelifera (Vanden Broeck *et al.* 1996), Diptera (z. B. East *et al.* 1996; Lenz *et al.* 2000b; Alves-Silva *et al.* 2010), Ensifera (Meyering-Vos *et al.* 2001), Hemiptera (Richards *et al.* 2010; Zandawala *et al.* 2012), Hymenoptera (Munoz-Torres *et al.* 2010), Isoptera (Elliott *et al.* 2009b) und Lepidoptera (Davey *et al.* 1999; Secher *et al.* 2001; Abdel-latif *et al.* 2004c). Bei den Coleoptera scheint dagegen kein AST-A vorzukommen (Li *et al.* 2008). Auch bei einigen Crustacea- (z. B. Yin *et al.* 2006) und Arachnida-Arten (Donohue *et al.* 2010) konnte das Allatostatin A-Gen identifiziert werden. Die AST-A Gene zeigen eine starke Variabilität hinsichtlich ihrer Länge und der Anzahl der kodierten AST-A Peptide. Dabei scheint die Anzahl der kodierten Peptide im Laufe der Evolution abgenommen zu haben. So enthalten die Prohormonvorläufer der Crustacea meistens über 30 AST-A Peptide, jedoch nur 12 bis 14 bei den Dictyoptera. Bei den am weitesten evolvierten Diptera kodiert das AST-A Gen nur noch für vier bis fünf AST-A Peptide.

Die Hemmung der JH-Biosynthese der CA durch AST-A Peptide *in vitro* ist schnell und reversibel (Woodhead *et al.* 1989). Effektive Konzentrationen liegen in einem Bereich von 10^{-10} bis 10^{-7} M für eine Inhibition von 50%. Die namensgebende Funktion scheint jedoch auf

Schaben (Pratt *et al.* 1989; Woodhead *et al.* 1989), Grillen (Lorenz *et al.* 1995a), Termiten (Yagi *et al.* 2005) und Heuschrecken (Li *et al.* 2005; Clark *et al.* 2008) beschränkt zu sein. In anderen Insekten wurden zahlreiche andere Wirkungen der AST-A Peptide nachgewiesen. Generell scheinen sie für eine Hemmung der viszeralen Muskulatur zuständig zu sein. Sie wirken myoinhibitorisch auf den Vorderdarm bei Lepidoptera (Duve *et al.* 1999), auf den Mitteldarm bei Blattaria (Fusé *et al.* 1999) und auf den Hinterdarm bei Blattaria und Diptera (Duve & Thorpe 1994; Lange *et al.* 1995; Duve *et al.* 1996). Eine myoinhibitorische Wirkung auf spontane Kontraktionen des Ovidukts bei der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Veelaert *et al.* 1996a). Bei der Schabe *Blattella germanica* führte die Behandlung mit AST-A zu einer Verringerung der Herzschlagrate (Vilaplana *et al.* 1999b). Ebenfalls bei *B. germanica* konnte eine mögliche Auswirkung von AST-A auf die Fortpflanzung durch Inhibition der Freisetzung von Vitellogenin aus dem Fettkörper *in vitro* nachgewiesen werden (Martín *et al.* 1996). Weiterhin wurde eine Stimulation der Freisetzung von Verdauungsenzymen im Mitteldarm von Schaben und Grillen durch AST-A Peptide beobachtet (Fusé *et al.* 1999; Aguilar *et al.* 2003; Woodring *et al.* 2009).

Die verschiedenen Funktionen der AST-A Peptide spiegeln sich auch in ihrer Verbreitung im Körper wider. Immunocytochemische Untersuchungen zeigten Immunoreaktivität gegen AST-A Antikörper in zahlreichen Geweben der untersuchten Insekten. Im Gehirn von *Diploptera punctata* wurde Immunoreaktivität in mehr als 30 lateralen neurosekretorischen Zellen des Pars lateralis im Protocerebrum nachgewiesen. Axone dieser Zellen verlassen das Gehirn über die NCC II und innervieren die Corpora cardiaca (CC), sowie über die Nervi corporis allati I (NCA I) die CA. Auch in vier medialen neurosekretorischen Zellen des Pars intercerebralis im Protocerebrum wurde Immunoreaktivität gefunden (Stay *et al.* 1992). Diese projizieren zu den lateralen neurosekretorischen Zellen, was auf eine neuromodulatorische Rolle der AST-A Peptide deutet (Stay *et al.* 1992; Bendena *et al.* 1999). Ähnliche Immunoreaktivität wurde auch bei Grillen (Neuhäuser *et al.* 1994), Heuschrecken (Veelaert *et al.* 1995) und Termiten (Yagi *et al.* 2005) beobachtet. Dagegen wurde keine AST-A Immunofärbung innerhalb der CA z. B. bei der Fliege *Calliphora vomitoria* (Duve & Thorpe 1994) oder beim Ohrwurm *Euborelia annulipes* (Rankin *et al.* 1998) nachgewiesen, also bei Insektenarten, deren CA *in vitro* keine Hemmung der JH-Biosynthese durch AST-A Peptide zeigen. Eine starke Immunofärbung der CC deutet darauf hin, dass dieses Neurohämälorgan der Freisetzung der AST-A Peptide in die Hämolymphe dient (Witek *et al.* 1999). Weitere Immunoreaktivität gegen AST-A Antikörper wurde beobachtet in verschiedenen Zellen und Axonen im Proto-, Deuto- und Tritocerebrum (Review in Bendena *et al.* 1997, 1999), im

Frontalganglion (Duve *et al.* 1999; Elliott *et al.* 2009a), in Thorakal- und Abdominalganglien (Duve *et al.* 1993; Elliott *et al.* 2009a), im Unterschlundganglion (Bendena *et al.* 1997; Elliott *et al.* 2009a) und in Nervenfasern, die verschiedene Teile des Darms innervieren (Review in Bendena *et al.* 1999). Aufgrund ihrer Verbreitung überwiegend in Bereichen des Gehirns und des Darms werden AST-A Peptide häufig auch als „Gehirn/Darm-Peptide“ bezeichnet.

Rezeptoren für AST-A Peptide wurden bisher nur bei wenigen Insektenarten identifiziert. In der Fliege *Drosophila melanogaster* wurden zwei Rezeptoren gefunden (Birgül *et al.* 1999; Lenz *et al.* 2000a, c), bei den Schaben *Periplaneta americana* (Auerswald *et al.* 2001) und *Diploptera punctata* (Lungchukiet *et al.* 2008a) sowie beim Schmetterling *Bombyx mori* (Secher *et al.* 2001) jeweils einer. Durch Genomanalysen sind inzwischen AST-A Rezeptorgene bei weiteren Arten bekannt, z. B. bei der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* (Hauser *et al.* 2010). Bei den AST-A Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die starke Ähnlichkeit zu Galaninrezeptoren bei Säugetieren aufweisen (Birgül *et al.* 1999). Die Rezeptorgene werden in verschiedenen Geweben exprimiert, z. B. im Gehirn, Darm und den Gonaden, was die Multifunktionalität der AST-A Peptide bestätigt (Secher *et al.* 2001; Gäde *et al.* 2008; Lungchukiet *et al.* 2008a). Die Expression des Rezeptorgens in Gehirn und CA ist dabei korreliert mit der Sensitivität der CA gegen Inhibition durch AST-A Peptide (Stay *et al.* 1991; Lungchukiet *et al.* 2008b).

Allatostatine des B-Typs sind Nonapeptide mit jeweils einem Tryptophan an Position 2 und 9. Diese W(X)₆W-amid Peptide wurden erstmals bei der Europäischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf Kontraktionen des Hinterdarms identifiziert (Schoofs *et al.* 1991). Auch beim Tabakswärmer *Manduca sexta* wurden zwei W(X)₆W-amid Peptide mit inhibitorischer Wirkung auf die Hinterdarmperistaltik isoliert (Blackburn *et al.* 1995). Diese Peptide wurden daher als myoinhibitorische Peptide (Locmi-MIP bzw. Manse-MIP) bezeichnet. Erst Lorenz *et al.* (1995b) haben die Inhibition der JH-Biosynthese bei der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* und beim Heimchen *Acheta domesticus* durch W(X)₆W-amid Peptide nachgewiesen. Sie bezeichneten die neu isolierten Neuropeptide aus *G. bimaculatus* daher als Allatostatin B-Peptide (Grillen-AST). Weitere AST-B Peptide bzw. AST-B Gene wurden bisher identifiziert bei *Bombyx mori* (Lepidoptera; Hua *et al.* 1999), *Carausius morosus* (Phasmatodea; Lorenz *et al.* 2000), *Periplaneta americana* (Blattaria; Predel *et al.* 2001), *Tribolium castaneum* (Coleoptera; Li *et al.* 2008), bei den Diptera *Drosophila melanogaster*

(Williamson *et al.* 2001a) und *Anopheles gambiae* (Riehle *et al.* 2002) sowie bei den Hemiptera *Myzus persicae* und *Aphis gossypii* (Christie 2008). Auch bei anderen Invertebraten konnten AST-B Peptide identifiziert werden, wie bei den Crustacea *Cancer productus* (Fu *et al.* 2005) und *Daphnia pulex* (Gard *et al.* 2009; Christie *et al.* 2011) sowie bei den Annelida *Helobdella robusta* und *Capitella teleta* (Veenstra 2011).

AST-B Peptide wirken *in vitro* inhibitorisch auf die JH-Biosynthese der CA bei Grillen (Lorenz *et al.* 1995b), Kurzfühlerschrecken (Li *et al.* 2005) und beim Mehlkäfer *Tenebrio molitor* (Abdel-latif & Hoffmann 2010), jedoch nicht bei anderen Insektenarten (Lorenz *et al.* 2000; Oeh *et al.* 2000). Weitere Funktionen der AST-B Peptide sind die Hemmung der Ecdysteroidbiosynthese der Prothoraxdrüse bei *Bombyx mori* (Hua *et al.* 1999) und des Ovars bei *G. bimaculatus* (Lorenz *et al.* 1997), die Hemmung der Ovidukt Kontraktion bei *L. migratoria* (Schoofs *et al.* 1991) und die bereits erwähnte Hemmung der Darmperistaltik bei *M. sexta* (Blackburn *et al.* 1995), *Leucophaea maderae*, *L. migratoria* (Schoofs *et al.* 1991) und *Periplaneta americana* (Predel *et al.* 2001). Ähnlich wie Allatostatine des A-Typs zeigen auch die AST-B Peptide eine weitreichende Verbreitung im Insektenkörper. Immunreaktivität und/oder Genexpression wurde nachgewiesen in verschiedenen Bereichen des Gehirns (z. B. Pars intercerebralis und lateralis), im Unterschlundganglion, in Nerven von CC und CA, in abdominalen und thorakalen Ganglien, aber auch im Hoden, Ovar und verschiedenen Teilen des Darms (Witek *et al.* 1999; Wang 2004; Griebler 2009).

Das erste Allatostatin des C-Typs wurde aus dem Kopf von *Manduca sexta* isoliert. AST-C Peptide werden daher auch Lepidoptera-AST genannt. Das isolierte Peptid mit der Struktur pEVRFRQCYFNPISCF-OH ist nicht amidiert, N-terminal blockiert und inhibiert *in vitro* die JH-Biosynthese der CA von *M. sexta* und *Heliothis virescens* (Kramer *et al.* 1991). Es enthält eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 7 und 14, die wichtig für die Konformation des Peptids und die Bindung an oder Aktivierung des Rezeptors ist (Audsley *et al.* 2008). Weitere AST-C Peptide und AST-C Gene wurden in anderen Lepidoptera-Arten z. B. *Lacanobia oleracea* (Edwards *et al.* 2001) und *Spodoptera frugiperda* (Abdel-latif *et al.* 2003), bei *Tribolium castaneum* (Weaver & Audsley 2009) und bei den Diptera *Drosophila melanogaster* (Williamson *et al.* 2001b), *Anopheles gambiae* (Riehle *et al.* 2002) und *Aedes aegypti* (Li *et al.* 2006) identifiziert. Im Genom der Honigbiene *Apis mellifera* wurde ein Peptid lokalisiert, welches aufgrund verschiedener Variationen zuerst nicht als AST-C erkannt wurde. Es ist amidiert und die C-terminale Sequenz ist nicht PISCF, sondern AVSCF (Hummon *et al.* 2006). Auch bei der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis*

(Hauser *et al.* 2010) wurde das AST-C Gen mit dieser Variation identifiziert. Bei einigen hemimetabolen Insekten und anderen Arthropoden wurde ebenfalls die amidierete AVSCF-Variante gefunden (Veenstra 2009; Weaver & Audsley 2009).

Die Inhibition der JH-Biosynthese *in vitro* wurde bisher nur bei Nachtfaltern und Mücken nachgewiesen (Kramer *et al.* 1991; Li *et al.* 2006; Audsley *et al.* 2008). Dabei gibt es große Unterschiede zwischen den einzelnen Arten. Bei *S. frugiperda* beispielsweise wirkt AST-C nur inhibierend auf vorher durch AT stimulierte CA (Oeh *et al.* 2000). AST-C Peptide wirken außerdem myoinhibitorisch auf den Vorderdarm in Lepidoptera (Review in Audsley *et al.* 2008) und cardioinhibitorisch bei *D. melanogaster* (Price *et al.* 2002). Wie AST-A und AST-B Peptide sind AST-C Peptide weit verbreitet im zentralen Nervensystem (Review in Audsley *et al.* 2008). AST-C Genexpression findet sich im Gehirn, Mitteldarm und den Reproduktionsorganen (Abdel-latif *et al.* 2004b; Griebler 2009).

Zusätzlich zum erwähnten AST-C Gen wurde in allen Insekten mit vollständig sequenziertem Genom sowie in der Zecke *Ixodes scapularis* ein weiteres Gen gefunden, welches ein AST-C ähnliches Peptid kodiert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum AST-C wird es als Allatostatin Doppel-C (AST-CC) bezeichnet. Die Funktion des Peptids ist bisher nicht bekannt. Das AST-CC Gen wird im Vergleich zum AST-C Gen in adulten *D. melanogaster* jedoch nur sehr schwach exprimiert (Chintapalli *et al.* 2007; Veenstra 2009).

1.3.3.2 Allatotropine

Bei den Allatotropinen (AT) wurden zwei strukturell unterschiedliche Peptide identifiziert. Das erste AT-Peptid mit der Struktur GFKNVEMMTARGF-amid wurde aus dem Kopf von *Manduca sexta* isoliert (Manse-AT). Es führte zu einer Steigerung der JH-Biosynthese der CA *in vitro* bei adulten *M. sexta* und *Heliothis virescens*, jedoch nicht bei Larven und Puppen. Kein Effekt wurde beobachtet beim Käfer *Tenebrio molitor*, bei der Schabe *Periplaneta americana* oder bei der Heuschrecke *Schistocerca nitens* (Kataoka *et al.* 1989). Ähnliche Peptide wurden auch bei weiteren Lepidoptera (Audsley *et al.* 2000; Oeh *et al.* 2000) sowie bei Diptera, Coleoptera und Orthoptera gefunden (Review in Elekonich & Horodyski 2003). Das erste AT-Gen wurde ebenfalls bei *M. sexta* sequenziert (Taylor *et al.* 1996). Es wird in drei verschiedenen mRNA-Isoformen exprimiert, die sich durch alternatives Splicing voneinander unterscheiden (Taylor *et al.* 1996; Lee *et al.* 2002). Auch bei anderen Schmetterlingen (z. B. Truesdell *et al.* 2000; Abdel-latif *et al.* 2003) und bei Mücken

(Veenstra & Costes 1999; Riehle *et al.* 2002) konnten AT-Gene identifiziert werden. Bei *Drosophila melanogaster* dagegen scheint AT nicht vorzukommen (Vanden Broeck 2001). Neben der Stimulation der JH-Biosynthese *in vitro* bei adulten Schmetterlingen (Kataoka *et al.* 1989; Oeh *et al.* 2000), Mücken (Li *et al.* 2003b) und Honigbienen (Rachinsky *et al.* 2000) konnten noch weitere Funktionen von AT beobachtet werden. Aus *Locusta migratoria* konnte ein AT-ähnliches Peptid mit myotroper Wirkung auf Ovidukt und Hinterdarm von *L. migratoria* und *Leucophaea maderae* isoliert werden (Paemen *et al.* 1991). Myotrope Wirkung auf Herz und Vorderdarm wurde bei *M. sexta* und *Helicoverpa armigera* beobachtet (Veenstra *et al.* 1994; Duve *et al.* 1999). Ebenfalls bei *M. sexta* wurde die Inhibition des Ionentransports im Mitteldarm durch AT gezeigt (Lee *et al.* 1998). AT-Peptide sind ähnlich wie AST-Peptide weit verbreitet im zentralen Nervensystem, aber auch in nicht-neuralen Geweben (Review in Gäde & Hoffmann 2005; Audsley *et al.* 2008). AT-Genexpression findet sich im Gehirn, Mitteldarm und den Reproduktionsorganen (Abdel-latif *et al.* 2004b).

Beim Nachtfalter *Spodoptera frugiperda* konnte zusätzlich zum Manse-AT ein weiteres Gen identifiziert werden, das für ein strukturell unähnliches Peptid kodiert. Das potentielle Peptid weist die C-terminale Struktur NPISCF auf, die identisch zum C-Terminus von AST-C bei *S. frugiperda* ist. Aufgrund seiner allatostimulierenden Wirkung in adulten Weibchen wurde das Peptid als Spofr-AT2 bezeichnet (Abdel-latif *et al.* 2004a). RNA-Interferenz-Experimente deuten jedoch auf eine entwicklungsabhängige Wirkung von AT2 hin – allatoinhibierend bei Larven, allatostimulierend bei Adulten (Griebler *et al.* 2008; Griebler 2009).

1.3.3.3 Weitere regulatorische Substanzen

Neben den allatoregulierenden Neuropeptiden wird die JH-Biosynthese auch durch Neurotransmitter wie Dopamin, L-Glutamat und Octopamin beeinflusst (Goodman & Granger 2005).

Juvenilhormone und Ecdysteroide haben zudem selber Einfluss auf ihre Biosynthese, sowie einen gegenseitigen Einfluss aufeinander (Tobe & Stay 1985; Nijhout 1994; Schal *et al.* 1997; Goodman & Granger 2005; Marchal *et al.* 2010).

1.3.4 Funktionen von Juvenilhormonen

Zu den vielfältigen Funktionen der JHs zählen die Verhinderung der Metamorphose bzw. Adulthäutung im juvenilen Tier (Wigglesworth 1934, 1936), die Stimulation der Eireifung (Wigglesworth 1936), die Regulation der Vitellogeninsynthese im Fettkörper (Engelmann 1969; Pan & Wyatt 1971) und der Aufnahme des Vitellogenins in die Oozyten (Bell & Barth 1971), die Stimulation der Entwicklung der männlichen akzessorischen Drüsen (Wigglesworth 1936) und der Proteinsynthese dieser (Piulachs *et al.* 1992). Außerdem spielt JH eine Rolle bei der Embryogenese (Review in Goodman & Granger 2005), bei der Diapause (de Wilde & de Boer 1961; Chippendale & Yin 1973) und der Pheromonbiosynthese und -freisetzung (Cusson & McNeil 1989; Cusson *et al.* 1990). Auch am Polyphänismus von Heuschrecken und Blattläusen ist JH beteiligt (Review in Nijhout 1994; Hartfelder 2000). Bei Honigbienen spielt JH eine Rolle bei der Regulation des Verhaltens (Review in Robinson 1992). Auch die Kastendifferenzierung bei sozialen Insekten soll von JH abhängig sein.

1.4 Juvenilhormon und Kastendifferenzierung

Erste Hinweise für die Beteiligung von JH an der Kastendifferenzierung von Termiten zeigten sich bei histologischen Untersuchungen der Corpora allata von verschiedenen Kasten. Dabei wurden vergrößerte CA vor und nach der Häutung bei Ersatzgeschlechtstieren und bei Vorsoldaten gefunden (Kaiser 1956; Lüscher 1957, 1958). Eine Vergrößerung der CA bei gleichzeitiger Abnahme der Kerndichte lässt auf eine Zunahme der Aktivität schließen (Engelmann 1957). Vergrößerte CA finden sich aber nicht nur in Ersatzgeschlechtstieren, auch primäre Geschlechtstiere nach Koloniegründung (König und Königin) weisen ein großes CA-Volumen auf (Lüscher & Springhetti 1960; Noirot 1969a). Bei physogastrischen Königinnen von *Macrotermes subhyalinus* beispielsweise können die CA im Vergleich zu geflügelten Alaten um das Hundertfache vergrößert sein (Lüscher 1976). Implantationsexperimente von Lüscher (1958) erbrachten weitere Hinweise auf die Rolle von JH bei der Kastendifferenzierung. Die Implantation aktiver CA in Larven, Nymphen oder Pseudergaten von *Kaloterme flavicollis* führte zur Bildung von Vorsoldaten (Lüscher 1958; Lüscher & Springhetti 1960). Auch die Behandlung mit JH oder JH-Analoga (JHA) wie Methopren oder Hydropren durch topikale Applikation, Injektion oder Verfütterung löste in allen bisher untersuchten Termitenarten eine verstärkte Bildung von Vorsoldaten aus (Hrdý &

Křeček 1972; Howard & Haverty 1979; Miura & Scharf 2011). Dabei wurde meistens keine hundertprozentige Umwandlung in Vorsoldaten beobachtet, die Vorsoldatenbildung schien abhängig von der Kompetenz der behandelten Individuen zu sein (Springhetti 1972; Lüscher 1974a; Okot-Kotber 1980a). Darüber hinaus kam es häufig zur Bildung von Zwischenformen zwischen verschiedenen Kasten (Interkasten), die Merkmale beider Kasten aufwiesen. So konnten Interkasten zwischen Nymphe-Vorsoldat oder Arbeiter-Vorsoldat beobachtet werden (Hrdý & Křeček 1972; Lelis & Everaerts 1993; Miura *et al.* 2003).

Untersuchungen der JH-Biosynthese und des JH-Titers bestätigten die Vermutungen und Ergebnisse der frühen Implantations- und Applikationsexperimente. Sehr hohe JH-Titer und eine hohe *in vitro* JH-Biosynthese konnten während der Soldatendifferenzierung und besonders in Vorsoldaten nachgewiesen werden. Bei „Arbeitern“ und Soldaten waren JH-Titer und *in vitro* JH-Synthese geringer (Park & Raina 2004; Cornette *et al.* 2008; Elliott & Stay 2008). Während der Imaginalentwicklung über die Nymphenstadien zur Alate wurden abnehmende JH-Titer nachgewiesen, die ihr Minimum unmittelbar vor der Adulthäutung erreichten (Cornette *et al.* 2008; Korb *et al.* 2012). Neotenicus wiesen ebenfalls nur geringe JH-Hämolymphtiter auf (Cornette *et al.* 2008). Während ihrer Differenzierung kam es jedoch zum Anstieg der *in vitro* JH-Synthese unmittelbar vor der Häutung (Elliott & Stay 2008), was sich auch in der Vergrößerung der CA kurz vor der Häutung widerspiegelt (Lüscher 1957).

Nijhout & Wheeler (1982) haben die bis dahin bekannten Fakten zusammengefasst und ein Modell für den Einfluss von JH auf die Kastendifferenzierung entwickelt. Die Kastendifferenzierung wurde dabei am Beispiel eines Pseudergaten betrachtet (linearer Entwicklungsweg, siehe Abb. 2, S. 7). Dieser hat vier Entwicklungsoptionen – stationäre Häutung oder Weiterentwicklung zum Vorsoldaten (Soldaten), zum Neotenic oder zur Nymphe (Alate) (Review in Korb & Hartfelder 2008). Die Art der nächsten Häutung wird dabei – wie bei anderen Insekten auch – durch den JH-Titer der Phase zwischen letzter und nächster Häutung (Zwischenhäutungsintervall) bestimmt (Riddiford 1994). Dem Modell nach gibt es im Zwischenhäutungsintervall drei JH-kritische Phasen (Abb. 4). Die erste Phase kontrolliert die Entwicklung von Fortpflanzungsorganen (Gonaden, externe Genitalien, akzessorische Drüsen), die sich sowohl bei Nymphen/Alaten als auch bei Neotenicus entwickeln (Nijhout & Wheeler 1982). Diese Phase fällt zeitlich mit der höchsten Kompetenz der Pseudergaten zur Neotenicbildung zusammen (Lüscher 1952). Die zweite Phase kontrolliert die Entwicklung der nicht-sexuellen Adultmerkmale, die nur bei Nymphen/Alaten zu finden sind (Augen, Flügel, Pigmentierung). Ein hoher JH-Titer während dieser ersten

beiden Phasen verhindert die Ausbildung der genannten Merkmale (Nijhout & Wheeler 1982). In der zweiten Hälfte des Zwischenhäutungsintervalls gibt es eine dritte JH-kritische Phase, die zeitlich mit der höchsten Kompetenz der Pseudergaten zur Vorsoldatenbildung zusammenfällt (Springhetti 1972; Lüscher 1974a). Diese dritte Phase kontrolliert die Entwicklung typischer Soldatenmerkmale (Vergrößerung Kopf und Mandibeln, Pigmentierung). Die Ausbildung der Soldatenmerkmale wird durch einen niedrigen JH-Titer während der dritte Phase verhindert (Nijhout & Wheeler 1982; Nijhout 1994). Ein geringer JH-Titer während des gesamten Zwischenhäutungsintervalls führt demnach – ähnlich wie bei anderen hemimetabolen Insekten (Lanzrein *et al.* 1985a; Nijhout 1994) – zur Imaginalentwicklung, über die Nymphe zur Alate. Die Entwicklung eines Vorsoldaten/Soldaten erfordert einen hohen JH-Titer während des gesamten Zwischenhäutungsintervalls. Hohe JH-Titer zu Beginn des Intervalls und geringe am Ende des Intervalls führen zur stationären Häutung, das umgekehrte Muster führt zur Bildung von Neotenic (Nijhout & Wheeler 1982). Dabei ist zu beachten, dass das Zwischenhäutungsintervall bei der Neotenicbildung verkürzt ist (Lüscher 1952), die Häutung findet statt, bevor die dritte JH-kritische Phase erreicht ist (Abb. 4; Nijhout & Wheeler 1982).

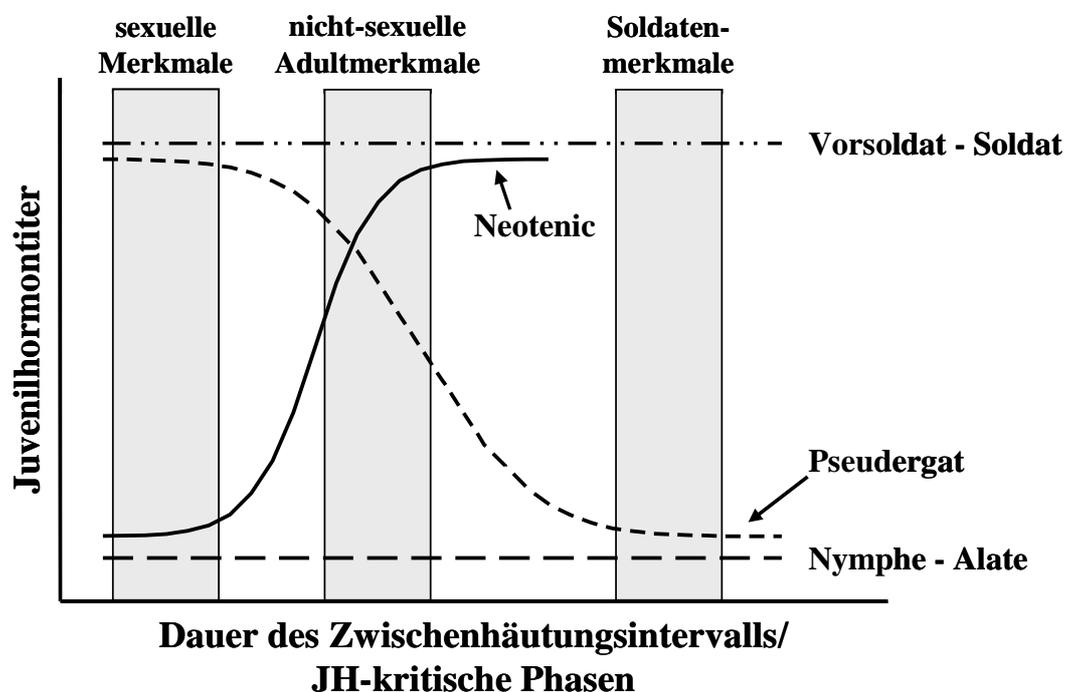


Abb. 4: Modell über den Einfluss des Juvenilhormontiters auf die Kastendifferenzierung bei Termiten mit linearem Entwicklungsweg.

Jede Kurve repräsentiert einen hypothetischen Verlauf des Juvenilhormontiters im Zwischenhäutungsintervall eines Pseudergaten bei Entwicklung der angegebenen Kästen. Graue Boxen: JH-kritische Phasen für die Kontrolle der Entwicklung von spezifischen Merkmalen. (Nach: Nijhout & Wheeler 1982; Nijhout 1994).

Bei Termiten mit zweiästigem Entwicklungsweg (siehe Abb. 2, S. 7) ist nur wenig über die Kontrolle der Kastendifferenzierung bekannt. Es wird eine maternale Determination über Einlagerung verschiedener Mengen von JH in die Eier vermutet (Lüscher 1976; Lanzrein *et al.* 1985b; Watson & Abbey 1987). Der JH-Gehalt von Eiern aus *Macrotermes subhyalinus*-Kolonien beispielsweise unterliegt saisonalen Schwankungen, ähnlich den saisonalen Schwankungen bei der Bildung von Nymphen. Kurz bevor sich normalerweise Nymphen entwickeln, konnte ein geringerer JH-Gehalt in Eiern nachgewiesen werden (Lüscher 1976). Die Determination der Soldaten erfolgt später innerhalb der apteren Linie. Auch hier scheint ein hoher JH-Gehalt die Voraussetzung für die Entwicklung zu sein (French 1974; Lenz 1976; Okot-Kotber 1980a). Anders als bei den niederen Termiten *Kaloterme flavicollis* und *Zootermopsis angusticollis* (Springhetti 1972; Lüscher 1974a) liegt bei den höheren Termiten die Phase der höchsten Kompetenz zur Vorsoldatenbildung vermutlich in der ersten Hälfte des Zwischenhäutungsintervalls (Okot-Kotber 1980a).

Die Ausbildung von Geschlechtstieren bei niedrigem JH-Titer unterscheidet sich deutlich von der Kastendifferenzierung der sozialen Hymenoptera. Königinnen bei Hummeln, Bienen und Ameisen entwickeln sich meist unter Einfluss eines hohen JH-Titers oder können durch Zugabe von JH künstlich erzeugt werden (z. B. Hartfelder 1987; Rachinsky *et al.* 1990; Cnaani *et al.* 2000).

Die Kastendifferenzierung wird durch verschiedene extrinsische und intrinsische Faktoren beeinflusst (Review in Miura & Scharf 2011). Zu den intrinsischen Faktoren gehören beispielsweise der Ernährungszustand bzw. das Gewicht (Okot-Kotber 1982), das Entwicklungsstadium (Okot-Kotber 1980c) oder die Kompetenz des Individuums (Lüscher 1952, 1974a; Springhetti 1972; Okot-Kotber 1980a). Zu den extrinsischen Faktoren zählen Umwelteinflüsse wie Jahreszeit (Lüscher 1972, 1976; Haverty & Howard 1981; Howard & Haverty 1981; Liu *et al.* 2005a), Temperatur (Waller & La Fage 1988; Liu *et al.* 2005b) oder Qualität und Quantität der Nahrung (Park & Raina 2003; Korb & Katrantzis 2004; Liu *et al.* 2005b). Soziale Faktoren wie die Größe (Haverty 1979; Elliott & Stay 2008; Mao & Henderson 2010) und die Zusammensetzung der Kolonie müssen ebenfalls zu den extrinsischen Faktoren mit Einfluss auf die Kastendifferenzierung gerechnet werden. Die Koloniezusammensetzung spielt eine besonders große Rolle, da gezeigt werden konnte, dass Individuen einer bestimmten Kaste inhibierend auf die Entstehung neuer Individuen derselben Kaste wirken können. So wirken Soldaten hemmend auf die Bildung von Vorsoldaten (Castle

1934; French 1974; Park & Raina 2003) und funktionelle Geschlechtstiere hemmend auf die Entwicklung von Nymphen und Neotenicis (Castle 1934; Lüscher 1952; Bordereau 1975). Andererseits konnte aber auch eine stimulierende Wirkung beobachtet werden. Geschlechtstiere wirken fördernd auf die Bildung neuer Vorsoldaten (Springhetti 1969; Bordereau & Han 1986), Soldaten dagegen stimulieren die Entwicklung von Geschlechtstieren (Lüscher 1975; Roux & Korb 2004). Eine Ausnahme bildet *Mastotermes darwiniensis*. Auch bei dieser Art wird die Bildung von Neotenicis durch vorhandene primäre Geschlechtstiere unterdrückt. Im Gegensatz zu anderen untersuchten Termitenarten konnte bei *M. darwiniensis* jedoch eine stimulierende Wirkung von Neotenicis auf die Bildung neuer Neotenicis beobachtet werden. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der reproduktiven Kapazität, was eine rasche Ausbreitung bei günstigen Umweltbedingungen ermöglicht (Watson *et al.* 1975; Watson & Abbey 1985).

Die Hemmwirkung ist wahrscheinlich auf Pheromone zurückzuführen (Karlson & Lüscher 1959; Lüscher 1974b). Extrakte aus Kopf und Thorax von Geschlechtstieren wirken hemmend auf die Neotenicbildung bei Verfütterung (Light 1944; Lüscher 1956, 1974b). Die Hemmwirkung der Geschlechtstiere wird bei *Kalotermes flavicollis* komplett aufgehoben, wenn ihr Anus abgedeckt ist. Es wurde daher vermutet, dass die hemmenden Pheromone der Geschlechtstiere im Kopf oder Thorax gebildet und über den Anus abgegeben werden. Die Aufnahme der Pheromone und Verbreitung in der Kolonie durch die Arbeiter erfolgt dann vermutlich über Trophallaxis (Lüscher 1955, 1956, 1962, 1974b). Untersuchungen an *Neotermes jouteli* zeigten dagegen eine deutliche Hemmwirkung der Geschlechtstiere auch bei versiegeltem Anus (Nagin 1972). Die Abgabe der Pheromone über die Körperoberfläche ist eine weitere Möglichkeit (Lüscher 1974b; Bordereau 1985; Šobotník *et al.* 2003; Hanus *et al.* 2010). Bisher wurde angenommen, dass die Hemmstoffe nicht flüchtig sind und nur über direkten Kontakt übertragen werden können (Lüscher 1952). In einer aktuellen Studie an *Reticulitermes speratus* konnte jedoch ein flüchtiger Stoff nachgewiesen werden, der nur von weiblichen reproduzierenden Neotenicis und ihren Eiern abgegeben wird. Dieser besteht aus den zwei Komponenten n-Butyl-n-butytrat und 2-Methyl-1-butanol und wirkt inhibierend auf die Entstehung neuer weiblicher Neotenicis (Matsuura *et al.* 2010). Bei Königinnen von *Nasutitermes takasagoensis* wurde ein anderer spezifischer flüchtiger Stoff (Phenylethanol) gefunden, dessen Wirkung bisher jedoch noch unbekannt ist (Himuro *et al.* 2011). Die Hemmstoffe scheinen demnach nicht nur geschlechtsspezifisch (Lüscher 1956, 1962; Matsuura *et al.* 2010), sondern auch artspezifisch zu sein.

Die Inhibition der Vorsoldatenbildung durch Soldaten benötigt physischen Kontakt zwischen den Arbeitern und Soldaten, der Hemmstoff der Soldaten ist nicht flüchtig (Okot-Kotber 1985; Park & Raina 2003; Dong *et al.* 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition durch lebende Soldaten, Ganzkörperextrakte von Soldaten oder Sekrete der Frontaldrüse in gleichem Ausmaß hervorgerufen wird. Die Frontaldrüse gilt daher als die wahrscheinlichste Quelle der Hemmstoffe (Lefeuvre & Bordereau 1984). Allerdings kommen Frontaldrüsen nur bei Soldaten der Familien Rhinotermitidae, Serritermitidae und Termitidae vor (Prestwich 1979). Kopfextrakte der Soldaten von *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae) wirken jedoch ebenfalls hemmend auf die Soldatenbildung. Die Quelle des Hemmstoffs bei dieser Art ist bisher unbekannt (Korb *et al.* 2003). Soldatenspezifische Terpene wie γ -Cadinen und γ -Cadinenal, die bei *Reticulitermes flavipes* identifiziert wurden, scheinen für die Hemmwirkung verantwortlich zu sein (Tarver *et al.* 2009, 2011). Die Hemmwirkung der Soldaten beruht wahrscheinlich auf der Regulation des JH-Titers der Arbeiter, es konnte eine Reduktion des endogenen JH-Titers von Arbeitern bei Anwesenheit von Soldaten nachgewiesen werden (Mao *et al.* 2005; Park & Raina 2005; Watanabe *et al.* 2011).

Es wurden zahlreiche Gene identifiziert, die in verschiedenen Kasten und während der Entwicklung der Kasten eine unterschiedliche Expression aufweisen. Auch die Behandlung mit JH oder JHA hatte häufig einen Einfluss auf die Expression dieser Gene. Zu den regulierten Genen gehörten beispielsweise Gene mit Verbindung zu JH-Synthese, -transport und -abbau wie Cytochrom P450, Hexamerin oder Vitellogenin (Scharf *et al.* 2005a, b; Cornette *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006a, c; Weil *et al.* 2007, 2009; Tarver *et al.* 2010). Die Expression von Allatostatin A wurde bisher nur einmal in Verbindung mit der Kastendifferenzierung untersucht (Elliott *et al.* 2009b). In Arbeitern und Nymphen sind die Gene für den Aufschluss von Lignozellulose besonders stark exprimiert (Scharf *et al.* 2003; Fujita *et al.* 2008). Während der Soldatendifferenzierung stehen die regulierten Gene im Zusammenhang mit dem zentralen Nervensystem (Ishikawa *et al.* 2008, 2010), kodieren für Proteine des Zytoskeletts, der Kutikula, der Muskulatur oder für ribosomale, DNA- oder Aktin-bindende Proteine (Scharf *et al.* 2003; Koshikawa *et al.* 2005).

1.5 Phylogenie der Dictyoptera

Gemeinsam mit den Ordnungen Mantodea (Fangschrecken bzw. Gottesanbeterinnen) und Blattaria (Schaben) bilden die Termiten (Isoptera) die Überordnung Dictyoptera. Die Monophylie der Dictyoptera gilt generell als gesichert (Hennig 1981; Kristensen 1981; Wheeler *et al.* 2001). Die Einordnung der drei Gruppen in die Überordnung Dictyoptera beruht auf fünf morphologischen Synapomorphien – einer Perforation des Tentoriums (1), der Bildung einer Genitaltasche (Vestibulum) beim Weibchen durch das verlängerte siebente Abdominalsternum (2), einem verkürzter Ovipositor (3), der Ablage der Eier in einer Schutzhülle (Oothek; bei Termiten nur bei *M. darwiniensis*) (4) und der Struktur des Proventrikulus (5) (Kristensen 1975; Thorne & Carpenter 1992; Klass 1998, 2003; Nalepa & Lenz 2000; Lo *et al.* 2003; Klass & Meier 2006). Auch die Monophylie der Gruppen Isoptera (Lo *et al.* 2000; Eggleton 2001; Ware *et al.* 2008) und Mantodea (Roy 1999; Svenson & Whiting 2004; Ware *et al.* 2008) gilt als gesichert. Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Dictyoptera sind dagegen noch nicht abschließend geklärt und werden seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Der Grund für die Diskussionen ist die Entdeckung von Cleveland *et al.* (1934), dass holzfressende Schaben der Gattung *Cryptocercus* (Familie Cryptocercidae) ähnliche symbiontische Darmflagellaten aufweisen wie einige niedere Termiten. Zur Anordnung der einzelnen Ordnungen innerhalb der Dictyoptera gibt es drei Hypothesen (Eggleton 2001):

1. *Cryptocercus* bildet die Schwestergruppe zu den Isoptera. Somit würden die Isoptera innerhalb der Blattaria stehen und die Blattaria würden eine paraphyletische Gruppe bilden.
2. Die monophyletischen Blattaria und Isoptera sind Schwestergruppen.
3. Blattaria und Mantodea gruppieren zusammen und die Isoptera bilden die Schwestergruppe dieses Komplexes.

Frühe Studien gingen aufgrund der ähnlichen Darmfauna von einer engen Verwandtschaft von *Cryptocercus* mit den Termiten sowie von einem gemeinsamen Vorfahr mit symbiontischen Darmflagellaten aus (Cleveland *et al.* 1934; Bobyleva 1975). Thorne (1990, 1991) dagegen vertrat eine andere Hypothese. Ihrer Meinung nach könnte ein Transfer der symbiontischen Fauna von einem Wirt auf den anderen stattgefunden haben, da sich viele holzfressende Schaben und Termiten den gleichen Lebensraum teilen (z. B. *Cryptocercus*

clevelandi und *Zootermopsis* sp. leben sympatrisch im pazifischen Nordwesten der USA). Durch interspezifische Aggressionen und Verzehr der getöteten Individuen könnte es bei den Vorfahren der Termiten und Schaben zur Übertragung der Flagellaten zwischen verschiedenen Wirten gekommen sein.

Eine phylogenetische Analyse verschiedener morphologischer, Entwicklungs- und Verhaltensmerkmale von sechs Dictyoptera-Taxa bestätigte die Hypothese von Thorne (1990, 1991). In dieser gruppierten die Blattaria (inklusive Cryptocercidae) zusammen mit den Mantodea, die Isoptera bildeten die Schwestergruppe dieses Komplexes (Thorne & Carpenter 1992). Eine andere Studie kam anhand von mitochondrialen RNA-Genen zu dem gleichen Ergebnis (Kambhampati 1995). Weitere Unterstützung der dritten Hypothese findet sich bei Grandcolas (1994, 1996) und Grandcolas & Deleporte (1996), die *Cryptocercus* aber zur Familie Polyphagidae und damit tief innerhalb der Blattaria einordneten.

Gäde *et al.* (1997a) befürworteten ebenfalls die Einordnung von *Cryptocercus* in die Familie Polyphagidae anhand einer Untersuchung von hypertrehalosämischen Neuropeptiden. Insgesamt zeigte sich jedoch bei Gäde *et al.* (1997a) eine andere Anordnung der Dictyoptera – Isoptera und Blattaria gruppierten zusammen, Mantodea bildete die Schwestergruppe (Hypothese 2). Die zweite Hypothese wird ebenfalls von Bandi *et al.* (1995) anhand einer phylogenetischen Untersuchung der Endosymbionten des Fettkörpers von Schaben und der Termiten *M. darwiniensis* bestätigt.

Die Mehrheit der Studien zur Phylogenie der Dictyoptera unterstützt allerdings die klassische Sichtweise (Cleveland *et al.* 1934), also die erste Hypothese der paraphyletischen Blattaria mit Isoptera und *Cryptocercus* als Schwestergruppen. Dabei gibt es Studien, die auf morphologischen (Deitz *et al.* 2003; Klass & Meier 2006), auf molekularen (Lo *et al.* 2000, 2003; Inward *et al.* 2007a; Pellens *et al.* 2007) oder auf einer Kombination aus morphologischen und molekularen Daten basieren (Kjer *et al.* 2006; Davis *et al.* 2009).

Neben den molekularen Daten sind es vor allem die zahlreichen morphologischen, Entwicklungs- und Verhaltensdaten, die für eine enge Verwandtschaft von Blattaria und Isoptera und besonders von *Cryptocercus* und den Termiten sprechen. Die Monophylie der Blattodea (Blattaria und Isoptera; Hennig 1981) wird unterstützt durch den Verlust des unpaaren Ocellus (1) (Hennig 1981), das Vorkommen von Endosymbionten im Fettkörper (2), die Produktion der Oothek im Vestibulum (3) und einen verkürzten Ovipositor (4). Bei den bereits erwähnten Endosymbionten handelt es sich um die Eubakterien *Blattabacterium*

cuenoti, die intrazellulär in spezialisierten Zellen (Bakteriozyten oder Myzetozyten) des abdominalen viszeralen Fettkörpers vorkommen, eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus spielen und vertikal über die Eier auf den Nachwuchs übertragen werden (Koch 1938; Sacchi *et al.* 1998, b, 2000; López-Sánchez *et al.* 2009). Sie wurden in allen bisher untersuchten Schabenarten gefunden, bei den Termiten jedoch nur in *M. darwiniensis* (Jucci 1952; Dasch *et al.* 1984). Die Entwicklung einer komplexen Mikrobiota im Darm, die die Rolle von *Blattabacterium* übernommen hat, könnte den Verlust des Endosymbionten in den anderen Termitenarten ermöglicht haben (Lo *et al.* 2003). Die Bildung der Oothek findet bei *M. darwiniensis* und bei verschiedenen Blattaria-Arten aufgrund des verkürzten Ovipositors innerhalb des Vestibulums statt. Bei den Mantodea dagegen wird die Oothek auf dem Substrat gebildet (Nalepa & Lenz 2000; Grimaldi & Engel 2005). In allen anderen Termitenarten werden die Eier einzeln gelegt, die Bildung einer Oothek durch *M. darwiniensis* ist einzigartig innerhalb der Isoptera. Die Oothek dient als Schutz der Eier vor Austrocknung, Räubern und Parasiten (Grimaldi & Engel 2005). Durch Aufrechterhaltung einer konstanten Luftfeuchtigkeit im Termitenbau und Pflege der Eier durch die Arbeiter wird dieser Schutz unnötig und könnte bei den anderen Termitenarten zu einer Rückbildung der Oothek geführt haben (Nalepa & Lenz 2000; Inward *et al.* 2007a).

Die Schabengattung *Cryptocercus* teilt zusätzlich vier weitere wichtige Gemeinsamkeiten mit den niederen Termiten (alle Familien außer Termitidae). Diese Gemeinsamkeiten sind Holzfraß (1), Flagellaten im Hinterdarm (2), proctodeale Trophallaxis (3) und ein erweitertes soziales Verhalten (4). Alle genannten Merkmale sind miteinander korreliert und werden im direkten Zusammenhang mit der Entstehung der Eusozialität bei Termiten gesehen (Nalepa *et al.* 2001; Inward *et al.* 2007a). Die Nutzung von zellulosebasiertem Material wie Holz als Futter durch Schaben und Termiten wird ermöglicht durch endogene Zellulaseenzyme (Lo *et al.* 2000; Klass *et al.* 2008). Bei *Cryptocercus* und den niederen Termiten ist ein weiterer zelluloseabbauender Mechanismus durch einzigartige symbiontische Flagellaten im Hinterdarm vorhanden (Cleveland *et al.* 1934; Honigberg 1970). Diese Flagellaten gehören zu den Spirotrichosomidae, Hoplonymphidae, Staurojoeninidae und Eucomonymphidae (Ordnung Oxymonadida und Hypermastigida) (Klass *et al.* 2008). Der Entwicklungszyklus der Flagellaten ist an den Häutungszyklus der Wirte gekoppelt, sie bilden Zysten und werden kurz vor der Häutung ausgeschieden (Nalepa 1984). Nach der Häutung des Wirts muss eine Neuinokulation erfolgen. Dies erfolgt durch proctodeale Trophallaxis. Die übertragene Hinterdarmflüssigkeit, die sich vom normalen Kot unterscheidet, enthält Flagellaten, Verdauungsprodukte und Holzfragmente (McMahan 1969). Die Erstinokulation von Larven

erfolgt auf die gleiche Weise (Nalepa 1984). Aufgrund der Notwendigkeit der proctodealen Trophallaxis muss ein erweitertes soziales Verhalten vorliegen. So lebt beispielsweise *Cryptocercus punctulatus* in biparentalen Familiengruppen, in denen beide Eltern mit ihren Nachkommen für mindestens drei Jahre zusammenleben (Subsozialität; Seelinger & Seelinger 1983; Nalepa 1984). Termiten zeigen ebenfalls biparentale Pflege der Nachkommen, jedoch nur in frühen Stadien der Koloniegründung durch die Alaten. Später – nach der Bildung erster Arbeiter bzw. Pseudergaten – erfolgt der Wechsel zu alloparentaler Pflege (Nutting 1969). Aufgrund der zahlreichen Gemeinsamkeiten bezüglich der Morphologie, der Entwicklung und des Verhaltens sowie der molekularen Daten scheint eine enge Verwandtschaft von *Cryptocercus* mit den Termiten bestätigt. *Cryptocercus* wird daher häufig als idealer Modellorganismus zur Untersuchung der Entstehung von Eusozialität bei Termiten angesehen (Klass *et al.* 2008).

Zur weiteren Systematik der Blattodea (neben der Stellung von *Cryptocercus* und Isoptera) gibt es ebenfalls zahlreiche Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Allen Studien gemeinsam ist die Zusammengruppierung der Familien Blattellidae und Blaberidae, wobei die Blattellidae hinsichtlich der Blaberidae häufig als paraphyletisch angesehen werden (z. B. Klass & Meier 2006; Ware *et al.* 2008; Roth *et al.* 2009). Heute werden die Blattaria in drei Überfamilien und acht verschiedene Familien unterteilt: Blaberidae, Ectobiidae (auch Blattellidae) (Überfamilie Blaberoidea), Blattidae, Lamproblattidae, Tryonycidae, Cryptocercidae (Überfamilie Blattoidea), Corydiidae (auch Polyphagidae) und Nocticolidae (Überfamilie Corydioidea; auch Polyphagoidea) (Beccaloni 2007).

Die Einordnung der Termiten innerhalb der Schaben ist problematisch für die Nomenklatur bzw. Klassifizierung. Bisher galten Termiten als eigenständige Ordnung Isoptera. Da eine Ordnung nicht innerhalb einer anderen vorkommen kann, haben Eggleton *et al.* (2007) und Beccaloni (2007) eine andere Klassifizierung vorgeschlagen. Sie ordnen die Termiten als Epifamilie (ein Rang zwischen Überfamilie und Familie) Termitoidae innerhalb der Überfamilie Blattoidea ein (Abb. 5; Beccaloni 2007; Eggleton *et al.* 2007). Bisher hat sich diese Bezeichnung in der Literatur jedoch noch nicht durchgesetzt (z. B. Davis *et al.* 2009; Svenson & Whiting 2009; Simon *et al.* 2010).

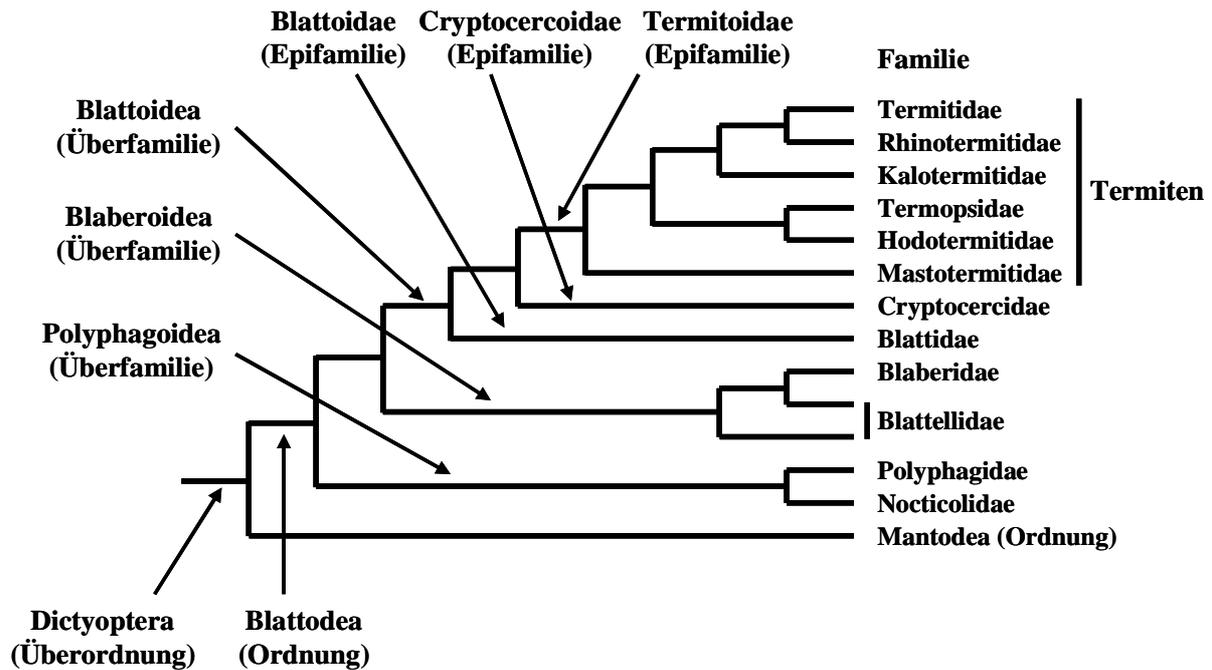


Abb. 5: Möglicher Stammbaum der Dictyoptera.

Einordnung der Termiten innerhalb der Blattodea als Epifamilie Termitoidae in der Überfamilie Blattoidea. (Bearbeitet nach: Eggleton *et al.* 2007).

Innerhalb der Termiten gibt es die sieben Familien Mastotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae und Termitidae (Engel & Krishna 2004; Lo *et al.* 2007b). Die Familie Mastotermitidae wird generell als basalste Familie angesehen, obwohl der einzige rezente Vertreter *M. darwiniensis* sowohl primitive als auch hoch entwickelte Merkmale aufweist. Zu den primitiven Merkmalen gehören die bereits erwähnten bakteriellen Endosymbionten des Fettkörpers und die Bildung einer Oothek. Weiterhin weist *M. darwiniensis* verschiedene schabenähnliche Merkmale auf, wie z. B. den gut ausgebildeten Anallappen der Hinterflügel (Tillyard 1936), Tarsi mit fünf Tarsomeren (vier Tarsomere bei den restlichen Termiten; Hill 1942), die Struktur des Kropfes (Salihah 1982), die Morphologie der weiblichen Genitalien (stark reduziert bei anderen Termiten; Nalepa & Lenz 2000; Klass & Meier 2006) und eine hohe Anzahl Malpighischer Gefäße (Klass & Meier 2006). Außerdem besitzt *M. darwiniensis* drei Sternaldrüsen an den Sterniten drei bis fünf, während alle anderen Termitenarten nur noch eine Sternaldrüse am Sternit vier oder fünf aufweisen (Sillam-Dussès *et al.* 2007). Zu den hoch entwickelten Merkmalen gehören das Vorkommen „echter“ Arbeiter (Watson *et al.* 1977b), die Größe der Kolonien (Hill 1942) und der zweiästige ontogenetische Entwicklungsweg (Watson & Sewell 1985). Obwohl es Studien gibt, die die Mastotermitidae nicht an basaler Stelle sehen (z. B. Thorne & Carpenter 1992), zeigt die Mehrzahl der Studien, dass die Familie Mastotermitidae die

Schwestergruppe der restlichen Termiten darstellt (z. B. Kambhampati *et al.* 1996; Thompson *et al.* 2000; Inward *et al.* 2007a, b; Davis *et al.* 2009). Nach den Mastotermitidae zweigen die Familien Hodotermitidae, Termopsidae und Kalotermitidae ab. Die genaue Beziehung der Familien zueinander ist noch nicht geklärt, es gibt mehrere Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen (z. B. Donovan *et al.* 2000; Inward *et al.* 2007b; Legendre *et al.* 2008). Die Familien Serritermitidae, Rhinotermitidae und Termitidae gruppierten in allen bisherigen Studien zusammen. Dabei bilden die Termitidae, die sogenannten „höheren“ Termiten, in allen Fällen eine monophyletische Gruppe. Die Stellung der Serritermitidae ist unklar. Sie bilden in einigen Fällen die Schwestergruppe zum Komplex aus Rhinotermitidae und Termitidae (Donovan *et al.* 2000; Thompson *et al.* 2000; Legendre *et al.* 2008). Andere Studien sehen sie innerhalb der Rhinotermitidae, die möglicherweise eine paraphyletische Gruppe bilden (Ohkuma *et al.* 2004; Inward *et al.* 2007b).

2 Zielsetzung und Fragestellungen

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Gehalts an Juvenilhormonen und Ecdysteroiden sowie der Allatostatin A-Expression auf die Kastendifferenzierung der Termiten *Mastotermes darwiniensis* untersucht werden. Zusätzlich sollten verschiedene molekularbiologische Methoden bei *M. darwiniensis* etabliert und einige unbekannte Gene identifiziert werden. Folgende Fragestellungen wurden experimentell untersucht:

1. Wie hoch ist der Gehalt an Ecdysteroid- und Juvenilhormonen in der Hämolymphe und in Ganzkörperextrakten verschiedener Kasten und Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis*?
2. Welche Organisation weisen AST-A Gen und AST-A Prohormonvorläufer von *M. darwiniensis* auf? Wie sind das AST-A Gen und der AST-A Prohormonvorläufer bei der potentiell nah verwandten Schabenart *Cryptocercus darwini* organisiert?
3. Wo erfolgt die Einordnung der Arten *M. darwiniensis* und *C. darwini* anhand der Sequenzen des AST-A Gens und des AST-A Prohormonvorläufers in die umstrittene Phylogenie der Dictyoptera? Eignet sich AST-A für eine phylogenetische Analyse der Insekten?
4. Wie hoch ist die Expression des AST-A Gens in verschiedenen Kasten und Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis*? In welchen Geweben wird das AST-A Gen bei *M. darwiniensis* exprimiert?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression des AST-A Gens im Gehirn und dem Juvenilhormongehalt bei *M. darwiniensis*?
6. Kann die Expression des AST-A Gens mit Hilfe der RNA-Interferenzmethode bei *M. darwiniensis* unterdrückt werden? Welche Auswirkung hat die potentielle Suppression auf den Juvenilhormongehalt in der Hämolymphe?
7. Welche „Housekeeping“-Gene können bei *M. darwiniensis* identifiziert werden? Eignen sich diese als Referenzgene für die Normalisierung von Expressionsdaten bestimmt mit Hilfe der quantitativen real-time PCR?

3 Material

3.1 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Alle Oligodesoxyribonukleotide (außer 3.1.3 Weitere Oligonukleotide) wurden mit Hilfe der Programme FastPCR Professional v5.3.13 (Ruslan Kalendar), Primer Express® v3.0 (Applied Biosystems) und W²H/GCG® v4.0 (Peter Ernst/Accelrys Software) von bekannten Sequenzen abgeleitet und auf ihre Qualität überprüft. Die Synthese und HPSF®-Reinigung der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D).

3.1.1 Oligonukleotide für die Amplifikation von DNA-Fragmenten bei *Mastotermes darwiniensis*

Für die Identifikation des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* wurden unterschiedliche Oligonukleotide verwendet. Diese sind in den Tabellen 1 bis 3 aufgeführt.

Tab. 1: Degenerierte Oligonukleotide für Allatostatin A bei *Mastotermes darwiniensis*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Mda_AS2aF	5' – GCC TAC AGC TA(CT) GTN TCN GAG TA(CT) AA(AG) CG – 3'
Mda-AS6R	5' – CC(CT) A(AG)(GT) CC(AG) AA(AG) CT(AG) TAA GG(CT) CTT GC – 3'
Mda_AS14R1	5' – CC(AGT) AT(AG) TC(AG) AA(AG) TC(AG) TAC ATN GG – 3'
Mda_AS14R2	5' – CC(AGT) ATN CC(AG) AA(AG) TC(AG) TAC ATN GG – 3'

Tab. 2: Sequenzspezifische Oligonukleotide für Allatostatin A bei *Mastotermes darwiniensis*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Mda_AS4F	5' – CCA TAC GGC GAT CCT ATG CGT ACT G – 3'
Mda_AS26F	5' – CTG CTA ATG CAT CTC AGC ATA CCG AC – 3'
Mda_AS140F	5' – GGG AGG ATG ATG ACG ACT ACG TTC – 3'
Mda_AS200F	5' – GCT TGA AGA CTC CGA TGT GGA CAC – 3'
Mda_AS8F	5' – GGA AGA TCC TTG TAC AGT TTC GGA CTT GG – 3'
Mda_AS13F	5' – GAA TTT ACC AGG CTC GTA CGT CGA CCT TTC – 3'
Mda_AS200R	5' – AGT GTC CAC ATC GGA GTC TTC AAG C – 3'
Mda_AS8R	5' – GCC AAG TCC GAA ACT GTA CAA GGA TCT TCC – 3'

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Mda_AS9R	5' – CAG CCC AAA AGG ATA CAG TCT ACC GTC AG – 3'
Mda_AS13R	5' – GAA AGG TCG ACG TAC GAG CCT GG – 3'
Mda_AS950R	5' – GGT GTT TGG TAA TAC TGG GGA GAC – 3'

Tab. 3: Oligonukleotide für „Genome Walking“ bei *Mastotermes darwiniensis*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Mda-TSP1	5' – CTT TCC CAG CCC GAA ACC GTA C – 3'
Mda-TSP2	5' – CAG CCC GAA ACC GTA CTC CTT AC – 3'
Mda-TSP3	5' – ACC CAA GCC AAA CTT ATA AAC AGG – 3'

Neben der Identifikation des AST-A Gens von *M. darwiniensis* sollten auch einige potentielle Referenzgene sequenziert werden. Die Amplifikation der Fragmente erfolgte mit den Oligonukleotiden in Tab. 4.

Tab. 4: Oligonukleotide für die Identifikation von Referenzgenen bei *Mastotermes darwiniensis*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Rfl_ActF2	5' – GGC ATC ACA CAT TCT ACA ATG AAC TGC GAG – 3'
Rfl_ActR2	5' – CCA ATG GTG ATG ACC TGG CCA TC – 3'
Mda_Act400R	5' – TCC TGC TCG AAG TCC AGG GCG ACA TAG – 3'
Mda_ND31F	5' – CCN TT(CT) GA(AG) TG(CT) GGN TT(CT) GAN CC – 3'
Mda_ND31R	5' – CC(CT) TG(AG) TTC CA(CT) TC(AG) TG(AG) (AT)AN A(AG)N CC – 3'
Mda_ND41F	5' – TGG GGN TA(CT) CA(AG) CCN GA(AG) (AC)G – 3'
Mda_ND41R	5' – GC(CT) TCN AC(AG) TGN GC(CT) TTN GG – 3'

Die quantitative Bestimmung der Expression von AST-A und von den potentiellen Referenzgenen erfolgte mittels quantitativer real-time PCR. Dafür wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet (Tab. 5).

Tab. 5: Oligonukleotide für die quantitative real-time PCR bei *Mastotermes darwiniensis*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
AstA_RTF	5' – AGC GAA CTT CAA GCC GTC AG – 3'
AstA_RTR	5' – AAT CAT ACG CCC GTT TTC CGA G – 3'
Akt_RTF	5' – CTC AAC CCC AAA GCC AAC AG – 3'
Akt_RTR	5' – CAC CAT CAC CAG AAT CCA GCA CGA – 3'
ND3_RTF	5' – GAT CTG CAC GAC TAC CTT TCT CC – 3'
ND3_RTR	5' – AGG AAT AGG GCT CTA ATA AGG GCT C – 3'
ND4_RTF	5' – CAG CCT CTT TAC CTT TGT TAG TTG G – 3'
ND4_RTR	5' – TTC AAC GTG TGC TTT CGG TAA TC – 3'

Für die Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) wurden speziell modifizierte Oligonukleotide benötigt. Diese sollten neben der AST-A spezifischen Sequenz eine sogenannte T7-Sequenz am 5'-Ende aufweisen. Die T7-Sequenz ist in der folgenden Auflistung (Tab. 6) fettgedruckt dargestellt.

Tab. 6: Oligonukleotide zur Herstellung von doppelsträngiger RNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen von *Mastotermes darwiniensis* (T7-Sequenz fettgedruckt).

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
T7Mda_AS8F	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA AGA TCC TTG TAC AGT TTC GGA CTT GG – 3'
T7Mda_AS13R	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAA GGT CGA CGT ACG AGC CTG G – 3'
T7Mda_AS140F	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AGG ATG ATG ACG ACT ACG TTC – 3'
T7Mda_AS9R	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGC CCA AAA GGA TAC AGT CTA CCG TCA G – 3'

3.1.2 Oligonukleotide für die Amplifikation von Allatostatin A bei *Cryptocercus darwini*

Für die Identifikation des AST-A Gens bei *C. darwini* wurden neben den degenerierten Oligonukleotiden (Tab. 1, S. 31) weitere sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet (Tab. 7 und 8).

Tab. 7: Sequenzspezifische Oligonukleotide für Allatostatin A bei *Cryptocercus darwini*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Cd_AS1F	5' – GGT CTG CGC TCG TGT TTG G – 3'
Cd_AS2bF	5' – ACC CGT TTA CAA TTT CGG ACT GG – 3'
Cd_AS10F	5' – CCG GTG AGT TCT GGA AGG CTA G – 3'
Cd_AS11R	5' – GGT ACA CCT CAT CTG TCC CGT TC – 3'
Cd_AS14R	5' – GTA CAT GGG AAT TCG TTT GCC AAG G – 3'

Tab. 8: Oligonukleotide für „Genome Walking“ bei *Cryptocercus darwini*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Cd-TSP1	5' – GTA ATC GTC GTA GTC TCG TTT CC – 3'
Cd-TSP2	5' – CCA AGG CCG AAG GAG TAC AAC C – 3'
Cd-TSP3	5' – AGG AGT ACA ACC TGC CGT CTG C – 3'

3.1.3 Weitere Oligonukleotide

Zusätzlich zu den bereits genannten Oligonukleotiden wurden für die Methoden „Genome Walking“ und RACE („**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds“) weitere Oligonukleotide benötigt (Tab. 9).

Tab. 9: Oligonukleotide für „Genome Walking“ und RACE zur Identifikation des Allatostatin A-Gens von *Mastotermes darwiniensis* und *Cryptocercus darwini*.

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
10x Universal Primer A Mix (UPM)	Long (0.4 µM): 5' – CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT – 3' Short (2 µM): 5' – CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C – 3'
DW-ACP3	5' – ACP-GGGTC – 3'
Universal Primer (10 µM) (UniP)	5' – TCA CAG AAG TAT GCC AAG CGA – 3'

3.2 Gebrauchsfertige Chemikaliensätze

Es wurden verschiedene bereits gebrauchsfertige Zusammenstellungen von Chemikalien („Kits“) verwendet. Diese sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Verwendete gebrauchsfertige Chemikaliensätze („Kits“).

Name des Kits	Hersteller; Firmensitz (Land)
Advantage® 2 PCR Kit	Clontech; Mountain View, CA (USA)
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
DNA Walking <i>SpeedUp</i> ™ Premix Kit	Seegene; Seoul (KOR)
GeneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Genomic DNA Purification Kit	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Gigapack® III Gold Packaging Extract	Stratagene; La Jolla, CA (USA)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare; München (D)
MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit	Ambion®; Austin, TX (USA)
Oligotex® mRNA Mini Kit	QIAGEN; Hilden (D)
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie; Erlangen (D)
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega; Madison, WI (USA)
<i>Power</i> SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
QIAGEN® Genomic-tip 500/G	QIAGEN; Hilden (D)
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN; Hilden (D)
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN; Hilden (D)
SMART™ cDNA Library Construction Kit	Clontech; Mountain View, CA (USA)
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech; Mountain View, CA (USA)
TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter (mit pCR®II-TOPO® Vektor)	Invitrogen; Carlsbad, CA (USA)
Wizard® <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System	Promega; Madison, WI (USA)

3.3 Chemikalien, Lösungen und Medien

Für die verschiedenen Experimente wurde eine Vielzahl an Chemikalien, Substanzen, Lösungen und Kulturmedien verwendet. Diese sind im Folgenden sortiert anhand der verwendeten Methoden aufgelistet (Tab. 11 – 19).

Tab. 11: Allgemeine Chemikalien, die in verschiedenen Versuchen verwendet wurden.

Name (ggf. Abkürzung)	Zusammensetzung oder Hersteller; Firmensitz (Land)
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem; Darmstadt (D)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Chloroform ROTIPURAN®	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem; Darmstadt (D)
Ethanol pro analysi	VWR International; Darmstadt (D)
Guanidiniumchlorid	Merck; Darmstadt (D)
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Isopropanol	VWR International; Darmstadt (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	Merck; Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Honeywell Riedel-de Haen®; Seelze (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck; Darmstadt (D)
Phenol (pH 8,0)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
RNase A (DNase-frei)	AppliChem; Darmstadt (D)
Salzsäure (HCl)	Merck; Darmstadt (D)
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton® X-100)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Tris	Carl Roth®; Karlsruhe (D)

Name (ggf. Abkürzung)	Zusammensetzung oder Hersteller; Firmensitz (Land)
Tween 20	AppliChem; Darmstadt (D)
Wasser (Diethylpyrocarbonat-behandelt; DEPC-H ₂ O)	1 ml DEPC pro 1 Milli-Q Wasser; Inkubation über Nacht bei 37°C und Rotation (50 rpm); autoklaviert
Wasser (Milli-Q)	Entsalzungsfiler: Millipore 0,2 µm
Wasser (nukleasefrei)	QIAGEN; Hilden (D)
Wasser (steril)	Milli-Q Wasser; autoklaviert

Tab. 12: Substanzen für Tierhaltung, Injektion und Präparation.

Name	Zusammensetzung oder Hersteller; Firmensitz (Land)
Lebensmittelfarbe (grün)	Brauns-Heitmann; Warburg (D)
modifizierter Grillenringer (Lorenz <i>et al.</i> 1997)	86 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 3 mM CaCl ₂
Standarddiät Kaninchen Haltung (Nr. 2021)	Altromin Spezialfutter; Lage (D)
Standarddiät Katze Haltung/Zucht (Nr. 5031)	Altromin Spezialfutter; Lage (D)
Standarddiät Ratte/Maus Zucht (Nr. 1311)	Altromin Spezialfutter; Lage (D)
Termitenringer (Elliott & Stay 2007)	1,093% (w/v) NaCl; 0,157% (w/v) KCl; 0,085% (w/v) CaCl ₂ ; 0,017% (w/v) MgCl ₂ ; steril filtriert

Tab. 13: Chemikalien für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS).

Name	Hersteller; Firmensitz (Land)
20-Hydroxyecdysen	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
2-Propanol LiChrosolv® HPLC gradient grade	Merck; Darmstadt (D)
Acetonitril ROTISOLV® HPLC gradient grade	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Ecdysen	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Isooktan pro analysi	Merck; Darmstadt (D)
Juvenilhormon I	SciTech; Prag (CZ)
Juvenilhormon II	SciTech; Prag (CZ)
Juvenilhormon III	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)

Name	Hersteller; Firmensitz (Land)
Methanol LiChrosolv® HPLC gradient grade	Merck; Darmstadt (D)
Methanol LiChrosolv® hypergrade	Merck; Darmstadt (D)
Wasser LiChrosolv® HPLC gradient grade	Merck; Darmstadt (D)

Tab. 14: Chemikalien für DNA-Isolation mit „Genomic-tip 500/G“ von QIAGEN.

Name	Zusammensetzung oder Hersteller; Firmensitz (Land)
Elutionspuffer QF	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol
Equilibrierungspuffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0,15% (v/v) Triton X-100
Lysepuffer G2	800 mM Guanidiniumchlorid; 30 mM Tris-HCl, pH 8,0; 30 mM EDTA, pH 8,0; 5% (v/v) Tween 20; 0,5% (v/v) Triton X-100
Lysepuffer G2 + RNase A	19 ml Lysepuffer G2 + 190 µl RNase A (2 mg/ml)
Proteinase K (20 mg/ml)	AppliChem; Darmstadt (D)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0
Waschpuffer QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol

Tab. 15: Chemikalien für cDNA-Herstellung.

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
5x Reaktionspuffer	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C; 250 mM KCl; 20 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 mM)	Diagonal; Münster (D)
M-MuLV Reverse Transcriptase (20 u/µl)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Oligo (dT) ₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Random Primer (Hexamer; 0,5 µg/µl)	Promega; Madison, WI (USA)
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)

Tab. 16: Chemikalien, Lösungen, Substanzen und Medien für „SMART cDNA Library Construction“.

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
1x Lambda Verdünnungspuffer	100 mM NaCl; 10 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O; 35 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01% (w/v) Gelatine; autoklaviert
10x Lambda Verdünnungspuffer	1 M NaCl; 0,1 M MgSO ₄ · 7 H ₂ O; 0,35 M Tris-HCl, pH 7,5; autoklaviert
10x Puffer G	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C; 0,1 M MgCl ₂ ; 0,5 M NaCl; 0,1% (w/v) BSA
Agar	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
D-(+)-Maltose	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Gelatine	Merck; Darmstadt (D)
Hefeextrakt	AppliChem; Darmstadt (D)
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,0; autoklaviert
Luria-Bertani-Medium mit Magnesiumsulfat und Maltose (LB/MgSO ₄ /Maltose-Medium)	LB-Medium mit 10 mM MgSO ₄ ; autoklaviert, mit 0,2% (w/v) Maltose versetzt
Luria-Bertani-Platten mit Magnesiumsulfat (LB-MgSO ₄ -Platten)	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar und 10 mM MgSO ₄ ; autoklaviert, in Petrischalen gegossen
Luria-Bertani-Platten mit Magnesiumsulfat und Tetracyclin (LB-MgSO ₄ /Tet-Platten)	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar und 10 mM MgSO ₄ ; autoklaviert, mit Tetracyclin versetzt (15 µg pro ml Medium), in Petrischalen gegossen
Luria-Bertani-Platten mit Tetracyclin (LB-Tet-Platten)	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar; autoklaviert, mit Tetracyclin versetzt (15 µg pro ml Medium), in Petrischalen gegossen
Polyethylenglycol (PEG 8000)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Proteinase K (recombinant; 20 µg/µl)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Restriktionsenzym <i>Sfi</i> I	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
SM-Puffer	100 mM NaCl; 8 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01% (w/v) Gelatine; autoklaviert
Soft Top Agar	LB-Medium mit 0,72% (w/v) Agar und 10 mM MgSO ₄ ; autoklaviert
Tetracyclin (15 mg/ml)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Trypton	AppliChem; Darmstadt (D)

Tab. 17: Chemikalien und Lösungen für Polymerasekettenreaktion und Gelelektrophorese.

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
10x Advantage® 2 PCR Puffer	Clontech; Mountain View, CA (USA) 400 mM Tricin-KOH, pH 8,7 bei 25°C; 150 mM KOAc; 35 mM Mg(OAc) ₂ ; 0,00375% (w/v) BSA; 0,05% (v/v) Tween 20; 0,05% (v/v) Nonidet-P40
10x Advantage® 2 SA PCR Puffer	Clontech; Mountain View, CA (USA) 100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl; 20 mM MgCl ₂
10x <i>Taq</i> Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1% (v/v) Tween 20
5x TBE-Puffer	446 mM Tris; 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA, pH 8,0
Advantage® 2 Polymerase Mix	Clontech; Mountain View, CA (USA)
Borsäure	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
DNA-Größenstandard 100 bp DNA Leiter (Fragmentlängen in bp: 100, 150, 200, 300, 400, 500 (2x), 600, 700, 800, 900, 1000)	Diagonal; Münster (D)
DNA-Größenstandard 1 kb DNA Leiter (Fragmentlängen in bp: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000)	Diagonal; Münster (D)
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 mM)	Diagonal; Münster (D)
Ethidiumbromid (10 mg/ml in H ₂ O)	Promega; Madison, WI (USA)
Laufpuffer	0,5x TBE-Puffer
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie; Erlangen (D)
Probenpuffer (Loading Solution)	Ambion®; Austin, TX (USA) 40% (w/v) Sucrose; 0,17% (w/v) Xylencyanol; 0,17% (w/v) Bromphenolblau
<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant; 1 u/μl)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)

Tab. 18: Chemikalien, Substanzen, Lösungen und Medien für Transformation, Fermentation, Plasmidpräparation.

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
10x Puffer <i>EcoRI</i>	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C; 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M NaCl; 0,2% (v/v) Triton X-100; 0,1% (w/v) BSA
10x Puffer O	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C; 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M NaCl; 0,1% (w/v) BSA
Agar	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Ampicillin (100 mg/ml in sterilem H ₂ O)	Invitrogen; Carlsbad, CA (USA)
Bakterienstamm <i>Escherichia coli</i> JM109 Genotyp: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^q Z Δ M15]	Promega; Madison, WI (USA)
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Dimethylformamid (DMF)	AppliChem; Darmstadt (D)
Glyzerin	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (USA)
Hefeextrakt	AppliChem; Darmstadt (D)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem; Darmstadt (D)
Kaliumacetat (KAc)	Merck; Darmstadt (D)
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,0; autoklaviert
Luria-Bertani-Platten mit Ampicillin (LB-Amp-Platten)	autoklavierter 60°C LB-Agar mit Ampicillin-Lösung (100 μ g pro ml Medium) in Petrischalen gegossen
Puffer S1 (Resuspendierungslösung)	25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose; steril filtriert
Puffer S2 (Lyselösung)	0,4 N NaOH + 2% (w/v) SDS; (1:1, v/v)
Puffer S3 (Neutralisierungslösung)	3 M K ⁺ ; 5 M Ac ⁻ ; pH 4,8 = 60 ml 5 M KAc + 11,5 ml Essigsäure + 28,5 ml H ₂ O
Restriktionsenzym <i>BamHI</i>	Promega; Madison, WI (USA)
Restriktionsenzym <i>BglII</i>	Fermentas; St. Leon-Rot (D)

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
SOB-Medium	1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Trypton; 10 mM NaCl; 250 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; pH 6,4; steril filtriert
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
Trypton	AppliChem; Darmstadt (D)

Tab. 19: Chemikalien, Lösungen und Enzyme für die quantitative real-time PCR (qPCR).

Name	Zusammensetzung und/oder Hersteller; Firmensitz (Land)
10x Puffer A	Promega; Madison, WI (USA) 60 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C; 60 mM MgCl ₂ ; 60 mM NaCl; 10 mM DTT
10x Puffer K	Promega; Madison, WI (USA) 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 bei 37°C; 0,1 M MgCl ₂ ; 1,5 M KCl
10x Puffer O	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C; 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M NaCl; 0,1% (w/v) BSA
10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	Fermentas; St. Leon-Rot (D) 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 25 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂
DNase I (RNase-frei)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
EDTA (25 mM)	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Restriktionsenzym <i>ApaI</i>	Promega; Madison, WI (USA)
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Fermentas; St. Leon-Rot (D)
Restriktionsenzym <i>ScaI</i>	Promega; Madison, WI (USA)
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas; St. Leon-Rot (D)

3.4 Verbrauchsmaterialien

Für die einzelnen Versuche wurden verschiedene Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße oder Küvetten verwendet. Diese sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien, deren genaue Typbezeichnung und Hersteller.

Material	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Einsätze für Probenfläschchen	Rotilabo®-Einsätze (100 µl)	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
HPLC-Säule	C18 RP-Säule, ReproSil-Pur® ODS-3, 5 µm, 150 x 2 mm	Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch (D)
Küvetten	Einmal-Plastikküvetten halbmikro, PLASTIBRAND®	Brand; Wertheim (D)
Mikropipetten	BLAUBRAND® intraMARK (5 µl; 10 µl; 20 µl)	Brand; Wertheim (D)
	minicaps, DURAN® (1 µl; 2 µl)	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt (D)
	ringcaps® Einmal-Mikropipetten mit Ringmarke (5 µl)	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt (D)
PCR-Gefäße	Dünnwandige PCR-Einzeltubes, flacher Deckel (0,2 ml; 0,5 ml)	Brand; Wertheim (D)
	Dünnwandige PCR-Einzeltubes, erhobener Deckel (0,2 ml)	Laborfachhandel Kauffmann; Jena (D)
	Quali-PCR-Tubes, erhobener Deckel (0,2 ml)	G. Kisker; Steinfurt (D)
Petrischalen	94 mm Durchmesser	Greiner Bio-One; Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen	Standard-Spitzen graduiert, 32 mm lang (0,2 – 10 µl)	Laborfachhandel Kauffmann; Jena (D)
	Quali Standard-Spitzen (10 - 1000 µl)	G. Kisker, Steinfurt (D)
	Universal-Pipettenspitzen graduiert (200 µl)	Greiner Bio-One; Frickenhausen (D)
Probenfläschchen	Rotilabo®-Probenfläschchen, mit Gewinde (2 ml)	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Reagenzgläser	starkwandig, mit glattem Rand (6,5 x 50 mm)	Novoglas; Bern (CH)
Reaktionsgefäße	Mikrozentrifugengefäß (1,5 ml)	Laborfachhandel Kauffmann; Jena (D)

Material	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Reaktionsgefäße	Mikrozentrifugengefäß mit Safe Lock (2 ml)	Laborfachhandel Kauffmann; Jena (D)
	Value Line Mikrozentrifugengefäß (2 ml)	G. Kisker, Steinfurt (D)
Reaktionsgefäße und Verschlüsse für qPCR	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
	MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip (0,2 ml)	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
Schraubkappen	mit Loch	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
	ohne Loch	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Septen	PTFE-beschichtet, Durchmesser 8 mm	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
	Silikon/PTFE-beschichtet, Durchmesser 8 mm	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Verschlussfolie	Parafilm® M	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Vorsäulen	SecurityGuard™ Cartridges C18 4 x 2 mm	Phenomenex; Aschaffenburg (D)

3.5 Geräte

Die für die verschiedenen Versuche verwendeten Geräte sind in der folgenden Tabelle (Tab. 21) zusammengefasst.

Tab. 21: Verwendete Geräte, deren genaue Typbezeichnung und Hersteller.

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Analysewaage	MC 210 P	Sartorius; Göttingen (D)
Autoinjektor	SIL-10AD VP	Shimadzu; Duisburg (D)
Autoklav	Century 2100	Prestige Medical; Northridge, CA (USA)

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Autoklav	CV-EL 18 L GS	CertoClav; Traun (AUT)
Elektrophoresekammer	E-H1	febikon Labortechnik; Wermelskirchen (D)
Elektrophorese- Spannungsquelle	PowerPac 3000	Bio-Rad; Hercules, CA (USA)
Geldokumentations- anlage	ImageMaster® VDS	GE Healthcare; München (D)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4	Martin Christ; Osterode (D)
Gewebehomogenisator	MHX/E	Xenox; Wecker (LUX)
Heizofen	Heraeus® T 5042 K	Thermo Fisher Scientific; Bonn (D)
HPLC-Pumpen	LC-20AD	Shimadzu; Duisburg (D)
	MicroPro™	Eldex®; Napa, CA (USA)
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic	Schott; Mainz (D)
Kreisschüttler	KS 501 digital	IKA® Labortechnik; Staufen (D)
Kühlzentrifuge	Heraeus® Multifuge® 1 L-R	Thermo Fisher Scientific; Bonn (D)
	Sigma 1-15K	Sartorius Stedim Biotech; Aubagne Cedex (F)
	Sigma 3 K 12	Sartorius Stedim Biotech; Aubagne Cedex (F)
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph; Schwabach (D)
Massenspektrometer	LCMS-2010A	Shimadzu; Duisburg (D)
Mikroliterspritze	MICROLITER™ Syringe, 700 Serie (10 µl; 25 µl; 50 µl; 100 µl; 500 µl; 1000 µl)	Hamilton Bonaduz; Bonaduz (CH)
PCR-Maschine	PTC-200 DNA engine	Biozym; Hess. Oldendorf (D)
	TGradient	Biometra; Göttingen (D)
	TPersonal 48	Biometra; Göttingen (D)
PCR Workstation	UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie; Erlangen (D)
pH-Meter	Calimatic 766	Knick; Berlin (D)
Pipetten	PIPETMAN® (P2; P10; P20; P100; P200; P1000; P5000)	Gilson; Middleton, WI (USA)
	Reference® (10 µl)	Eppendorf; Hamburg (D)

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Pipettierhilfe	Micropipetter für ringcaps®	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt (D)
Präparierbesteck	Vannas Mikroschere (sehr fein, gerade & gebogen)	Riede Augen- und Mikrochirurgische Instrumente; Emmingen-Liptingen (D)
	Dumont® Präzisionspinzetten	Carl Roth®; Karlsruhe (D)
Präzisionsküvette	105.202-QS aus Quarzglas SUPRASIL®, Schichtdicke 10 mm	Hellma®; Müllheim (D)
Präzisionswaage	1219 MP	Sartorius; Göttingen (D)
Reagenzglasschüttler	REAX 2000	Heidolph; Schwabach (D)
	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries; Bohemia, NY (USA)
Real-Time PCR Maschine	7300 Real-Time PCR System + Dell™ Laptop	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
Rotations-Vakuum- Konzentrator (Vakuumzentrifuge)	Alpha RVC	Martin Christ; Osterode (D)
Säulenthermostat	Mistral	SunChrom; Friedrichsdorf (D)
Stereomikroskop	MZ6	Leica Microsystems; Wetzlar (D)
	MZ8	Leica Microsystems; Wetzlar (D)
Sterilwerkbank	Heraeus® LaminAir HBB 2448	Thermo Fisher Scientific; Bonn (D)
Stickstoffgenerator	G3200E (ohne Kompressor)	Domnick Hunter; Willich (D)
System Controller	SCL-10A VP	Shimadzu; Duisburg (D)
Tiefkühlagergerät	Heraeus® HERAfreeze® HFU 586 STD-V12	Thermo Fisher Scientific; Bonn (D)
UV-Flächenstrahler	NU72	Konrad Benda; Wiesloch (D)
UV/VIS – Spektrophotometer	Lambda 25	PerkinElmer® Instruments; Waltham, MA (USA)
	Pharmacia LKB Ultrospec® III	GE Healthcare; München (D)
Thermoblock	TB1	Biometra; Göttingen (D)
Thermomixer	5433	Eppendorf; Hamburg (D)
Vakuum-Entgaser	Degasser 234	SunChrom; Friedrichsdorf (D)
Vakuumpumpe (Massenspektrometer)	2-Phasen-Drehschieber- rotationspumpe E2M28	Edwards; Kirchheim (D)

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller; Firmensitz (Land)
Vakuumpumpe (Gefriertrocknung)	Drehschiebervakuumpumpe RC6	Vacuubrand; Wertheim (D)
Zentrifuge	5415C	Eppendorf; Hamburg (D)
	Heraeus® Biofuge 13	Thermo Fisher Scientific; Bonn (D)
	Mikro 20	Hettich; Tuttlingen (D)
	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge „Uni-fuge“	Carl Roth®; Karlsruhe (D)

3.6 Software

Für die Aufnahme und Analyse der Daten wurden verschiedene Computerprogramme genutzt. Eine Zusammenfassung findet sich in Tab. 22.

Tab. 22: Für die Datenaufnahme und -analyse verwendete Software.

Name (Version)	Bezugsquelle; Sitz (Land)
7300 System SDS Software (Version 1.4.0.25)	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
BCM Search Launcher: Sequence Utilities	Baylor College of Medicine, Human Genomic Sequencing Center; Houston, TX (USA)
BestKeeper© (Version 1.0)	Michael W. Pfaffl; TU München; München (D)
BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.9.0)	Thomas A. Hall; Raleigh, NC (USA)
BOXSHADE (Version 3.21)	Kay Hofmann; ISREC Bioinformatics Group, Lausanne (CH) Michael D. Baron; Institute for Animal Health, Pirbright (UK)
ClustalX2 (Version 2.0.9)	Des Higgins; Dublin (IRL)
FastPCR Professional (Version 5.3.13)	Ruslan Kalendar; Helsinki (FIN)
geNorm (Version 3.5)	Center for Medical Genetics; Ghent University Hospital; Gent (BEL)
ImageMaster® VDS Software für Windows® 95, NT (Version 3.0)	GE Healthcare; München (D) MediaCybernetics®; Bethesda, MD (USA)
jModelTest (Version 0.1.1)	David Posada; Vigo (ES)

Name (Version)	Bezugsquelle; Sitz (Land)
LCMSSolution (Version 2.05)	Shimadzu; Duisburg (D)
MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Version 4.0.2)	Koichiro Tamura; Tokyo (J) Joel Dudley; Palo Alto, CA (USA) Masatoshi Nei; State College, PA (USA) Sudhir Kumar; Tempe, AZ (USA)
Microsoft® Office Standard Edition 2003 SP1	Microsoft® Deutschland; Unterschleißheim (D)
MrBayes (Version 3.1.2)	John P. Huelsenbeck; Berkeley, CA (USA) Fredrik Ronquist; Tallahassee, FL (USA)
NormFinder (Version 20.0)	Molecular Diagnostic Laboratory; Aarhus University Hospital; Aarhus (DK)
Primer Express® Software für Real-Time PCR (Version 3.0)	Applied Biosystems™; Foster City, CA (USA)
SigmaPlot 11.0 für Windows® (Version 11.0.0.75)	Systat Software; Chicago, IL (USA)
SignalP (Version 3.0)	Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark; Lyngby (DK)
SPSS® 14.0 für Windows® (Version 14.0.1)	SPSS® Inc.; Chicago, IL (USA)
TreeView (Version 1.6.6)	Roderic D. M. Page; Glasgow (UK)
UV WinLab (Version 4.0.0.0182)	PerkinElmer® Instruments; Waltham, MA (USA)
W ² H: WWW Interface to Sequence Analysis Software Tools (Version 4.0)	Peter Ernst; Heidelberg (D)
Wisconsin Package (GCG®)	Accelrys® Software; San Diego, CA (USA)

4 Methoden und Durchführung

4.1 Verwendete Versuchstiere

4.1.1 Tierhaltung von *Mastotermes darwiniensis* und *Gryllus bimaculatus*

Der größte Teil der Untersuchungen wurde an Termiten der Art *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Mastotermitidae) durchgeführt. Zur Verfügung gestellt wurden die verwendeten Kolonien von PD Dr. Rüdiger Plarre (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung Berlin (BAM), Abteilung IV.1). Die Gründung der Ursprungskolonie erfolgte im Jahr 1972 durch ein Paar geflügelter Geschlechtstiere. Diese stammten aus dem Norden Australiens (Northern Territory bzw. Queensland), dem natürlichen Verbreitungsgebiet von *M. darwiniensis*, und wurden von Dr. Michael Lenz nach Deutschland importiert. Alle verwendeten Kolonien waren Tochterkolonien dieser Ursprungskolonie. Die Haltung der universitätseigenen Kolonien erfolgte in Metallbottichen (ca. 60 x 35 cm, Durchmesser x Höhe). Als Abgrenzung nach oben dienten umgestülpte Plastikwannen (ca. 50 x 25 cm, Durchmesser x Höhe). Die Luftfeuchtigkeit betrug 60 – 70%, die Temperatur $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Zusätzlich wurden die Kolonien regelmäßig alle drei bis vier Tage mit Leitungswasser besprüht. Die Tiere wurden im Dunkeln gehalten. Als Nahrung dienten Birkenholzscheite (*Betula spec.*). Die Kolonien enthielten Stadien jeder Altersstufe, auch Eier und kleine Larvenstadien konnten beobachtet werden. Es wurden sekundäre, jedoch niemals primäre, geflügelte Geschlechtstiere gefunden. Die Kolonien enthielten zwischen 2000 und 3000 Tiere. Für verschiedene Versuche wurden die Tiere aus den Kolonien entnommen und in kleineren Gruppen (10 bis 48 Tiere) gehalten. Die Haltung erfolgte in Plastikboxen (ca. 20 x 10 x 12 cm, L x B x H) mit Wasserspendern. Der Boden war mit angefeuchtetem Vermiculit mit einer Körnung von ca. 2 mm bedeckt. Vermiculit ist ein Schichtsilikat, das für seine enorme Wasserspeicherkapazität bekannt ist. Als Nahrung dienten kleine Birkenholzstücke. Die äußeren Bedingungen (Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Licht) entsprachen den bereits beschriebenen. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die Boxen zusätzlich in eine größere Plastikbox (ca. 50 x 25 x 40 cm, L x B x H) gestellt, deren Boden mit durchfeuchteter Watte und Zellstoff bedeckt war.

Für die LC-MS-Messungen wurde eine Standardmatrix aus Grillenhämolymphe verwendet. Die für die Hämolymphabnahme verwendeten Grillen waren adulte, einen Tag alte, weibliche

Mittelmeerfeldgrillen *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae) aus der Zucht der Universität Bayreuth. Sie wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit), bei $27 \pm 1^\circ\text{C}$ und 40 – 60% Luftfeuchtigkeit in großen Plastikboxen (ca. 60 x 40 x 40 cm, L x B x H) gehalten. Zur Vermeidung von Stress wurden Eierschalenkartons (ca. 30 x 30 cm) als Trenn- und Versteckmöglichkeit verwendet. Als Futter diente eine Mischung aus Kaninchen-, Ratten/Mäuse- und Katzenfutter im Verhältnis 4:2:1 (w/w) und Wasser *ad libitum*. Die adulten Weibchen wurden am Tag der Adulthäutung aus den Zuchtboxen entnommen. Frisch gehäutete Weibchen waren gut erkennbar an der weißen Färbung der Kutikula. Auch etwas ältere Tiere mit einem weißen Legebohrer wurden als frisch gehäutet identifiziert und verwendet. Die Haltung der entnommenen Tiere erfolgte in Faunaboxen (ca. 30 x 20 x 20 cm, L x B x H) in einer Gruppengröße von maximal 40 Tieren für einen Tag unter den bereits beschriebenen Bedingungen bis zur Abnahme der Hämolymphe.

4.1.2 Einordnung der Termiten in Entwicklungsstadien

Die Einteilung der untersuchten Termiten der Art *M. darwiniensis* zu den einzelnen Entwicklungsstadien bzw. Kasten erfolgte anhand von Watson (1971) und Watson *et al.* (1977b). Zunächst wurden die Tiere aufgrund ihrer Körpergröße und Färbung geordnet. Innerhalb der juvenilen Stadien konnte zwischen den Tieren der apteren (Larven) und der nymphalen Linie (Nymphen) anhand der Färbung, Behaarung, Körperform und -größe unterschieden werden. Die Nymphen sind kleiner und besitzen eine eher längliche Körperform im Vergleich zu den etwas breiteren Larven. Außerdem sind die Larven kaum gefärbt und wenig behaart, während die Nymphen gold-bräunlich gefärbt sind und eine starke Behaarung aufweisen. Für die Unterscheidung zwischen den einzelnen Larven- bzw. Nymphenstadien können verschiedene Parameter verwendet werden, z. B. die Kopfkapselbreite, die Prothoraxbreite oder die Länge der Metatibia. Diese Parameter sind relativ schwer zu bestimmen und können zwischen Tieren verschiedener Kolonien variieren (Watson *et al.* 1977b). Daher erfolgte die Einteilung hier anhand der Anzahl der Antennensegmente. Die Antenne der Termiten ist eine typische Geißelantenne und weist an der Basis einen Schaft (Scapus) und ein erstes, Pedicellus genanntes, Segment auf. Daran anschließend befindet sich die Geißel (Flagellum) mit einer variablen Anzahl von Segmenten (Abb. 6). Die Anzahl der Segmente nimmt mit zunehmenden Alter zu, wobei pro Häutung ein bis zwei Segmente hinzukommen (Lüscher 1952; Watson *et al.* 1977b). Für die Bestimmung der Anzahl der Antennensegmente wurden nur die Segmente der Geißel gezählt, die sichtbare

sensorische Sensillen aufwiesen. Außerdem wurden nur intakte Antennen, erkennbar an dem kleineren, länglicheren Endsegment, ausgezählt.

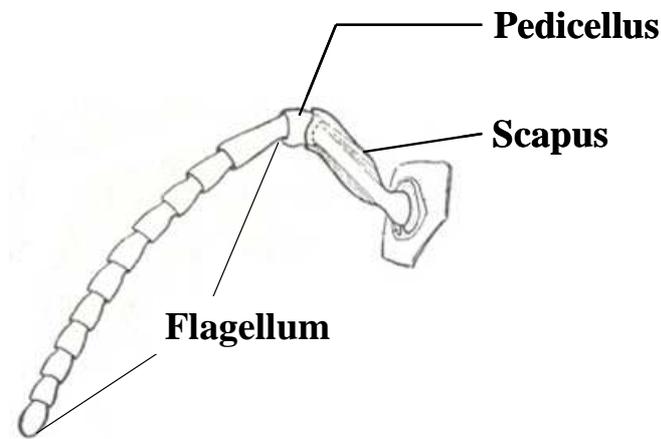


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Geißelantenne der Insekten.

Typischer Aufbau bestehend aus Schaft (Scapus), erstem Segment (Pedicellus) und Geißel (Flagellum). (Nach: Snodgrass 1993).

Es wurde zwischen fünf verschiedenen Larvalstadien (L_1 bis L_5) unterschieden, deren Antennensegmentanzahl zwischen 8 und 19 variierte. Die genaue Zuteilung zu den einzelnen Larvenstadien ist in Tab. 23 aufgetragen. Laut Watson *et al.* (1977b) gibt es bei *M. darwiniensis* elf verschiedene Nymphenstadien. Hier konnten jedoch nur drei Stadien untersucht werden, die aufgrund einer Antennensegmentanzahl von 12 bis 17 in die ersten drei Nymphenstadien eingeordnet wurden (Tab. 23). Zusätzlich zu den juvenilen Stadien wurde eine weitere Gruppe von Tieren untersucht, die als Arbeiter bezeichnet wurden (Abb. 7C; aptere Linie). Die Arbeiter bei *M. darwiniensis* können noch weitere Häutungen durchlaufen – wie stationäre Häutungen oder die Häutung zum Neotenic – daher können sie nicht als adulte Tiere angesehen werden. Alle Larven ab einer Antennensegmentanzahl von 20 wurden daher als Arbeiter bezeichnet. Bei den adulten Tieren konnte unterschieden werden zwischen Neotenic (Abb. 7B), Soldaten (Abb. 7A; beide aptere Linie) sowie den geflügelten Geschlechtstieren (Alaten; Abb. 7F; nymphale Linie). Die Neotenic und Soldaten ähneln den Arbeitern mit kleinen Unterschieden. Bei den Neotenic ist der gesamte Körper hellbraun gefärbt, die Soldaten haben einen braunen Kopf und vergrößerte, stark sklerotisierte, schwarz gefärbte Mandibeln. Die Alaten sind dunkelbraun gefärbt, haben ein stark vergrößertes Halsschild und bis zu 3 cm lange, das Abdomen überragende Flügel (Abb. 7).

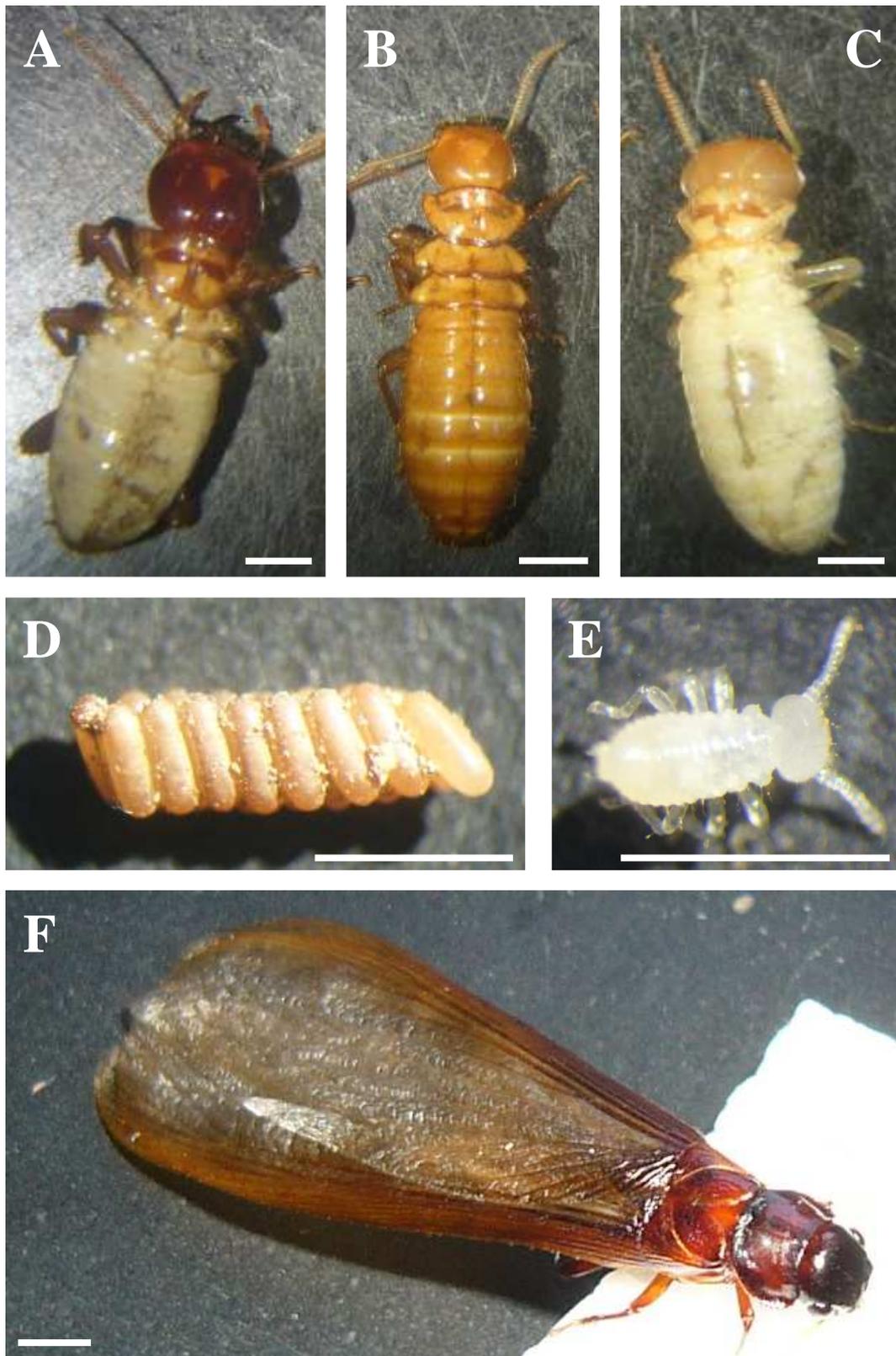


Abb. 7: Fotos verschiedener Entwicklungsstadien und Kasten von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Soldat, (B) Ersatzgeschlechtstier (Neotenic), (C) Arbeiter, (D) Oothek, (E) Larve im ersten Larvalstadium (L_1), (F) geflügeltes Geschlechtstier (Alate). (A) – (C) aptere Linie, (D) und (E) aptere/nymphale Linie, (F) nymphale Linie. Die Balken auf allen Grafiken entsprechen 0,2 cm.

Tab. 23: Einteilung der für die Untersuchungen verwendeten Entwicklungsstadien der Termiten *Mastotermes darwiniensis* nach Entwicklungslinie (aptere oder nymphale), Alter und Anzahl der Antennensegmente.

w = weiblich, m = männlich.

Entwicklungslinie	Alter	Bezeichnung	Code	Anzahl der Antennensegmente
aptere/ nymphale	juvenil	Eier	Ei	-
		1. Larvenstadium	L ₁	8-11
aptere	juvenil	2. Larvenstadium	L ₂	12-13
		3. Larvenstadium	L ₃	14-15
		4. Larvenstadium	L ₄	16-17
		5. Larvenstadium	L ₅	18-19
		Arbeiter (w/m)	A	≥ 20
	„adult“	Soldat	S	17-22
		Ersatzgeschlechtstier (Neotenic; w/m)	Neo	-
nymphale	juvenil	1. Nymphenstadium	N ₁	12-13
		2. Nymphenstadium	N ₂	14-15
		3. Nymphenstadium	N ₃	16-17
	adult	Geflügeltes Geschlechtstier (Alate; w/m)	Ala	-

4.1.3 *Cryptocercus darwini*

Die Identifikation der Sequenz des Allatostatin A-Gens bei der Schabengattung *Cryptocercus* (Cryptocercidae) erfolgte an einem Exemplar der Art *Cryptocercus darwini* (Burnside *et al.* 1999). Dabei handelte es sich um ein Alkoholpräparat einer Larve im letzten Larvenstadium unbekanntes Geschlechts. Das Tier wurde zur Verfügung gestellt von Bastian Fromm (ehemals Universität Jena, aktuell Universität Oslo) und Prof. Dr. Srinivas Kambhampati (Kansas State University). Es handelte sich um einen Wildfang aus dem Verbreitungsgebiet der Art in den Appalachen im Osten der USA (Abb. 8).

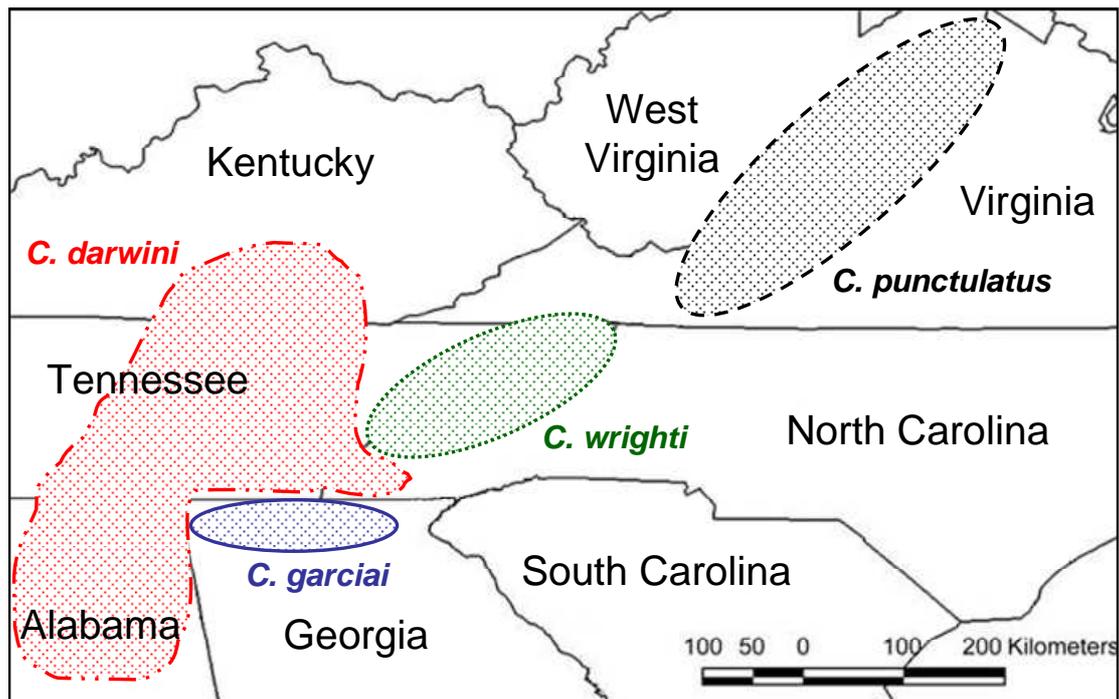


Abb. 8: Verbreitungsgebiete von vier verschiedenen *Cryptocercus*-Arten in den Appalachen im Osten der USA.

Rot: *C. darwini*; blau: *C. garciai*; schwarz: *C. punctulatus*; grün: *C. wrighti*. (Nach: Burnside *et al.* 1999; Aldrich *et al.* 2005).

4.2 Allgemein verwendete Methoden

4.2.1 Gewebepreparation

Die Präparation der Gewebe von *M. darwiniensis* zur Isolation von RNA erfolgte unter modifiziertem Grillenringer (Lorenz *et al.* 1997) mit Hilfe eines Stereomikroskops. Vor der Präparation erfolgte die Dekapitierung der Tiere mit einer Rasierklinge. Für die Präparation des Oberschlundganglions (OSG; Gehirn) wurde der Kopf in einer Präparierschale festgesteckt und mit einer leicht gebogenen, feinen Schere posterior geöffnet. Anschließend wurde die Kutikula mit einer Dumont-Pinzette entfernt, das Gehirn frei präpariert, mit einer feinen Schere herausgelöst und von anhängendem Fett- und Muskelgewebe befreit. Für die Präparation der restlichen Gewebe wurde der Körper dorsal mit einer feinen Schere geöffnet und festgesteckt. Anschließend konnten die gewünschten Gewebe – der Fettkörper und die drei Darmabschnitte Vorder-, Mittel- und Hinterdarm – frei präpariert werden. Der Vorder- und der Hinterdarm setzten sich dabei jeweils aus mehreren Teilen zusammen. Das mit Vorderdarm bezeichnete Gewebe enthielt Ösophagus, Kropf und Proventrikulus. Das

Hinterdarmgewebe bestand aus fünf Abschnitten – dem ersten Hinterdarmsegment, dem Darmventil, dem Pansen, dem Colon und dem Rektum (Abb. 9). Der komplette Darm wurde ebenfalls mittels einer feinen Schere und einer Dumont-Pinzette freigelegt, von anhängendem Fettgewebe, Speicheldrüsen, Malpighischen Gefäßen und Tracheen befreit und aus dem Körper herausgelöst. Anschließend erfolgte die Trennung in die drei Abschnitte Vorder-, Mittel- und Hinterdarm sowie die Entleerung des Darms. Das mit Fettkörper bezeichnete Gewebe enthielt Teile des freien Fettkörpers, welche mit einer Dumont-Pinzette entnommen wurden. Die Gewebe, die zur RNA-Isolation verwendet werden sollten, wurden direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

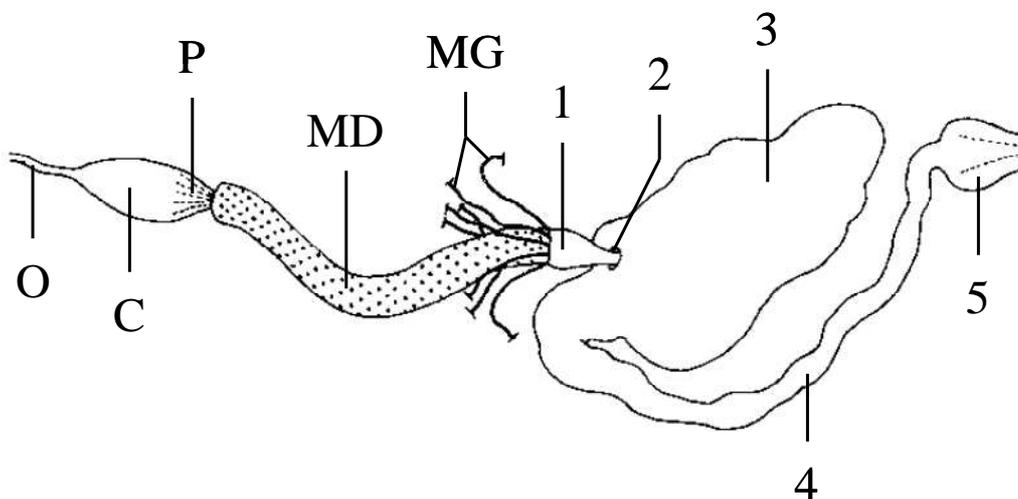


Abb. 9: Schematisierte Darstellung eines Termitendarms.

C = Kropf; MD = Mitteldarm; MG = Malpighische Gefäße; O = Ösophagus; P = Proventrikulus. Abschnitte des Hinterdarms: 1 = erstes Hinterdarmsegment; 2 = Darmventil; 3 = Pansen (Ileum); 4 = Colon; 5 = Rektum. (Bearbeitet nach: Noirots & Noirots-Timothee 1969).

4.2.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Geweben von *M. darwiniensis* erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen mit Chemikaliensets von zwei verschiedenen Herstellern – dem „RNeasy® Mini Kit“ von Qiagen und „peqGOLD TriFast™“ von Peqlab.

Am Anfang der Studie sollte eine cDNA-Bibliothek von *M. darwiniensis* erstellt werden. Dafür wurde die RNA mittels des „RNeasy® Mini Kits“ isoliert. Die Isolation erfolgte nach dem „RNeasy® Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“. Die tiefgefrorenen Gewebe wurden abgewogen und in Portionen zu je 30 mg in Reaktionsgefäße

überführt. Anschließend wurden 200 µl Puffer RLT (versetzt mit 2 µl β-Mercaptoethanol) dazugegeben und das Gemisch mit einem Gewebehomogenisator für ca. 2 min homogenisiert. Dazu wurden weitere 400 µl Puffer RLT (mit 4 µl β-Mercaptoethanol) gegeben und mit der Pipette vermischt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers mit verlängerten Zentrifugationszeiten. In allen Schritten wurde statt 15 s bei 8161 x g für je 1 min zentrifugiert. Nach dem Waschen mit dem Puffer RPE wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert für 2 min bei 13793 x g, um mögliche Überstände des Waschpuffers zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 50 µl DEPC-Wasser.

Die mit dem „RNeasy® Mini Kit“ isolierte Gesamt-RNA konnte nicht direkt für die Erstellung der cDNA-Bibliothek verwendet werden. Stattdessen wurde aus der Gesamt-RNA die mRNA mit dem „Oligotex® mRNA Mini Kit“ isoliert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem „Oligotex® mRNA Spin-Column“-Protokoll. Es wurden ca. 80 µg Gesamt-RNA verwendet. Diese wurden mit DEPC-Wasser auf 250 µl aufgefüllt und mit 250 µl Puffer OBB versetzt. Zu der Lösung wurden 15 µl Oligotex® Suspension hinzugegeben. Alle weiteren Schritte richteten sich nach den Herstellerangaben. Die Elution erfolgte mit 20 µl Puffer OEB (70°C). Die erhaltene Flüssigkeit wurde erneut auf 70°C erhitzt und für eine weitere Elution verwendet. Um die maximale Ausbeute an mRNA zu gewährleisten, wurde anschließend ein drittes Mal mit 20 µl Puffer OEB (70°C) eluiert.

Da mit dem säulenbasierten „RNeasy® Mini Kit“ zwar eine gute Reinheit, aber nur eine geringe Ausbeute an RNA erzielt werden konnte, wurde im späteren Verlauf der Studie auf „peqGOLD TriFast™“ umgestiegen. Diese Methode beruht auf der Einzelschrittmethod von Chomczynski & Sacchi (1987) zur Isolation von RNA unter Verwendung von Guanidinisothiocyanat, Phenol und Chloroform. Dafür wurden maximal 50 mg Gewebe mit 200 µl TriFast™ versetzt und mit einem Gewebehomogenisator für ca. 2 min homogenisiert. Anschließend wurden weitere 800 µl TriFast™ dazugegeben, die Lösung wurde gut gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben, es wurde 15 s kräftig gemischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde 5 min bei 13793 x g zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden erneut 200 µl Chloroform dazugegeben, es wurde 15 s kräftig gemischt und bei 13793 x g für weitere 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und bei -20°C für mindestens eine Stunde gefällt. Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation bei 18894 x g für 30 min bei 4°C. Danach wurde das Pellet zweimal mit je 500 µl kaltem Ethanol

(70%, v/v) gewaschen und für je 20 min bei 18894 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde für ca. 15 min an der Luft getrocknet, danach in 50 bis 100 µl DEPC-Wasser (je nach Gewebe) aufgelöst und bei 60°C für 15 min inkubiert, um die Löslichkeit zu verbessern.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.2.4) Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

4.2.3 DNA-Isolation

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Bei der Isolation von DNA aus *M. darwiniensis* wurde das „Genomic DNA Purification Kit“ von Fermentas verwendet, für die Isolation von genomischer DNA aus *C. darwini* wurde „Genomic-tip 500/G“ von Qiagen benutzt.

Für die Isolation der DNA aus *M. darwiniensis* wurden entweder ganze Tiere (zwei bis vier Stück) oder nur die Köpfe der Tiere (sechs bis zehn Stück) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Danach wurden die Gewebe in einen Mörser auf Trockeneis überführt und mittels eines Pistills unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver zermahlen. Von diesem Pulver wurden 30 mg abgewogen, in ein Mikrozentrifugengefäß überführt und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Isolation der genomischen DNA nach Angaben des Herstellers mit wenigen Änderungen. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 300 µl kalten Ethanol (100%) und einer verlängerten Inkubation bei -20°C für mindestens 60 min. Nach der Inkubation wurde die Probe bei 18894 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl kalten Ethanol (70%, v/v) gewaschen, getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser gelöst.

Da Individuen von *C. darwini* viel größer sind als Individuen von *M. darwiniensis* erfolgte die DNA-Isolation bei *C. darwini* nach einem anderen Protokoll. Außerdem stand nur ein Exemplar des letzten Larvenstadiums von *C. darwini* für die DNA-Isolation zur Verfügung. Dieses sollte komplett in einer Probe verarbeitet werden, um eine ausreichend große Menge an reiner DNA zu erhalten. Daher wurden hier Säulen des „Genomic-tip 500/G“ verwendet, welche die Verwendung von bis zu 500 mg Gewebe erlauben. Da das verwendete Gewebe ein Alkoholpräparat war, musste zuerst der überschüssige Alkohol entfernt werden, da dieser die nachfolgenden Schritte stören könnte. Der Alkohol wurde in einer Vakuumzentrifuge für ca. 10 min verdampft. Anschließend wurden die stark sklerotisierten Beine und Mundwerkzeuge

entfernt und das Präparat in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Danach wurde das Präparat in einen Mörser auf Trockeneis überführt und mittels eines Pistills unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver zermahlen. 500 mg von diesem Pulver wurden in ein 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt und in 19 ml Lysepuffer G2 mit RNase A resuspendiert. Anschließend wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von 760 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Lösung gut gemischt und im Wasserbad bei 50°C und gelegentlichem Mischen solange inkubiert, bis die Trübung vollständig verschwunden war. Laut Herstellerangaben sollte dieser Vorgang etwa zwei Stunden dauern, hier musste die Zeit jedoch auf ca. dreieinhalb Stunden verlängert werden. Danach wurde das Lysat für 20 min bei 15090 x g und 10°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit musste die zu verwendende Säule vorequibriert werden. Dazu wurden 10 ml Equilibrierungspuffer QBT auf die Säule transferiert. Für die Equilibrierung musste der Puffer QBT die Säule einmal komplett durchlaufen. Nach der Zentrifugation wurde das Lysat in ein neues 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt, für 10 s kräftig gemischt und sofort auf die vorequibrierte Säule überführt. Mit einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 20 – 40 Tropfen pro Minute passierte das Lysat die Matrix der Säule. Nach dem kompletten Durchlauf des Lysats durch die Säule folgten zwei Waschschrte mit je 30 ml Waschpuffer QC, die nacheinander auf die Säule überführt wurden und diese mit derselben Durchflussgeschwindigkeit passierten. Die Überstände der Puffer QBT, G2 und QC wurden verworfen. Nach den Waschschrten wurde die Säule in ein neues Glaszentrifugenröhrchen überführt und es wurden 15 ml Elutionspuffer QF (50°C) auf die Säule gegeben. Zum Durchfluss wurden 10,5 ml Isopropanol gegeben, die Lösung wurde gut gemischt und bei 4°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 5445 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde zweimal mit je 4 ml kaltem Ethanol (70%, v/v) gewaschen und bei 4°C und 5445 x g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für ca. 20 min an der Luft getrocknet und unter ständigem Schütteln über Nacht in 500 µl TE-Puffer gelöst. Während der Aufarbeitung wurden regelmäßig Kontrollproben der einzelnen Überstände entnommen, um den Fortschritt und die Qualität der Probe zu kontrollieren. Diese wurden am Ende der Aufarbeitung mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.6) überprüft.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.2.4). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die weitere Verarbeitung der hergestellten DNA- und RNA-Lösungen ist die Kenntnis über deren genaue Konzentration unerlässlich. Diese wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt. Die Messung erfolgte im UV-Bereich, da RNA und DNA in diesem absorbieren. Da alle Nukleotidmonophosphate, mit Ausnahme von 5'-CMP, ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, wurde die optische Dichte (OD) bei dieser Wellenlänge zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Dabei gilt, dass eine Absorptionseinheit bei A_{260} (1 OD_{260}) je nach Art der Nukleinsäure einer bestimmten Nukleinsäurekonzentration (spezifischer Absorptionskoeffizient) entspricht. Bei einzelsträngiger RNA (ssRNA) entspricht 1 OD_{260} 40 ng/ μl , bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) 50 ng/ μl (Sambrook *et al.* 1989; Mülhardt 2009). Für doppelsträngige RNA (dsRNA) ist kein genauer Wert bekannt, daher wurde hier der Wert für dsDNA von 50 ng/ μl verwendet. Da ausschließlich verdünnte Lösungen gemessen wurden, musste zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration auch die Verdünnung eingerechnet werden, so dass sich die Konzentration mit folgender Formel berechnen ließ:

$$\text{Konzentration [ng/\mu l]} = (A_{260} - A_{320}) * \text{Verdünnung} * \text{spez. Absorptionskoeffizient}$$

Zusätzlich zur Messung bei 260 nm wurde die Absorption bei 280 nm und 320 nm bestimmt. Der gemessene Wert bei 320 nm entspricht dem sogenannten „Streuwert“. Er gibt die allgemeine Streuung der Lichtstrahlen in der Lösung an und muss von den übrigen Werten abgezogen werden. Bei 280 nm haben Proteine ihr Absorptionsmaximum, daher wurde dieser Wert zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösungen verwendet. Die folgende Formel wurde für die Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösungen verwendet:

$$\text{Reinheit} = \frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Reine DNA weist einen Quotienten (A_{260}/A_{280}) von 1,8 auf, bei reiner RNA liegt der Quotient bei 2,0. Eine DNA- oder RNA-Lösung mit einem signifikant niedrigeren Quotienten ist wahrscheinlich mit Phenol oder Proteinen kontaminiert (Sambrook *et al.* 1989).

4.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“; PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Vermehrung definierter DNA-Fragmente, welches von Mullis *et al.* (1986) entwickelt wurde. Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments sind zwei passende Oligonukleotidprimer, die komplementär zu den jeweiligen Enden des DNA-Fragments sind.

Eine PCR-Reaktion gliedert sich in die drei Schritte Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Elongation. Die Denaturierung erfolgt bei 94 – 96°C, die Hybridisierung in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer bei Temperaturen zwischen 50 – 65°C. Die Elongation läuft meist bei 68 – 72°C ab, das Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) liegt bei ca. 74°C. Der Zyklus aus Denaturieren, Hybridisieren und Synthese wird meist 20 bis 45x wiederholt, wobei sich die Menge des gewünschten DNA-Fragments in jedem Zyklus annähernd verdoppelt. Durch den exponentiellen Anstieg der Menge des DNA-Fragments liegt dieses am Ende der PCR-Reaktion in millionenfacher Kopie vor.

Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurden alle benötigten Komponenten in passende PCR-Reaktionsgefäße überführt und anschließend in einer PCR-Maschine mit einem entsprechenden PCR-Programm inkubiert. Ein PCR-Programm beschreibt das verwendete Temperaturprofil während der PCR-Reaktion. In dieser Studie wurden verschiedene Programme verwendet, ein Beispiel für deren Aufbau ist in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Beispiel für ein PCR-Programm, das während dieser Studie für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet wurde.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	1:00	
Hybridisierung	55	1:00	40
Elongation	72	2:00	
Abschlussynthese	72	10:00	1

Die Methode der PCR wurde in dieser Studie für verschiedene Untersuchungen verwendet. Die verwendeten Programme und die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind bei den

entsprechenden Versuchen aufgeführt. Mittels Agarosegel-Elektrophorese wurden die entstandenen PCR-Produkte analysiert (siehe 4.2.6).

4.2.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, das in der Molekularbiologie häufig eingesetzt wird, um Moleküle verschiedener Größe und Ladung zu trennen. Dabei wird die Probe in ein Trägermaterial überführt und in ein elektrisches Feld gebracht. Abhängig von der Ladung wandern die Moleküle dann entweder zur Anode (negativ geladene Teilchen) oder zur Kathode (positiv geladene Teilchen). DNA-Moleküle sind im verwendeten Laufpuffer mit leicht alkalischen pH-Wert negativ geladen und wandern daher zur Anode. Für die Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Größe muss ein Gel verwendet werden, um die aufgrund der identischen Ladungsdichte gleichschnelle Wanderung der Moleküle im elektrischen Feld zu verhindern. Diese Gele bestehen meist aus Agarose und/oder Polyacrylamid. In dieser Studie wurde Agarose als Trägermaterial verwendet. Die Agarosemoleküle bilden im Gel ein kompliziertes Netzwerk, durch dessen Poren die DNA-Moleküle wandern müssen. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große Moleküle, daher werden die Moleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt (Brown 2007). Um die DNA-Moleküle im Agarosegel sichtbar zu machen, wurde eine Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen die Basen des DNA-Moleküls einlagert. Durch die Bindung an DNA wird die Fluoreszenz des Farbstoffes bei Anregung mit UV-Licht stark erhöht, so dass sich die markierten Nukleinsäuren deutlich vom dunkleren Hintergrund abheben. Die Intensität ist dabei proportional zur Konzentration an Nukleinsäuren (Le Pecq & Paoletti 1966, 1967).

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1 – 2% (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung der Flüssigkeit auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromidlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml dazugegeben. Anschließend wurde die Mischung in ein Gelgießgestell gegossen. Nach dem Erkalten wurde das entstandene Gel in eine Elektrophoresekammer, ebenfalls gefüllt mit 0,5x TBE-Puffer, überführt. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer vermischt (1 µl Probenpuffer pro 5 µl Probe) und in die Taschen des Gels gefüllt. Zusätzlich wurden 7 – 12 µl DNA-Größenstandard aufgetragen, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt. Die Elektrophorese lief mit einer Spannung von fünf bis acht Volt pro cm für 30 bis 50 min.

Anschließend wurde das Agarosegel mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert, wobei die DNA-Fragmente durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht wurden.

Für die Analyse der doppelsträngigen RNA wurden alle verwendeten Gefäße mit DEPC-Wasser ausgespült und der TBE-Puffer wurde anstatt mit Milli-Q Wasser mit DEPC-Wasser hergestellt, um einen Abbau der RNA zu verhindern.

Die Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte anhand einer Eichgerade, die mit Hilfe des mitgelaufenen DNA-Größenstandards erstellt wurde. Dafür wurde die Laufstrecke der einzelnen Fragmente des DNA-Größenstandards bestimmt und gegen den dekadischen Logarithmus (lg) der Fragmentlängen in Basenpaaren (bp) aufgetragen, da diese beiden Größen umgekehrt proportional zueinander sind (Mülhardt 2009). Aus der Geradengleichung der Eichgerade und der Laufstrecke der untersuchten DNA-Fragmente konnte anschließend die Länge der DNA-Fragmente berechnet werden.

4.2.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung der durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit den Chemikaliensets „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ und „QIAquick® Gel Extraction Kit“. Beide Protokolle beruhen auf der Bindung von DNA an Silikat-Membranen. Durch Zugabe eines Bindepuffers mit einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen wird die Agarose aufgelöst und die Bindung von doppelsträngiger DNA an die Silikat-Membran ermöglicht. Darauf folgt ein Waschschriff mit einer Salz-Ethanol-Lösung. Durch Zugabe einer Lösung mit geringer Salzkonzentration (z. B. Wasser, TE-Puffer oder Tris-HCl-Lösung) wird die DNA wieder gelöst und durch einen Zentrifugationsschritt gesammelt (Mülhardt 2009).

Vor der Reinigung wurden die gewünschten DNA-Fragmente auf einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Nach der Gewichtsbestimmung des Gelstückes erfolgte die Zugabe des entsprechenden Volumens von Bindepuffer. Die Aufreinigung erfolgte beim „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Herstellerangaben, beim „QIAquick® Gel Extraction Kit“ wurde das „Gel Extraction Spin Protocol“ des Herstellers verwendet. Für die Elution der DNA von der Silikat-Membran wurde entweder der entsprechende Elutionspuffer oder steriles Wasser verwendet.

Für manche Experimente war es notwendig, durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente durch eine erneute PCR-Reaktion nochmals zu amplifizieren. Um zu verhindern, dass übrig gebliebene Komponenten der ersten Reaktion die zweite Reaktion stören, wurde der gesamte PCR-Ansatz ebenfalls mit dem „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Herstellerangaben aufgereinigt. Diese Methode entfernte nicht nur die Salze und Enzymreste der ersten PCR-Reaktion effektiv, sondern auch die verwendeten Oligonukleotide, die in der zweiten PCR-Reaktion ansonsten zu unerwünschten Nebenprodukten führen könnten.

4.2.8 Klonierung

Ein häufig angewendetes Verfahren für die Vermehrung definierter DNA-Fragmente ist die Klonierung. Dafür wird das gewünschte DNA-Fragment zuerst in einen geeigneten Vektor integriert. Anschließend wird dieser Vektor in eine Bakterienzelle transformiert. Die Vektoren enthalten ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum, so dass anschließend an die Transformation eine Selektion der Bakterien stattfinden kann. Dazu werden die transformierten Bakterien auf einen Nährboden mit Antibiotikum (meist Ampicillin) überführt. Nur diejenigen Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben und damit das Antibiotika-Resistenzgen tragen, können auf einem solchen Nährboden wachsen.

4.2.8.1 Ligation

Zur Vermehrung der gewünschten DNA-Fragmente müssen die durch PCR amplifizierten und aufgereinigten Fragmente zunächst in einen geeigneten Vektor integriert werden. Es wurden Plasmid-Klonierungsvektoren verschiedener Hersteller verwendet. Die verwendeten Chemikaliensets waren „CloneJET™ PCR Cloning Kit“, „GeneJET™ PCR Cloning Kit“ (beide Fermentas), „pGEM®-T Easy Vector System I“ (Promega) und „TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter“ (Invitrogen). Die Sets von Invitrogen und Promega arbeiten nach dem TA-Klonierungsprinzip, welches besonders geeignet ist für DNA-Fragmente, die mit einer *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden. Die *Taq*-Polymerase weist eine unspezifische terminale Transferase-Aktivität auf, die an das 3'-Ende von PCR-Produkten eine einzelne Desoxyadenosin-Base anfügt. Die Vektoren pGEM®-T Easy und pCR®II-TOPO® weisen komplementär dazu am 3'-Ende eine einzelne überhängende Thymidin-Base auf. Dadurch wird die Rezirkularisierung des Vektors verhindert und die Ligationseffizienz erhöht. Die

komplementären überhängenden Basen von Vektor und PCR-Produkt bilden über Wasserstoffbrückenbindungen eine schwache Basenpaarung. Bei pGEM®-T Easy werden diese Verknüpfungen durch die T4-DNA-Ligase und Bildung von Phosphodiesterbindungen verfestigt. Der Vektor pCR®II-TOPO® ist mit einer Topoisomerase I vom *Vaccinia*-Virus kovalent verknüpft. Durch Abspaltung der Topoisomerase kommt es zur Neuausbildung der Phosphodiesterbindung zwischen Vektor und PCR-Produkt (Shuman 1994; Mülhardt 2009). Die Sets von Fermentas arbeiten nach dem sogenannten „Blunt-End-Cloning“-Prinzip. Dabei weisen beide DNA-Stücke (Vektor und PCR-Produkt) „glatte“ Enden auf und können so durch eine T4-DNA-Ligase verbunden werden. Bei PCR-Produkten, die mit einer *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, muss vorher eine „Blunting“-Reaktion durchgeführt werden, bei der ein Enzym die überhängenden Enden abschneidet.

Die Durchführung der Reaktion erfolgte jeweils weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Die genaue Zusammensetzung der Ligationsansätze und der Ablauf der Ligationsreaktionen sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Tab. 25: Zusammensetzung des Ligationsansatzes und Ablauf der Ligationsreaktion.

RT = Raumtemperatur, ÜN = über Nacht.

	CloneJET™ PCR Cloning Kit	GeneJET™ PCR Cloning Kit	pGEM®-T Easy Vector System I	TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter
<i>2x Reaktions- puffer</i>	5 µl	5 µl	2,5 µl	-
<i>DNA-Fragment</i>	25 – 75 ng	25 – 75 ng	25 – 75 ng	25 – 75 ng
<i>DNA Blunting Enzym</i>	0,5 µl	0,5 µl	-	-
<i>Wasser (nukleasefrei)</i>	auf 9 µl	auf 9 µl	auf 8,5 µl	auf 4 µl
Blunting- Reaktion:	5 min bei 70°C, danach auf Eis	5 min bei 70°C, danach auf Eis	-	-
<i>Vektor</i>	pJet1.2/blunt 0,5 µl	pJET1/blunt 0,5 µl	pGEM®-T Easy 0,5 µl	pCR®II-TOPO® 1 µl
<i>T4-DNA-Ligase</i>	0,5 µl	0,5 µl	1 µl	-
<i>Salzlösung</i>	-	-	-	1 µl
Gesamt- volumen	10 µl	10 µl	10 µl	6 µl
Ligations- reaktion:	30 min bei RT	30 min bei RT	ÜN bei 16°C	30 min bei RT

4.2.8.2 Herstellung kompetenter Zellen

Für eine erfolgreiche Aufnahme des Vektors in die Bakterienzelle ist eine vorangehende Behandlung der Bakterien essentiell, da die meisten Bakterienarten unter natürlichen Bedingungen DNA nur sehr begrenzt aufnehmen. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA zu erleichtern, müssen die Bakterienzellen vorher einer physikalischen (z. B. Elektroporation) oder chemischen Behandlung (z. B. Behandlung mit Calciumchlorid) unterzogen werden. Die Zellen nach der Behandlung werden kompetente Zellen genannt (Brown 2007). In dieser Studie wurde eine chemische Behandlung verwendet, die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte mit eisgekühlter Calciumchloridlösung.

Für die Herstellung der kompetenten Bakterienzellen wurde eine Startkultur von *Escherichia coli* JM109 verwendet. 150 µl Bakteriensuspension wurde kurz auf Eis aufgetaut und in 50 ml LB-Medium überführt. Anschließend erfolgte eine ca. zweistündige Inkubation bei 37°C und 240 rpm bis die optische Dichte (OD) bei 550 nm einen Wert zwischen 0,45 und 0,55 aufwies. Daraufhin wurde das LB-Medium in ein eiskaltes Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min auf Eis inkubiert und für weitere 10 min bei 2254 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 4°C und 2254 x g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂ / 15% (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Die so entstandene Lösung wurde portioniert und bei -70°C gelagert.

Die Wirksamkeit der Behandlung wurde mittels einer Testtransformation überprüft. Dafür wurden die kompetenten Zellen mit 15 ng des zirkulären pGEM®-T Easy Vektors transformiert und auf Nährmedium ausplattiert. Anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien konnte die Kompetenz der Zellen in koloniebildenden Einheiten („colony forming units“; cfu) pro µg DNA bestimmt werden. Die Kompetenz betrug zwischen 10⁴ und 10⁵ cfu pro µg DNA.

4.2.8.3 Transformation

Als Transformation wird die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Die vorherige Behandlung der Bakterienzellen mit Calciumchlorid beeinflusst nicht die eigentliche Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle, sorgt aber dafür, dass die

DNA besser an der Außenseite der Zelle binden kann. Die Aufnahme der DNA erfolgt während einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur auf 42°C (Brown 2007).

Für die Transformation wurde der Ligationansatz zu 100 µl kompetenten Zellen des *E. coli*-Stamms JM109 gegeben und durch leichtes Klopfen gegen das Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurde das Gemisch 20 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock der Zellen bei 42°C für genau 2 min. Dieser Schritt ist der kritische Schritt bei der Transformation, da hier die DNA in die Zellen eingeschleust wird. Nach dem Hitzeschock erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium wurden die Zellen bei 37°C und 160 rpm für mindestens 1,5 h inkubiert. In dieser Zeit fand eine Revitalisierung der Zellen und die Expression der Antibiotikaresistenzgene statt. Im Anschluss wurden die Bakterien auf LB-Amp-Platten ausplattiert, die zuvor mit 100 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 20 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) behandelt wurden. Die Mischung wurde in einem 2:1 (v/v) Verhältnis auf zwei Platten verteilt. Danach wurden die LB-Amp-Platten zuerst für 30 min bei 37°C und anschließend in umgekehrter Orientierung bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.2.8.4 Selektion der transformierten Zellen

Da die Effizienz einer Transformation meist nicht sehr hoch ist, wird eine einfache Methode zur Unterscheidung von erfolgreich transformierten Zellen und nicht-transformierten Zellen benötigt. Alle verwendeten Plasmid-Klonierungsvektoren tragen zu diesem Zweck ein Ampicillinresistenzgen, welches bei *E. coli* normalerweise nicht vorhanden ist. Werden die transformierten Zellen dann auf ein Selektionsmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin ausplattiert, können nur die Zellen wachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Die Anwesenheit des Vektors allein reicht dafür nicht aus, das Resistenzgen muss auch exprimiert und das entsprechende Enzym in ausreichender Menge gebildet werden (Brown 2007). Dafür dient die Inkubation mit SOC-Medium unmittelbar nach der Transformation, während der die Plasmidreplikation und Genexpression anlaufen.

Nach der Selektion von erfolgreich transformierten Zellen erfolgt eine weitere Selektion, in der zwischen Zellen mit rekombinierten DNA-Molekülen (Plasmid mit integriertem DNA-Fragment) und Zellen mit selbstligiertem Vektor unterschieden werden muss. Die Zugabe von IPTG und X-Gal zum Nährmedium erlaubt eine relativ einfache Methode zur Selektion der

gewünschten Bakterienkolonien mittels der Lac-Selektion oder Blau-Weiß-Selektion. Diese Methode ist mit den meisten modernen Plasmidvektoren durchführbar und beruht auf der Unterbrechung des *lacZ'*-Gens. Das *lacZ'*-Gen kodiert für das α -Fragment der β -Galactosidase und befindet sich innerhalb der multiplen Klonierungsstelle („Multiple Cloning Site“; MCS) auf dem eingeschleusten Vektor. Zusammen mit dem ω -Fragment, welches sich im Genom des *E. coli* Bakterienstamms JM109 (Genotyp *laqI^qZ Δ M15*) befindet, bildet das α -Fragment das funktionelle Enzym β -Galactosidase. Die β -Galactosidase kann das Lactoseanalogon X-Gal spalten, was zu dem unlöslichen Produkt 5-Brom-4-chlorindoxyl führt. Dieses färbt die Bakterienkolonien tiefblau. IPTG wird zur Induktion des Enzyms hinzugegeben. Durch Einschleusen eines DNA-Fragments in die MCS des Vektors wird das *lacZ'*-Gen unterbrochen und es kann keine funktionelle β -Galactosidase gebildet werden. Dadurch erfolgt keine Spaltung des X-Gals und die tiefblaue Färbung der Bakterienkolonien bleibt aus. Die Bakterienkolonien, die den Vektor und das gewünschte DNA-Fragment enthalten, sind demnach weiß gefärbt (Brown 2007; Mülhardt 2009). Bei kleinen DNA-Fragmenten (unter 1 kb Länge) kann es passieren, dass trotz enthaltenem Insert der *lacZ'*-Leserahmen nicht unterbrochen wird und ein funktionelles Enzym produziert wird. Die resultierenden Kolonien weisen eine hellblaue Farbe auf, sind aber von den tiefblauen Kolonien ohne Insert gut zu unterscheiden (Mülhardt 2009). Auch mit diesen Kolonien wurde daher weitergearbeitet.

Bei der Benutzung der Vektoren pJET1 und pJet1.2 (GeneJET™ und CloneJET™ PCR Cloning Kit) war keine Blau-Weiß-Selektion notwendig. Beide Vektoren weisen innerhalb ihrer MCS ein Gen auf, das ein die Bakterienzelle abtötendes Protein kodiert. Dessen Expression kann nur durch erfolgreiches Einbringen eines Inserts unterbrochen werden. Daher wuchsen bei Verwendung dieser beiden Vektoren nur Zellen mit rekombiniertem Vektor.

4.2.8.5 Fermentation

Für die weitere Vermehrung der positiven Klone wurden einige positiv bewertete Kolonien einzeln mit einer sterilen Pipettenspitze von den LB-Amp-Platten entnommen und jeweils auf einer neuen LB-Amp-Platte ausgestrichen. Diese wurde erneut bei 37°C in umgekehrter Orientierung über Nacht inkubiert.

Die Fermentation erfolgte am darauf folgenden Tag. Dafür wurde erneut eine einzelne Kolonie des Verdünnungsausstriches mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 5 ml

LB-Medium mit 500 µg Ampicillin überführt. Dieses wurde dann bei 37°C und 240 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend konnte die Plasmidpräparation durchgeführt werden.

4.2.8.6 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation dient der Isolation des vermehrten Plasmids aus den Bakterienzellen. Die Isolation erfolgte dabei entweder mit konventionellen Minipräparation-Sets oder über die Methode der alkalischen Lyse.

Die verwendeten Minipräparation-Sets waren das „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ und das „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System“. Die Durchführung beim „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ erfolgte nach den Angaben des Herstellers, beim „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System“ wurde nach dem Zentrifugationsprotokoll des Herstellers verfahren.

Beide Minipräparation-Sets lieferten zwar Plasmidlösungen mit hoher Reinheit, jedoch nur geringe Mengen des gewünschten Plasmids. Daher wurde für die Plasmidpräparation die Methode der alkalischen Lyse verwendet, wenn nachfolgende Reaktionen eine große Menge an Plasmid erforderten. Dafür wurde zuerst das LB-Medium mit den Bakterienzellen in ein Mikrozentrifugengefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 13793 x g pellettiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Puffer S1, versetzt mit 1 µl RNase A (100 µg/µl), resuspendiert. Danach wurden 200 µl Puffer S2 hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 150 µl Puffer S3 dazugegeben, es wurde sofort durch invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die RNase A sorgt für den Abbau der bakteriellen RNA. Der Puffer S2 enthält Natriumhydroxid und das ionische Detergenz SDS. Durch das SDS werden die Bakterienmembranen lysiert und die Proteine denaturiert. In der chromosomalen DNA der Bakterien kommt es durch das SDS zu Strangbrüchen, daher liegt diese in gestreckter Form vor. Durch den hohen pH-Wert kommt es zur Denaturierung der chromosomalen DNA. Da die Plasmide in überspiralisierter Form vorliegen, werden sie nicht denaturiert. Der Puffer S3 enthält Essigsäure und verursacht eine Neutralisation der Lösung. Die Einzelstränge der chromosomalen DNA lagern sich durch Zugabe der Säure zu einer unlöslichen Masse zusammen. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung (Brown 2007). Durch den Austausch von Natrium- durch Kaliumionen kommt es zur Bildung des schwerlöslichen Kalium-DS (Kaliumdodecylsulfat), welches zusammen mit der chromosomalen DNA, den denaturierten

Proteinen und Zellbestandteilen ausfällt und abzentrifugiert werden kann. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 13793 x g. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 13793 x g zentrifugiert. Zur Fällung wurde der Überstand mit dem 0,8-fachem Volumen an Isopropanol versetzt und bei -20°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 18894 x g für 30 min wurde die Plasmid-DNA pellettiert. Das Pellet wurde mit je 500 µl Ethanol (70%, v/v) zweimal gewaschen und jeweils bei 18894 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach den Waschschritten wurde das Pellet gut getrocknet und in 50 bis 100 µl sterilem Wasser gelöst.

4.2.8.7 Analyse der isolierten Plasmide

Zur Überprüfung der Länge des in den Vektor eingebauten DNA-Fragments wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen konnte eine PCR durchgeführt werden, zum anderen konnte das eingebaute DNA-Fragment mittels Restriktionsenzymverdau wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Die PCR wurde unter denselben Bedingungen und mit denselben Primern durchgeführt wie die PCR, mit der das DNA-Fragment ursprünglich amplifiziert wurde. Bei einem Restriktionsenzymverdau werden sogenannte Restriktionsendonukleasen vom Typ II (auch Restriktionsenzyme) eingesetzt. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die DNA an einer spezifischen DNA-Basensequenz schneiden. Die Erkennungssequenzen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Enzymen und sind zwischen vier und acht Basenpaare lang (Mülhardt 2009). Zum Herauslösen des DNA-Fragments aus dem Plasmid musste das Plasmid zweimal in der Nähe des Inserts geschnitten werden. Dadurch war das herausgeschnittene Stück nur minimal größer als das Insert. Dafür wurde entweder ein Restriktionsenzym verwendet, das im Plasmid zwei Erkennungsstellen hat und daher zweimal schneidet, oder es wurden zwei Restriktionsenzyme eingesetzt, die jeweils einmal schneiden. Die verwendeten Restriktionsenzyme, die eingesetzten Volumina und der Ablauf des Restriktionsenzymverdaus sind in Tab. 26 zusammengefasst. Nach Ablauf der Reaktion wurde diese durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) abgestoppt und die Länge des DNA-Fragments mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.6) überprüft.

Tab. 26: Zusammenfassung der eingesetzten Chemikalien, Volumina und Inkubationszeiten des Restriktionsenzymverdaus.

	CloneJET™ PCR Cloning Kit	GeneJET™ PCR Cloning Kit	pGEM®-T Easy Vector System I	TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter
<i>Puffer</i>	10x Puffer O 2 µl	10x Puffer <i>EcoRI</i> 2,5 µl	10x Puffer <i>EcoRI</i> 2 µl	10x Puffer <i>EcoRI</i> 2 µl
<i>Plasmid</i>	0,5 – 1 µg	0,5 – 1 µg	0,5 – 1 µg	0,5 – 1 µg
<i>Restriktions- enzym</i>	<i>BglII</i> 1 µl	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> 0,5 µl + 1 µl	<i>EcoRI</i> 1 µl	<i>EcoRI</i> 1 µl
<i>Wasser (nukleasefrei)</i>	auf 20 µl	auf 25 µl	auf 20 µl	auf 20 µl
Inkubation	2 h bei 37°C	2 h bei 37°C	2 h bei 37°C	2 h bei 37°C

4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) zur Bestimmung des Hormongehalts

4.3.1 Probennahme

4.3.1.1 Hämolympheproben von *Gryllus bimaculatus*

Für die Herstellung eines externen Standards für die HPLC-MS-Messungen wurde Hämolymphe von weiblichen, adulten, einen Tag alten Mittelmeerfeldgrillen *G. bimaculatus* als Matrix verwendet. Dadurch sollten eventuelle Matrixeffekte ausgeglichen werden, z. B. Wechselwirkungen der nicht untersuchten Inhaltsstoffe der Hämolymphe mit der HPLC-Säule. Es wurden einen Tag alte Grillenweibchen gewählt, da Westerlund (2004) zeigen konnte, dass diese nur eine geringe Menge an Juvenilhormon und keine Ecdysteroide in der Hämolymphe aufweisen.

Vor der Hämolympheabnahme wurden die Tiere gekühlt, um die Koagulation der Hämolymphe zu verzögern. Zur Hämolympheabnahme wurden die Tiere mit der ventralen Körperseite nach oben fixiert. Mit einer Nadel wurde die Haut zwischen Metathorax und metathorakalem Bein angestochen, der austretende Hämolymphtropfen mit einer geeichten Glaskapillare aufgefangen und das exakte Volumen bestimmt. Um die Ausbeute an Hämolymphe zu erhöhen, wurden die Tiere leicht am Abdomen zusammengedrückt. So konnten pro Tier zwischen 30 und 140 µl Hämolymphe gewonnen werden. Die Hämolymphe

wurde anschließend in ein Reagenzglas, gefüllt mit 200 µl eines Methanol-Isooktan-Gemisches (MIG; 1:1, v/v), überführt, ca. 20 s kräftig gemischt und mit Alufolie und Parafilm verschlossen. Das Verhältnis von Hämolymphe zu Lösungsmittel betrug eins zu zehn (v/v), d. h. es wurden je 20 µl Hämolymphe in 200 µl Lösungsmittel überführt. Danach wurden die Proben ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren wurden.

4.3.1.2 Hämolympfproben und Ganztierextrakte von *Mastotermes darwiniensis*

Die Probennahme bei den Versuchstieren der Termitenart *M. darwiniensis* erfolgte ähnlich wie die Hämolympfabnahme bei den Grillen. Bei den Termiten wurden jedoch zwei verschiedene Ansätze zur Bestimmung des Hormongehalts verfolgt. Zum einen erfolgte die Untersuchung der Hämolymphe, zum anderen die Untersuchung von Ganztierextrakten. Zur Hämolympfabnahme wurden die Tiere mit der dorsalen Seite nach oben fixiert und mit einer Nadel wurde in die Haut zwischen Kopf und Thorax gestochen. Dabei wurden die Tiere am Abdomen leicht zusammengedrückt. Der austretende Hämolymphtropfen wurde mit einer geeichten Glaskapillare aufgefangen, das exakte Volumen wurde bestimmt und sofort in ein Reagenzglas mit 200 µl MIG (1:1, v/v) überführt. Pro Tier konnten je nach Stadium zwischen 0,1 und 5 µl Hämolymphe gewonnen werden. Das Verhältnis von Hämolymphe zu Lösungsmittel betrug eins zu zehn (v/v), dafür musste die Hämolymphe mehrerer Tiere vereinigt werden. Anschließend wurden die Proben ca. 20 s gut gemischt, mit Alufolie und Parafilm verschlossen, bei Raumtemperatur ca. 30 min inkubiert und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Da pro Tier nicht genügend Hämolymphe für eine individuelle Messung gewonnen werden konnte, wurden zusätzlich zu den Hämolympfproben individuelle Ganztierextrakte untersucht. Dafür wurde jedes Tier gewogen, es wurde das Geschlecht bestimmt und zur Bestimmungen des Stadiums die Antennensegmente gezählt (siehe 4.1.2). Anschließend wurden die Tiere einzeln in Reagenzgläser mit 200 µl MIG (1:1, v/v) überführt, mit einer feinen Schere gründlich zerkleinert und mit einem Gewebehomogenisator für mindestens drei Minuten homogenisiert. Danach wurden die Proben wieder gut gemischt, bei Raumtemperatur inkubiert und bei -70°C eingefroren.

4.3.2 Aufarbeitung der Proben

Die weitere Aufarbeitung der Hämolympfproben von *Gryllus* und *Mastotermes* sowie der Ganztierextrakte von *Mastotermes* erfolgte nach dem Protokoll von Westerlund & Hoffmann (2004) und Westerlund (2004). Die Proben wurden bei 8161 x g für 20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten drei Phasen unterschieden werden – die obere Isooktanphase, die mittlere Phase mit denaturierten Proteinen und die untere Methanolphase. Die Isooktanphase wurde mit einer Mikroliterspritze in ein neues Reagenzglas überführt und die verbleibenden Phasen erneut ca. 5 s gut vermischt. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 8161 x g für 20 min. Nach der Zentrifugation wurde die Methanolphase mit einer Mikroliterspritze abgenommen und wieder mit der Isooktanphase vereint. Anschließend wurden die Proben bei -70°C eingefroren. Kurz vor der Messung der Proben wurde die Isooktanphase in einer Vakuumzentrifuge verdampft und die Methanolphase auf ca. 20 µl reduziert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 8161 x g. Nach der Zentrifugation wurde die Methanolphase mit einer Mikroliterspritze in ein Probenfläschchen bestückt mit einem 100-µl-Einsatz überführt, das genaue Volumen bestimmt und gegebenenfalls mit Methanol auf 20 µl aufgefüllt.

4.3.3 Messung der Proben

Die Quantifizierung der Hormone in der Hämolymphe bzw. in den Ganztierextrakten erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (high performance liquid chromatography – mass spectrometry; HPLC-MS) leicht verändert nach der Methode von Westerlund & Hoffmann (2004) und Westerlund (2004). Die Analyse wurde mit einem Massenspektrometer LCMS 2010A, gekoppelt an einen Autoinjektor SIL-10AD VP und eine HPLC-Einheit, durchgeführt. Als HPLC-Pumpe wurde zu Beginn der Versuche die Pumpe Eldex® MicroPro™ verwendet, diese musste aber später aufgrund eines Defekts gegen zwei Pumpen vom Typ LC-20AD ausgetauscht werden. Dies hatte allerdings kaum Einfluss auf die verwendete Methode und die Konfigurationen. Der einzige Unterschied zeigte sich in einer leichten Retentionszeitverschiebung, hervorgerufen durch die kürzere Laufstrecke des Laufmittels. Die Auftrennung der Probe erfolgte durch eine C18 Reversed Phase Säule geschützt durch eine C18 Vorsäule (Security Guard Cartridge). Als Laufmittel diente ein Methanol/Wasser-Gemisch mit variierender Zusammensetzung (Tab. 27) bei einer Flussrate von 200 µl/min.

Tab. 27: Zusammensetzung des Methanol/Wasser-Gemisches während des HPLC-Laufs.

Zeit (min)	Methanol/Wasser Gradient (v/v)
0 – 10	30 – 100%
10 – 15	100%
15 – 16	100 – 30%
16 – 20	30%

Pro Lauf wurden je 10 µl der Probe durch einen Autoinjektor injiziert. Die Säule wurde während des HPLC-Laufs auf 37°C temperiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit der Methode der Elektrospray-Ionisierung (ESI) im positiven Modus. Es wurden folgende Einstellungen verwendet: Die höchste Probenspannung betrug 4,5 kV, die Spannung der „Curved Desolvation Line“ (CDL) 25 V und die CDL-Temperatur 250°C. Die Temperatur des Heizblocks wurde auf 200°C, der Stickstofffluss auf vier Liter pro Minute festgesetzt. Die ESI-Methode ist eine sanfte Ionisierungsmethode, daher gibt es kaum Fragmentierung der Verbindungen. Die im positiven Modus überwiegend entstehenden Addukte sind $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$. Bei der Messung des Hormongehalts von Hämolymphe wird überwiegend $[M+Na]^+$, weniger häufig auch $[M+K]^+$ gebildet (Westerlund 2004). Daher wurden diese Addukte der Ecdysteroide 20-Hydroxyecdysen und Ecdysen sowie der Juvenilhormone I, II und III analysiert (Tab. 28).

Tab. 28: Durch Elektrospray-Ionisierung gebildete Addukte der untersuchten Hormone (Ecdysteroide und Juvenilhormone) und ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis.

Untersuchtes Hormon	m/z $[M+Na]^+$	m/z $[M+K]^+$
20-Hydroxyecdysen	503	519
Ecdysen	487	503
Juvenilhormon III	289	305
Juvenilhormon II	303	319
Juvenilhormon I	317	333

4.3.4 Analyse

Die Quantifizierung der Hormone erfolgte über einen externen Standard, indem Hämolymphe von weiblichen, ein Tag alten Grillen mit definierten Mengen der untersuchten Hormone 20-Hydroxyecdysen, Ecdysen, JH III, II und I versetzt und daraus eine Eichgerade erstellt wurde.

Zusätzlich wurden zu Beginn, in der Mitte und am Ende jedes Messtages weitere externe Standardproben mit definierter Konzentration gemessen. Dadurch sollten eventuelle Schwankungen des Massenspektrometers ausgeglichen werden, indem die untersuchten Proben zusätzlich mit diesem Standard normalisiert wurden.

4.3.5 Zusammenfassung durchgeführter Experimente

Die Bestimmung des Hormongehalts erfolgte in zwei getrennten Messreihen. Zu Beginn der Versuche wurden Hämolympheproben der verschiedenen Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* untersucht. Dabei traten zwei Probleme auf. Zum ersten gab es zu dieser Zeit Stabilitätsschwankungen des verwendeten Massenspektrometers, daher war es schwierig, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Deshalb wurden zwischen 2 und 15 Proben desselben Entwicklungsstadiums vereinigt, gut gemischt, wieder aufgeteilt und getrennt gemessen. Der Mittelwert des Hormongehalts dieser Pseudoreplikate sollte dem tatsächlichen Hormongehalt annähernd entsprechen. Durch dieses Vorgehen war die tatsächliche Stichprobengröße jedoch gering. Zum zweiten konnte aus sehr kleinen Individuen (L_1) und Eiern keine Hämolymphe gewonnen werden. Aus diesem Grund wurden von diesen beiden Stadien Ganzkörperextrakte angefertigt. Es wurden je 250 Eier bzw. je 60 Larven zu einer Probe vereinigt, mit 200 μ l MIG (1:1, v/v) versetzt und mit einem Gewebehomogenisator gründlich zerkleinert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 4.3.1.2 und 4.3.2). Im Zuge der ersten Messreihe (Februar 2007 bis Mai 2008) wurden alle in Tab. 23 (S. 53) beschriebenen Entwicklungsstadien untersucht – die Eier, fünf Larvalstadien, drei Nymphenstadien, Arbeiter, Soldaten und Alaten. Die Alaten stammten dabei nicht aus den eigenen Kolonien, sondern aus der bereits beschriebenen Ursprungskolonie (BAM, Berlin). In den eigenen Kolonien konnten zu keiner Zeit Alaten beobachtet werden.

Da die Ergebnisse der Hämolympheproben und Ganzkörperextrakte nicht ohne weiteres vergleichbar sind und außerdem keine individuellen Ergebnisse verfügbar waren, wurden in der zweiten Messreihe ausschließlich Ganzkörperextrakte untersucht. Dabei wurden

Individuen analysiert, es fand keine Vereinigung der Proben statt. Für die zweite Messreihe (Oktober 2008 bis Mai 2010) konnten jedoch nicht alle Entwicklungsstadien untersucht werden, da einige der Stadien zu diesem Zeitpunkt nicht in den Kolonien vorhanden waren. Es wurden ausschließlich Stadien der apteren Entwicklungslinie analysiert – fünf Larvalstadien, Arbeiter, Soldaten und einige Neotenicis.

Zusätzlich zu den Entwicklungsstadien, die aus den normalen Kolonien entnommen wurden, konnten zweimal Termiten von absterbenden Kolonien untersucht werden. Aus unbekannter Ursache kam es zum Absterben der Kolonien verbunden mit einer massiven Schimmelbildung. Dabei konnte das massenhafte Auftreten von Ersatzgeschlechtstieren beobachtet werden. Diese und die verbliebenen Arbeiter der Kolonien wurden in beiden Messreihen untersucht.

Eine Zusammenfassung der Experimente zur Bestimmung des Hormongehaltes ist in Abb. 61 dargestellt (Anhang, S. 254). Die detaillierte Aufarbeitung der Proben sowie die analysierten Entwicklungsstadien für beide Messreihen sind in Abb. 71 und Tab. 50 zusammengefasst (Anhang, S. 269ff).

4.4 Identifikation der Sequenzen verschiedener Gene bei *Mastotermes darwiniensis* und *Cryptocercus darwini*

In dieser Studie wurden verschiedene Gene identifiziert und sequenziert. Dazu gehörten zum einen die AST-A Gene von *M. darwiniensis* und *C. darwini*. Zum anderen wurden Fragmente verschiedener „Housekeeping“-Gene bei *M. darwiniensis* identifiziert. Eine Zusammenfassung der Experimente zur Identifikation der verschiedenen Gensequenzen ist in Abb. 62 dargestellt (Anhang, S. 255).

4.4.1 Identifikation des Allatostatin A-Gens bei *Mastotermes darwiniensis*

Für die Identifikation der Sequenz des AST-A Gens von *M. darwiniensis* wurden verschiedene Versuchsansätze getestet. Bei den ersten zwei Methoden wurde RNA als Ausgangsmaterial genutzt. Damit wurde zum einen eine cDNA-Bibliothek hergestellt (4.4.1.1). Zum anderen erfolgte mit der RNA die Identifikation der 5'- und 3'-Enden der cDNA durch die Methode der „schnellen Amplifikation von cDNA-Enden“ („Rapid Amplification of cDNA Ends“, RACE) (4.4.1.2). Beim dritten und vierten Versuchsansatz diente genomische DNA als Ausgangsmaterial (4.4.1.3).

4.4.1.1 SMART cDNA Library Construction

Zunächst wurde eine cDNA-Bibliothek mittels des „SMART™ cDNA Library Construction Kit“ hergestellt. Die Herstellung erfolgte weitestgehend nach Herstellerangaben mit einigen Änderungen. Für die Herstellung wurde die mRNA aus ca. 630 Oberschlundganglien von *M. darwiniensis*-Arbeitern verwendet. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem „RNeasy® Mini Kit“, die Isolation der mRNA mit dem „Oligotex® mRNA Mini Kit“ (siehe 4.2.2). Für die Synthese des cDNA-Einzelstrangs wurde ca. 0,5 µg mRNA verwendet. Die Amplifikation der cDNA mittels „Long Distance PCR“ (LD PCR) erfolgte mit einer Zyklenzahl von 32 Zyklen statt der vorgegebenen 20 Zyklen. Die Zentrifugations- und Fällungszeiten des Proteinase K-Verdau wurden verlängert. Nach der Zugabe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) wurde für 10 min statt der vorgegebenen 5 min zentrifugiert. Bei der Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) wurde 15 min zentrifugiert. Die Fällung mit Natriumacetat, Glykogen und Ethanol erfolgte bei -20°C über Nacht, um die Ausbeute zu erhöhen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 18894 x g für 40 min. Die erhaltenen Überstände wurden aufbewahrt und erneut gefällt. Anschließend wurden alle Proben wieder vereinigt. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I erfolgte bei 50°C für 4 h. Nach der cDNA-Größenfraktionierung mittels Chroma SPIN-400 wurden vier Fraktionen aufgefangen, vereinigt und weiter verarbeitet. Die Ligation der aufgereinigten cDNA in den λ TriplEx2™ Vektor erfolgte nach Herstellerangaben mit 1,5 µl cDNA. Der Vektor mit der ligierten cDNA wurde anschließend mittels des „Gigapack® III Gold Packaging Extract“ nach Herstellerangaben in λ-Bakteriophagen verpackt. Die Amplifikation der cDNA-Bibliothek und die Bestimmung des Titors erfolgten ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Die Lagerung erfolgte in 2-ml-Portionen nach Zugabe von DMSO (Endkonzentration: 7%, v/v) bei -70°C.

Vor der Verwendung der cDNA-Bibliothek wurde diese mittels PEG-Fällung gereinigt. Dafür wurde 1 ml Lysat bei 13793 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Dabei wurde nacheinander je 1 ml Phenol (pH 8,0), Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v), Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) und Chloroform zur oberen Phase hinzugegeben. Nach der Zugabe wurde jeweils gemischt, bei 13793 x g für 5 min zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl MgCl₂ (30 mM) und 40% (w/v) PEG 8000 und zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 35 min bei 10000 x g und 10°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet

wurde mit Ethanol (70%, v/v) gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Zur Amplifikation der gesuchten Fragmente wurden verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei diente sowohl die gereinigte als auch die ursprüngliche ungereinigte cDNA-Bibliothek als Matrize.

4.4.1.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Zusätzlich zur Erstellung einer cDNA-Bibliothek wurde die RACE-Methode für die Identifikation der 5'- und 3'-Enden der cDNA verwendet. Dabei wird beim Umschreiben der RNA in cDNA eine Ankersequenz am jeweiligen Ende angefügt, die in der nachfolgenden PCR-Reaktion als Bindungsstelle für ein spezifisches Oligonukleotid dient (Frohman *et al.* 1988). Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ nach Angaben des Herstellers. Es wurde dieselbe mRNA aus den Oberschlundganglien von *M. darwiniensis*-Arbeitern verwendet wie für die Herstellung der cDNA-Bibliothek. Es wurden zwei Reaktionen durchgeführt – eine zur Synthese von „5'-RACE-Ready cDNA“ und eine zur Synthese von „3'-RACE-Ready cDNA“. Für beide Reaktionen wurde je ca. 0,5 µg mRNA eingesetzt. Die Verdünnung der synthetisierten cDNA erfolgte mit 250 µl Tricine-EDTA-Puffer. Anschließend erfolgte die erste PCR-Reaktion zur Amplifikation der gewünschten Fragmente. Dafür wurde der Primer UPM, der an die Ankersequenz bindet, und ein sequenzspezifischer Primer eingesetzt. Für die PCR-Reaktion wurden die Komponenten des „Advantage® 2 PCR Kits“ verwendet. Eine PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

34,5 µl	PCR-Grade Wasser
5 µl	10x Advantage 2 PCR Puffer
5 µl	Primer UPM (10x)
1 µl	sequenzspezifischer Primer (10 µM)
1 µl	dNTP Mix (10 mM)
1 µl	50x Advantage 2 Polymerase Mix
2,5 µl	RACE cDNA

Für die Durchführung der PCR wurde das vom Hersteller empfohlene Temperaturprofil in Tab. 29 verwendet.

Tab. 29: Temperaturprofil für die erste PCR-Reaktion mit der „RACE-Ready cDNA“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von *Mastotermes darwiniensis*.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	94	0:30	25
Hybridisierung	68	0:30	
Elongation	72	3:00	

Die Produkte der ersten PCR-Reaktion wurden mit dem „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ wie unter 4.2.7 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde eine sogenannte „nested PCR“ durchgeführt. Dafür wurden die gereinigten Produkte der ersten Reaktion, der Primer UPM und ein anderer sequenzspezifischer Primer verwendet. Der zweite eingesetzte spezifische Primer lag dabei näher am jeweiligen Ende der cDNA, so dass in der „nested PCR“ ein kürzeres Fragment als in der ersten PCR-Reaktion amplifiziert wurde. Für die zweite PCR-Reaktion wurde dasselbe Temperaturprofil wie für die erste PCR-Reaktion verwendet, mit dem Unterschied, dass statt 25 Zyklen 30 durchgeführt wurden.

4.4.1.3 Analyse der genomischen DNA

In weiteren Experimenten zur Identifikation der Sequenz des AST-A Gens wurde genomische DNA als Ausgangsmaterial verwendet. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit dem „Genomic DNA Purification Kit“ wie unter 4.2.3 beschrieben. Die isolierte DNA wurde anschließend direkt für PCR-Reaktionen mit degenerierten und sequenzspezifischen Primern eingesetzt.

Zusätzlich wurde die genomische DNA für das sogenannte „Genome Walking“ mit dem „DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit“ eingesetzt. Im Chemikalienset sind vier Oligonukleotide mit der Sequenz XGGTC am 3'-Ende enthalten. Diese Sequenz kommt mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit im gesamten Genom vor. Daher können diese Oligonukleotide verwendet werden, um unbekannte Fragmente von nahezu jedem Gen zu amplifizieren. Das 5'-Ende der Primer bildet eine spezifische Sequenz, die als Ankersequenz für die Primer der nachfolgenden Reaktionen dient. Die Durchführung erfolgte

weitgehend nach Angaben des Herstellers. Für die erste PCR-Reaktion wurde das PCR-Programm in Tab. 30 verwendet.

Tab. 30: Temperaturprofil für die erste PCR-Reaktion des „Genome Walking“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von *Mastotermes darwiniensis*.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	94	5:00	
Hybridisierung	42	1:00	1
Elongation	72	2:00	
Denaturierung	94	0:30	
Hybridisierung	55	0:30	30
Elongation	72	1:40	
Abschlussynthese	72	7:00	1

Die Aufreinigung der Produkte der ersten PCR-Reaktion erfolgte mit dem „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (siehe 4.2.7). Für die zweite und dritte PCR-Reaktion wurde das PCR-Programm in Tab. 31 genutzt.

Tab. 31: Temperaturprofil für die zweite und dritte PCR-Reaktion des „Genome Walking“ zur Amplifikation von Allatostatin A-Fragmenten von *Mastotermes darwiniensis*.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	94	3:00	1
Denaturierung	94	0:30	
Hybridisierung	60	0:30	35
Elongation	72	1:40	
Abschlussynthese	72	7:00	1

DNA-Fragmente, die aus genomischer DNA amplifiziert worden, wurden anschließend durch Amplifikation derselben Fragmente aus cDNA überprüft. Dabei sollte kontrolliert werden, ob Introns in der Gensequenz enthalten waren. Diese wären in Sequenzen der genomischen DNA, aber nicht in denen der cDNA enthalten. Zur Herstellung der cDNA wurde RNA aus verschiedenen Geweben (hauptsächlich aus dem Gehirn) verwendet. Vor der Reversen Transkription erfolgte ein DNase-Verdau mit DNase I (Fermentas) nach Herstellerangaben. Die Herstellung der cDNA erfolgte entweder mit der „RevertAid™ H Minus M-MuLV

Reverse Transcriptase“ oder mit der „M-MuLV Reverse Transcriptase“ jeweils nach Angaben des Herstellers.

4.4.2 Identifikation des Allatostatin A-Gens von *Cryptocercus darwini*

Die Identifikation der Sequenz des Allatostatin A-Gens bei der holzfressenden Schabe *C. darwini* erfolgte ausschließlich aus genomischer DNA. Für die Isolation der genomischen DNA wurde ein Alkoholpräparat des letzten Larvenstadiums von *C. darwini* und „Genomic-tip 500/G“-Säulen verwendet. Die Isolation erfolgte wie unter 4.2.3 beschrieben. Die erhaltene genomische DNA wurde für PCR-Reaktionen in Kombination mit degenerierten Oligonukleotiden von *M. darwiniensis* und sequenzspezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Für die Identifikation der Sequenz der 5'- und 3'-Enden wurde das bereits beschriebene „DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit“ eingesetzt (siehe 4.4.1.3). Identifizierte Sequenzen wurden mit sequenzspezifischen Primern überprüft.

4.4.3 Identifikation von Referenzgenen bei *Mastotermes darwiniensis*

Zusätzlich zur Identifikation des AST-A Gens von *M. darwiniensis* und *C. darwini* sollten Fragmente weiterer Gene von *M. darwiniensis* identifiziert werden. Diese sollten in späteren Experimenten als Referenzgene für die Normalisierung der Expression von AST-A dienen (siehe 4.6.2). Fünf verschiedene Referenzgene sollten identifiziert werden: β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Elongationsfaktor 1 alpha (EF1 α) sowie Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) Dehydrogenase Untereinheit 3 und 4 (ND3 und ND4). Die Oligonukleotide für die einzelnen PCR-Reaktionen wurden – außer bei β -Aktin – von bekannten Aminosäuresequenzen dieser Gene bei anderen Insekten abgeleitet. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation diente genomische DNA von *M. darwiniensis* (siehe 4.2.3).

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte mittels PCR unter verschiedenen bezüglich der Konzentration der Komponenten und des Temperaturprofils optimierten Bedingungen. Alle Versuche, Fragmente der Gene von GAPDH und EF1 α zu amplifizieren, schlugen fehl. Daher sind im Folgenden nur die Bedingungen für β -Aktin, ND3 und ND4 aufgeführt.

4.4.3.1 Identifikation von β -Aktin

Für die Amplifikation des β -Aktin Fragments wurden die Primer Rfl_ActF2 und Rfl_ActR2 verwendet. Diese wurden abgeleitet von der β -Aktin Sequenz der Termitenart *Reticulitermes flavipes* (DQ206832.1). Ein PCR-Ansatz bestand aus:

34 μ l	sterilem Milli-Q Wasser
5 μ l	10x <i>Taq</i> Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
4 μ l	dNTP Mix (2,5 mM)
1 μ l	Primer Rfl_ActF2 (10 μ M)
1 μ l	Primer Rfl_ActR2 (10 μ M)
1 μ l	MgCl_2 (25 mM)
1 μ l	DMSO
2 μ l	genomischer DNA von <i>M. darwiniensis</i> (ca. 100 ng/ μ l)
1 μ l	<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant; 1 u/ μ l)

Die Amplifikation erfolgte nach dem Temperaturprofil in Tab. 32.

Tab. 32: Temperaturprofil für die Amplifikation eines β -Aktin Fragments von *Mastotermes darwiniensis*.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	1:00	
Hybridisierung	50	1:00	40
Elongation	72	2:00	
Abschlussynthese	72	10:00	1

Außerdem wurde das Fragment, wie zuvor die AST-A Fragmente, durch erneute Amplifikation mit cDNA als Matrize überprüft. Dafür wurde der Oligonukleotidprimer Rfl_ActF2 verwendet. Für die Amplifikation des komplementären DNA-Strangs wurde der für *M. darwiniensis* spezifische Primer Mda_Act400R eingesetzt.

4.4.3.2 Identifikation von NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 und 4

Die Oligonukleotide für die Amplifikation der Fragmente von ND3 und ND4 wurden aus bekannten Aminosäuresequenzen von Insekten verschiedener Ordnungen (u. a. Diptera, Ensifera, Blattaria, Isoptera) abgeleitet. Der PCR-Ansatz für die Amplifikation des ND3-Fragments setzte sich wie folgt zusammen:

12 µl	steriles Milli-Q Wasser
2,5 µl	10x <i>Taq</i> Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄
2 µl	dNTP Mix (2,5 mM)
1 µl	Primer Mda_ND31F (10 µM)
1 µl	Primer Mda_ND31R (10 µM)
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	DMSO
2,5 µl	genomische DNA von <i>M. darwiniensis</i> (ca. 100 ng/µl)
1 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant; 1 u/µl)

Für die Amplifikation des ND4-Fragments wurde die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes folgendermaßen gewählt:

27 µl	steriles Milli-Q Wasser
5 µl	10x <i>Taq</i> Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄
4 µl	dNTP Mix (2,5 mM)
1 µl	Primer Mda_ND41F (10 µM)
1 µl	Primer Mda_ND41R (10 µM)
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	DMSO
5 µl	genomische DNA von <i>M. darwiniensis</i> (ca. 100 ng/µl)
2 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant; 1 u/µl)

Das verwendete Temperaturprofil für die Amplifikation des ND3- und ND4-Fragments entsprach weitestgehend dem bereits für die Amplifikation des β-Aktin-Fragments beschriebenen (Tab. 32). Im Hauptamplifikationsschritt wurden allerdings 45 (statt 40) Zyklen durchgeführt und die Annealingtemperatur wurde von 50°C auf 51°C erhöht. Da beim

ND4-Fragment nach der ersten Amplifikation nur eine geringe Menge des gewünschten PCR-Produktes vorlag, wurde noch eine zweite PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das verwendete Temperaturprofil entsprachen denen der ersten PCR. Als Matrize wurde allerdings keine DNA von *M. darwiniensis* eingesetzt, sondern das PCR-Produkt der ersten PCR-Reaktion.

4.4.4 Sequenzierung amplifizierter DNA-Fragmente

Erfolgreich amplifizierte DNA-Fragmente von *M. darwiniensis* und *C. darwini* wurden zunächst durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (4.2.6), gereinigt (4.2.7) und kloniert (4.2.8). Gereinigte Plasmide wurden anschließend zur Sequenzierung nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) an die Firma GATC Biotech AG versendet. Eine erste Editierung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Phred und Phrap (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.* 1998) durch die GATC Biotech AG. Für weitere Editierungen wurde das Programm BioEdit v7.0.9.0 (Hall 1999) verwendet. Die Übersetzung der DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm BCM Search Launcher (Smith *et al.* 1996).

4.5 Phylogenetische Sequenzanalyse

Nach der Identifikation des Allatostatin A-Gens und Prohormonvorläufers von *C. darwini* und *M. darwiniensis* sollten diese Sequenzen mit bereits bekannten AST-A Sequenzen anderer Insekten verglichen werden. Zusätzlich sollte eine phylogenetische Analyse anhand von Stammbaumberechnungen durchgeführt werden. Die dafür verwendeten Berechnungen und Analyseschritte sind in der Abb. 63 zusammengefasst dargestellt (Anhang, S. 256).

Der größte Teil der für die Berechnungen verwendeten AST-A Sequenzen anderer Insekten (außer *M. darwiniensis* und *C. darwini*) und einer Crustacea-Art wurden der Gendatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) entnommen. Die analysierten Arten sind in Tab. 33 zusammengefasst.

Tab. 33: Zusammenfassung aller für die Stammbaumberechnung verwendeten Allatostatin A-Sequenzen verschiedener Insektenarten und einer Crustacea-Art (Außengruppe).

Darstellung der Zuordnung der einzelnen Arten zu den jeweiligen Ordnungen und der Kennnummer der NCBI-Gendatenbank. AS = Aminosäuresequenz.

Ordnung	Art	Kennnummer
Blattaria	<i>Blaberus craniifer</i>	AF068062.1
	<i>Blatta orientalis</i>	AF068064.1
	<i>Blattella germanica</i>	AF068061.1
	<i>Diploptera punctata</i>	U00444.1
	<i>Periplaneta americana</i>	X91029.1
	<i>Supella longipalpa</i>	AF068063.1
Caelifera	<i>Schistocerca gregaria</i>	Z58819.1
Diptera	<i>Aedes aegypti</i>	U66841.1
	<i>Anopheles gambiae</i>	XM_313511.3
	<i>Calliphora vomitoria</i>	– (East <i>et al.</i> 1996)
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001849994.1
	<i>Drosophila ananassae</i>	XM_001964412.1
	<i>Drosophila erecta</i>	XM_001981909.1
	<i>Drosophila grimshawi</i>	XM_001990019.1
	<i>Drosophila madeirensis</i>	AJ849768.1
	<i>Drosophila melanogaster</i>	AF263923.1
	<i>Drosophila mojavensis</i>	XM_001998495.1
	<i>Drosophila persimilis</i>	XM_002020181.1
	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>	XM_001357677.2
	<i>Drosophila sechellia</i>	XM_002032516.1
	<i>Drosophila simulans</i>	XM_002104731.1
	<i>Drosophila subobscura</i>	AJ849766.1
	<i>Drosophila virilis</i>	XM_002052990.1
	<i>Drosophila willistoni</i>	XM_002073224.1
	<i>Drosophila yakuba</i>	XM_002099154.1
	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	EZ423869.1
<i>Lucilia cuprina</i>	– (East <i>et al.</i> 1996)	
Ensifera	<i>Gryllus bimaculatus</i>	AJ302036.1
Hemiptera	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XM_003247391.1
	<i>Rhodnius prolixus</i>	GQ856315.1
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	GU785070.1

Ordnung	Art	Kennnummer
Hymenoptera	<i>Bombus impatiens</i>	XM_003489910.1
	<i>Bombus terrestris</i>	XM_003396956.1
	<i>Camponotus floridanus</i>	EFN68211.1 (AS) (Munoz-Torres <i>et al.</i> 2010)
	<i>Harpegnathos saltator</i>	EFN80332.1 (AS) (Munoz-Torres <i>et al.</i> 2010)
	<i>Nasonia vitripennis</i>	XM_003425630.1
Isoptera	<i>Reticulitermes flavipes</i>	FJ668632.1
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	AF309090.1
	<i>Helicoverpa armigera</i>	AF015296.1
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	AJ555184.1
Calanoida (Crustacea, Copepoda)	<i>Calanus finmarchicus</i>	EU000307.1

4.5.1 Alignment der Allatostatin A-Sequenzen

Zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume wurden die identifizierten Sequenzen des AST-A Gens und des AST-A Prohormonvorläufers von *M. darwiniensis* und *C. darwini* zunächst mit bekannten AST-A Sequenzen anderer Insekten mit Hilfe des Programms ClustalX v2.0.9 (Thompson *et al.* 1994; Larkin *et al.* 2007) aligniert. Der Begriff „Alignierung“ (auch „Alignment“) beschreibt die Anordnung verschiedener Sequenzen zueinander, so dass homologe Positionen der Sequenzen jeweils untereinander stehen. Eine grafische Darstellung des Alignments erfolgte durch das Programm BOXSHADE v3.21.

Insgesamt wurden vier Datensätze analysiert – jeweils ein Datensatz mit bekannten AST-A Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Vertretern der Überordnung Dictyoptera und jeweils ein Datensatz mit AST-A Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von 42 Vertretern acht verschiedener Insektenordnungen.

4.5.2 Identifikation des passenden Substitutionsmodells

Mit dem Programm jModelTest v0.1.1 (Guindon & Gascuel 2003; Posada 2008) wurde anschließend an das Alignment das jeweils passende Substitutionsmodell für die alignierten

Nukleinsäuresequenzdatensätze bestimmt. Es wurden 88 verschiedene Modelle getestet und das am besten passende Modell nach dem Akaike Informationskriterium (AIC; Akaike 1974) anhand des $-\ln L$ Wertes (negativer natürlicher Logarithmus der Wahrscheinlichkeit) ausgewählt. Das „General Time Reversible Model“ (GTR; Tavaré 1986; Rodríguez *et al.* 1990) in Kombination mit einer Gamma-Verteilung (GTR+G) wies beim Datensatz der Dictyoptera den geringsten AIC-Wert auf und wurde daher für die Stammbaumrekonstruktion verwendet. Für den Datensatz der acht verschiedenen Insektenordnungen wurde ebenfalls das GTR-Modell gewählt. Zusätzlich zur Gamma-Verteilung wurde für diesen Datensatz der Anteil der invariablen Positionen in die Berechnungen einbezogen (GTR+I+G). Für die alignierten Aminosäuresequenzdatensätze erfolgte im Vorfeld keine Auswahl des passenden Substitutionsmodells.

4.5.3 Stammbauberechnungen

Die Berechnung der Stammbäume erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden – zum einen wurde die distanzbasierte Neighbor-Joining-Methode (NJ; Saitou & Nei 1987) verwendet, zum anderen die wahrscheinlichkeitsbasierte Bayesianische Statistik (BI; Bayesian Inference; Huelsenbeck *et al.* 2001). Insgesamt wurden pro Datensatz zwei Stammbäume berechnet – je ein Konsensusbaum mit BI und einer mit NJ. Beide Bäume eines Datensatzes wurden zu einem Stammbaum zusammengefasst. Eine Ausnahme bildete der Datensatz der Nukleinsäuresequenzen der acht verschiedenen Insektenordnungen. Mit diesem Datensatz wurde nur ein Konsensusbaum mit BI berechnet.

Als Außengruppe für die Stammbauberechnungen der Überordnung Dictyoptera wurde die Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* verwendet. Für die Stammbauberechnungen der acht verschiedenen Insektenordnungen diente der Ruderfußkrebs *Calanus finmarchicus*, ein Vertreter der Crustacea, als Außengruppe.

4.5.3.1 Stammbauberechnungen mit Nukleinsäuresequenzen

Die Stammbauberechnung mit Bayesian Inference erfolgte mit MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003). Es wurden die in 4.5.2 bestimmten Substitutionsmodelle verwendet – GTR+G für den Datensatz der Dictyoptera sowie GTR+I+G für den Datensatz der verschiedenen Insektenordnungen. Pro Datensatz

wurden zehn Millionen Generationen durchlaufen und dabei jeder tausendste Baum gespeichert (sampling frequency = 1000). Die Wahrscheinlichkeitswerte wurden von vier simultanen Markov-Ketten berechnet. Es liefen immer zwei Berechnungen pro Datensatz parallel, die Ergebnisse jeder zehntausendsten Generation wurden miteinander verglichen, um die Konvergenz beider Läufe zu überprüfen. Pro Lauf wurden demnach 10.000 Bäume berechnet, durch die parallele Berechnung von zwei Läufen wurden am Ende 20.000 Bäume für jeden Datensatz erhalten. Am Ende der Analyse wurde überprüft, ob die Ergebnisse der beiden parallelen Läufe konvergierten. Wenn die durchschnittliche Standardabweichung beider Läufe unter 0,01 lag, wurde die Analyse gestoppt. Bei allen Datensätzen lag die Abweichung nach 10 Mio. Generationen zwischen 0,001 und 0,003, was darauf hindeutet, dass eine ausreichende Menge von Generationen berechnet wurde.

Zu Beginn solch einer BI-Analyse werden meist nur suboptimale Stammbäume gefunden, da die berechneten Wahrscheinlichkeitswerte anfangs noch nicht stabil sind. Diese Anlaufphase wird als Burn-in bezeichnet. Der Burn-in wurde auf 2.500 festgelegt, d. h. die ersten 2.500 Bäume jedes Laufes wurden verworfen. Pro Datensatz wurden demnach 15.000 Stammbäume – (10.000 Bäume pro Lauf minus 2.500 Bäume Burn-in) x 2 parallele Läufe – analysiert und zu einem Konsensusbaum zusammengefasst. Die Darstellung des Konsensusbaumes erfolgte mit dem Programm TreeView v1.6.6 (Page 1996). An den Abzweigungen des Konsensusbaums wurde die relative Häufigkeit angegeben, d. h. wie oft der entsprechende Knoten in den berechneten Stammbäumen gefunden wurde.

Die Stammbäume nach der Neighbor-Joining-Methode wurden mit dem Programm MEGA v4.0.2 (Tamura *et al.* 2007) erstellt. Zur Überprüfung der Stammbäume wurde das Bootstrap-Verfahren mit einer Wiederholungsrate von 10.000 durchgeführt. Bei einer Bootstrap-Analyse werden die Stammbäume mit zufällig gewählten Stichproben des Datensatzes neu berechnet (Felsenstein 1985; Knoop & Müller 2009). Die relative Häufigkeit, mit der einzelne Knoten wieder gefunden werden, wird in Prozent an den Knoten angegeben. Da das für Bayesian Inference verwendete Substitutionsmodell GTR im Programm MEGA nicht verfügbar ist, wurde das in MEGA verfügbare Substitutionsmodell gewählt, welches den niedrigsten AIC-Wert aufwies. Das Tamura-Nei-Modell (TN; Tamura & Nei 1993) in Kombination mit einer Gamma-Verteilung (TN+G) erfüllte die genannten Voraussetzungen. Dieses Modell wurde für die Berechnung des Stammbaums beruhend auf AST-A Nukleotidsequenzen von Vertretern der Dictyoptera verwendet.

4.5.3.2 Stammbauberechnungen mit Aminosäuresequenzen

Das passende Substitutionsmodell für die alignierten Aminosäuresequenzen konnte, anders als bei den Nukleinsäuresequenzen, nicht im Vorfeld der Stammbauberechnung bestimmt werden. Stattdessen wurde im Programm MrBayes das sogenannte „model jumping“ angewendet. Bei dieser Methode werden verschiedene Substitutionsmodelle in die Berechnung mit einbezogen, am Ende weist ein Modell die höchste Posterioriwahrscheinlichkeit auf und ist damit das am besten passende. Das so ermittelte Substitutionsmodell war das Modell nach Jones, Taylor und Thornton (JTT; Jones *et al.* 1992).

Weitere Einstellungen im Programm MrBayes wie die Anzahl der Generationen etc. entsprachen den zuvor beschriebenen (siehe 4.5.3.1). Die Berechnung der Stammbäume mit dem Neighbor-Joining-Verfahren erfolgte ebenfalls mit dem JTT-Substitutionsmodell und den bereits beschriebenen Einstellungen (siehe 4.5.3.1).

4.6 Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei *Mastotermes darwiniensis*

Um die Funktion von AST-A bei *M. darwiniensis* zu charakterisieren, wurde die Expression von AST-A in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter und im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien untersucht. Dafür wurde die Methode der quantitativen real-time PCR (qPCR) verwendet. Für die Normalisierung der AST-A Expression wurde zudem die Expression verschiedener Referenzgene bestimmt. Eine Zusammenfassung aller Experimente zur Expressionsanalyse ist in Abb. 64 dargestellt (Anhang, S. 257).

4.6.1 Vorteile der quantitativen real-time PCR

Die Methode der quantitativen real-time PCR (qPCR) bietet mehrere Vorteile. Sie ist schnell, weist eine hohe Empfindlichkeit auf und ermöglicht die Analyse zum optimalen Zeitpunkt. Die Schnelligkeit der qPCR gegenüber herkömmlichen (semi)quantitativen Methoden besteht darin, dass zeitaufwendige Schritte, wie Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese, Übertragung auf eine Membran („Southern Blot“) und anschließende Sondenhybridisierung und Immunodetektion, wegfallen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgt

zeitgleich zur Amplifikation der DNA-Fragmente, demzufolge wird eine sofortige Analyse ermöglicht. Außerdem kann dadurch die Analyse in der frühen exponentiellen Phase der PCR erfolgen, in der sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA befindet. Diese ist direkt proportional zu der ursprünglich eingesetzten Menge an Zielgen-mRNA. Der Nachweis und die Quantifizierung der amplifizierten Fragmente erfolgten mittels Fluoreszenzmessung. Dafür wurde zum Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green gegeben. Dieser bindet in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA. Bei Bindung an dsDNA intensiviert sich die Emission des Farbstoffes, d. h. je mehr dsDNA produziert wird, umso mehr Farbstoffmoleküle können binden und umso stärker wird die Fluoreszenz. Der Nachteil von SYBR® Green ist, dass die Moleküle unspezifisch an dsDNA binden. Daher werden auch unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere detektiert. Die Wahl der passenden Primer, eine Optimierung der Reaktion, eine Schmelzkurvenanalyse und verschiedene Kontrollen sind daher essentiell. Nur so kann eine Überschätzung der tatsächlichen Menge des PCR-Produkts verhindert werden. Die Schmelzkurvenanalyse wird am Ende der PCR durchgeführt. Dabei wird die Temperatur schrittweise von 60°C auf 95°C erhöht. Die entstandenen Produkte werden dabei erneut aufgeschmolzen. Ist die Schmelztemperatur erreicht, liegen die Produkte wieder einzelsträngig vor, es kann kein SYBR® Green binden und es ist keine Fluoreszenz mehr nachweisbar. Die Schmelztemperatur wird beeinflusst von der Länge der Fragmente und dem Anteil an den Basen Guanin und Cytosin (GC-Gehalt). Unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere weisen daher eine andere Schmelztemperatur auf als spezifische Produkte (Abb. 10).

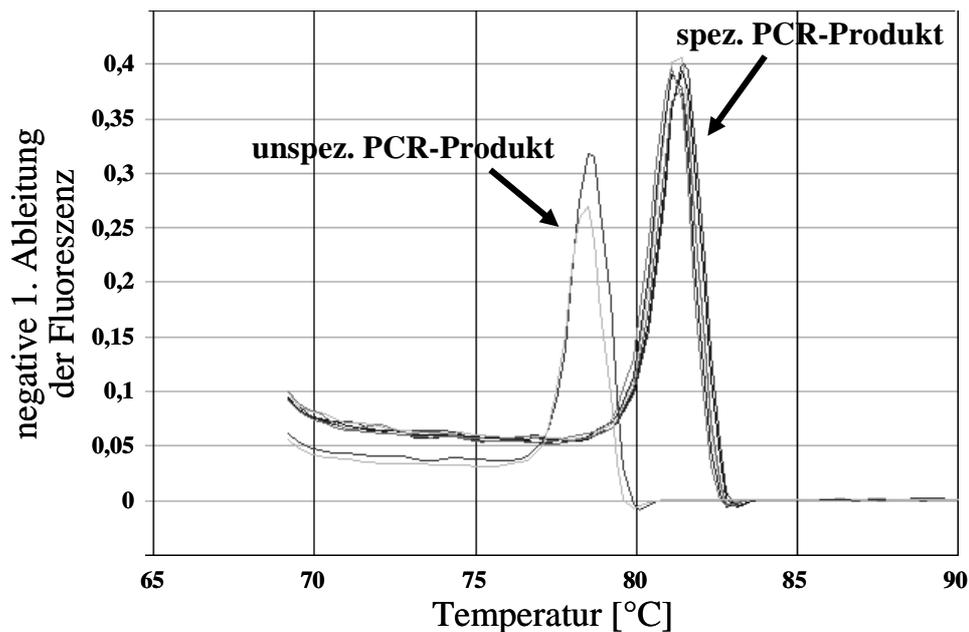


Abb. 10: Beispiel für eine Schmelzkurvenanalyse.

Auftragung der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenz von SYBR® Green gegen die Temperatur in °C. Durch die starke Reduktion der Fluoreszenz durch Zerfall des DNA-Doppelstrangs im Bereich der Schmelztemperatur (ca. 78 bzw. 82°C) kommt es zu einer Peakbildung in der 1. Ableitung der Fluoreszenz. Die Schmelztemperatur des spezifischen (spez.) PCR-Produktes liegt über der des unspezifischen (unspez.) PCR-Produktes.

4.6.2 Normalisierung von Expressionsdaten

Bei der Auswertung einer qPCR muss eine Normalisierung der Daten durchgeführt werden. Die untersuchte Variation der Expression kann durch verschiedene Fehlerquellen beeinflusst werden und falsche Ergebnisse hervorrufen. Mögliche Fehlerquellen sind Variationen bezüglich der RNA-Konzentration und Reinheit, der Reversen Transkriptase-Reaktion etc. Es gibt verschiedene Methoden für die Normalisierung der Daten (Review in Huggett *et al.* 2005). Bei der am häufigsten verwendeten Methode erfolgt die Normalisierung über interne Kontrollen durch sogenannte Referenzgene. Diese kodieren häufig für den Grundstoffwechsel oder für Grundbestandteile der Zelle. Im Idealfall sollten sie in allen Geweben und unter allen Versuchsbedingungen eine stabile Expression aufweisen (Thellin *et al.* 1999). Leider wurde bis jetzt noch kein Gen gefunden, das diese Voraussetzung zu 100% erfüllt (Schmittgen & Zakrajsek 2000; Tricarico *et al.* 2002; Vandesompele *et al.* 2002; Gilsbach *et al.* 2006). Häufig verwendete Referenzgene sind das β -Aktin, die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) (Vandesompele *et al.* 2002; Huggett *et al.* 2005; Gilsbach *et al.* 2006). Die Vorteile der Verwendung von Referenzgenen zur Normalisierung liegen darin, dass mögliche Variationen

in der Aufbereitung der Proben sowohl das Zielgen als auch die Referenzgene betreffen. Nachteilig ist der enorme Kosten- und Zeitaufwand, um ein geeignetes Referenzgen zu finden (Huggett *et al.* 2005).

4.6.3 Durchführung der qPCR

4.6.3.1 DNase-Verdau und Reverse Transkription

Der erste Schritt für die Durchführung einer qPCR nach der Isolation der RNA (siehe 4.2.2) ist der DNase-Verdau. Bei der Isolation von RNA kann es vorkommen, dass ein geringer Teil von genomischer DNA ebenfalls isoliert wird. Daher sollte die RNA zuerst mit einer DNase behandelt werden. Dafür wurde die DNase I von Fermentas verwendet. Es wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach dem DNase-Verdau erfolgte die Umschreibung der RNA in DNA (komplementäre DNA; cDNA). Dieser Prozess wird als Reverse Transkription bezeichnet. Dafür wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ verwendet, welches alle benötigten Komponenten enthält. Der RNase Inhibitor „RiboLock™ RNase Inhibitor“ wurde in einigen Reaktionen statt des enthaltenen RNase Inhibitors zugesetzt. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA verwendet. Zur RNA wurde 1 µl 10x RT Random Primer hinzugegeben. Anschließend folgten eine fünfminütige Inkubation bei 70°C und eine weitere fünfminütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die folgenden Komponenten hinzugefügt:

1 µl	10x RT Puffer
0,4 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
0,5 µl	RNase Inhibitor
0,5 µl	MultiScribe™ Reverse Transkriptase

Mit nukleasefreiem Wasser wurde bis auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und die Reaktion in einer PCR-Maschine nach dem Temperaturschema in Tab. 34 durchgeführt.

Tab. 34: Temperaturprofil für die Reverse Transkription mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“.

Temperatur [°C]	Dauer [min]
25	10:00
37	120:00
85	5:00

Es wurde davon ausgegangen, dass der Umsatz von RNA in cDNA im Verhältnis 1:1 stattfand. Daher wurde die Konzentration der eingesetzten RNA als Konzentration für die entstandene cDNA übernommen. Die Konzentration der cDNA betrug demnach 50 ng/µl.

4.6.3.2 Herstellung eines externen Standards zur Quantifizierung der Expression

Für die Bestimmung der mRNA-Menge des Zielgens und der Referenzgene wurden externe Standards benötigt, die parallel amplifiziert werden konnten. Die externen Standards wurden außerdem verwendet, um die Effizienz der eingesetzten Primer zu ermitteln. Es gibt verschiedene Möglichkeiten für externe Standards, z. B. rekombinierte linearisierte Plasmide oder *in vitro* transkribierte RNA (Bustin 2000; Pfaffl 2003, 2004a). In dieser Studie wurden linearisierte Plasmide verwendet, die jeweils ein DNA-Fragment des untersuchten Gens enthielten. Linearisierte Plasmide sind stabil gegenüber unspezifischen Spaltungen und Proofreadingaktivität der Polymerase während der PCR. Außerdem können mit linearisierten Plasmiden auch nach einer längeren Lagerung reproduzierbare Standardkurven erstellt werden (Pfaffl 2003, 2004a). Es musste für jedes untersuchte Gen – sowohl Ziel- als auch Referenzgene – ein eigener Standard hergestellt werden.

Für die Herstellung der Standards wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Die zirkulär vorliegenden Plasmide wurden dabei an einer Stelle mit einem Restriktionsenzym geschnitten, um sie zu linearisieren. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

max. 5 µg	Plasmid
5 µl	Restriktionsenzym
5 µl	10x Puffer
auf 50 µl	H ₂ O steril

Das verwendete Restriktionsenzym durfte dabei nur eine Erkennungssequenz bzw. Spaltstelle auf dem Vektor und zugleich keine im eingebauten DNA-Fragment haben. Die verwendeten Plasmide, Restriktionsenzyme und Puffer für die einzelnen Standards sind in Tab. 35 aufgeführt.

Tab. 35: Für die Herstellung der externen Standards für die qPCR verwendete Plasmide, Identität und Länge des eingebauten DNA-Fragments und des Vektors, verwendete Restriktionsenzyme und Puffer.

Apa = *Acetobacter pasteurianus*, NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, *Not* = *Nocardia otitidis-caviarum*, *Sca* = *Streptomyces caespitosus*.

Name des Plasmids	Gen	Vektor (Länge)	Länge des Inserts	Restriktionsenzym	10x Puffer
AS8F-13R	Allatostatin A	pGEM-T Easy (3015 bp)	480 bp	<i>ApaI</i>	Puffer A
Rfl_ActF2/Act400R	β -Aktin	pGEM-T Easy (3015 bp)	421 bp	<i>ApaI</i>	Puffer A
ND3	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3	pJet1.2 (2974 bp)	217 bp	<i>ScaI</i>	Puffer K
ND4	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4	pJet1.2 (2974 bp)	245 bp	<i>NotI</i>	Puffer O

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde für zwei (Restriktionsenzym *NotI*) bzw. drei Stunden (*ApaI* und *ScaI*) bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenolextraktion. Dafür wurden 50 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) zum Reaktionsansatz hinzugegeben, 1 min kräftig gemischt und 2 min bei 13793 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 μ l Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Erneut wurde 1 min kräftig gemischt und 2 min bei 13793 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 μ l 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 100 μ l Ethanol (98%, v/v) vermischt und bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 18894 x g und 4°C für 30 min. Danach wurde das Pellet zweimal mit je 50 μ l Ethanol (70%, v/v) gewaschen und bei 18894 x g und 4°C für jeweils 15 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 15 μ l DEPC-Wasser aufgelöst.

4.6.3.3 Kontrollreaktionen

Zusätzlich zu den verschiedenen Proben wurden in der qPCR-Reaktion verschiedene Kontrollen untersucht. Diese sind notwendig, um einer Überschätzung des PCR-Produkts und damit der eingesetzten Menge an Zielgen-cDNA vorzubeugen. Dabei sollte vor allem auf Kontaminationen der verwendeten Lösungen und auf das Vorhandensein von genomischer DNA getestet werden.

Falls trotz des durchgeführten DNase-Verdau noch genomische DNA in der RNA-Lösung vorhanden ist, wird diese während der PCR-Reaktion ebenfalls amplifiziert. Dies führt zur Messung von höheren Werten und damit zu einer Überschätzung der ursprünglich vorhandenen Menge an Zielgen-mRNA. Zur Abschätzung des Gehalts an genomischer DNA in der RNA-Lösung gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen könnte die RNA-Lösung direkt in die qPCR-Reaktion eingesetzt werden. Da die RNA nicht durch die eingesetzte DNA-abhängige Polymerase amplifiziert werden kann, würde nur die genomische DNA in der Lösung amplifiziert werden. Dies könnte allerdings zu ungenauen Ergebnissen führen, da die eingesetzte cDNA und die RNA nicht gleich behandelt wurden. In der cDNA-Lösung sind noch Puffer, Salze, Nukleotide und die Reverse Transkriptase von der vorher durchgeführten Reversen Transkription vorhanden. Obwohl das Enzym Reverse Transkriptase inaktiviert wurde, ist nicht auszuschließen, dass einzelne Komponenten der Reversen Transkriptions-Reaktion die PCR-Reaktion stören könnten, was zu einer niedrigeren Ausbeute an PCR-Produkt führen würde. Diese störenden Komponenten wären in der RNA-Lösung nicht vorhanden. Daher ist die Verwendung der zweiten Möglichkeit zur Abschätzung des Gehalts an genomischer DNA vorzuziehen. Bei dieser wird die eingesetzte RNA derselben Behandlung unterzogen wie die zu untersuchende cDNA. Dabei wird für den Test auf genomische DNA nahezu die identische Reaktion durchgeführt wie unter 4.6.3.1 beschrieben. Allerdings wird die RNA nicht am Anfang der Reaktion dazugegeben, sondern erst nach Ende der Reaktion, nachdem die Reverse Transkriptase durch eine zusätzliche Inkubation für 5 min bei 95°C inaktiviert wurde.

Die verwendeten Lösungen wurden durch die sogenannte NTC-Kontrolle („no template control“; Negativkontrolle) auf Kontaminationen getestet. Dabei wurde statt DNA als Matrize nur Wasser eingesetzt.

4.6.3.4 qPCR-Reaktion

Für die qPCR-Reaktion wurde der „Power SYBR® Green PCR Master Mix“ verwendet. Dieser enthielt alle benötigten Komponenten für die Reaktion wie die Polymerase, Nukleotide, Puffer und Salze. Daher mussten nur die entsprechenden Oligonukleotide und die DNA dazugegeben werden. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl	Power SYBR® Green PCR Master Mix
7,2 µl	nukleasefreies H ₂ O oder ddH ₂ O
0,4 µl	Forward Primer (5 µM)
0,4 µl	Reverse Primer (5 µM)
2 µl	DNA

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Oligonukleotide und die DNA-Lösungen immer frisch verdünnt und die Verdünnungen nach dem Ansetzen der Reaktion verworfen. Abhängig von dem zu amplifizierenden Gen wurden verschiedene cDNA-Mengen zwischen 1 und 40 ng eingesetzt.

Die Reaktion wurde in 96-Well-Platten angesetzt. Zur Bestimmung der Expression des Zielgens und der Referenzgene wurde eine Eichgerade benötigt. Dafür wurden die jeweiligen Standards in einer 10er-Verdünnungsreihe im Bereich von 10⁻³ bis 10² pg verdünnt. Pro Standard wurden fünf aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen für jede qPCR-Reaktion verwendet. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils dreimal getestet. Die cDNA wurde ebenfalls je dreimal pro Ziel- und Referenzgen gemessen. Der Test auf genomische DNA erfolgte für jede cDNA je einmal pro Ziel- und Referenzgen. Pro Primerpaar wurde eine NTC-Kontrolle durchgeführt.

Die Amplifikation erfolgte nach dem Temperaturprofil in Tab. 36. Schritt 3 entsprach dabei der unter 4.6.1 und in Abb. 10 (S. 90) beschriebenen Schmelzkurvenanalyse. Die Erhöhung der Temperatur von 60 auf 95°C erfolgte mit 1,1°C pro Sekunde.

Tab. 36: Temperaturprofil für die quantitative real-time PCR zur Bestimmung der Expression mit dem 7300 Real-Time PCR System.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
1	95	11:00	1
2	95 60	0:15 1:00	40
3 (Schmelzkurvenanalyse)	95 60 95	0:15 0:30 0:15	1

4.6.3.5 Auswertung

Der erste Schritt der Auswertung bestand darin, die automatisch durch die 7300 System SDS Software bestimmten Parameter Basislinie und Schwelle („threshold“) manuell nachzukorrigieren. Die Basislinie entspricht der Hintergrundfluoreszenz. Als deren Grundlage wurde die Fluoreszenz in den ersten Zyklen bis ca. drei Zyklen vor dem exponentiellen Anstieg der Kurven verwendet. Der Schwellenwert wird auch C_T -Wert („cycle threshold“) genannt und entspricht der Zyklenzahl, bei der die Hintergrundfluoreszenz erstmals deutlich überschritten wird. Die Schwelle sollte so gewählt werden, dass sie im frühen exponentiellen Bereich aller Amplifizierungskurven liegt. Sie wurde bei allen 96-Well-Platten eines Experiments auf den gleichen Wert gesetzt. Anhand der C_T -Werte und der bekannten Konzentration der eingesetzten Standards konnte eine Eichgerade erstellt werden. Mittels der Eichgeraden wurde die Quantität der Proben unbekannter Konzentration bestimmt. Zusätzlich ließ sich aus der Steigung der Eichgeraden die Effizienz (E) der Reaktion in Abhängigkeit von den eingesetzten Oligonukleotiden mit folgender Formel berechnen:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die Effizienz in einem Bereich von 1,8 bis 2,2 (\triangleq 80 bis 120%) lag. Eine Effizienz von $E = 2$ (\triangleq 100%) würde eine optimale Amplifikation bedeuten, d. h. das entstehende Fragment würde sich in jedem Zyklus verdoppeln.

Nach der Quantifizierung der Menge von AST-A mRNA wurde diese noch mit den Werten der Referenzgene normalisiert. Die Normalisierung kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen. Zum einen können die erhaltenen Werte direkt miteinander verrechnet werden, indem der Quotient aus der cDNA-Menge von Ziel- und Referenzgen für jede Probe

berechnet wird. Bei mehreren Referenzgenen wird zuerst der Mittelwert der cDNA-Menge der Referenzgene gebildet und anschließend der Quotient aus Zielgen und dem Mittelwert der Referenzgene. Zum anderen kann die „delta-delta C_T “-Methode ($\Delta\Delta C_T$) verwendet werden. Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode sind keine Standards für eine Eichgerade notwendig. Die Quantifizierung erfolgt relativ anhand der C_T -Werte, in dem die Proben mit einer Kontrollprobe verglichen werden. Diese Methode bietet sich besonders an, wenn Proben von behandelten und Kontrolltieren verglichen werden sollen. Daher wurde bei der Auswertung der Experimente zur RNA-Interferenz zusätzlich die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet (siehe 5.5.2). Die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds (Ratio) zwischen einer Probe und einer Kontrollprobe erfolgt in drei Schritten –die Normalisierung zum Referenzgen (1), die Normalisierung zur Kontrollprobe (2) und die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds (3) (Livak & Schmittgen 2001; Pfaffl 2001, 2004a, b). Dafür werden folgende Formeln benötigt:

- (1) $\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$
- (2) $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$
- (3) $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$

Diese Formeln können jedoch nur bei einer Effizienz von $E = 2$ bei allen verwendeten Primerpaaren genutzt werden. Da die Effizienz in der Regel davon abweicht, empfiehlt es sich ein Effizienz-korrigiertes relatives Quantifizierungsmodell zu verwenden (Pfaffl 2001, 2004a, b). Die Berechnung erfolgt ebenfalls in drei Schritten:

- (1) $\Delta C_T \text{ Zielgen} = C_T \text{ Kontrolle} - C_T \text{ Probe}$
- (2) $\Delta C_T \text{ Referenzgen} = C_T \text{ Kontrolle} - C_T \text{ Probe}$
- (3)
$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen}}}$$

Werden mehrere Referenzgene verwendet, muss der Mittelwert der C_T -Werte und der Effizienz der Referenzgene gebildet und in die entsprechende Formel eingesetzt werden.

4.7 RNA-Interferenz

Für die Analyse der Funktion von AST-A *in vivo* bei *M. darwiniensis* wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) angewendet. Dabei wurde doppelsträngige RNA (dsRNA) abgeleitet von einem AST-A Fragment in Arbeiter von *M. darwiniensis* injiziert. Durch den RNAi-Mechanismus sollte es zum spezifischen Abbau der mRNA von AST-A in der Zelle kommen.

4.7.1 Herstellung von doppelsträngiger RNA

4.7.1.1 Amplifikation der T7-Matrize

Um den Mechanismus der RNA-Interferenz auszulösen, wurde sequenzspezifische dsRNA benötigt. Diese wurde durch *in vitro* Transkription aus dsDNA hergestellt. Die Umschreibung der DNA in RNA erfolgte durch die T7-RNA-Polymerase. Diese benötigt eine Erkennungs- und Bindungsstelle auf der dsDNA. Da in der verwendeten dsDNA keine T7-Promotorsequenz vorhanden war, musste diese künstlich eingeführt werden. Daher wurde zuerst eine PCR mit speziellen Oligonukleotiden durchgeführt, die an ihrem 5'-Ende um die T7-Promotorsequenz verlängert waren. Das resultierende PCR-Produkt war anschließend ebenfalls an beiden Seiten um die T7-Promotersequenz verlängert.

Für die Voruntersuchungen zur RNAi wurde das Plasmid AS140F-950R 2.1 kombiniert mit dem Forward-Primer T7Mda_AS8F und dem Reverse-Primer T7Mda_AS13R für die Herstellung der T7-dsDNA verwendet. Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurde später ein anderes Fragment für die Herstellung der T7-dsDNA verwendet und die Oligonukleotide ausgetauscht. Als Forward-Primer diente T7Mda_AS140F und als Reverse-Primer T7Mda_AS9R. Die PCR-Ansätze setzten sich wie in Tab. 37 beschrieben zusammen.

Tab. 37: Zusammensetzung der verschiedenen PCR-Ansätze zur Herstellung der T7-dsDNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen von *Mastotermes darwiniensis* (Gesamtvolumen: 50 µl).

Komponente	T7Mda_AS8F + T7Mda_AS13R	T7Mda_AS140F + T7Mda_AS9R
ddH ₂ O	32 µl	30 µl
10x <i>Taq</i> Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl	5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	3 µl

Komponente	T7Mda_AS8F + T7Mda_AS13R	T7Mda_AS140F + T7Mda_AS9R
Forward-Primer (10 μ M)	1 μ l	1 μ l
Reverse-Primer (10 μ M)	1 μ l	1 μ l
DMSO	-	2 μ l
Plasmid AS140F-950R 2.1 (100 ng/ μ l)	2 μ l	2 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant; 1 U/ μ l)	2 μ l	2 μ l

Die PCR-Reaktionen wurden mit den Temperaturprofilen in Tab. 38 und 39 durchgeführt.

Tab. 38: PCR-Programm für die Herstellung der T7-dsDNA mit den Primern T7Mda_AS8F und T7Mda_AS13R.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	1:00	
Hybridisierung	59	1:00	40
Elongation	72	2:00	
Abschlussynthese	72	10:00	1

Tab. 39: PCR-Programm für die Herstellung der T7-dsDNA mit den Primern T7Mda_AS140F und T7Mda_AS9R.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	1:00	
Hybridisierung	64 (-0,5 $^{\circ}$ C pro Zyklus)	1:00	10
Elongation	72	2:00 (+ 1 s pro Zyklus)	
Denaturierung	95	1:00	
Hybridisierung	59	1:00	30
Elongation	72	2:10 (+ 1 s pro Zyklus)	
Abschlussynthese	72	10:00	1

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.6) analysiert und wie unter 4.2.7 beschrieben aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten

DNA-Fragmente wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.2.4). Bei einer geringen Konzentration wurde die DNA-Lösung aufkonzentriert, d. h. ein Teil des Elutionspuffers wurde durch Zentrifugation in einer Vakuumzentrifuge verdampft und dadurch die Konzentration der DNA-Lösung erhöht.

4.7.1.2 *In vitro* Transkription

Der Begriff Transkription bezeichnet das Umschreiben von DNA in RNA, d. h. ein DNA-Strang dient als Vorlage zur Synthese von RNA, deren Nukleotidsequenz komplementär zu der der DNA ist. Die Synthese der RNA erfolgt durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Diese binden an eine Erkennungs- und Bindungsstelle der DNA, dem sogenannten Promotor. Anschließend erfolgt die Entwindung des DNA-Doppelstrangs und das Ablesen des DNA-Stranges vom 3'-Ende in 5'-Richtung. Die RNA-Synthese läuft in 5'-3'-Richtung. Dabei werden freie Nucleosid-Triphosphate, welche komplementär zum DNA-Strang sind, durch das Enzym mittels Phosphodiesterbindungen verknüpft (Knippers 2006).

Die *in vitro* Transkription bezeichnet die künstliche Herstellung von RNA aus DNA im Labor. Mit dieser Methode ist es möglich, beliebige RNA herzustellen. Die DNA mit der Ausgangssequenz muss dafür in einen Vektor mit geeigneten Promotorsequenzen für die RNA-Polymerase überführt werden. Häufig verwendete RNA-Polymerasen stammen aus den Bakteriophagen SP6, T7 oder T3 (Mülhardt 2009). Eine weitere Möglichkeit der Herstellung einer geeigneten DNA-Matrize ist die oben beschriebene PCR (4.7.1.1) mit am 5'-Ende verlängerten Oligonukleotiden.

Für die *in vitro* Transkription wurde das „MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit“ verwendet. Als Matrize dienten die in 4.7.1.1 amplifizierte und aufgereinigten DNA-Fragmente. Es wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg	T7-DNA-Fragment
2 µl	10x Reaktionspuffer
je 2 µl	ATP, CTP, GTP, UTP (je 75 mM)
2 µl	Enzym Mix
auf 20 µl	nukleasefreies Wasser

Nach dem Zusammenführen aller Komponenten in einem PCR-Reaktionsgefäß wurden diese mit der Pipette vermischt, kurz zentrifugiert und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert (ca. 16 h). Nach der Inkubation erfolgte ein DNase-Verdau durch Zugabe von 1 µl TURBO DNase (2 u/µl), kurzem Vermischen mit der Pipettenspitze und Inkubation bei 37°C für 15 min. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C für 15 min abgestoppt und es wurden 15 µl nukleasefreies Wasser und 30 µl Lithiumchloridlösung (7,5 M LiCl, 50 mM EDTA) dazugegeben. Anschließend wurde eine schrittweise Fällung durchgeführt. Zuerst wurde für 24 h bei 4°C gefällt, anschließend für weitere 24 h bei -20°C und zuletzt für 24 h (oder länger) bei -70°C. Nach der Fällung wurde die Mischung für 15 min bei 4°C und 18894 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 50 µl Ethanol (70%, v/v) gewaschen und bei 18894 x g und 4°C für weitere 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgelöst. Da RNA beim raschen Abkühlen häufig unerwünschte Sekundärstrukturen bildet, wurde die RNA abschließend bei 95°C für 5 min in der PCR-Maschine erhitzt und damit denaturiert. Danach wurde die RNA langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um ein korrektes Aneinanderlagern der komplementären einzelsträngigen RNA-Fragmente bei Raumtemperatur über Nacht zu ermöglichen.

Die Konzentration der doppelsträngigen RNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.2.4) und die Qualität mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.6.) überprüft. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

4.7.2 Injektion

Für die Experimente zur RNA-Interferenz wurden Arbeiter von *M. darwiniensis* mit verschiedenen Lösungen injiziert. Die Injektion erfolgte mit Hilfe einer Hamiltonspritze (100 µl) lateroventral in das Abdomen. Dabei wurde die Spritze zwischen das zweite und dritte bzw. das dritte und vierte Abdominalsegment in Kopfrichtung eingestochen. Um Verletzungen der inneren Organe zu vermeiden, musste die Spritze flach unter der Kutikula entlang geführt werden. Nach der Injektion wurde die Spritze für ca. 20 s im Tier belassen, um eine gute Verteilung der Injektionslösung zu gewährleisten. Nach der Injektion wurden die Tiere getrennt von der Kolonie in Gruppen von 10 bis 48 Individuen gehalten. Die Haltung erfolgte wie unter 4.1.1 beschrieben.

4.7.3 Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz

Vor der Durchführung der Versuche zur RNAi waren einige Voruntersuchungen notwendig, da die Methode der RNAi bei *M. darwiniensis* bisher nicht angewendet wurde. Verschiedene Parameter wurden im Laufe der Voruntersuchungen überprüft. Eine Zusammenfassung der Experimente der Voruntersuchung befindet sich in Abb. 66 (Anhang, S. 259).

Als erstes wurde die Verteilung der Injektionsflüssigkeit im Körper der Termiten untersucht. Die Injektion der Lösungen erfolgte lateroventral in den Hämolympdraum des Abdomens. Um eine Wirkung auch in weiter entfernten Geweben auszulösen, muss die injizierte Lösung von der Injektionsstelle ausgehend im gesamten Körper verteilt werden. Zudem kommt es durch die Injektion zu einer Verletzung der Kutikula und dadurch bedingt zu einem Austreten von Flüssigkeit bei Entfernung der Injektionsnadel. Daher wurde geprüft, ob sich die Injektionslösung im gesamten Körper verteilt oder ob diese durch das Herausziehen der Injektionsspritze wieder austritt. Zu diesem Zweck wurde ein Arbeiter von *M. darwiniensis* mit grüner Lebensmittelfarbe gelöst in 2 µl sterilem Wasser injiziert und die Verteilung des Farbstoffes über einen Zeitraum von 90 min dokumentiert.

Für die Injektion von dsRNA kann diese entweder in sterilem Wasser oder Ringerlösung gelöst werden. Bei einem relativ großen Injektionsvolumen im Vergleich zur Gesamtmenge an Hämolymphe im Individuum, ist die Verwendung einer Ringerlösung zu bevorzugen. Diese entspricht durch die Zugabe definierter Konzentrationen verschiedener Salze eher der Hämolymphe der Termiten und verdünnt diese nicht. Arbeiter von *M. darwiniensis* haben ein freies Hämolympfvolumen von ca. 2 bis 5 µl. Dieses Volumen wurde während der Hämolympfabnahme bestimmt, bei der die Tiere am Abdomen zusammengedrückt wurden bis ein Austreten des Fettkörpers aus der Wunde beobachtet wurde. Bei Arbeitern von *Hodotermopsis sjostedti*, die mit ca. 70 mg Körpergewicht eine ähnliche Größe aufweisen wie Arbeiter von *M. darwiniensis*, wurde ebenfalls ein Hämolympfvolumen von ca. 2 bis 4 µl bestimmt (Cornette *et al.* 2008). Das Injektionsvolumen betrug 2 µl und entsprach damit in etwa der Menge an freier Hämolymphe. Die dsRNA wurde daher in Ringerlösung gelöst.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse der RNAi-Experimente auszuschließen, musste zunächst untersucht werden, ob die Injektion von Termitenringer einen Einfluss auf die Expression des AST-A Gens hat. Dafür wurden *M. darwiniensis*-Arbeiter mit 2 µl Termitenringer injiziert und getrennt von der Kolonie in Gruppen mit 20 bis 22 Individuen

gehalten. Nach zwei Tagen wurde die AST-A Expression im Gehirn und in den drei Darmabschnitten Vorder-, Mittel- und Hinterdarm mittels qPCR analysiert (siehe 4.6.3). Die AST-A Expression von unbehandelten Arbeitern diente als Vergleichswert.

In einem weiteren Experiment sollte die optimale Injektionsmenge an AST-A dsRNA zur Auslösung der RNAi bestimmt werden. Dafür wurden weibliche und männliche Arbeiter von *M. darwiniensis* einer von fünf unterschiedlichen Behandlungen unterzogen und für drei Tage getrennt von der Kolonie in Gruppen mit 10 bis 21 Individuen gehalten. Die Arbeiter wurden entweder unbehandelt belassen, mit 2 μ l Termitenringer oder mit 0,5 μ g, 1 μ g oder 2 μ g AST-A dsRNA (abgeleitet vom Fragment Mda_AS8F bis Mda_AS13R, nt 580-1059, AST-A dsRNA1, siehe 4.7.1.1) jeweils gelöst in 2 μ l Termitenringer injiziert. Nach drei Tagen wurden die Tiere analysiert. Zwei Parameter wurden bestimmt. Zum einen wurde der Einfluss der Injektion von Ringerlösung oder dsRNA auf die Mortalität untersucht, da es durch die Verletzung oder durch die injizierten Substanzen zu einer erhöhten Mortalität der Tiere kommen könnte. Zum anderen wurde die AST-A Expression im Gehirn mittels qPCR (siehe 4.6.3) analysiert. Die AST-A Expression wurde mit der Expression des Referenzgens β -Aktin normalisiert. Dafür wurden beide in 4.6.3.5 beschriebene Methoden verwendet.

4.7.4 Experimente zur Suppression der Allatostatin A-Expression durch RNA-Interferenz

Anhand der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurde der Versuchsablauf für erste Experimente zur Unterdrückung der Expression des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* festgelegt. Arbeitern von *M. darwiniensis* wurde 1 μ g AST-A dsRNA (abgeleitet vom Fragment Mda_AS140F bis Mda_AS9R, nt 362-645, AST-A dsRNA2, siehe 4.7.1.1) gelöst in 2 μ l Termitenringer injiziert. Als Kontrolltiere dienten Arbeiter, denen 2 μ l Termitenringer injiziert wurde. Nach der Injektion wurden die Tiere in Gruppen von 21 bis 48 Individuen getrennt von der Kolonie gehalten. Dabei wurde auf eine annähernde Gleichverteilung der Individuen auf behandelte und Kontrolltiere geachtet. Drei Tage nach der Injektion wurden die Mortalität, der Hormongehalt der Hämolymphe und die AST-A Expression bestimmt. Insgesamt wurden vier Experimente durchgeführt. Diese Experimente sind in Tab. 40 und Abb. 66 (Anhang, S. 259) nochmals zusammengefasst.

Die Analyse der AST-A Expression erfolgte mittels qPCR (siehe 4.6.3) in den Geweben Gehirn, Vorder-, Mittel- und Hinterdarm nur in den Experimenten 1 und 2. Im ersten Experiment wurden die männlichen und weiblichen Arbeiter einer Gruppe jeweils zusammen untersucht. Im zweiten Experiment erfolgte die Analyse der AST-A Expression getrennt nach dem Geschlecht.

Der Gehalt an Ecdysteroid- und Juvenilhormonen in der Hämolymphe wurde in den Experimenten 2 bis 4 mittels HPLC-MS (siehe 4.3) bestimmt. Für jede Probe wurde die Hämolymphe von mehreren Tieren vereinigt.

Tab. 40: Zusammenfassung der Experimente zur Suppression der Expression von Allatostatin A (AST-A) durch RNA-Interferenz.

Bestimmung der AST-A Expression in den Geweben Gehirn (OSG), Vorder- (VD), Mittel- (MD) und Hinterdarm (HD), Bestimmung des Titers an Ecdysteroiden und Juvenilhormonen (JH) der Hämolymphe. AST-A dsRNA abgeleitet vom Fragment Mda_AS140F bis Mda_AS9R gelöst in 2 µl Termitenringer (AST-A dsRNA2).

Experiment	Injektion	Injizierte Tiere	AST-A Expression	Hormontiter
1	2 µl Termitenringer	14 ♀ 10 ♂	OSG, VD, MD, HD bei (♀ + ♂)	nicht bestimmt
	1 µg AST-A dsRNA	13 ♀ 8 ♂		
2	2 µl Termitenringer	15 ♀ 15 ♂	OSG, VD, MD, HD bei ♀ & bei ♂	Ecdysteroide, JH
	1 µg AST-A dsRNA	15 ♀ 15 ♂		
3	2 µl Termitenringer	17 ♀ 31 ♂	nicht bestimmt	Ecdysteroide, JH
	1 µg AST-A dsRNA	18 ♀ 23 ♂		
4	2 µl Termitenringer	16 ♀ 17 ♂	nicht bestimmt	Ecdysteroide, JH
	1 µg AST-A dsRNA	16 ♀ 17 ♂		

4.8 Statistische Datenanalyse

Für die statistische Analyse der Daten erfolgte zunächst die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzhomogenität (Levene-Test). Datensätze mit einer Stichprobengröße von $n \leq 2$ wurden nicht statistisch ausgewertet. Zur Analyse metrischer Daten wurde bei gegebener Normalverteilung, Varianzhomogenität und ausreichender Stichprobengröße ($n \geq 10$) ein parametrischer Test verwendet. Ansonsten wurden nicht-parametrische Tests genutzt. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mit dem t-Test (parametrischer Test) oder dem Mann-Whitney U-Test (nicht-parametrischer Test). Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis H-Test. Bei einem signifikanten Ergebnis wurden *post hoc*-Vergleiche zwischen jeweils zwei Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Ergebnisse der *post hoc*-Vergleiche wurden mittels sequenzieller Bonferroni-Korrektur korrigiert (Holm 1979). Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS v14.0 durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$) sind in den Grafiken mit * ($P < 0,05$) gekennzeichnet. Werte von $0,05 < P < 0,1$ wurden als tendenzielle Unterschiede gewertet und mit # bezeichnet. Bei *post hoc*-Vergleichen bedeuten unterschiedliche Buchstaben einen signifikanten Unterschied.

Die Expression von AST-A im Oberschlundganglion und der Juvenilhormongehalt in der Hämolymphe der Tiere wurden auf einen statistisch abgesicherten Zusammenhang getestet. Da die Datensätze nicht normalverteilt waren, wurden eine Transformation der Daten durchgeführt. Bei der Bildung des dekadischen Logarithmus (lg) der Daten wurde eine Normalverteilung erreicht. Daher konnte ein parametrischer Test angewendet werden – die Korrelation nach Pearson. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde die Korrelation nach Spearman berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Hormongehalt von *Mastotermes darwiniensis*

Die Messung des Hormongehalts in der Hämolymphe und in Ganzkörperextrakten von *M. darwiniensis* erfolgte mittels HPLC-MS. Dabei wurden die Proben auf das Vorkommen und die Quantität der fünf Hormone 20-Hydroxyecdysol, Ecdysol und Juvenilhormon I, II und III überprüft. Im Folgenden sind die Ergebnisse getrennt nach dem Gehalt an Juvenil- und Ecdysteroidhormonen dargestellt.

5.1.1 Juvenilhormongehalt

Bei allen untersuchten Proben wurde lediglich eines der drei untersuchten Juvenilhormon-Homologe nachgewiesen – das Juvenilhormon III. Die JH-Homologe I und II traten in keiner Probe auf.

In der ersten Messreihe wurde die Hämolymphe der Termiten untersucht. Dabei mussten mehrere Tiere für eine Probe vereinigt werden. Außerdem konnte aus Larven im ersten Larvenstadium (L₁) und aus Eiern keine Hämolymphe gewonnen werden, daher wurden diese Proben als Ganzes verarbeitet. Um individuelle Tiere untersuchen zu können, wurden für die zweite Messreihe Ganzkörperextrakte von allen untersuchten Stadien angefertigt. Die Ergebnisse der beiden Messreihen sind im Folgenden getrennt dargestellt.

5.1.1.1 Juvenilhormon III-Gehalt in Hämolympheproben

Die Ergebnisse der ersten Messreihe, in der für die meisten Entwicklungsstadien Hämolympheproben untersucht wurden, sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 11 und 12) für alle Messungen zusammengefasst. Die geringe Stichprobenzahl wurde verursacht durch die Vereinigung der Proben (siehe 4.3.5) und ließ keine statistische Auswertung zu.

Juvenile Stadien von *M. darwiniensis* (Abb. 11A und B) wiesen generell einen höheren JH III-Gehalt auf als die „Adultstadien“ (Abb. 11C). Innerhalb der apteren Linie zeigten sich dabei Unterschiede zwischen den ersten vier Larvenstadien und dem letzten Larvenstadium (L₅). Bei L₅ kam es zum Absinken des JH III-Titers auf das Niveau der Arbeiter und Soldaten. Mit 519 ± 428 pg pro μ l wies das erste Larvenstadium den höchsten Gehalt an JH III auf. Ein direkter Vergleich der Messwerte der Eier und des L₁-Stadiums mit denen der anderen

Entwicklungsstadien ist jedoch nicht möglich, da diese Proben aus Ganzkörperextrakten gewonnen wurden. Innerhalb der nymphalen Linie konnten nur drei der elf bei *M. darwiniensis* vorkommenden Nymphenstadien (Watson et al. 1977b) untersucht werden. Diese Nymphen traten einmalig im Untersuchungszeitraum in den institutseigenen Kolonien auf und konnten den ersten drei Nymphenstadien (N₁ bis N₃) zugeordnet werden. Geflügelte Geschlechtstiere (Alaten) wurden ebenfalls nur einmalig beobachtet. Diese traten jedoch nicht in den institutseigenen Kolonien, sondern lediglich in der Ursprungskolonie auf. Wie innerhalb der apteren Linie wiesen auch die juvenilen Tiere der nymphalen Linie (Abb. 11A und B) einen höheren JH III-Gehalt auf als die adulten Alaten (Abb. 11C). Dabei war der JH III-Titer bei N₁ am höchsten (313 pg/μl) und schien danach abzusinken. Alle Nymphen wiesen einen geringeren JH III-Gehalt auf als die Tiere des ersten Larvenstadiums. Der Vergleich der Nymphen mit den Larven der gleichen Altersgruppe zeigt, dass die Larven generell einen höheren JH III-Gehalt aufwiesen (Abb. 11B). Innerhalb der „Adultstadien“ konnte bei den Arbeitern mit 147 ± 29 pg pro μl der höchste JH III-Gehalt nachgewiesen werden. Die Soldaten (98 ± 30 pg/μl) und Alaten (53 ± 27 pg/μl) zeigten einen geringeren JH III-Gehalt (Abb. 11C).

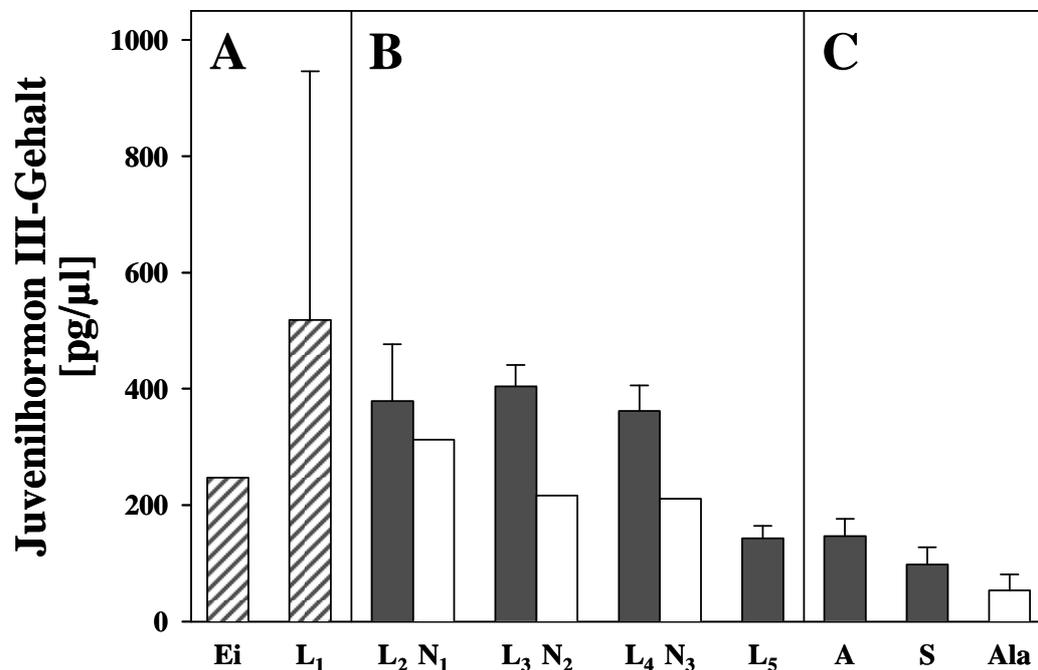


Abb. 11: Juvenilhormon III-Gehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Untersuchung von Ganzkörperextrakten, (B) und (C) Untersuchung der Hämolymphe. (A) und (B) juvenile Stadien, (C) „Adultstadien“. Ei und L₁ zu beiden Entwicklungslinien zugehörig. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). A = Arbeiter, Ala = Alaten, L_n = n. Larvenstadium, N_n = n. Nymphenstadium, S = Soldaten. n = 1 – 8.

In den Versuchskolonien konnte zweimal das Auftreten von Ersatzgeschlechtstieren (Neotenicis) in großer Zahl beobachtet werden. Dies war mit einer massiven Schimmelbildung und einem Absterben der Kolonie kurze Zeit später verbunden. Normalerweise treten Neotenicis eher selten auf (Watson *et al.* 1975). Diese Neotenicis und die noch vorhandenen Arbeiter der Kolonien wurden bezüglich ihres Hormongehalts untersucht. Als Vergleichswerte dienten Arbeiter von gesunden Kolonien. Diesen drei Gruppen gegenüber gestellt wurden die Alaten (Abb. 12). Die Arbeiter der gesunden Kolonien wiesen den höchsten JH III-Titer auf (126 – 168 pg/ μ l). Alle anderen Gruppen lagen mit 34 bis 72 pg JH III pro μ l niedriger. Die Arbeiter der absterbenden Kolonien hatten dabei einen ähnlich niedrigen Titer wie die Neotenicis derselben Kolonien. Bei fast allen Gruppen, jedoch nicht bei den Alaten, wiesen die Weibchen einen leicht höheren JH-Titer auf als die Männchen. Weibliche Alaten hatten mit 34 pg pro μ l den geringsten JH III-Gehalt.

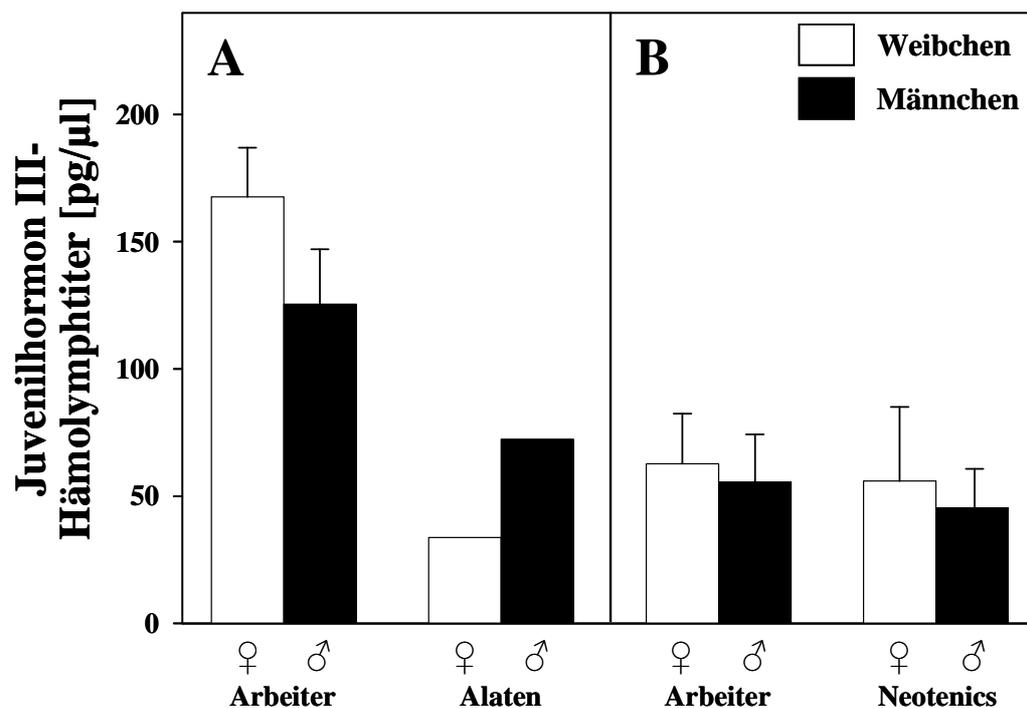


Abb. 12: Juvenilehormon III-Hämolymphtiter in verschiedenen „Adultstadien“ von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Arbeiter und primäre Geschlechtsstiere (Alaten) aus gesunden Kolonien, (B) Arbeiter und sekundäre Geschlechtsstiere (Neotenicis) aus absterbenden Kolonien. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Daten für (A) aus Abb. 11. n = 1 – 8.

5.1.1.2 Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten

Für die zweite Messreihe, in der ausschließlich Ganzkörperextrakte untersucht wurden, standen keine Tiere der nymphalen Linie zur Verfügung. Daher konnten nur aptere Tiere – Larven, Arbeiter und Soldaten – untersucht werden. Zusätzlich wurden einige Neotenicus beobachtet, die ebenfalls in die Analysen einbezogen wurden.

Die Larven des ersten bis vierten Larvenstadiums ($L_1 - L_4$) wiesen einen signifikant höheren JH III-Gehalt auf als die Larven des fünften Stadiums (L_5), die Arbeiter und die Soldaten (Abb. 13). Innerhalb der ersten vier Larvenstadien scheint es im zeitlichen Verlauf eine Abnahme des JH III-Gehaltes zu geben, mit einem Maximum von 22 ± 18 pg pro mg Körpergewicht (KG) bei L_2 . Durch die große Streuung konnten jedoch zwischen L_1 bis L_4 keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. L_5 wies den niedrigsten JH III-Gehalt auf mit $1,3 \pm 1,2$ pg pro mg KG. Der JH III-Gehalt der Soldaten und Arbeiter lag bei ca. 3 pg JH III pro mg KG und damit signifikant höher als bei L_5 .

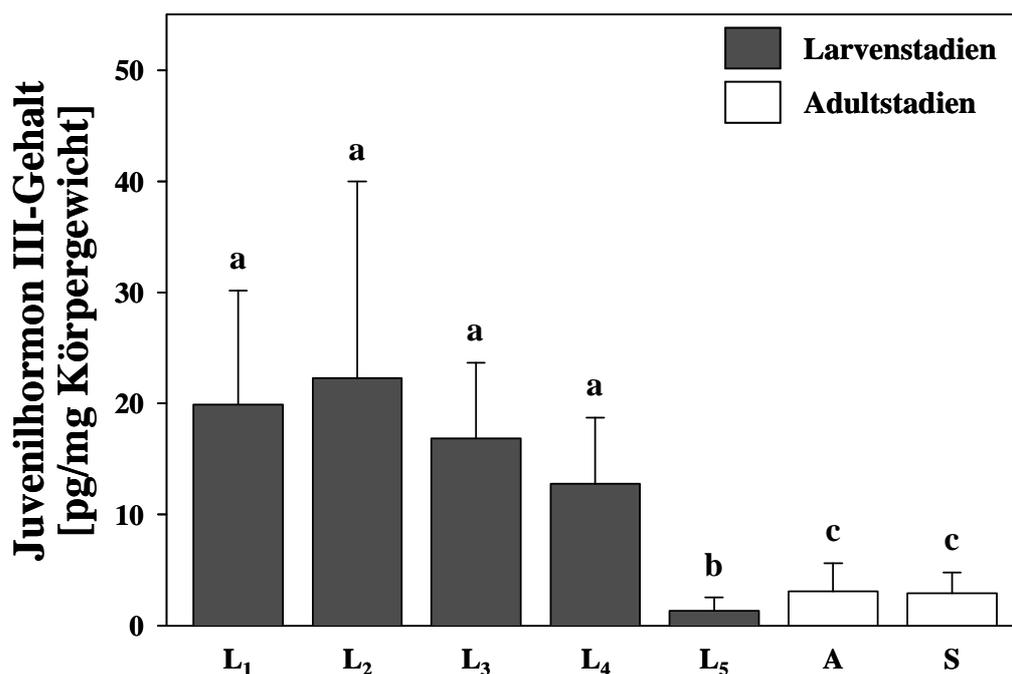


Abb. 13: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).

A = Arbeiter, $L_n = n$. Larvenstadium, S = Soldaten. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 178,254$; $df = 6$; $P < 0,001$. *Post hoc*-Test: Mann-Whitney U-Test mit sequenzieller Bonferroni-Korrektur; unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $n = 9 - 76$.

Die Darstellung der einzelnen JH III-Messwerte aus Abb. 13 zeigt die große Variation zwischen den Individuen eines Stadiums (Abb. 14). Besonders große Unterschiede gab es dabei zwischen Individuen innerhalb der ersten zwei Larvenstadien. Einige Individuen von L₂ wiesen einen sehr hohen JH III-Gehalt von über 40 pg pro mg KG auf.

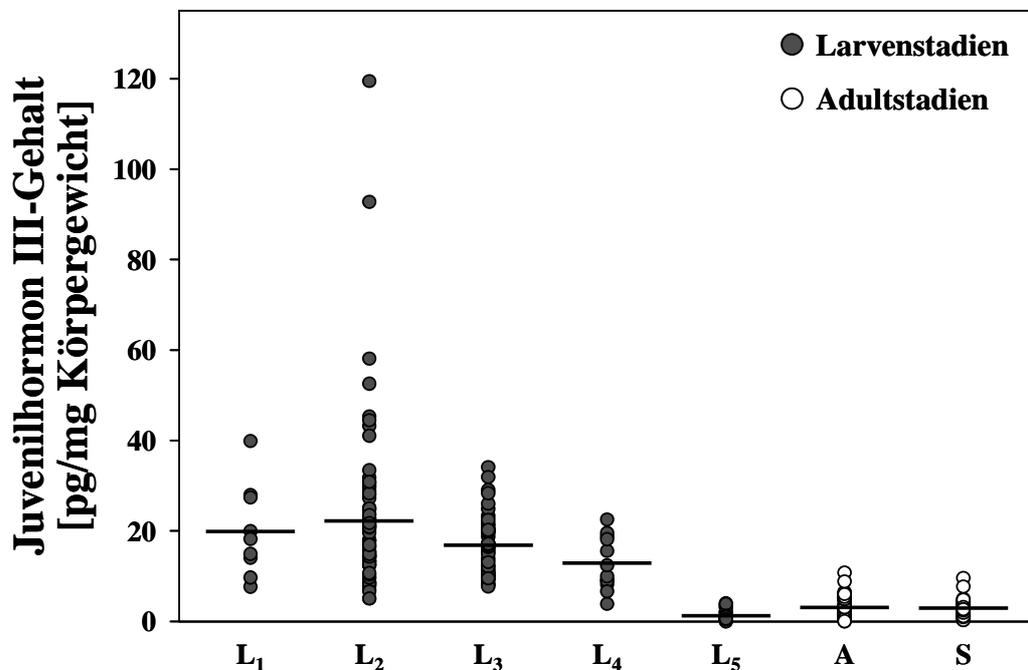


Abb. 14: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung der Einzelwerte).

Die horizontale Linie stellt jeweils den Mittelwert dar. Daten aus Abb. 13. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. n = 9 – 76.

Bei der Betrachtung der Daten, getrennt nach dem Geschlecht, fällt auf, dass sich der Verlauf des JH III-Gehalts innerhalb der ersten vier Larvenstadien bei Männchen und Weibchen leicht unterschied (Abb. 15). Im L₁-Stadium war noch keine Unterscheidung zwischen Männchen und Weibchen möglich. Beide Kurven erreichten in L₂ ihr Maximum, aber bei den Männchen stieg der JH III-Gehalt von L₁ nach L₂ stärker an und fiel dann in Richtung L₅ steiler ab als bei den Weibchen. Insgesamt wiesen die Weibchen einen tendenziell höheren Gehalt an JH III auf (Mann-Whitney U-Test: U = 6814; Z = -1,923; P = 0,055). Allerdings zeigten sich zwischen Männchen und Weibchen eines Entwicklungsstadiums keine signifikanten Unterschiede.

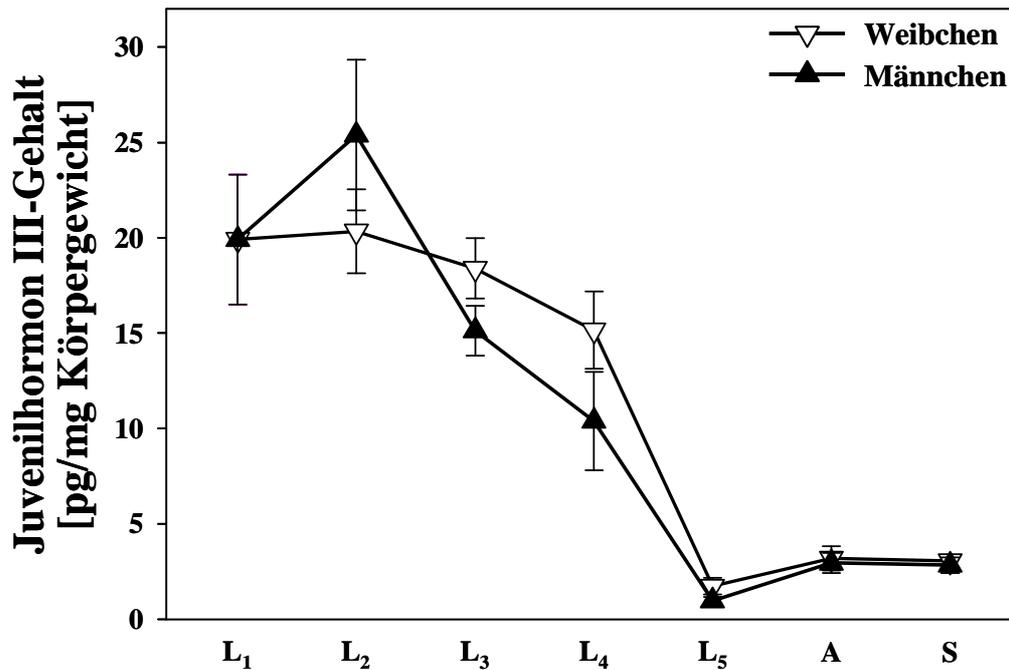


Abb. 15: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Darstellung des Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetrischen Mittels. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Werte für L₁ sind identisch bei Männchen und Weibchen, da in diesem Stadium die Unterscheidung zwischen den Geschlechtern nicht möglich ist. Mann-Whitney U-Tests innerhalb eines Entwicklungsstadiums zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen. Daten aus Abb. 13. n = 6 – 47.

Während der Probennahme für die Ganzkörpermessungen konnten neben den Larven, Arbeitern und Soldaten drei Neotenicis (zwei weibliche, ein männliches) beobachtet werden. Diese wurden untersucht und mit den dazugehörigen Arbeitern verglichen. Außerdem wurden erneut Arbeiter und Neotenicis einer absterbenden Kolonie analysiert und den Tieren der gesunden Kolonie gegenübergestellt (Abb. 16). Die Arbeiter der gesunden Kolonie wiesen mit 2 bis 2,6 pg pro mg KG einen höheren JH III-Gehalt auf als die Arbeiter und männlichen Neotenicis der absterbenden Kolonie (0,3 – 0,7 pg/mg KG). Bei den weiblichen Neotenicis der absterbenden Kolonie (Abb. 16B) konnte ein höherer JH III-Gehalt ($3,5 \pm 0,4$ pg/mg KG) als bei den anderen Tieren der absterbenden Kolonie gemessen werden. Mit $21,3 \pm 1,9$ und $29,6$ pg pro mg KG zeigten die weiblichen und männlichen Neotenicis der gesunden Kolonie (Abb. 16A) einen stark erhöhten JH III-Gehalt im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen.

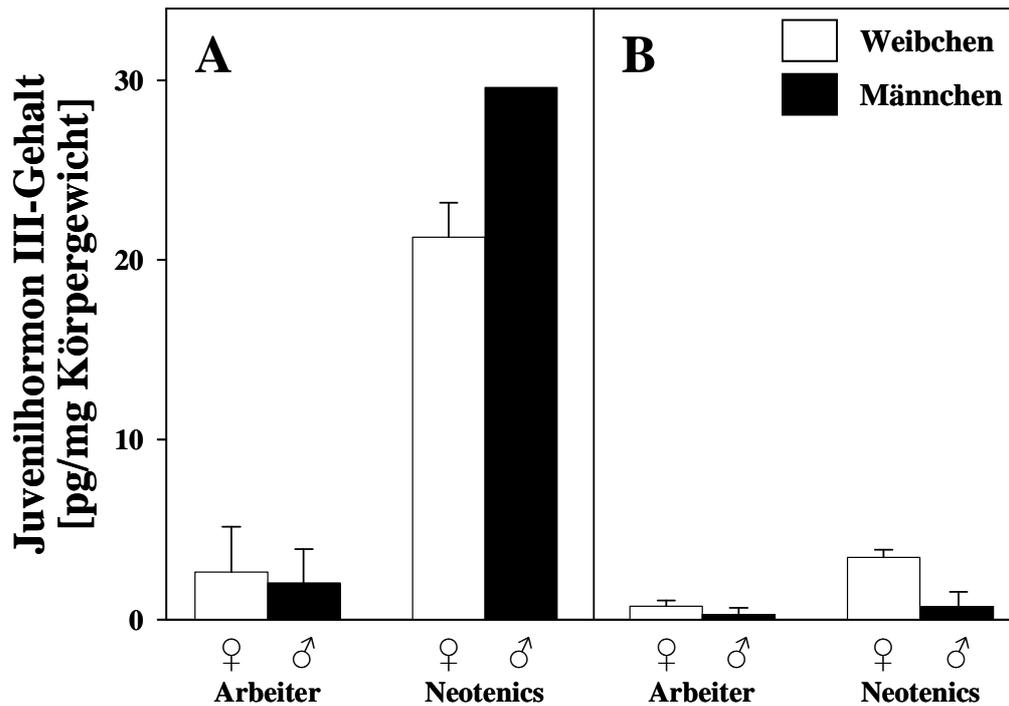


Abb. 16: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener „adulter“ Stadien von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Arbeiter und Neotenicus einer gesunden Kolonie, (B) Arbeiter und Neotenicus einer absterbenden Kolonie. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Daten für (A) Arbeiter aus Abb. 13. $n = 1 - 32$.

In der ersten Messreihe wurden Hämolympfproben und Ganzkörperextrakte untersucht und verglichen (Abb. 11, S. 107). Da sich diese Ergebnisse nur schwer vergleichen lassen, wurden in einer zweiten Messreihe alle vorhandenen Entwicklungsstadien als Ganzkörperextrakte verarbeitet. Für die zweite Messreihe konnten jedoch keine Eier gefunden werden. Daher wurden die Ergebnisse der Ganzkörperextrakte der Messreihen 1 und 2 nochmals zusammengefasst (Abb. 17). Die Eier wiesen einen JH III-Gehalt von 35 pg pro mg Frischgewicht auf. Durch das Hinzufügen der drei Proben aus der ersten Messreihe von L_1 zu den vorhandenen Proben der zweiten Messreihe zeigten die L_1 -Larven einen durchschnittlichen JH III-Gehalt von 33 ± 46 pg pro mg KG (L_1 aus Messreihe 2: 20 ± 10 pg/mg KG). Damit lag der JH III-Gehalt auf demselben Niveau wie der JH III-Gehalt der Eier und höher als bei allen anderen Gruppen.

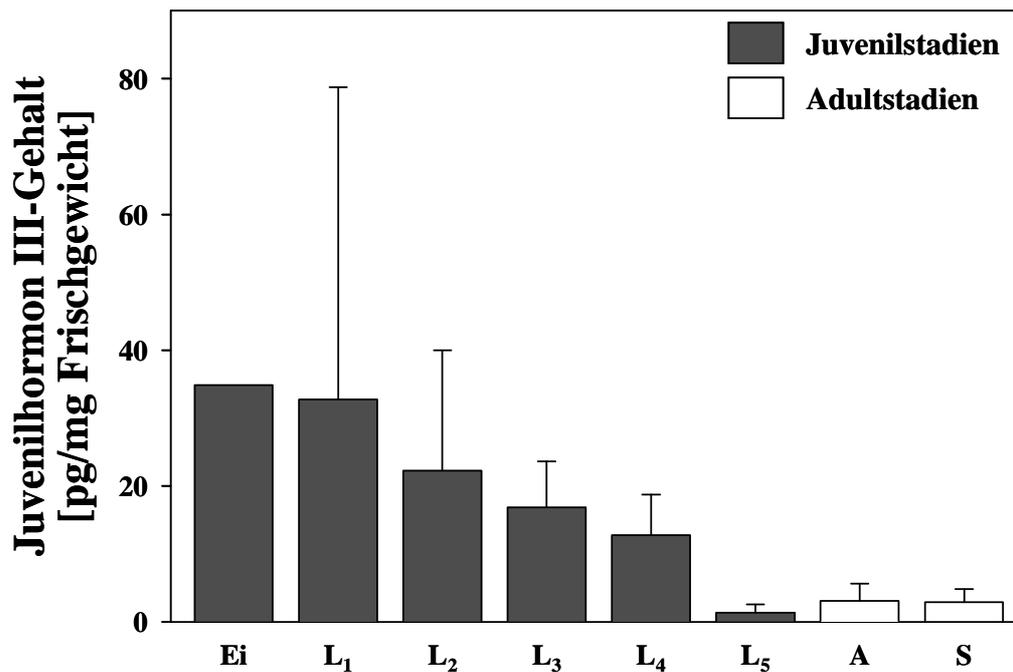


Abb. 17: Juvenilhormon III-Gehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Kombination Messreihe 1 und 2).

Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Daten aus Abb. 11 und 13. n = 1 – 76.

5.1.2 Ecdysteroidgehalt

In beiden Messreihen wurde auf das Vorkommen der beiden freien Ecdysteroide 20-Hydroxyecdysen (20-HE) und Ecdysen getestet. Da die Empfindlichkeit der verwendeten HPLC-MS Methode für Ecdysteroide nicht so hoch ist wie für Juvenilhormone (Westerlund 2004) konnten nicht in allen Proben Ecdysteroide nachgewiesen werden. 20-Hydroxyecdysen war sowohl bei den Hämolympfproben (Wilcoxon-Test: $Z = -3,296$; $n = 38$; $P = 0,001$) als auch bei den Ganzkörperextrakten (Wilcoxon-Test: $Z = -6,471$; $n = 243$; $P < 0,001$) das dominante Ecdysteroid. Die Auswertung erfolgte getrennt für beide Messreihen. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl wurde die Messreihe 1 nicht statistisch ausgewertet.

5.1.2.1 Ecdysteroidgehalt in Hämolympfproben

20-Hydroxyecdysen (20-HE)

In den Larven der Stadien L₁ bis L₄ konnten 59 – 108 pg 20-HE pro μl nachgewiesen werden. Die Eier enthielten ebenfalls 20-HE (60 pg/ μl), Arbeiter und Soldaten wiesen nur einen geringen 20-HE-Gehalt auf (6 pg/ μl ; Abb. 18). Innerhalb der nymphalen Linie konnte 20-HE

nur in N_1 und N_2 nachgewiesen werden (Abb. 18B). Die Alaten enthielten kein messbares 20-HE (Abb. 18C). Damit zeigten die juvenilen Stadien wie bereits beim JH III einen höheren Hormongehalt als die „Adultstadien“. Der direkte Vergleich der Larven mit den Nymphen der gleichen Altersgruppe ermöglichte keine klare Aussage (Abb. 18B). Das L_2 -Stadium wies einen höheren 20-HE-Gehalt auf als das parallele N_1 -Stadium. Bei L_3 und N_2 zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Ältere Stadien (L_5 und N_3) hatten keinen messbaren 20-HE-Gehalt.

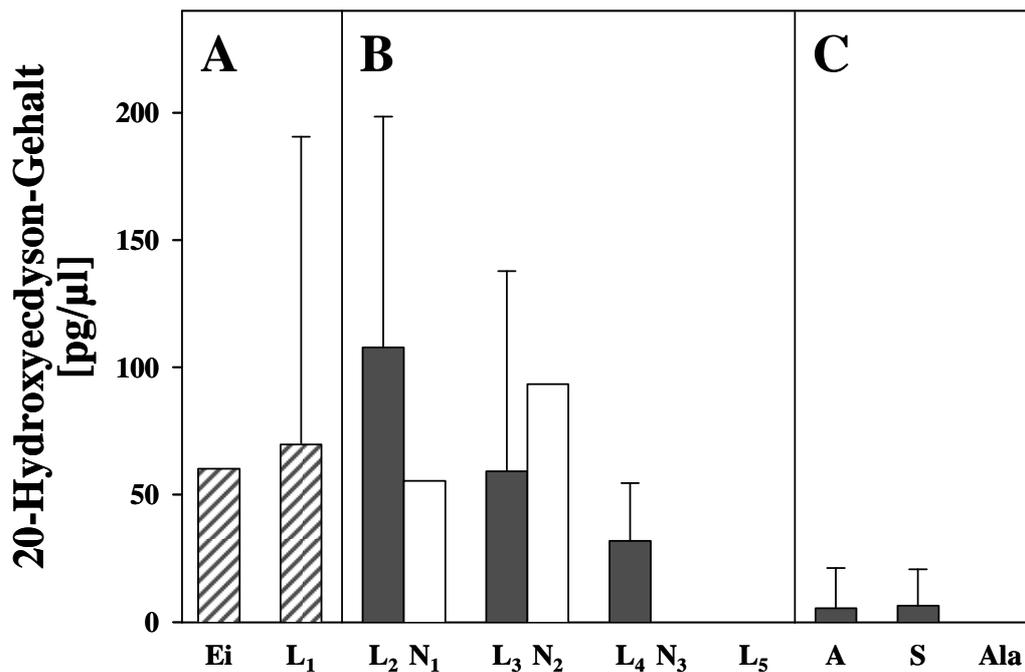


Abb. 18: 20-Hydroxyecdysone-Gehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Untersuchung von Ganzkörperextrakten, (B) und (C) Untersuchung der Hämolymphe. (A) und (B) juvenile Stadien, (C) „Adultstadien“. Ei und L_1 zu beiden Entwicklungslinien zugehörig. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). A = Arbeiter, Ala = Alaten, $L_n = n$. Larvenstadium, $N_n = n$. Nymphenstadium, S = Soldaten. $n = 1 - 8$.

Die Termiten der bereits beschriebenen absterbenden Kolonien wurden ebenfalls auf ihren Gehalt an 20-HE untersucht. Von diesen zeigten lediglich die weiblichen Arbeiter mit 47 ± 30 pg pro μl eine messbare Menge an 20-HE (nicht dargestellt).

Ecdyson

Ecdyson konnte in der ersten Messreihe lediglich in drei Proben nachgewiesen werden – in den Eiern (28 pg/ μl), im zweiten Nymphenstadium (13 pg/ μl) und in einer Probe des zweiten Larvenstadiums (11 pg/ μl). Auf eine grafische Darstellung wurde daher verzichtet.

5.1.2.2 Ecdysteroidgehalt in Ganzkörperextrakten

20-Hydroxyecdysol

Die Individuen der ersten vier Larvenstadien wiesen einen höheren Gehalt an 20-HE auf als Individuen des fünften Larvenstadiums und die Arbeiter (Abb. 19). Signifikante Unterschiede konnten jedoch nur zwischen L_4 und den Arbeitern nachgewiesen werden. Die Soldaten zeigten mit $0,7 \pm 3,3$ pg pro mg KG den geringsten 20-HE-Gehalt, der sich signifikant von dem aller anderen Gruppen (mit Ausnahme von L_1) unterschied. Innerhalb der Larvenstadien schien der Gehalt an 20-HE mit zunehmenden Alter kontinuierlich abzunehmen, jedoch ließ sich darüber aufgrund der großen Streuung keine statistisch abgesicherte Aussage treffen.

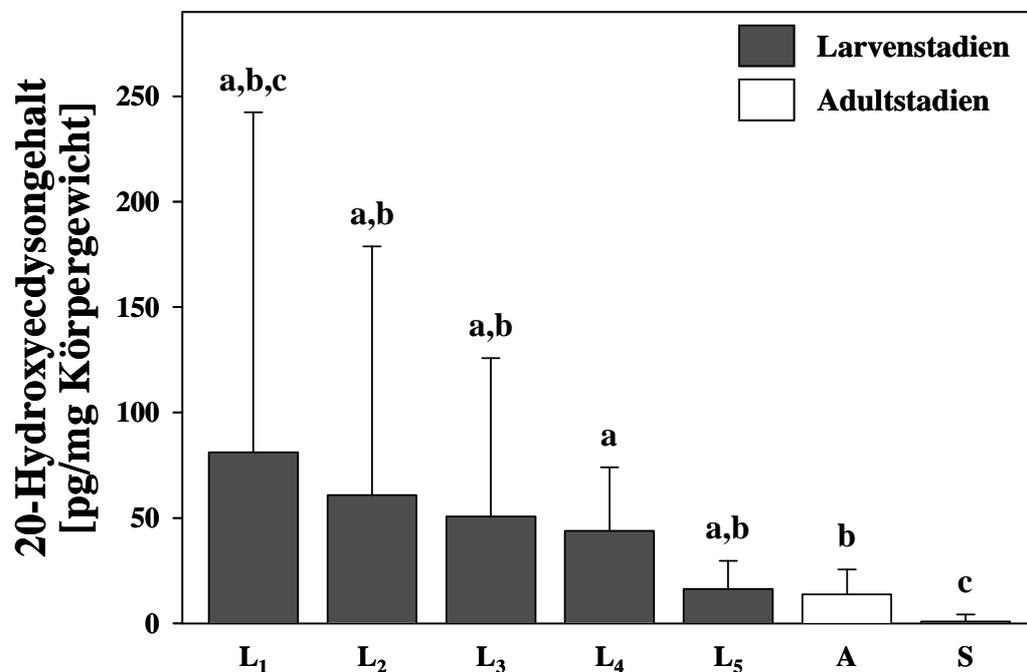


Abb. 19: Gehalt an 20-Hydroxyecdysol in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).

A = Arbeiter, $L_n = n$. Larvenstadium, S = Soldaten. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 45,959$; $df = 6$; $P < 0,001$. *Post hoc*-Test: Mann-Whitney U-Test mit sequenzieller Bonferroni-Korrektur; unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $n = 9 - 76$.

Die einzelnen Individuen der Larvenstadien L_1 bis L_3 zeigten im Vergleich zu den Larvenstadien L_4 und L_5 , den Arbeitern und Soldaten die größten Schwankungen hinsichtlich des 20-HE-Gehalts (Abb. 20; Darstellung der Einzelwerte aus Abb. 19). Besonders innerhalb des L_1 -Stadiums konnte eine sehr große Variation beobachtet werden. Zwei Individuen

wiesen einen 20-HE-Gehalt von über 300 pg pro mg KG auf, während bei allen anderen der 20-HE-Gehalt unter der Nachweisgrenze lag. Individuen des L₂-Stadiums zeigten ebenfalls eine große Variation, der 20-HE-Gehalt schwankte zwischen 0 und 464 pg pro mg KG.

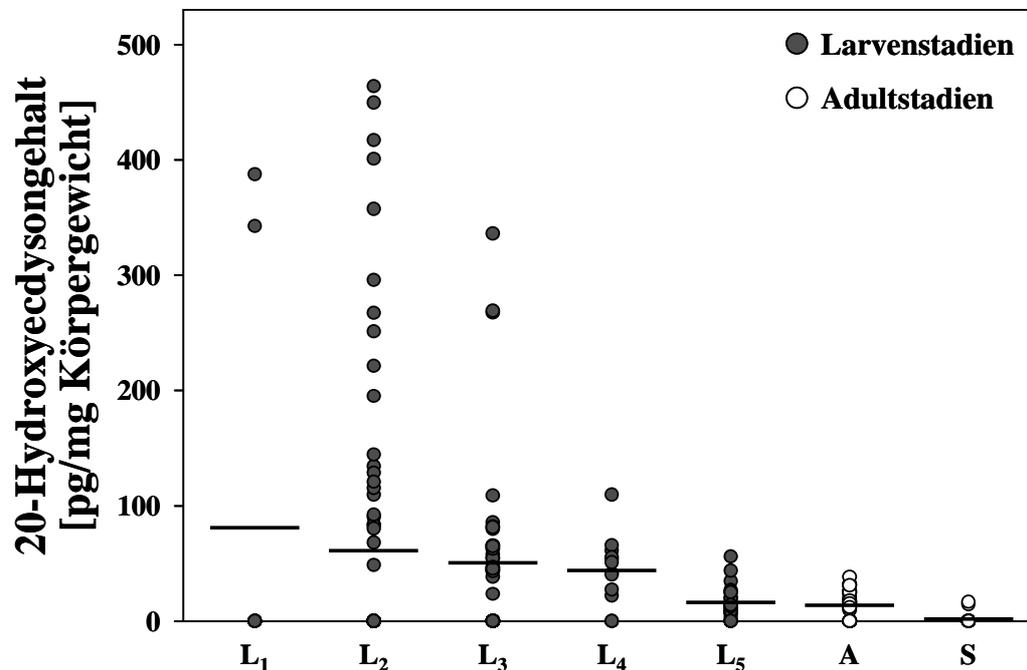


Abb. 20: Gehalt an 20-Hydroxyecdysone in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung der Einzelwerte).

Die horizontale Linie stellt jeweils den Mittelwert dar. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Daten aus Abb. 19. n = 9 – 76.

Bei der Auftragung der Daten getrennt nach dem Geschlecht (Abb. 21) zeigte sich bei beiden Geschlechtern eine scheinbar kontinuierliche Abnahme des 20-HE-Gehalts von L₁ bis zu den Soldaten. Zwischen Männchen und Weibchen gab es sowohl insgesamt (Mann-Whitney U-Test: $U = 7582$; $Z = -0,533$; $P = 0,594$) als auch innerhalb eines Entwicklungsstadiums keine signifikanten Unterschiede.

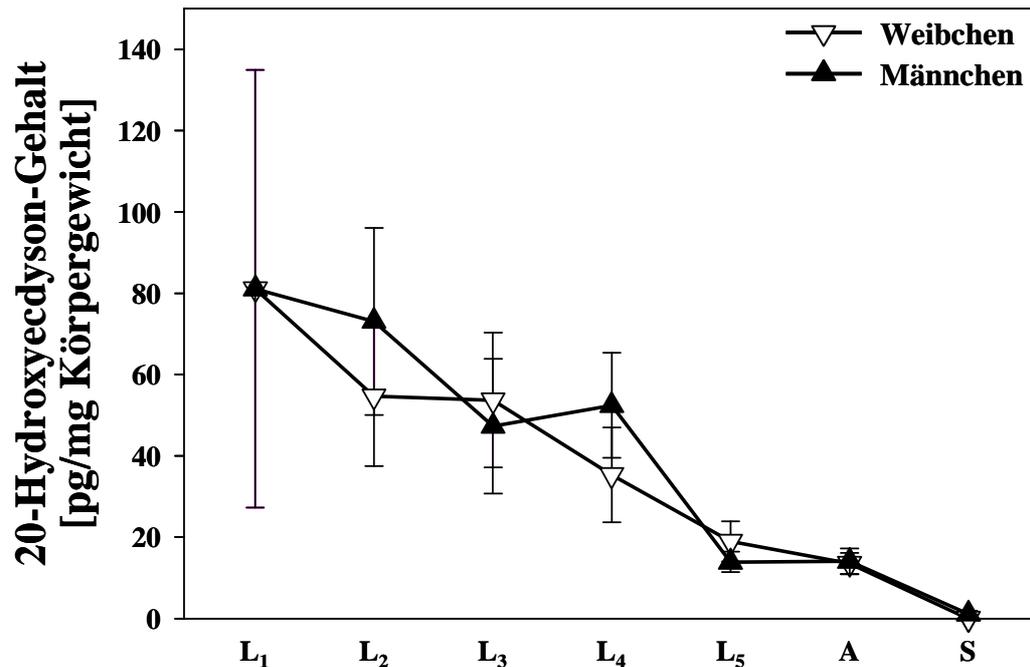


Abb. 21: Gehalt an 20-Hydroxyecdysone in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Darstellung des Mittelwerts \pm Standardfehler des arithmetrischen Mittels. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Werte für L₁ sind identisch bei Männchen und Weibchen, da in diesem Stadium die Unterscheidung zwischen den Geschlechtern nicht möglich ist. Mann-Whitney U-Tests innerhalb eines Entwicklungsstadiums zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen. Daten aus Abb. 19. n = 6 – 47.

Bei den drei neotenen Geschlechtstieren, die während der Probennahme für die Ganzkörperextrakte beobachtet wurden, konnten keine Ecdysteroide nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Der direkte Vergleich der Ganzkörperextrakte aus den Messreihen 1 und 2 zeigte, dass die Eier einen niedrigeren 20-HE-Gehalt aufwiesen als alle Larvalstadien (Abb. 22). Ansonsten war das gleiche Muster wie in Abb. 19 – 21 zu beobachten, mit höheren Werten für die Larvalstadien von L₁ bis L₄ und niedrigen Werten für L₅, Arbeiter und Soldaten.

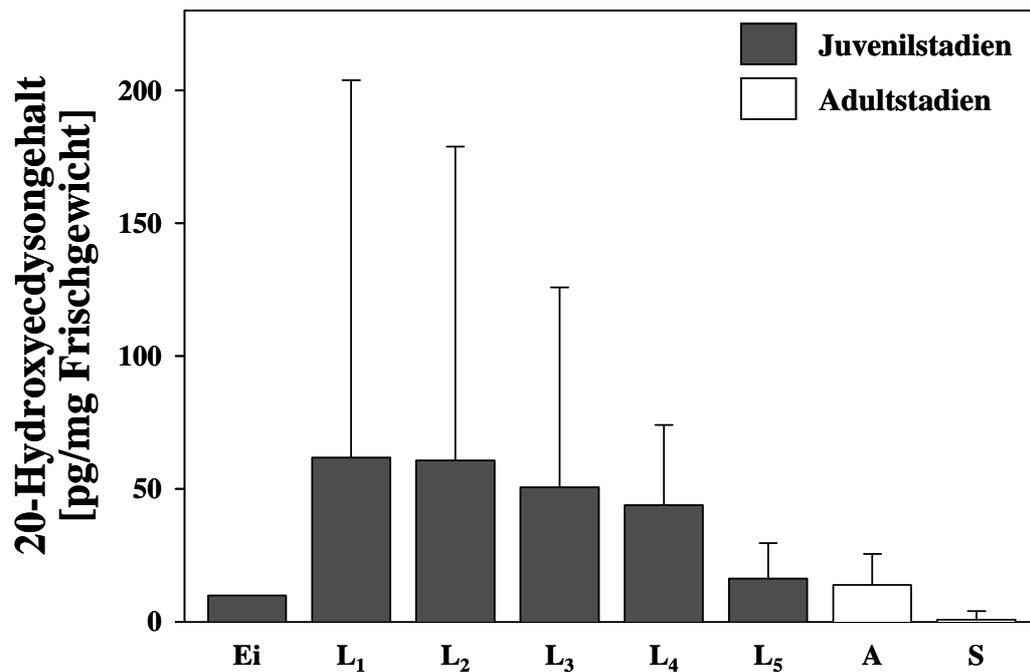


Abb. 22: Gehalt an 20-Hydroxyecdysion in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis*. (Kombination Messreihe 1 und 2).

Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Daten aus Abb. 18 und 19. n = 1 – 76.

Ecdyson

Die ersten beiden Larvenstadien wiesen den höchsten Ecdysongehalt auf mit 38 ± 113 (L₁) bzw. 29 ± 102 pg pro mg KG (L₂). Alle anderen untersuchten Entwicklungsstadien der apteren Linie zeigten einen geringeren Ecdysongehalt (1 – 10 pg/mg KG; Abb. 23). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Kruskall-Wallis H-Test: $H = 2,273$; $df = 6$; $P = 0,893$).

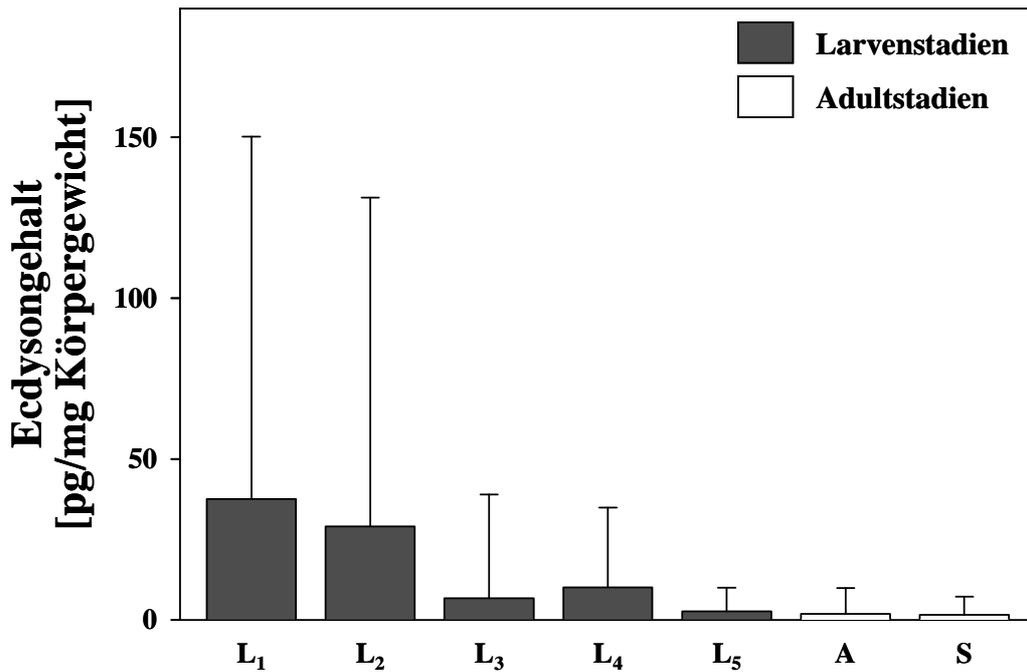


Abb. 23: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung).

A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Kruskal-Wallis H-Test: H = 2,273; df = 6; P = 0,893. n = 9 – 76.

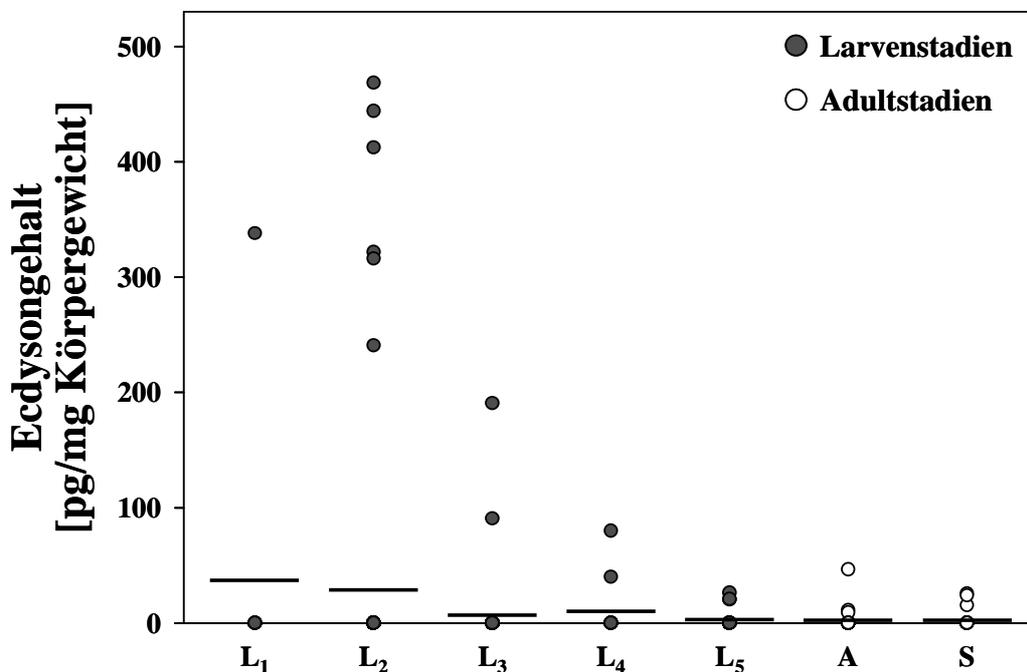


Abb. 24: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Darstellung der Einzelwerte).

Die horizontale Linie stellt jeweils den Mittelwert dar. Daten aus Abb. 23. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. n = 9 – 76.

Die Auftragung der einzelnen Messwerte aus Abb. 23 zeigt, dass generell nur in sehr wenigen Individuen Ecdyson nachgewiesen werden konnte (Abb. 24). In nur 20 von insgesamt 243 Individuen lag der Ecdysongehalt über der Nachweisgrenze. Die meisten Individuen mit nachweisbarem Ecdyson gehörten dabei zum L₂-Stadium mit Werten von bis zu 469 pg Ecdyson pro mg KG.

Bei der Betrachtung des Ecdysongehalts, getrennt nach dem Geschlecht, fällt auf, dass die Männchen insgesamt einen höheren Ecdysongehalt aufwiesen als die Weibchen (Abb. 25; Mann-Whitney U-Test: $U = 7011$; $Z = -3,077$; $P = 0,002$). Innerhalb eines Entwicklungsstadiums gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern mit Ausnahme des fünften Larvenstadiums, in dem die Männchen tendenziell mehr Ecdyson enthielten (Mann-Whitney U-Test: $U = 66$; $Z = -1,668$; $P = 0,095$). Wie bereits für die Abb. 23 und 24 beschrieben, ist auch in Abb. 25 zu erkennen, dass der Ecdysongehalt in L₁ und L₂ am höchsten war und anschließend stark abnahm.

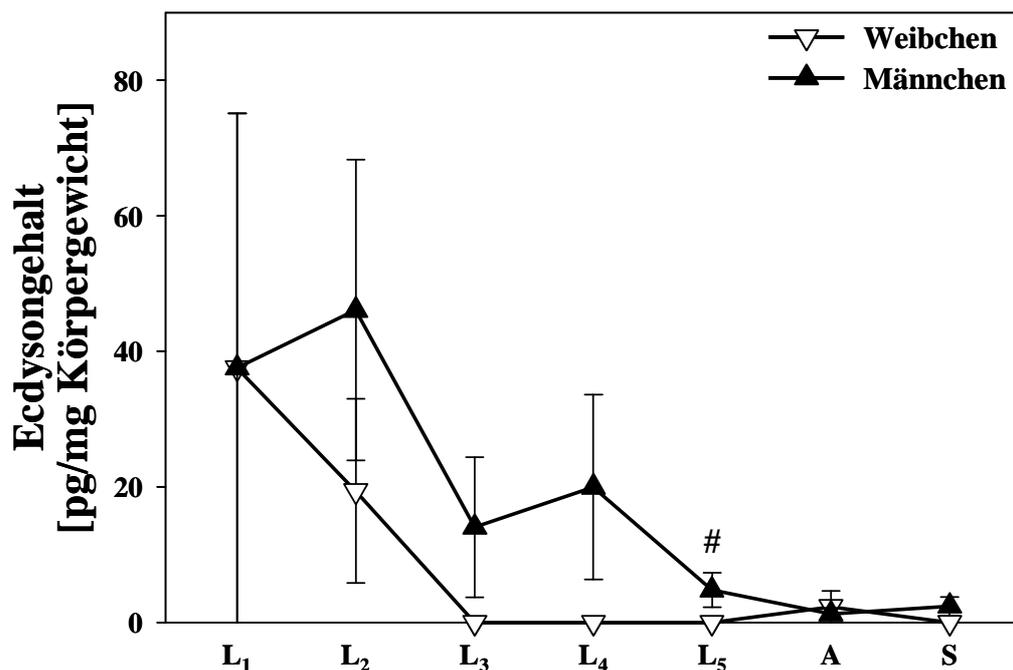


Abb. 25: Ecdysongehalt in Ganzkörperextrakten von Weibchen und Männchen verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Darstellung des Mittelwerts \pm Standardfehler des arithmetrischen Mittels. A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Werte für L₁ sind identisch bei Männchen und Weibchen, da in diesem Stadium die Unterscheidung zwischen den Geschlechtern nicht möglich ist. Mann-Whitney U-Tests innerhalb eines Entwicklungsstadiums zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen, lediglich in L₅ ist ein tendenzieller Unterschied vorhanden (#; $U = 66$; $Z = -1,668$; $P = 0,095$). Daten aus Abb. 23. $n = 6 - 47$.

Die Zusammenfassung des Ecdysongehalts in Ganzkörperextrakten beider Messreihen zeigte, dass die Eier nur geringe Mengen an Ecdyson enthielten (4 pg/mg Frischgewicht; Abb. 26). Der Ecdysongehalt der Eier lag damit unter dem der ersten vier Larvenstadien. Bei L_1 lag der Ecdysongehalt in der Messreihe 1 im Gegensatz zur Messreihe 2 in allen Proben unter der Nachweisgrenze. Eine Kombination der beiden Messreihen ergab dadurch einen geringeren Mittelwert für das erste Larvenstadium. Mit 28 ± 98 pg Ecdyson pro mg KG zeigte L_1 damit einen ähnlichen Ecdysongehalt wie L_2 (29 ± 102 pg/mg KG).

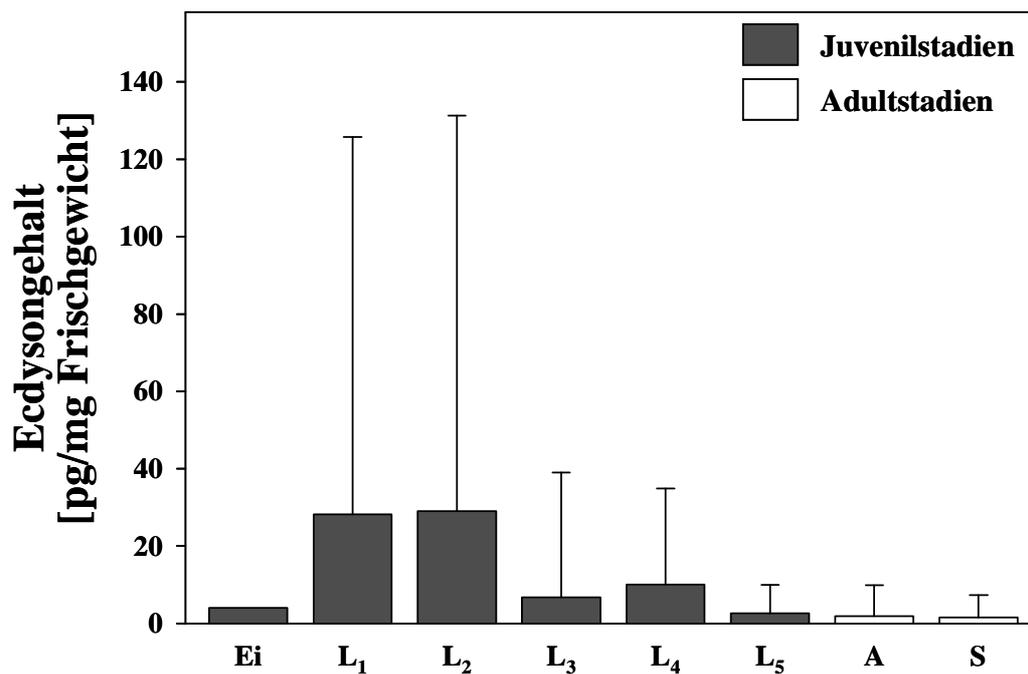


Abb. 26: Gehalt an Ecdyson in Ganzkörperextrakten verschiedener Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis* (Kombination Messung 1 und 2).

Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). A = Arbeiter, $L_n = n$. Larvenstadium, S = Soldaten. Daten teilweise aus Abb. 23. $n = 1 - 76$.

5.2 Identifikation der Sequenzen verschiedener Gene bei *Mastotermes darwiniensis* und *Cryptocercus darwini*

5.2.1 Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Mastotermes darwiniensis*

Zur Identifikation des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* wurden degenerierte Oligonukleotide aus bekannten Aminosäuresequenzen des AST-A Prohormonvorläufers von sechs verschiedenen Schabenarten (*Blaberus craniifer*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Diploptera punctata*, *Periplaneta americana*, *Supella longipalpa*; Kennnummern siehe Tab. 33; S. 84f) abgeleitet. Die degenerierten Oligonukleotide Mda_AS2aF und Mda_AS6R wurden in einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus Arbeitern von *M. darwiniensis* verwendet. Die Amplifikation führte zu einem 299 bp langen Fragment. Innerhalb des Fragments wurden vier potentielle Peptide mit dem für AST-A charakteristischen C-terminalen Ende kodiert. Von der Sequenz dieses Fragments wurde das Oligonukleotid Mda_AS140F abgeleitet, welches anschließend in zwei PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Als gegenläufige Oligonukleotide wurden die degenerierten Oligonukleotide Mda_AS14R1 und -R2 verwendet. Das resultierende Fragment hatte eine Länge von 745 bp und enthielt die kodierenden Sequenzen von neun potentiellen AST-A Peptiden. Aus der nun bekannten Sequenz mit einer Gesamtlänge von 887 bp konnten sequenzspezifische Oligonukleotide entwickelt werden. Für die Identifikation des 3'-Endes wurde die RACE-Methode verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden Mda_AS13F (sequenzspezifisch) und UPM (Bindung an Ankersequenz). Das resultierende Fragment hatte eine Länge von 209 bp und enthielt das komplette 3'-Ende der AST-A mRNA. Die Identifikation des 5'-Endes erfolgte mittels „Genome Walking“. Die Oligonukleotide Mda-TSP3 (sequenzspezifisch) und UniP (Bindung an Ankersequenz) wurden dafür verwendet und ergaben ein 284 bp langes Fragment, welches u. a. die Sequenz des Startcodons enthielt. Anschließend wurde die komplette Sequenz überprüft, indem mehrere Kombinationen von Oligonukleotiden für verschiedene PCR-Reaktionen mit cDNA aus Gehirnen männlicher und weiblicher Arbeiter als Matrize verwendet wurden. Die erhaltenen Fragmente hatten eine Länge von ca. 300 bis 800 bp und wurden separat sequenziert (siehe Tab. 42, Anhang S. 262). Zusätzlich wurden zwei Fragmente mit einer Polymerase amplifiziert, die durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturaktivität („Proofreading“) aufwies. Die beiden Fragmente waren 646 bp (Oligonukleotide: Mda_AS4F und Mda_AS9R) und 587 bp (Oligonukleotide: Mda_AS8F und Mda_AS950R) lang und beinhalteten die gesamte kodierende Region des AST-A Gens.

Eine Kombination aller Einzelfragmente ergab die endgültige Sequenz des AST-A Gens von *M. darwiniensis* mit einer Länge von 1238 bp (Abb. 30; S. 127). Eine Zusammenfassung des Ablaufs der Sequenzidentifikation und der Lage der sequenzierten Einzelfragmente befindet sich in Abb. 27 und in Tab. 42 im Anhang (S. 262).

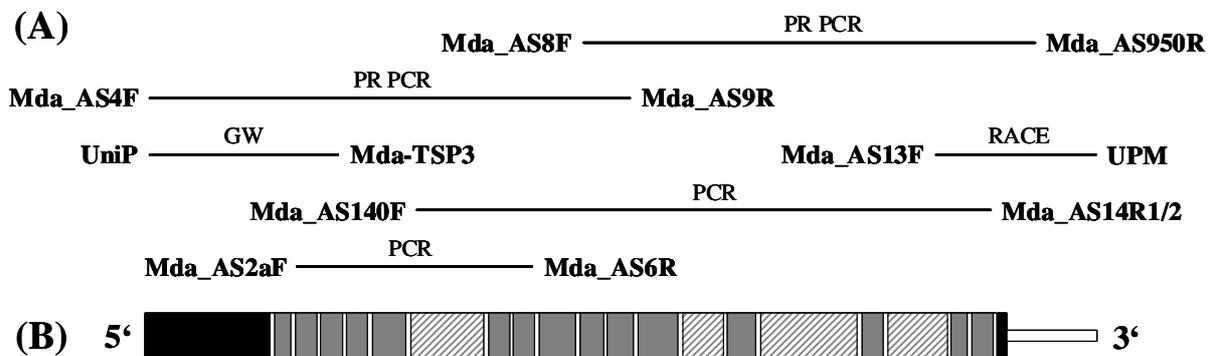


Abb. 27: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Lage der sequenzierten Einzelfragmente. Fettgedruckt: verwendete Oligonukleotide; normale Formatierung: Methode der Amplifikation. GW = Genome Walking, PCR = Polymerasekettenreaktion, PR = Proofreading, RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends. (B) Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz. Sequenzen dargestellt als Blöcke (breit: kodierende Region; schmal: nicht-kodierende Region). Schwarz: kodierende Regionen am 5'- und 3'-Ende (z. B. Signalpeptid), grau: potentielle Allatostatin A-Peptide, grau gestreift: saure Spacerregionen, weiß: dibasische Spaltungsstellen.

Die Kombination der sequenzierten Einzelfragmente führte zu einer 1238 bp langen Nukleotidsequenz, die die gesamte kodierende Region des AST-A Gens, das Start- und Stoppcodon und ein potentielles Polyadenylierungssignal enthielt (Abb. 30; S. 127). Der offene Leserahmen („open reading frame“; ORF) erstreckt sich über 1098 bp von Nukleotidposition (nt) 28 bis Position 1125. Das Startcodon ATG befindet sich an Nukleotidposition 28-30, das Stoppcodon TAG an Position 1123-1125. Das 3'-Ende erstreckt sich über 113 bp und enthält ein potentielles Polyadenylierungssignal (AATAAA) an Position 1190-1195. Die Sequenz enthält einen nicht-kodierenden Abschnitt am 5'-Ende von 27 bp.

Die mRNA kodiert ein Translationsprodukt aus 365 Aminosäuren. Eine Analyse mit SignalP v3.0 (Nielsen *et al.* 1997; Bendtsen *et al.* 2004) identifizierte die ersten neun Aminosäuren als Signalpeptid mit einer Spaltungsstelle zwischen Glycin (nt 52-54) und Threonin (nt 55-57). Signalpeptide befinden sich N-terminal und werden während des Transports des Peptids durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums durch die Signalpeptidase I abgespalten (von Heijne 1990). Ein Signalpeptid besteht aus drei Domänen – eine positiv

geladene n-Region (1 – 5 AS), eine hydrophobe h-Region (7 – 15 AS) und eine polare c-Region (3 – 7 AS) (Abb. 28; von Heijne 1990).

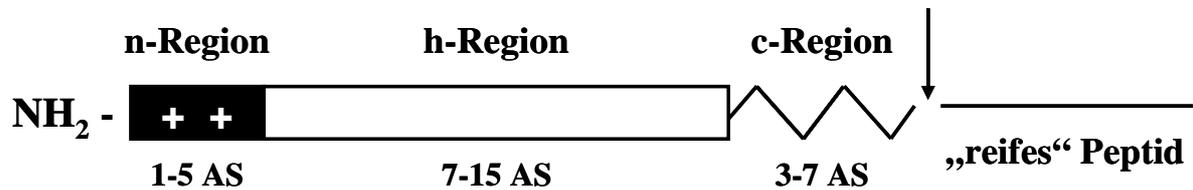
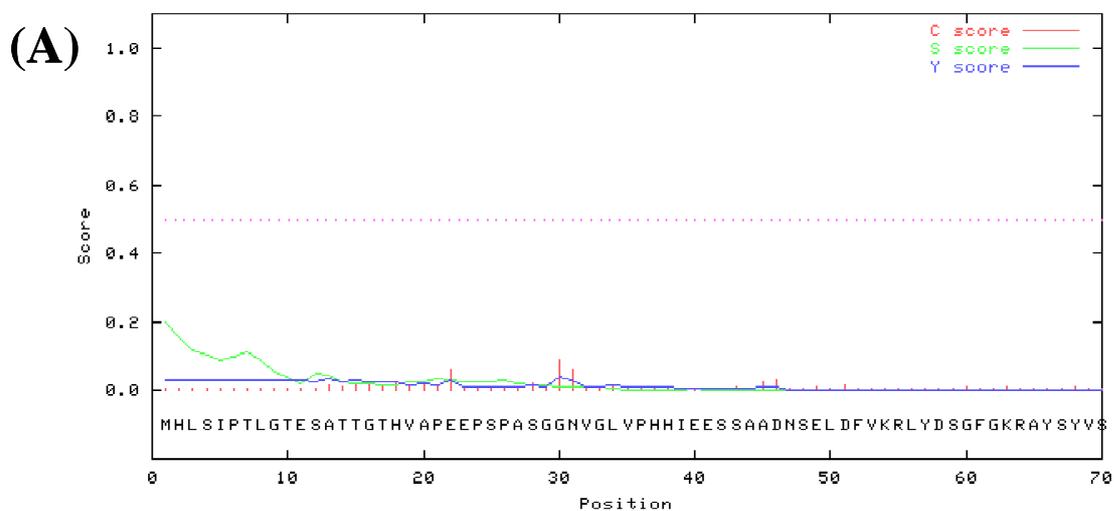


Abb. 28: Schematische Darstellung eines Signalpeptids.

Schwarz: n-Region mit positiv geladenen Aminosäuren, weiß: h-Region mit hydrophoben Aminosäuren, Zickzack-Linie: c-Region mit polaren Aminosäuren. AS = Aminosäuren. Der Pfeil stellt die Spaltungsstelle dar. (Bearbeitet nach: von Heijne 1990).

Die Analyse mit SignalP v3.0 identifizierte zwar ein Signalpeptid, allerdings nicht bei der Analyse der Aminosäuren ab Methionin (nt 28 – 30; Abb. 29A). Erst die Übersetzung der ersten 27 Nukleotide der Sequenz in Aminosäuren und eine erneute Analyse mit SignalP v3.0 mit der verlängerten Aminosäuresequenz identifizierte eine potentielle Spaltungsstelle (Abb. 29B). Die zusätzliche Aminosäuresequenz HTAILCVLL enthält mit Alanin, Isoleucin, Valin und 3x Leucin insgesamt sechs hydrophobe Aminosäuren. Daher entspricht sie wahrscheinlich einem Teil der h-Region des Signalpeptids. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass das Methionin an Position 28-30 wahrscheinlich nicht den Startpunkt der Translation darstellt, sondern dass in 5'-Richtung noch ein weiteres Methionin zu finden ist. Da diese Sequenz aber unbekannt ist, wurde weiterhin das Codon ATG an Position 28-30 als Startcodon bezeichnet.



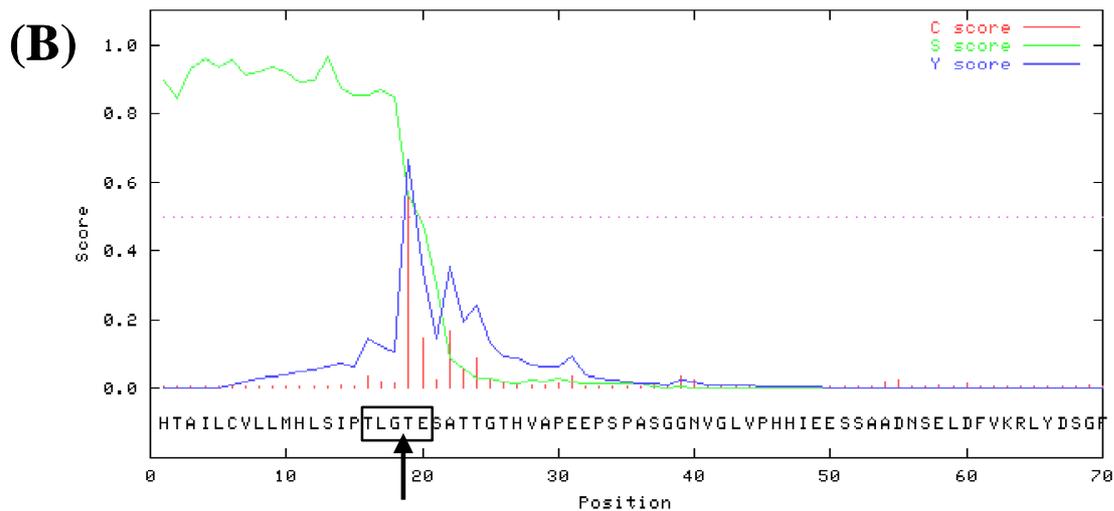


Abb. 29: Grafische Darstellung des Ergebnisses des SignalP v3.0-Programms zur Analyse der Aminosäuren der N-terminalen Region des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von *Mastotermes darwiniensis* (Algorithmus: Neural Network).

(A) Erste Analyse: Verwendet wurde die Aminosäuresequenz ab nt 28-30. Es wurde keine Spaltungsstelle für ein Signalpeptid gefunden. (B) Zweite Analyse: Verwendet wurde die Aminosäuresequenz ab nt 1-3. Es wurde eine Spaltungsstelle für ein Signalpeptid zwischen den Aminosäurepositionen 18 und 19 gefunden. Der Rahmen markiert die Aminosäuren an Position -3 bis +2 relativ zur Spaltungsstelle. Der Pfeil markiert die potentielle Spaltstelle. C score (rot) = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass Aminosäure die erste im „reifen“ Proteins ist; S score (grün) = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass Aminosäure zum Signalpeptid gehört; Y score (blau) = Kombination aus S und C score (Nielsen *et al.* 1997).

Das Translationsprodukt der cDNA enthält Spaltungsstellen, die die Prozessierung in 14 potentielle AST-A Peptide erlauben. Diese sind in Abb. 30 durchnummeriert in der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen (Masda-AST-1 bis 14). Die individuellen AST-A Peptide sind flankiert von dibasischen endoproteolytischen Schnittstellen aus Lysin und Arginin (Loh & Gainer 1983; Veenstra 2000). Es gibt drei Ausnahmen – eine Schnittstelle besteht aus Lys-Lys (Nukleotidposition 706-711), eine aus Arg-Arg (nt 1048-1053) und eine aus einem einzelnen Lys (nt 1108-1110). Zusätzlich befindet sich eine dibasische Schnittstelle aus Lys-Arg innerhalb von Masda-AST-2 an Position 244-249 und eine aus Arg-Arg innerhalb von Masda-AST-11 (nt 781-786). Von den 14 Peptiden weisen nur 11 die für AST-A Peptide charakteristische C-terminale Sequenz auf. Diese besteht aus einer Reihe von fünf Aminosäuren – Tyrosin/Phenylalanin-X-Phenylalanin-Glycin-Leucin/Isoleucin/Valin (Y/FXFGL/I/V). Das X steht für eine beliebige Aminosäure, hier ist es entweder Alanin, Asparagin, Aspartat, Glycin, Lysin, Prolin oder Serin. Masda-AST-1, Masda-AST-5 und Masda-AST-14 weichen von diesem Muster ab. Beim Peptid Masda-AST-1 (LYDSGF) scheint die Abweichung durch zwei Punktmutationen hervorgerufen worden sein. An Position 203 kam es wahrscheinlich zum Austausch von Thymin durch Cytosin und dadurch zum

Austausch von Phenylalanin durch Serin. Die Base Thymin an Position 208 ersetzte Cytosin und damit kam es zum Austausch von Leucin durch Phenylalanin. Beim Peptid Masda-AST-5 (ERLYSFDL) kam es wahrscheinlich ebenfalls zu einer Punktmutation. An Position 482 wurde Guanin durch Adenin ersetzt. Dadurch kam es zum Austausch von Glycin durch Aspartat. Der Austausch von Thymin durch Cytosin an Position 1103 führte offenbar zu einem Austausch von Isoleucin durch Threonin im Peptid Masda-AST-14 (IPIYDFGT).

Auf die Pentapeptidsequenz Y/FXFGL/I/V am C-terminalen Ende der AST-A Peptide folgt normalerweise die Aminosäure Glycin. Diese ermöglicht die Amidierung der Peptide durch die Peptidylglycin- α -Amidierung-Monooxygenase (Bradbury *et al.* 1982; Murthy *et al.* 1986; Eipper *et al.* 1992). Die Amidierung ist notwendig für die allatostate Aktivität (Pratt *et al.* 1989). Die Aminosäure Glycin findet sich allerdings nicht am Ende der Peptide Masda-AST-5, 9, 10 und 14. Bei den Peptiden Masda-AST-5, 9 und 14 ist die Abweichung durch jeweils eine Punktmutation zu erklären. Bei allen drei Peptiden fand ein Austausch von Guanin durch Adenin statt (nt 488, 647 bzw. 1106), wodurch es zu einem Austausch von Glycin durch Glutamat kam.

Neben den 14 Peptiden enthält der Prohormonvorläufer noch weitere 114 Aminosäuren. Diese sind in vier Regionen zusammengefasst, die zwischen den potentiellen AST-A Peptiden liegen und diese zu Gruppen zusammenfassen. Die vier Zwischenstücke werden auch Spacer genannt und sind in Abb. 30 ebenfalls nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen durchnummeriert (Spacer I bis IV). Die Spacer enthalten sehr häufig die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat (46 von 114 AS). Laut Schaefer *et al.* (1985) und Donly *et al.* (1993) haben die Spacer eine neutralisierende Funktion. Sie bilden das Gegengewicht zu den basischen Aminosäuren der Neuropeptide und Spaltungsstellen. Im AST-A Prohormonvorläufer ist dadurch die Anzahl der basischen und sauren Aminosäuren nahezu identisch (67 bzw. 66 AS).

5'-	CATACGGCGATCCTATGCGTACTGCTAATGCATCTCAGCATACCGACCCTCGGCACAGAATCGGCCACTACTGGGACCCAC	81
	M H L S I P T L G ↓ T E S A T T G T H	18
	GTGGCTCCTGAAGAACCTTCACCCGCTTCAGGAGGTAACGTGGGACTTGTGCCTCATCACATCGAAGAATCATCCGCAGCC	162
	V A P E E P S P A S G G N V G L V P H H I E E S S A A	45
	GACAATTCTGAAGTGGACTTCGTGAAACGACTTTATGACTCTGGTTTTGGAAAGCGTGCATATAGTTACGTGTCCGAATAC	243
	D N S E L D F V <u>K R</u> <u>L Y D S G F</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>A Y S Y V S E Y</u>	72
	Masda-AST-1	
	AAGCGACTGCCTGTTTATAAGTTTGGCTTGGGTAAGAGAAGTAAGGAGTACGGTTTCGGGCTGGGAAAGCGGGCGGGAGCT	324
	<u>K R</u> <u>L P V Y K F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>S K E Y G F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>A G A</u>	99
	Masda-AST-2 Masda-AST-3	
	GACGGCGCCGGTTCTATTCTTCGGTCTCGGCAAAAGGGAGGATGATGACGACTACGTTCAAGAAGGAAGACGAGAAT	405
	<u>D G G R F Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>E D D D D Y V Q E E E D E N</u>	126
	Masda-AST-4	
	CAAATAAATGGAACGATGAGCTTGAAGACTCCGATGTGGACACTATGGATAAACGTGAAAGGCTCTATTTCGTTTGTATCTA	486
	<u>Q I N G N D E L E D S D V D T M D</u> <u>K R</u> <u>E R L Y S F D L</u>	153
	Spacer I Masda-AST-5	
	GAAAAGAGGGTTCAGACCTTACAGTTTCGGTCTTGAAAACGAAGTCTTCTCAGGAATTCAGCGACTTTATGGGTTTGGT	567
	E <u>K R</u> <u>V R P Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>S P S S G I Q R L Y G F G</u>	180
	Masda-AST-6 Masda-AST-7	
	GTTGAAAAAGAGGAAGATCCTTGTACAGTTTCGGACTTGGCAAACGTTCTGACGGTAGACTGTATCCTTTTGGGCTGGAG	648
	<u>V</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>G R S L Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>S D G R L Y P F G L E</u>	207
	Masda-AST-8 Masda-AST-9	
	AAGAGCCTGCCAGTTCTGGTAGACAATCTGGAAGCCGTTTTAACTTCGGTCTTCTGAAAAATCATATGACACCAACTTG	729
	<u>K R</u> <u>P A S S G R Q S G S R F N F G L</u> <u>L</u> <u>K K</u> <u>S Y D T N L</u>	234
	Masda-AST-10	
	GAGGAATTTGAAGACGAAATGGAGGAAGAAGCAAAGAGATCTCCCAAGGACGCAGATATTCGTTTGGGATGGGAAACGT	810
	<u>E E F E D E M E E E A</u> <u>K R</u> <u>S P Q G R R Y S F G M G</u> <u>K R</u>	261
	Spacer II Masda-AST-11	
	GAGGTAGCTCCAGCGAACTTCAAGCCGTGAGAAATGAAGAACGAGTAAGGAGATGGATAACAAGGAAGAAAGCAGGAAT	891
	<u>E V A P S E L Q A V R N E E R V R E M D N K E E S R N</u>	288
	Spacer III	
	AATGGAAGTCTGAAGGTTACCACCACTCTGTGAAAGGGTGAAGAGAAGTCTTCACTACGCTTTCGGCTCGGAAAACGG	972
	<u>N G T A E G Y H H S A E R V</u> <u>K R</u> <u>S L H Y A F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u>	315
	Masda-AST-12	
	GCGTATGATTTGTATTCATCTCTTACGGCGATGAGGATGACGAGGTGGTGGTGAAGAATTTACCAGGCTCGTACGTCGA	1053
	<u>A Y D L Y S S L D G D E D D E V G D E E F T R L V</u> <u>R R</u>	342
	Spacer IV	
	CCTTCAAATTTGGCCTCGGTAAACGAATCCCAATTTACGATTTCCGGCACTGAAAAGCTATCGGAACGTTAGAATTTGGTT	1134
	<u>P F K F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>I P I Y D F G T E</u> <u>K</u> <u>L S E R</u> *	365
	Masda-AST-13 Masda-AST-14	
	CAATCCCGTCTCCCGAGTATTACCAACACCAACAGAAAATTTGCTCCTCTCTCAATAAAATTACTGACTCTAAATGTAC	1215
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA -3'	1238

Abb. 30: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fett gedruckt) des Allatostatin A-Gens von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die 14 potentiellen AST-A Peptide sind unterstrichen und nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen durchnummeriert. Die Zwischenstücke mit vorwiegend sauren Aminosäuren (Spacer) sind ebenfalls durchnummeriert und mit einer Wellenlinie unterstrichen. Mono- und dibasische Spaltstellen sind umrandet. Die für die Amidierung der einzelnen Peptide benötigten Glycin-Aminosäuren sind doppelt unterstrichen. Der Pfeil kennzeichnet die Stelle, an der das Signalpeptid potentiell abgespalten wird. Der Stern kennzeichnet das Stoppcodon. Das potentielle Polyadenylierungssignal AATAAA ist fett gedruckt.

5.2.2 Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Cryptocercus darwini*

Für die Identifikation des AST-A Gens der Schabe *C. darwini* wurden zu Beginn dieselben degenerierten Oligonukleotide verwendet wie bei der Identifikation der AST-A Sequenz von *M. darwiniensis*. Die Oligonukleotide Mda_AS2aF und Mda_AS6R wurden in einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA von *C. darwini* eingesetzt. Das dabei amplifizierte Fragment hatte eine Länge von 296 bp. Die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden Mda_AS2aF und Mda_AS14R2 führte zur Amplifikation eines 893 bp langen Fragments. Beide Fragmente enthielten Abschnitte, die die typische Y/FXFGL-Struktur der AST-A Peptide kodierten. Aus den Sequenzen beider Fragmente konnten nun sequenzspezifische Oligonukleotide entwickelt werden. Die Identifikation des 5'-Endes erfolgte mit dem „Genome Walking“-Verfahren. Die Oligonukleotide UniP (Bindung an Ankersequenz) und Cd-TSP3 (sequenzspezifisch) wurden dafür verwendet. Es konnte ein 376 bp langes Fragment amplifiziert werden, welches u. a. die Sequenz des Startcodons enthielt. Die Identifikation des 3'-Endes mit dem „Genome Walking“-Verfahren schlug dagegen fehl. Anschließend wurde die identifizierte Sequenz mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden überprüft, indem verschiedene Fragmente zwischen 450 und 660 bp Länge amplifiziert und sequenziert wurden (siehe Anhang, Tab. 44, S. 263). Zusätzlich wurden zwei Fragmente mit einer Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturaktivität) amplifiziert. Diese hatten eine Länge von 386 bp (Oligonukleotide: Cd_AS1F und Cd-TSP2) und 847 bp (Oligonukleotide: Cd_AS2bF und Cd_AS14R) und umfassten die gesamte kodierende Sequenz des AST-A Gens von *C. darwini* mit Ausnahme eines Stückes am 3'-Ende. Die Kombination der Einzelfragmente ergab eine Nukleotidsequenz mit der Länge von 1137 bp (Abb. 33; S. 133). Eine Zusammenfassung der einzelnen Fragmente und des Ablaufs der Sequenzidentifikation ist in Abb. 31 und in Tab. 44 (Anhang, S. 263) dargestellt.



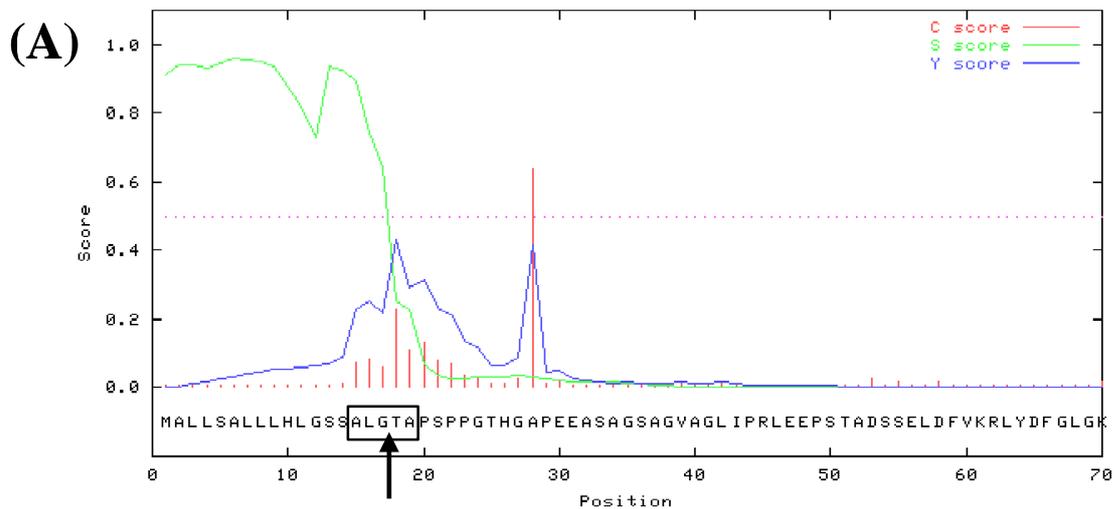
Abb. 31: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Cryptocercus darwini*.

(A) Lage der sequenzierten Einzelfragmente. Fettgedruckt: verwendete Oligonukleotide; normale Formatierung: Methode der Amplifikation. GW = Genome Walking, PCR = Polymerasekettenreaktion, PR = Proofreading. (B) Schematische Darstellung eines Teilfragments der cDNA-Sequenz. Sequenzen dargestellt als Blöcke (breit: kodierende Region; schmal: nicht-kodierende Region). Schwarz: kodierende Region am 5'-Ende (z. B. Signalpeptid), grau: potentielle Allatostatin A-Peptide, grau gestreift: saure Spacer, weiß: dibasische Spaltungsstellen. Das Fragezeichen deutet die bislang unbekannt Sequenz am 3'-Ende an.

Die identifizierte Teilsequenz des AST-A Gens von *C. darwini* ist 1137 bp lang und enthält das Startcodon und einen großen Teil des offenen Leserahmens (ORF) (Abb. 33; S. 133). Das Startcodon ATG liegt an Nukleotidposition 40-42. Der offene Leserahmen erstreckt sich über 1098 bp. Der Vergleich mit der Sequenz von *M. darwiniensis* zeigt, dass vermutlich noch ca. 30 Nukleotide bis zum Stoppcodon fehlen. Die Sequenz enthält einen nicht-kodierenden Abschnitt von 39 bp am 5'-Ende.

Die Übersetzung in Aminosäuren führt zu einem Translationsprodukt von 366 Aminosäuren. Der Vergleich mit der Sequenz von *M. darwiniensis* zeigt, dass am C-terminalen Ende des Prohormonvorläufers wahrscheinlich noch acht Aminosäuren fehlen. Die Analyse der N-terminalen Sequenz mit SignalP v3.0 (Nielsen *et al.* 1997; Bendtsen *et al.* 2004) ergab zwei potentielle Stellen für die Abspaltung eines Signalpeptids. Bei der Verwendung des „Neural Network“ (NN) Algorithmus wurde die wahrscheinlichste Spaltungsstelle zwischen Glycin (nt 88-90) und Threonin (nt 91-93) berechnet (Abb. 32A). Der Algorithmus „Hidden Markov Model“ (HMM; Nielsen & Krogh 1998) dagegen berechnete die wahrscheinlichste Spaltungsstelle zwischen Glycin (nt 118-120) und Alanin (nt 121-123) (Abb. 32B). Die Stelle, an der das Signalpeptid abgespalten wird, ist durch eine festgelegte Anordnung von Aminosäuren gekennzeichnet. Die wichtigste Regel ist die sogenannte „-3,-1-Regel“ (von Heijne 1983, 1986). Diese beschreibt die Aminosäuren, die an der dritten und ersten Stelle vor

der Spaltungsstelle (in 5'-Richtung) stehen dürfen. An Position -3 darf keine aromatische, geladene oder große und polare Aminosäure sein. Die Aminosäure an Position -1 muss klein sein, wie z. B. Alanin, Serin, Glycin, Cystein oder Threonin. Zusätzlich darf kein Prolin an den Stellen -3 bis +1 vorkommen (von Heijne 1986). Diese drei Voraussetzungen erfüllen beide potentielle Spaltungsstellen (Abb. 32). An Position -3 steht Alanin oder Threonin, an Position -1 bei beiden ein Glycin. Innerhalb der Positionen -3 bis +1 kommt kein Prolin vor. Neben der „-3,-1-Regel“ gibt es jedoch noch weitere Muster, die häufig in der Umgebung von solchen Spaltungsstellen gefunden werden. Die Aminosäure an Position -2 ist oft aromatisch (von Heijne 1983). Bei der Spaltungsstelle des HMM-Algorithmus (Abb. 32B) wird diese Regel erfüllt, es steht ein Histidin an Position -2. Die Spaltungsstelle des NN-Algorithmus hat an dieser Position ein Leucin (Abb. 32A). Außerdem befinden sich die Aminosäuren Prolin und Glycin häufig an Position -5 und -4 (von Heijne 1983). Die Spaltungsstelle des NN-Algorithmus hat die Aminosäure Serin an Position -5 und -4 (Abb. 32A). Bei der Spaltungsstelle des HMM-Algorithmus dagegen befindet sich Prolin an Position -6 und -5 sowie Glycin an Position -4 (Abb. 32B). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Berechnung mit dem HMM-Algorithmus das wahrscheinlichere Ergebnis liefert. Das Signalpeptid ist somit 27 Aminosäuren lang und wird zwischen Glycin (nt 118-120) und Alanin (nt 121-123) abgespalten.



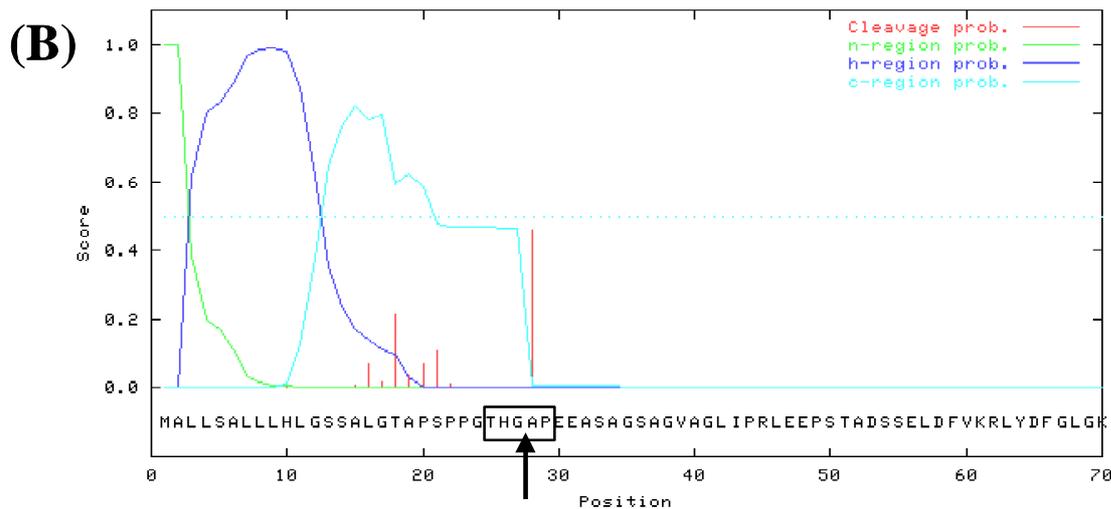


Abb. 32: Grafische Darstellung des Ergebnisses des SignalP v3.0-Programms zur Analyse der Aminosäuren der N-terminalen Region des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von *Cryptocercus darwini*.

(A) Algorithmus Neural Network: Das Signalpeptid wird zwischen ALG-TA abgespalten. C score (rot) = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass Aminosäure die erste im „reifen“ Proteins ist; S score (grün) = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass Aminosäure zum Signalpeptid gehört; Y score (blau) = Kombination aus S und C score (Nielsen *et al.* 1997). (B) Algorithmus Hidden Markov Modell: Das Signalpeptid wird zwischen THG-AP abgespalten. Prob. = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass Aminosäure zur n-Region (grün), h-Region (blau) oder c-Region (hellblau) des Signalpeptids gehört. Rot = Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Abspaltung (cleavage prob.) (Nielsen & Krogh 1998). Der Rahmen markiert die Aminosäuren in Position -3 bis +2 relativ zur Spaltungsstelle. Der Pfeil zeigt die potentielle Spaltungsstelle.

Die Aminosäuresequenz des AST-A Gens von *C. darwini* (Abb. 33) enthält Schnittstellen, die die Prozessierung in mindestens 13 potentielle AST-A Peptide erlauben. Diese dibasischen endoproteolytischen Schnittstellen bestehen aus der Aminosäure Lysin, gefolgt von der Aminosäure Arginin (Loh & Gainer 1983; Veenstra 2000). In einem Fall kommt es zu einer Paarung von Arg-Arg (nt 1187-1192), in einem anderen Fall zur Paarung Arg-Lys (nt 913-918). Die 13 potentiellen AST-A Peptide sind in Abb. 33 nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen durchnummeriert (Cryda-AST-1 bis 13). Da die Sequenz am 3'-Ende nicht vollständig ist, können die verbleibenden sechs Aminosäuren, die sich an die dibasische Spaltungsstelle nach Cryda-AST-13 anschließen, nicht eindeutig zugeordnet werden. Im Vergleich zur Sequenz von *M. darwiniensis* (Abb. 30; S. 127) fällt jedoch auf, dass die Aminosäuren fast identisch sind – IPIYDF (*M. darwiniensis*) und IPMYDF (*C. darwini*). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Sequenz dem Anfang des 14. AST-A Peptids entspricht. In Abb. 33 wird sie entsprechend als Cryda-AST-14 bezeichnet. Die 13 vollständigen Peptide weisen alle die für AST-A charakteristische C-terminale Sequenz Y/FXFGL auf. Das X steht für eine beliebige Aminosäure, bei *C. darwini* entweder Alanin, Asparagin, Aspartat, Glycin oder Serin. Nach dem Pentapeptid Y/FXFGL folgt bei jedem der

13 Peptide Glycin, welches – wie bereits erwähnt – wichtig für die Amidierung der Peptide durch die Peptidylglycin- α -Amidierung-Monooxygenase ist (Bradbury *et al.* 1982; Murthy *et al.* 1986; Eipper *et al.* 1992).

Neben den 13 (bis 14) potentiellen AST-A Peptiden enthält der Prohormonvorläufer weitere 117 Aminosäuren. Diese sind in vier Bereichen zusammengefasst, die zwischen den AST-A Peptiden liegen und diese zu Gruppen zusammenfassen. Die vier Zwischenstücke werden Spacer genannt und sind in Abb. 33 ebenfalls nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen durchnummeriert (Spacer I bis IV). Mit fast 40 Prozent sind die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat in den Spacern überdurchschnittlich häufig vertreten. Die sauren Spacer stellen ein Gegengewicht zu den basischen Aminosäuren der Peptide und endoproteolytischen Spaltungsstellen dar (Schaefer *et al.* 1985; Donly *et al.* 1993). So ist die Anzahl an basischen und sauren Aminosäuren im AST-A Prohormonvorläufer von *C. darwini* fast identisch mit 62 bzw. 59 Aminosäuren.

5'-	GGTCTGCGCTCGTGTGGCACCATTCGGGTCCTTCAGATGGCGCTTCTATCAGCGCTGCTGCTCCATCTCGGGTCATCG	81
	M A L L S A L L L H L G S S	14
	GCCCTAGGAACAGCACCATCTCCTCTGGAAGCTCACGGGGCTCCTGAAGAAGCTTCCGCCGTTTCAGCCGGGTGCGCCGGA	162
	A L G↓T A P S P P G T H G↓A P E E A S A G S A G V A G	41
	CTCATACCCCGTCTTGAGGAACCTTCCACGGCCGACAGCTCCGAACTGGACTTCGTGAAACGACTTTACGATTTTCGGCCTT	243
	L I P R L E E P S T A D S S E L D F V <u>K R</u> <u>L Y D F G L</u>	68
	Cryda-AST-1	
	GGGAAGCGTGCCTACAGTTACGTATCGGAATACAAACGACTACCCGTTTACAATTTTCGGACTGGGAAAAGAAGCAAGATG	324
	<u>G</u> <u>K R</u> <u>A Y S Y V S E Y</u> <u>K R</u> <u>L P V Y N F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>S K M</u>	95
	Cryda-AST-2	
	TACGGATTTGGGCTTGGTAAGCGAGCCGTAGCAGACGGCAGGTTGTACTCCTTCGGCCTTGGGAAACGAGACTACGACGAT	405
	<u>Y G F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>A V A D G R L Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>D Y D D</u>	122
	Cryda-AST-3	Cryda-AST-4
	TACATTCAAGAAGACGAAGACGAAGATCAGATCAACGGAGACGAGAACTGAAGATTCTGATGTGGATTTTATGGCCAAA	486
	<u>Y I Q E D E D E D Q I N G D E E L E D S D V D F M A</u> <u>K</u>	149
	Spacer I	
	CGGAAAGGCTTTACTCTTTGGATTAGGGAAGAGGGCTAGGCCCTACAGTTTCGGACTTGGTAAGCGTATTCGGTCTTCA	567
	<u>R</u> <u>E R L Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>A R P Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>I P S S</u>	176
	Cryda-AST-5	Cryda-AST-6
	GGAATCCAGCGACTGTACGGCTTTGGTCTTGGTAAGAGAGAGGTTCTATGTATAGCTTCGGTCTTGGCAAACGCGGTGAT	648
	<u>G I Q R L Y G F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>G G S M Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>G D</u>	203
	Cryda-AST-7	Cryda-AST-8
	GGACGCTGTATTCTTTGGGCTGGGAAAGAGCCGGTGAGTTCTGGAAGGCTAGCCGGAAGCCGATTCAACTTCGGCCTT	729
	<u>G R L Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>P V S S G R L A G S R F N F G L</u>	230
	Cryda-AST-9	Cryda-AST-10
	GGAAAGAGGTCAGACGATATCGACTTGAATGAACTCGAGGAAGAGATTGAGGAGGAAGGTAAGAGGACACCTGCAGGTAC	810
	<u>G</u> <u>K R</u> <u>S D D I D L N E L E E E I E E E G</u> <u>K R</u> <u>T P A G H</u>	257
	Spacer II	
	AGGTTTTCATTTGGCCTTGGAAAACGTCGAGGTCGCACCCAGCGAACTGGAAGCAGTCAGGAATGAAGAGAGGGAAAAGAG	891
	<u>R F S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>E V A P S E L E A V R N E E R E K E</u>	284
	Cryda-AST-11	
	ACGAACCACAAGGAAGAACTAGGAAGAACGGGACAGATGAGGTGTACCAACATTCTGGGGACAGGGTGAAGAGAAGTCTG	972
	<u>T N H K E E T</u> <u>R K</u> <u>N G T D E V Y Q H S G D R V</u> <u>K R</u> <u>S L</u>	311
	Spacer III	
	CATTACGCCTTTGGTCTCGGAAAACGGGGTCTCCTCGCCGTACGATTTGGAATCATCATTCGACAGCAATGAGAATGAT	1053
	<u>H Y A F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>G S P S P Y D L E S S F D S N E N D</u>	338
	Cryda-AST-12	Spacer IV
	GAATTGGCGCTGAAGAATTGCTCGGATCGTCCGTCGACCTTACAGCTTTGGCCTTGGCAAACGAATTCCCATGTACGAC	1134
	<u>E L G A E E F A R I V</u> <u>R R</u> <u>P Y S F G L</u> <u>G</u> <u>K R</u> <u>I P M Y D</u>	365
	Cryda-AST-13	Cryda-AST-14
TTY -3'		1137
	<u>F</u>	366

Abb. 33: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fett gedruckt) des Allatostatin A-Gens von *Cryptocercus darwini*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Die 13 (-14) potentiellen AST-A Peptide sind unterstrichen und nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Gen durchnummeriert. Die Zwischenstücke mit vorwiegend sauren Aminosäuren (Spacer) sind ebenfalls durchnummeriert und mit einer Wellenlinie unterstrichen. Dibasische Spaltstellen sind umrandet. Die für die Amidierung der einzelnen Peptide benötigten Glycin-Aminosäuren sind doppelt unterstrichen. Die Pfeile kennzeichnen die zwei möglichen Stellen, an denen das Signalpeptid potentiell abgespalten wird (SignalP 3.0: Algorithmen Neural Network und Hidden Markov Modell).

5.2.3 Sequenz verschiedener Referenzgene von *Mastotermes darwiniensis*

Bei *M. darwiniensis* wurden erst relativ wenige Gene sequenziert. Die bekannten Sequenzen sind fast ausschließlich auf das mitochondriale Genom (Cytochromoxidase Untereinheit I und II) und ribosomale RNA-Gene (16S, 18S und 28S) beschränkt. Daher wurden neben dem untersuchten AST-A Gen Abschnitte weiterer Gene identifiziert, die als Referenzgene zur Normalisierung der Expression von AST-A dienen sollten. Die Identifikation der Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Elongationsfaktor 1 alpha (EF1 α) schlug fehl, da keine spezifischen Fragmente amplifiziert werden konnten. Allerdings konnten Simon *et al.* (2010) inzwischen die Sequenz von EF1 α aus *M. darwiniensis* (EU414693.2) identifizieren. Die Sequenz von GAPDH dagegen ist weiterhin unbekannt.

Die Amplifikation eines Abschnitts des β -Aktin Gens von *M. darwiniensis* erfolgte mit den Oligonukleotiden Rfl_ActF2 und Rfl_ActR2, die von der Sequenz des β -Aktin Gens der Termiten *Reticulitermes flavipes* (DQ206832.1) abgeleitet worden waren. Das amplifizierte Fragment war 496 bp lang. Die Übersetzung der Nukleotidsequenz in Aminosäuren zeigte eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung mit bereits bekannten Aminosäuresequenzen des β -Aktin Gens der Termitenarten *Coptotermes formosanus* (AB433199.1), *C. acinaciformes* (AF339151.1), *Nasutitermes takasagoensis* (AB501107.1), *Reticulitermes speratus* (AB520714.1) und *R. flavipes*. Zur Überprüfung der Sequenz wurde eine erneute Amplifikation mit dem sequenzspezifischen Oligonukleotid Mda_Act400R und dem vorher erwähnten Rfl_ActF2 durchgeführt. Als Matrize diente cDNA, synthetisiert aus isolierter RNA aus Oberschlundganglien von *M. darwiniensis*-Arbeitern. Die Sequenz des Teilfragments von β -Aktin ist im Anhang dargestellt (Abb. 67, S. 260).

Die degenerierten Oligonukleotide für die Amplifikation der Gene der Untereinheiten 3 und 4 der NADH-Dehydrogenase (ND3 und ND4) wurden von bekannten Sequenzen verschiedener Insektenordnungen abgeleitet.

Die Amplifikation mit den Oligonukleotiden Mda_ND31F und Mda_ND31R ergab ein Fragment des ND3-Gens mit einer Länge von 217 bp. Nach der Übersetzung der Nukleotidsequenz in Aminosäuren erfolgte ein Vergleich mit bekannten Aminosäuresequenzen von vier Termitenarten der Gattung *Reticulitermes* (*R. flavipes*, NC_009498.1; *R. santonensis*, NC_009499.1; *R. virginicus*, NC_009500.1; *R. hageni*,

NC_009501.1) und mit *C. formosanus* (NC_015800.1). Die Sequenzen zeigten eine Übereinstimmung von ca. 80%.

Das Fragment des ND4-Gens, das mit den Oligonukleotiden Mda_ND41F und Mda_ND41R amplifiziert wurde, hatte eine Länge von 245 bp. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wies eine Übereinstimmung von ca. 70% mit den Aminosäuresequenzen der oben genannten Termitenarten auf. Durch die hohe Übereinstimmung kann auf eine korrekte Identifikation beider Gene geschlossen werden. Die Sequenzen der Teilfragmente von ND3 und ND4 sind im Anhang (Abb. 68 und 69, S. 261) dargestellt.

Zum Zeitpunkt der Versuche zur Identifikation der Gene ND3 und ND4 war deren Sequenz bei *M. darwiniensis* noch nicht bekannt. Kürzlich wurde jedoch das gesamte mitochondriale Genom von *M. darwiniensis* sequenziert und veröffentlicht (Kennnummer: JX144929.1; Cameron *et al.* 2012). Der Vergleich der Sequenzen der hier identifizierten Fragmente von ND3 und ND4 mit der Sequenz der Gendatenbank zeigt eine hohe Übereinstimmung bei beiden Genen. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von ND3 wies eine Übereinstimmung von 96% mit der Sequenz der Gendatenbank auf. Die Aminosäuresequenz von ND4 zeigte mit einer Abweichung von nur einer Aminosäure eine Übereinstimmung von 99%.

Die sequenzierten Einzelfragmente der Gene β -Aktin, ND3 und ND4 sind im Anhang in Tab. 43 (S. 262) zusammengefasst.

5.3 Phylogenetische Sequenzanalyse

5.3.1 Vergleich der Sequenzen des Allatostatin A-Prohormonvorläufers innerhalb der Dictyoptera

Als Grundlage für die Stammbaumberechnung zur Einordnung der AST-A Sequenzen von *M. darwiniensis* und *C. darwini* in die bestehende Systematik der Insekten erfolgte eine Alignierung aller bisher bekannten AST-A Sequenzen von Insekten. Im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der AST-A Prohormonvorläufer von sechs verschiedenen Schabenarten und der Termitenart *R. flavipes* zeigen die Sequenzen von *M. darwiniensis* und *C. darwini* große Ähnlichkeit (Abb. 34, S. 138f). Die Prohormonvorläufer von *C. darwini* und *M. darwiniensis* enthalten je 14 potentielle AST-A Peptide und vier saure Spacerregionen. Bei den Schaben *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana* und der Termitenart *R. flavipes* trifft dies ebenfalls zu. Bei den anderen vier Schabenarten kodiert das AST-A Gen vermutlich nur für 13 potentielle AST-A Peptide. Die Aminosäuresequenz von AST-1 ist identisch bei allen Schaben und *R. flavipes*, während es bei *M. darwiniensis* durch die bereits beschriebenen zwei Punktmutationen zum Austausch von zwei Aminosäuren kommt. AST-2 ist ebenfalls identisch innerhalb der Dictyoptera, bis auf einen Aminosäureaustausch von Asn gegen Lys bei *M. darwiniensis*. AST-3 und 6 sind bei allen untersuchten Schabenarten konserviert, die Sequenz der beiden Termitenarten weicht um eine bzw. zwei Aminosäuren (AST-3 bei *R. flavipes*) ab.

Insgesamt zeigen die Aminosäuresequenzen der AST-A Prohormonvorläufer von *C. darwini* und *M. darwiniensis* die größte Ähnlichkeit zu denen der Termitenart *R. flavipes* und der beiden Schaben *B. orientalis* und *P. americana*. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz aller AST-A Peptide, des Amidierungssignals Glycin und der endoproteolytischen Schnittstellen zeigt, dass die Aminosäuren der erwähnten Arten zu 82 bis 99% übereinstimmen (Tab. 41). *M. darwiniensis* zeigt dabei die größten Abweichungen zu den anderen Sequenzen, mit Werten von nur 82 bis 84% Übereinstimmung, während die anderen Arten Übereinstimmungen von 91 bis 99% aufweisen. Hervorgerufen werden diese Abweichungen bei *M. darwiniensis* vor allem durch Änderungen der Aminosäureabfolge am C-terminalen Ende bzw. beim Amidierungssignal und den endoproteolytischen Schnittstellen von AST-1, 5, 9, 10 und 14.

Tab. 41: Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers der Schaben *Cryptocercus darwini*, *Blatta orientalis* und *Periplaneta americana* sowie der Termiten *Mastotermes darwiniensis* und *Reticulitermes flavipes*.

Vergleich der Sequenzen der potentiellen AST-A Peptide, der Amidierungssignale und der endoproteolytischen Schnittstellen. Prozentsatz der Ähnlichkeit (von links nach rechts) und Gleichheit der Sequenzen (von oben nach unten).

	<i>M. darwiniensis</i>	<i>R. flavipes</i>	<i>C. darwini</i>	<i>B. orientalis</i>	<i>P. americana</i>
<i>M. darwiniensis</i>	-	86,3	86,6	86,6	85,8
<i>R. flavipes</i>	82,0	-	93,3	93,3	94,0
<i>C. darwini</i>	83,8	90,5	-	92,1	92,7
<i>B. orientalis</i>	82,7	90,5	91,0	-	99,4
<i>P. americana</i>	82,0	90,7	91,6	99,4	-

Bei der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* (Ordnung Ensifera), die für folgende Stammbaumberechnungen als Außengruppe fungierte, enthält der AST-A Prohormonvorläufer ebenfalls 14 potentielle AST-A Peptide und vier Spacerregionen. Die Aminosäureabfolge des Prohormonvorläufers von *G. bimaculatus* stimmt jedoch nur zu 71 bis 83% mit der der Schaben und Termiten überein (siehe Anhang, Tab. 45, S. 263). Dies weist auf eine enge Verwandtschaft der Schaben und Termiten hin, die im Folgenden durch Stammbaumanalysen weiter untersucht werden soll.

B. craniifer 1 MPGPR-TYITLPAALLL-VLISLSTTALGTATEP---SGVHEE SPAGGG--AELLPH-PEEL SASDNDLE FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
D. punctata 1 MSGPR-TCFCLPSALVL-VLISLSTSALGTAPEP---SGVHEE SPAGGG--TDLLPH-PEEL SASDNDLE FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
B. germanica 1 MPGPR-TWYSLQAALVLSLLLKLSSSAFA TTT SAG-THAVQEE SSAGGG--AEILPR-LEEL--ADNSELDLVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
S. longipalpa 1 MPDSR-TCISLQAVLLLALLLQLANSAFGTATAP---AGSPEEAS SNAG--SELLSH-LEES---ENFELD FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
C. darwini 1 -----MALLSALLLHLGSSALGTAPSPFGTHCAPEEASAGSAGVAGLIPR-LEEPSTADSSSELD FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
M. darwiniensis 1 -----MHLSP TLTGTESATTC THVAP EEPSPASCGNVGLVPHHEES SAADNSELD FVKRLYDSGFGKRA YSVSEYKRLPVYK
B. orientalis 1 -----VNDLSELDFTKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
P. americana 1 -----MGFLQLILLIILHLSTGSLATAPANSCHNGAPEEIPSGAATGSGLLPH-LEESVNDNSELD FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
R. flavipes 1 MPGLQPCSRYSQVVFV CVLLQLSVLALGTVPNSGSHCTPEE SSSGSGSGVGLLPH-NEETSAAADNTELD FVKRLYDFGLGKRA YSVSEYKRLPVYN
G. bimaculatus 1 -----PASDAAAQEAAGELLERLENEAGSG-----ATP DDELEFYKRLYDFGVGKRA YSVSEYKRLPVYN

1 2

B. craniifer 92 FGLGKRS--KMYGFGLGKR---DG-RMYSFGLGKR---DYD-YYGE-DEDDQLANGDEDIEDSEVGDLDLIDKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRAP--SG
D. punctata 92 FGLGKRS--KMYGFGLGKR---DG-RMYSFGLGKR---DYD-YYGEEDDEDQQAIGDEDIEESDVGDLMDKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRAP--SG
B. germanica 93 FGLGKRS--KMYGFGLGKRAGSDG--RLYSFGLGKR---DYDDY YGDDDEEDHOTS ADEDIEDADSVDLMDKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRAP--SS
S. longipalpa 90 FGLGKRS--KMYGFGLGKRAGSDS--RLYSFGLGKR---DYDDY YEEDEDEDQSSG--EDIDDSDAVDLVDKRERLYSFGLGKRARPYSFGLGKRAPSSG
C. darwini 87 FGLGKRS--KMYGFGLGKRAVADG--RLYSFGLGKR---DYDDY IQE-DEDEDQINGDEELEDSD--VDFMAKRERLYSFGLGKRARPYSFGLGKRIPSSG
M. darwiniensis 80 FGLGKRS--KEYGFGLGKRAGADCGRFYSFGLGKRE--DDDDYVQE--EEDENQINGNDELEDSD--VDIMDKRERLYSFDLEKRVRPYSFGLGKRSPSSG
B. orientalis 37 FGLGKRS--KMYGFGLGKRSGNDG--RLYSFGLGKR---DYDDY IQE-DEDEDISSGDDVDNSEYEDLMDKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRSPS--G
P. americana 92 FGLGKRS--KMYGFGLGKRSGNDG--RLYSFGLGKR---DYDDY IQE-DEDEDISSGDDVDNSEYEDLMDKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRSPS--G
R. flavipes 99 FGLGKRN--KTYGFGLGKRAGADG--RLYSFGLGKR---DYDDY IQE-DED--VIDDEEDLDDAD--VDLMEKRDRLYSFGLGKRARPYSFGLGKRSPSSG
G. bimaculatus 63 FGLGKRAGGRQYGFGLGKRAG--G-RQYGFGLGKRTPGDEDDY YFP--DEEEEDVPEENLDDSD---SVDKRDRLYSFGLGKRSPFGLGKRAG---

2 3 4 5 6 7

B. craniifer 179 TQRLYAFGLGKRAGSSLYSFGLGKRGEGRLYGFGLGKRPNVSGRSGSRFNFGLGKRSEDDIDIRDL EEFKFAEEKRYPOEHRFAFGLGKREVAPSELEA
D. punctata 180 AQRLYGFGLGKRGGSLYSFGLGKRGDGRLYAFGLGKRPNVSGRSGSRFNFGLGKRSDDDIDIRLEEFKFAED-KRYPOEHRFSFGLGKREVAPSELEA
B. germanica 185 AQRLYGFGLGKRA---LYSFGLGKRAGGRLYSFLGKRPNVSGRQSGSRFNFGLGKRSDDFDIRLEEFKFAEEDKRSPQOHRFSFGLGKREVAPSELEA
S. longipalpa 182 VQRLYGFGLGKRGGSLYSFGLGKRGGRLYAFGLGKRPNVSGRQ TGSRFNFGLGKRSEDDI-----EEDKRFPOHRFAFGLGKRKLHPVSI EA
C. darwini 178 IQRLYGFGLGKRGGSMYSFGLGKRGDGRLYSFLGKRPNVSSGRLAGSRFNFGLGKRSDDDIDINEL EEEIEEEGKRTPAGHRFSFGLGKREVAPSELEA
M. darwiniensis 173 IQRLYGFGLGKRGGSLYSFGLGKRSDGRLYPFLGKRPNVSSGRLAGSRFNFGLGKRSDDDIDINEL EEEIEEEGKRTPAGHRFSFGLGKREVAPSELEA
B. orientalis 128 MQRLYGFGLGKRGGSMYSFGLGKRADGRLYAFGLGKRPNVSSARQTGSRFNFGLGKRSEIDDKET EEEIEAEEGKRSPQOHRFSFGLGKREVAPSELEA
P. americana 183 MQRLYGFGLGKRGGSMYSFGLGKRADGRLYAFGLGKRPNVSSARQTGSRFNFGLGKRSEIDDKET EEEIEAEEGKRSPQOHRFSFGLGKREVAPSELEA
R. flavipes 188 NQRLYGFGLGKRGGSLYSFGLGKR--GRLYSFLGKRPNVSGRQSGSRFNFGLGKRSEIDSWDEY EEDIEAEEGKRSPQOHRFAFGLGKREVAPGELEA
G. bimaculatus 151 ---MYSFGLGKRAQH-QYSFGLGKRGEGRMYSFGLGKRPNYERMAGSRFNFGLGKR--ADANPAYLLSDLGEE--KRGP--DHRFAFGLGKREVSPNELEA

7 8 9 10 11

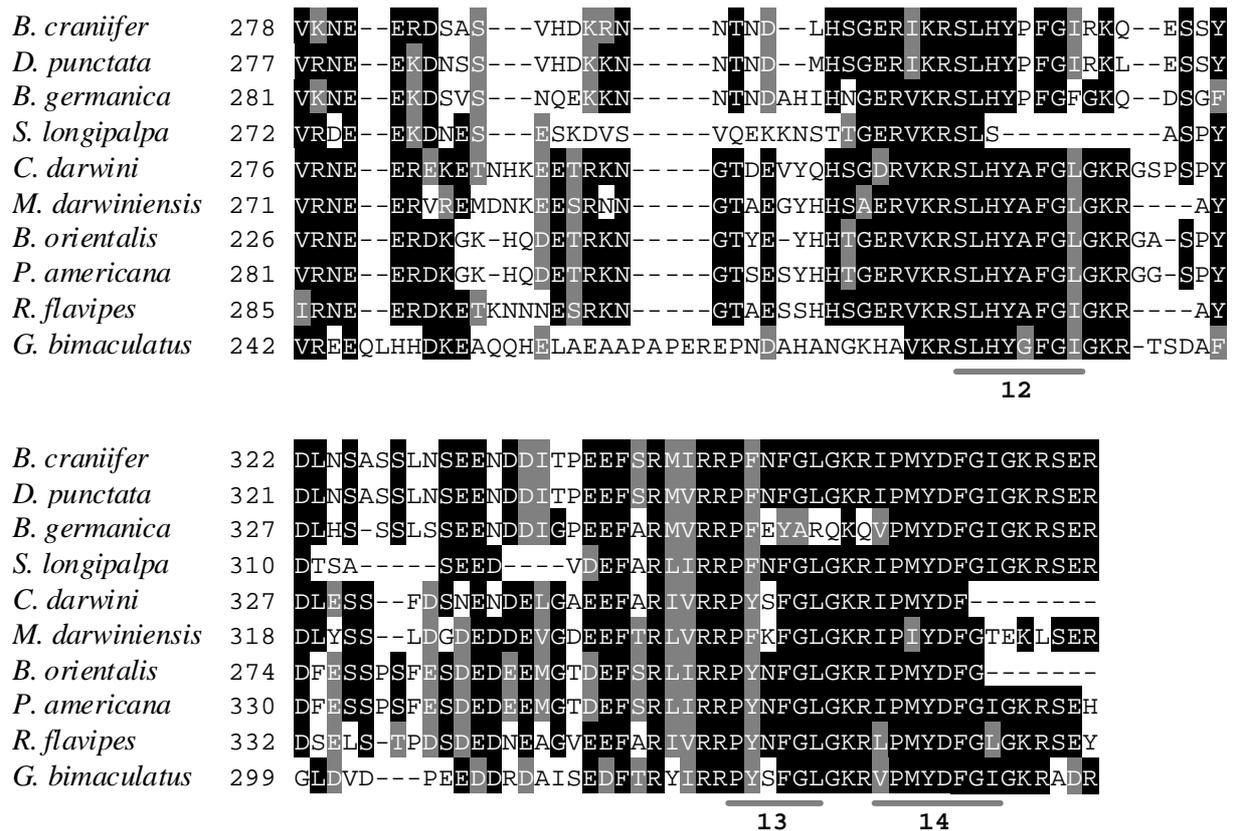


Abb. 34: Alignment der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers von sieben Schaben-, zwei Termiten- und einer Grillenart.

Die Alignierung erfolgte mit dem Programm ClustalX (Version 2.0.9), die Darstellung durch das Programm BOXSHADE (Version 3.21). Die Schwelle wurde bei 50% festgelegt. Schwarze Boxen bedeuten Gleichheit, graue Boxen Ähnlichkeit. Einzelne AST-A Peptide sind durch graue Balken gekennzeichnet und entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens im Prohormonvorläufer durchnummeriert. Schaben: *Blaberus craniifer*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Cryptocercus darwini*, *Diploptera punctata*, *Periplaneta americana*, *Supella longipalpa*; Termiten: *Mastotermes darwiniensis*, *Reticulitermes flavipes*; Grillen: *Gryllus bimaculatus*. Kennnummern siehe Tab. 33, S. 84f.

5.3.2 Phylogenetische Sequenzanalyse anhand von Stammbaumberechnungen

Zur Einordnung der identifizierten AST-A Sequenzen von *M. darwiniensis* und *C. darwini* in die bestehende Systematik der Insekten wurden phylogenetische Analysen durchgeführt. Es wurden verschiedene Stammbäume berechnet. Zunächst erfolgte die Einordnung von *M. darwiniensis* und *C. darwini* innerhalb der Überordnung Dictyoptera anhand der Nukleotid- und der daraus resultierenden Aminosäuresequenz von AST-A. Anschließend wurde eine phylogenetische Analyse bisher bekannter AST-A Sequenzen von 42 Vertretern acht verschiedener Insektenordnungen durchgeführt. Für alle Stammbäume – bis auf die Analyse der AST-A Nukleinsäuresequenz der acht verschiedenen Insektenordnungen –

erfolgten zwei Berechnungen – zum einen mittels Bayesian Inference (BI), zum anderen mittels des Neighbor-Joining-Verfahrens (NJ).

Die Stammbaumberechnung mit Nukleotidsequenzen des AST-A Gens (Abb. 35) und mit Aminosäuresequenzen des AST-A Prohormonvorläufers (Abb. 36) innerhalb der Dictyoptera führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei den Nukleotidsequenzen gruppierten die jeweils zwei Vertreter der Familien Blattellidae, Blaberidae und Blattidae zusammen (Abb. 35). Außerdem bildeten die Blattellidae und Blaberidae zusammen eine Gruppe. Die beiden Termitenarten *M. darwiniensis* und *Reticulitermes flavipes* gruppierten ebenfalls zusammen, die Schwestergruppe bildete *C. darwini* (Cryptocercidae). Der Komplex aus den Gruppen Blattellidae/Blaberidae und Isoptera/Cryptocercidae wurde durch eine hohe Wiederfindungsrate (BI) bzw. einen mittleren Bootstrap-Wert (NJ) abgesichert. Die Blattidae bildeten die Schwestergruppe dieses Komplexes. Insgesamt zeigte sich eine sehr zentrale Stellung der Isoptera innerhalb der Blattaria.

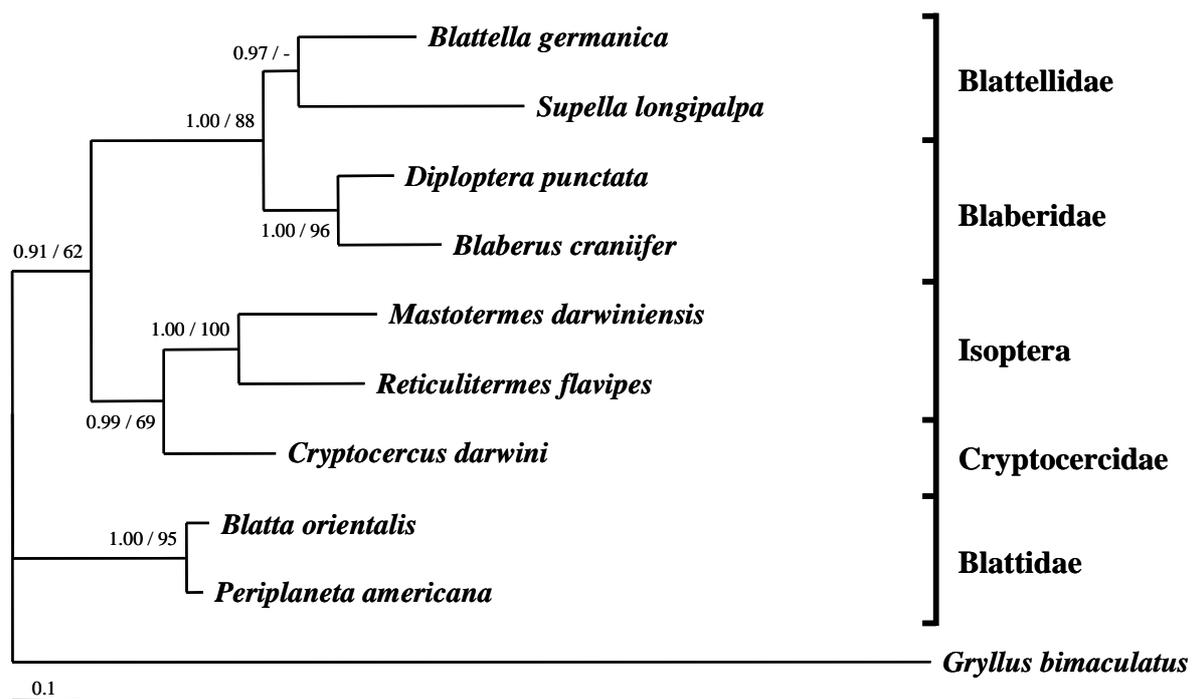


Abb. 35: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Nukleinsäuresequenz des Allatostatin A-Gens von sieben Schaben- und zwei Termitenarten.

Gryllus bimaculatus (Ensifera) diente als Außengruppe. Baum erstellt mit MrBayes v3.1.2 und dargestellt mit TreeView v1.6.6. Länge des Alignments: 1466 bp; Substitutionsmodell: GTR+G; Anzahl der Generationen: 10.000.000; Sampling Frequency: 1000; Burn-in: 2500. Zahlen an den Abzweigungen sind prozentuale Häufigkeiten der Wiederfindungsrate bei Bayesian Inference/Neighbor-Joining-Bootstrap-Analyse. Die Astlängen spiegeln die Mutationsrate wider. Neighbor-Joining-Analyse mit Modell TN+G, Bootstrap: 10.000 Wiederholungen. Verwendete Parameter für die Berechnung: siehe Anhang, Tab. 46 und 48, S. 264f.

Bei der Berechnung mit Aminosäuresequenzen zeigte sich eine andere Anordnung der einzelnen Arten (Abb. 36). Die jeweils zwei Vertreter der Familien Blaberidae und Blattidae gruppierten wieder zusammen – beide Familien bildeten jeweils eine monophyletische Gruppe. Die zwei Vertreter der Blattellidae (*Blattella germanica*, *Supella longipalpa*) bildeten keine monophyletische Gruppe, aber wie zuvor bildeten die Blattellidae und Blaberidae einen gemeinsamen Komplex. Dieser Komplex bildete in diesem Stammbaum allerdings die Schwestergruppe zu den anderen untersuchten Arten. Die Isoptera und *C. darwini* wiesen hier eine engere Verwandtschaft zu den Blattidae auf. Innerhalb des Komplexes Blattidae/Isoptera/Cryptocercidae gruppierten die Schabe *C. darwini* und die Termiten *M. darwiniensis* zusammen. Die Termiten *R. flavipes* dagegen bildete die Schwestergruppe zu den Blattidae, so dass die Isoptera keine monophyletische Gruppe darstellen. Die enge Verwandtschaft von *C. darwini* und *M. darwiniensis* wurde jedoch nicht durch eine hohe Wiederfindungsrate abgesichert und die Einordnung von *R. flavipes* als Schwestergruppe der Blattidae wurde bei der Berechnung mit dem Neighbor-Joining-Verfahren nicht unterstützt.

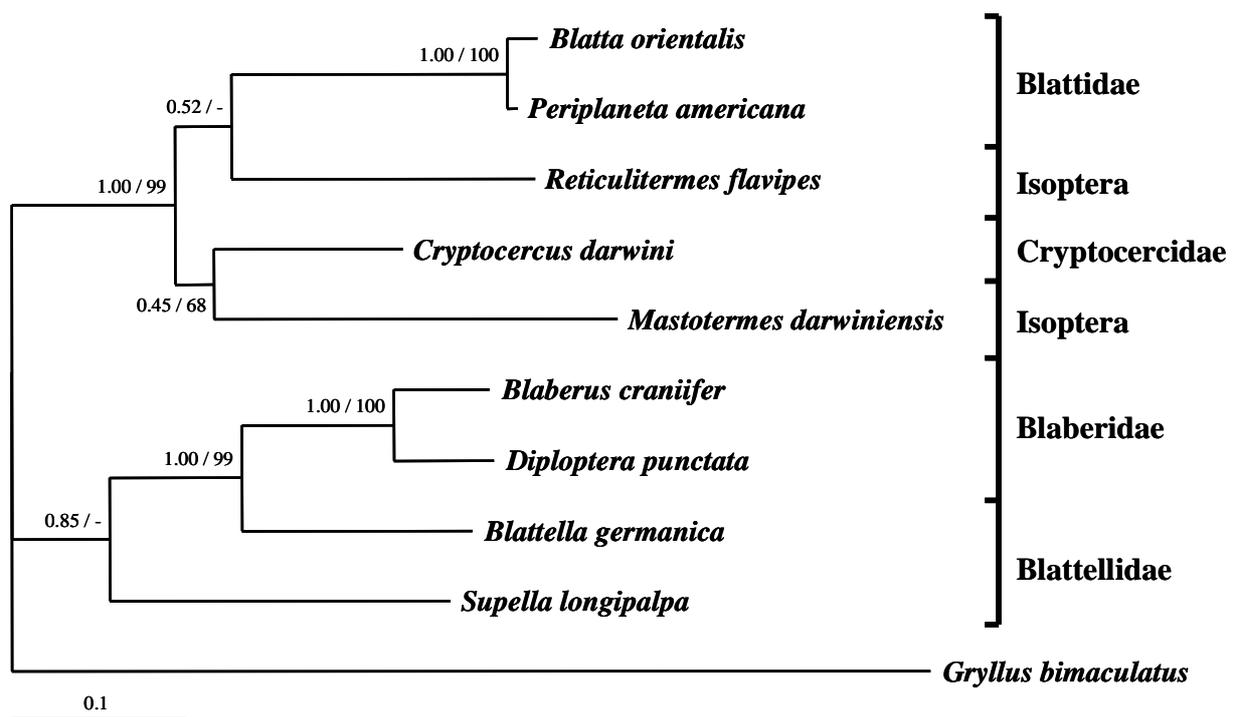
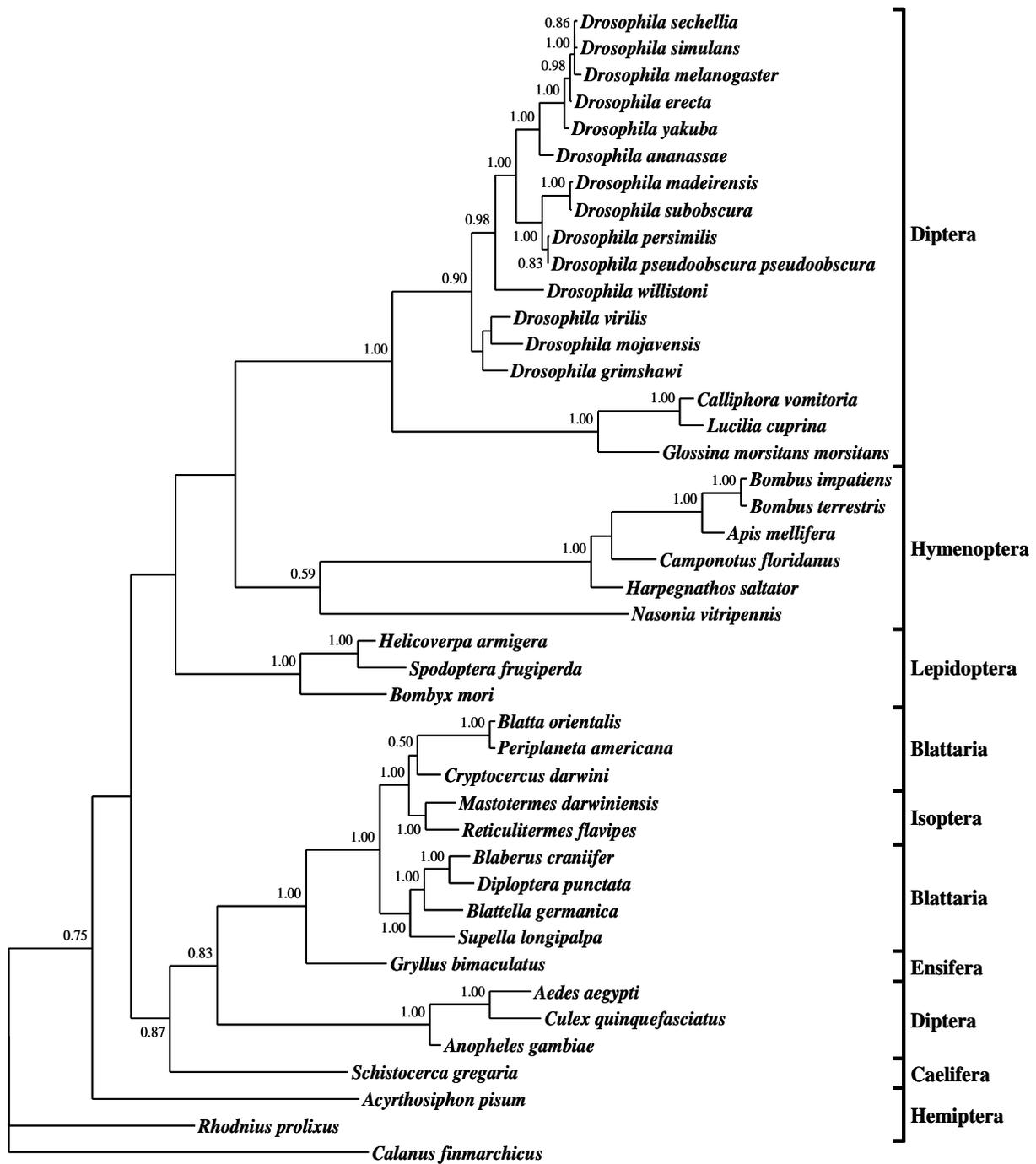


Abb. 36: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Aminosäuresequenz des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von sieben Schaben- und zwei Termitenarten.

Gryllus bimaculatus (Ensifera) diente als Außengruppe. Baum erstellt mit MrBayes v3.1.2 und dargestellt mit TreeView v1.6.6. Länge des Alignments: 386 AS; Substitutionsmodell: JTT; Anzahl der Generationen: 10.000.000; Sampling Frequency: 1000; Burn-in = 2500. Zahlen an den Abzweigungen sind prozentuale Häufigkeiten der Wiederfindungsrate bei Bayesian Inference/Neighbor-Joining-Bootstrap-Analyse. Die Astlängen spiegeln die Mutationsrate wider. Neighbor-Joining-Analyse mit Modell JTT, Bootstrap: 10.000 Wiederholungen. Verwendete Parameter für die Berechnung: siehe Anhang, Tab. 47 und 48, S. 265.

Die phylogenetische Analyse der Nukleotidsequenzen des AST-A Gens von 42 Vertretern verschiedener Insektenordnungen (Abb. 37) führte in einigen Fällen zu einem anderen Ergebnis als die Analyse der Aminosäuresequenzen des AST-A Prohormonvorläufers (Abb. 38). In beiden Stammbäumen gruppieren die untersuchten Arten der Ordnungen Ensifera, Isoptera und Blattaria zusammen. Die Anordnung innerhalb dieses Komplexes unterschied sich von der in den Abb. 35 und 36. Die beiden Termitenarten (*M. darwiniensis*, *R. flavipes*) bildeten gemeinsam eine Untergruppe der Blattaria. Als Schwestergruppe zu den Blattodea (Blattaria und Isoptera) wurde die Grille *G. bimaculatus* eingeordnet (Abb. 37 und 38). Der Blattaria/Isoptera/Ensifera-Komplex wurde in beiden Stammbäumen durch hohe Wahrscheinlichkeitswerte abgesichert. Bei der Berechnung nach NJ zeigte sich eine andere Anordnung der drei Arten *M. darwiniensis*, *R. flavipes* und *C. darwini* zueinander (nicht dargestellt), die Anordnung der restlichen Blattaria und von *G. bimaculatus* war jedoch identisch. Die 20 untersuchten Arten der Ordnung Diptera bilden in Abb. 38 eine monophyletische Gruppe mit einer klaren Auftrennung in die Untergruppen der Diptera – die Mücken (Nematocera) mit den Gattungen *Aedes*, *Culex* und *Anopheles* auf der einen Seite, die Fliegen (Brachycera) mit *Drosophila*, *Calliphora*, *Lucilia* und *Glossina* auf der anderen Seite. In Abb. 37 hingegen bilden die Vertreter der Nematocera die Schwestergruppe zum basal stehenden Blattaria/Isoptera/Ensifera-Komplex und die Diptera daher keine monophyletische Einheit. Die Anordnung der Vertreter der Diptera wurde nur teilweise durch hohe Wiederfindungsraten (BI) bzw. Bootstrap-Werte (NJ) gestützt. Die untersuchten Arten der Ordnungen Lepidoptera und Hymenoptera wurden in beiden Stammbäumen jeweils in monophyletische Gruppen eingeordnet. Innerhalb der Hymenoptera wurden *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* und *Bombus impatiens* – alle zur Familie Apidae gehörend – immer zusammengruppiert. In Abb. 37 bilden die Hymenoptera die Schwestergruppe der Brachycera und die Lepidoptera die Schwestergruppe zu diesem Komplex. In Abb. 38 hingegen gruppieren die Vertreter der Lepidoptera und Hymenoptera zusammen und wurden mit einer hohen Wiederfindungsrate bzw. einem hohen Bootstrap-Wert als Schwestergruppe des Blattaria/Isoptera/Ensifera-Komplexes eingeordnet. Die Stellung der Raubwanze *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) ist unklar, in Abb. 37 steht sie an basaler Stelle, in Abb. 38 wird sie zum Blattaria/Isoptera/Ensifera-Komplex zugeordnet. Die andere Art der Ordnung Hemiptera – die Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* – steht in beiden Stammbäumen an basaler Stelle.



0.1

Abb. 37: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Nukleinsäuresequenz des Allatostatin A-Gens von 42 Vertretern der Ordnungen Diptera, Lepidoptera, Blattaria, Ensifera, Caelifera, Hymenoptera, Hemiptera und Isoptera.

Calanus finmarchicus (Crustacea, Calanoida) diente als Außengruppe. Baum erstellt mit MrBayes v3.1.2 und dargestellt mit TreeView v1.6.6. Länge des Alignments: 3791 bp; Substitutionsmodell: GTR+I+G; Anzahl der Generationen: 10.000.000; Sampling Frequency: 1000; Burn-in = 2500. Zahlen an den Abzweigungen sind prozentuale Häufigkeiten der Wiederfindungsrate bei Bayesian Inference. Darstellung der prozentualen Häufigkeiten über 0.5. Die Astlängen spiegeln die Mutationsrate wider. Verwendete Parameter für die Berechnung: siehe Anhang, Tab. 46 und 48, S. 264f.

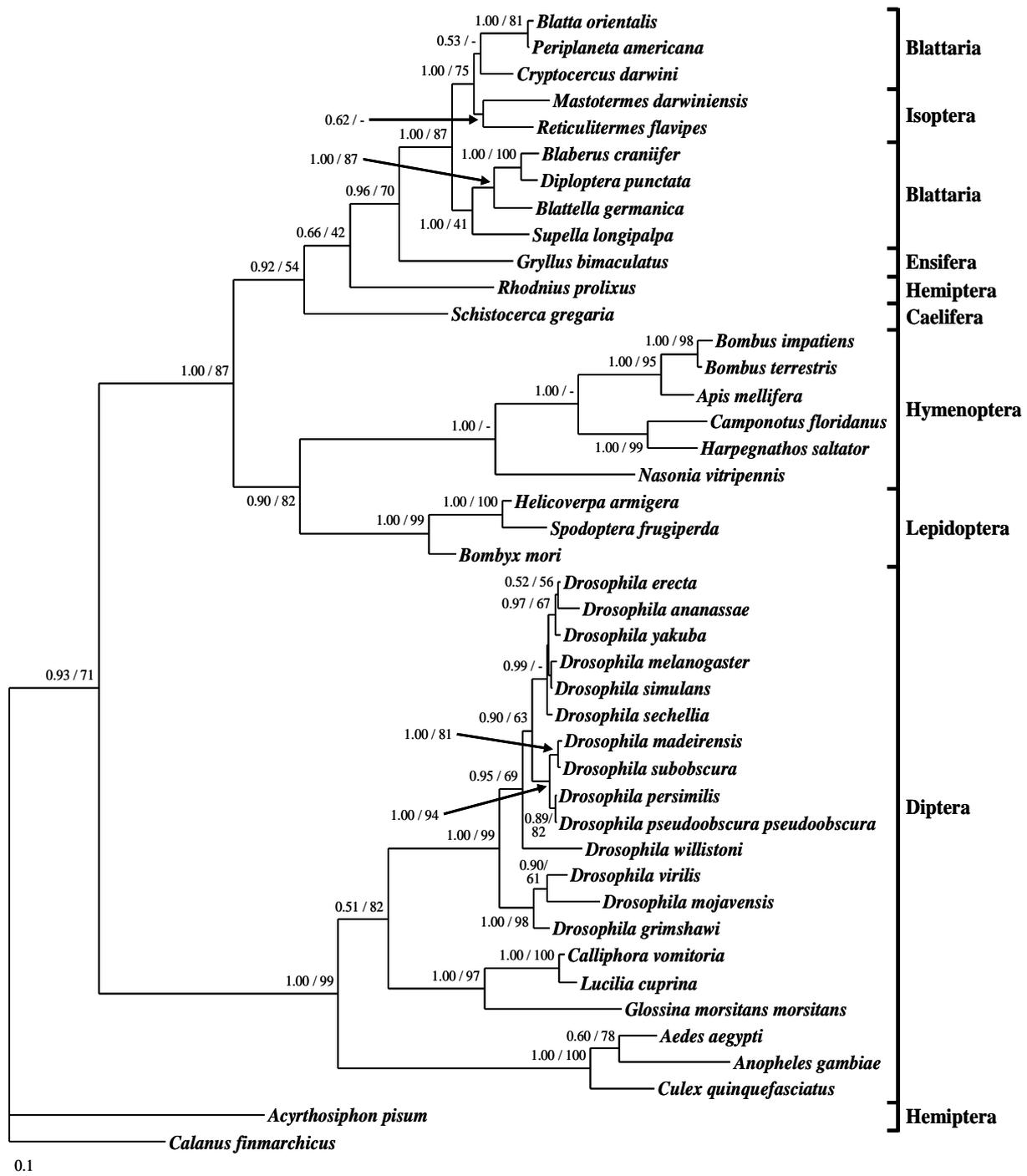


Abb. 38: Konsensusbaum basierend auf Bayesian Inference von der Aminosäuresequenz des Allatostatin A-Prohormonvorläufers von 42 Vertretern der Ordnungen Diptera, Lepidoptera, Blattaria, Ensifera, Caelifera, Hymenoptera, Hemiptera und Isoptera.

Calanus finmarchicus (Crustacea, Calanoida) diente als Außengruppe. Baum erstellt mit MrBayes v.3.1.2 und dargestellt mit TreeView v1.6.6. Länge des Alignments: 397 AS; Substitutionsmodell: JTT; Anzahl der Generationen: 10.000.000; Sampling Frequency: 1000; Burn-in = 2500. Zahlen an den Abzweigungen sind prozentuale Häufigkeiten der Wiederfindungsrate bei Bayesian Inference/Neighbor-Joining-Bootstrap-Analyse. Darstellung der prozentualen Häufigkeiten über 0.5. Die Astlängen spiegeln die Mutationsrate wider. Neighbor-Joining-Analyse mit Modell JTT, Bootstrap: 10.000 Wiederholungen. Verwendete Parameter für die Berechnung: siehe Anhang, Tab. 47 und 48, S. 265.

5.4 Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei *Mastotermes darwiniensis*

Die Expression des Allatostatin A-Gens wurde mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) analysiert. Für die Gewinnung einer Probe mussten die Gewebe mehrerer Individuen zusammengefasst werden. Es wurden einerseits verschiedene Gewebe von weiblichen und männlichen Arbeitern und andererseits das Oberschlundganglion von verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden getrennt dargestellt.

5.4.1 Expression von Allatostatin A in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern

Für die Analyse der AST-A Expression wurden fünf verschiedene Gewebe verwendet. Dabei handelte es sich um Oberschlundganglion (OSG, Gehirn), Vorderdarm (bestehend aus Ösophagus, Kropf und Proventrikulus), Mitteldarm (Ventrikulus), Hinterdarm (bestehend aus fünf Abschnitten) und Fettkörper. In anderen Studien zur Expression von AST-A wurden zusätzlich auch noch verschiedene Teile des Reproduktionsapparates wie Ovarien oder akzessorische Drüsen untersucht (Garside *et al.* 2002; Aguilar *et al.* 2003; Meyering-Vos & Hoffmann 2003; Abdel-latif *et al.* 2004c). Da hier allerdings Termitenarbeiter verwendet wurden, war die Untersuchung der Gewebe des Reproduktionsapparates nicht möglich, da diese in Arbeitern kaum ausgebildet sind (Thorne 1996).

Die Amplifikation des untersuchten AST-A Fragments missglückte in allen Versuchen bei der aus Fettkörper isolierten RNA. Auch das Referenzgen β -Aktin konnte bei dieser RNA nicht amplifiziert werden. Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass aus dem Fettkörper in allen Versuchen keine reine, hochkonzentrierte RNA isoliert werden konnte. Die Reinheitsbestimmung mittels des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm zu 280 nm lieferte ebenfalls nur geringe Reinheitswerte zwischen 0,4 und 1,0 bei der aus dem Fettkörper isolierten RNA. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse der Gewebe Gehirn, Vorder-, Mittel- und Hinterdarm dargestellt.

Im Gehirn sowohl der männlichen als auch der weiblichen Arbeiter zeigte sich die höchste Expression von AST-A mit 11,6 bzw. 12,1 fg AST-A mRNA pro ng cDNA im Vergleich zu den anderen Geweben (Abb. 39). Die einzelnen Darmabschnitte unterschieden sich kaum

voneinander hinsichtlich ihrer AST-A Expression. Im Mitteldarm war die Expression minimal höher (1,5 fg mRNA/ng cDNA) als in den anderen Darmabschnitten (0,9 bis 1,2 fg mRNA/ng cDNA). Zwischen Männchen und Weibchen gab es keine Unterschiede.

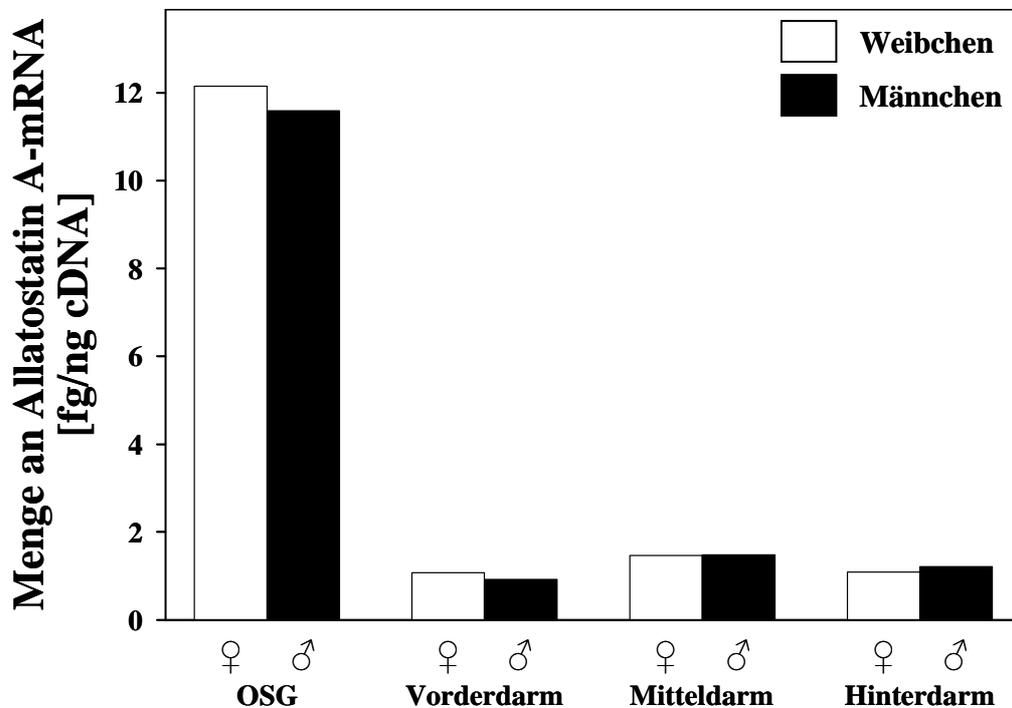


Abb. 39: Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis*.

Das Maß für die Expression ist die Menge von amplifizierter AST-A mRNA pro eingesetzter Gesamt-cDNA. OSG = Oberschlundganglion (Gehirn). n = 1 (je 20 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2x gemessen).

Nach der Normalisierung der AST-A Expression mit der Expression des Referenzgens β -Aktin (Abb. 40) zeigte sich ein ähnliches Muster wie bei der Expression von AST-A ohne Normalisierung (Abb. 39). Im Gehirn war die relative Expression von AST-A höher als in den einzelnen Darmabschnitten. Im Unterschied zur Abb. 39 war jedoch die relative Expression von AST-A im Mitteldarm deutlich erhöht im Vergleich zum Vorder- und Hinterdarm (Abb. 40). Außerdem konnten geringe geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden.

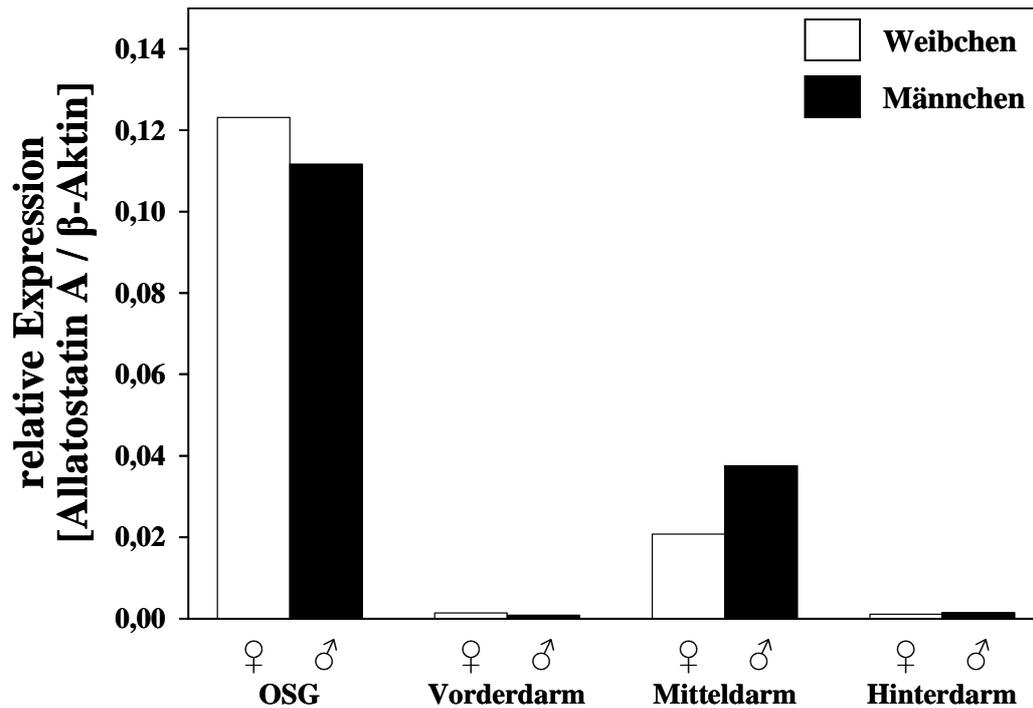


Abb. 40: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. OSG = Oberschlundganglion (Gehirn). n = 1 (je 20 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2x gemessen).

5.4.2 Expression von Allatostatin A in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis*

Für die Analyse der Expression des AST-A Gens in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde das Oberschlundganglion verwendet. Dieses wies im vorangegangenen Experiment die höchste AST-A Expression auf (Abb. 39 und 40) und schien daher am besten geeignet. Die Untersuchung wurde an Larven, Arbeitern und Soldaten der apteren Linie von *M. darwiniensis* sowie an Nymphen und Alaten der nymphalen Linie durchgeführt. Außerdem wurden Arbeiter und Neotenicus von absterbenden Kolonien untersucht.

Das β -Aktin Gen wurde erneut als Referenzgen zur Normalisierung verwendet. Ein Vergleich aller untersuchten Gruppen zeigte, dass die Expression von β -Aktin zwischen den verschiedenen Gruppen relativ stabil war (0,5 bis 2,4 pg mRNA/ng cDNA; Abb. 41). Eine Ausnahme bildeten die Soldaten, Neotenicus und Alaten mit sehr niedrigen Expressionswerten. Die extrem niedrige β -Aktin Expression der Alaten (4×10^{-4} pg mRNA/ng cDNA) spiegelte

das Alter und damit die Abbaurate der RNA wider, die zum Zeitpunkt der Analyse bereits mehrere Monate alt war.

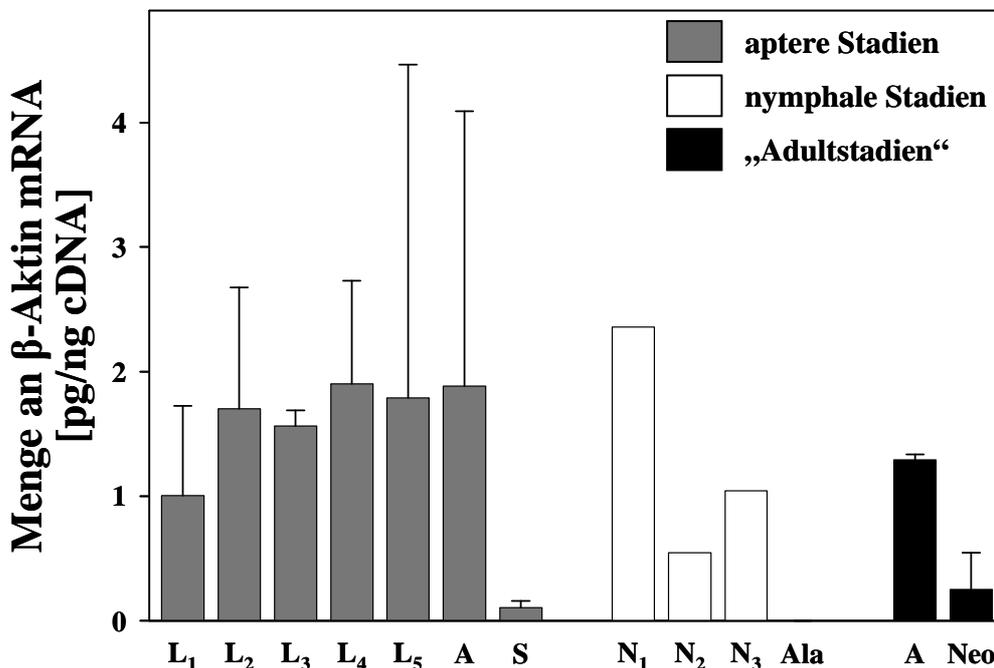


Abb. 41: Expression des Referenzgens β -Aktin im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis*.

Zusammenfassung der Daten von Männchen und Weibchen. Das Maß für die Expression ist die Menge an amplifizierter β -Aktin mRNA pro eingesetzter Gesamt-cDNA. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Aptere Stadien: A = Arbeiter, L_n = n. Larvenstadium, S = Soldaten. Nymphale Stadien: Ala = Alaten, N_n = n. Nymphenstadium. „Adultstadien“ der absterbenden Kolonien: A = Arbeiter, Neo = Neotenicus. n = 1 – 6 (je 11 bis 60 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

Aufgrund der relativ stabilen Expression des Referenzgens wurde die Expression des untersuchten Gens AST-A mit den Werten von β -Aktin normalisiert und im weiteren Verlauf nur noch die relative Expression von AST-A betrachtet.

Juvenile Stadien von *M. darwiniensis* (Abb. 42A) wiesen eine geringere relative AST-A Expression im Gehirn auf als die „Adultstadien“ (Abb. 42B). Auch die statistische Auswertung zeigte einen tendenziellen Unterschied zwischen Juvenil- und Adultstadien (Mann-Whitney U-Test: U = 67; Z = -1,736; P = 0,083). Innerhalb der apteren Linie wiesen die Larven eine relative AST-A Expression von $9,7 \times 10^{-4}$ bis $1,1 \times 10^{-2}$ auf, während die Expression der Arbeiter im Vergleich dazu mit $0,05 \pm 0,09$ ca. 10x höher war. Soldaten zeigten eine noch höhere relative AST-A Expression von $0,19 \pm 0,12$. Innerhalb der nymphalen Linie lag die Expression der adulten Tiere bei $14,05 \pm 14,55$ und damit 185.800x höher als bei den juvenilen Nymphen. Beim Vergleich der juvenilen Tiere der apteren und

nymphalen Linie der gleichen Altersgruppe zeigte sich kein eindeutiges Muster (Abb. 42A). Während die Individuen des L₂-Stadiums eine höhere relative AST-A Expression aufwiesen als korrespondierende Individuen des N₁-Stadiums, war es bei L₃ und N₂ umgekehrt. Individuen der Stadien L₄ und N₃ unterschieden sich dagegen kaum hinsichtlich der relativen AST-A Expression. Das L₁-Stadium, mit Individuen der apteren und nymphalen Linie, zeigte die höchste relative AST-A Expression innerhalb der juvenilen Stadien.

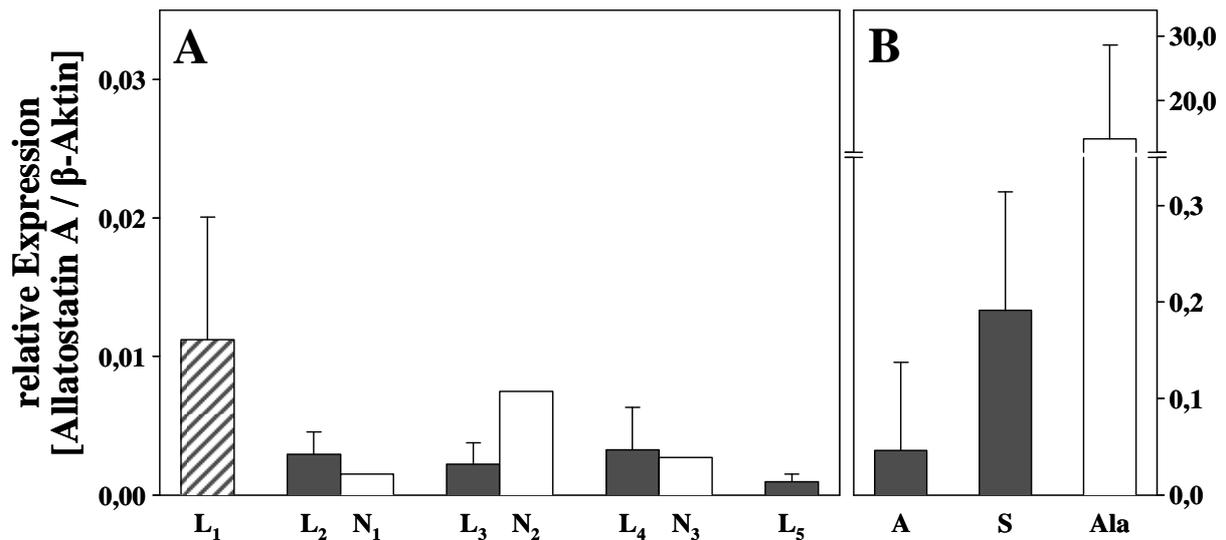


Abb. 42: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien der apteren (grau) und nymphalen Linie (weiß) von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Juvenile Stadien, (B) „Adultstadien“. L₁ zu beiden Entwicklungslinien zugehörig. Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Die y-Achse bei (B) wurde für bessere Übersichtlichkeit geteilt. A = Arbeiter, Ala = Alaten, L_n = n. Larvenstadium, N_n = n. Nymphenstadium, S = Soldaten. n = 1 – 6 (je 11 bis 60 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

In den Versuchskolonien kam es – wie auch schon bei den Messungen des Hormontiters beschrieben (siehe 5.1) – zu einem massenhaften Auftreten von Neotomics in zwei absterbenden Kolonien. Bei diesen Neotomics und den verbliebenen Arbeitern wurde ebenfalls die AST-A Expression im Oberschlundganglion bestimmt. Als Vergleichswert dienten Arbeiter und Alaten aus gesunden Kolonien (Abb. 43). Die Arbeiter beider Kolonietypen wiesen die niedrigste relative AST-A Expression im Gehirn auf (0,016 – 0,076). Die Neotomics zeigten mittlere Expressionswerte von $0,45 \pm 0,5$ und $0,85 \pm 1,05$, wobei die Expression der Männchen gegenüber den Weibchen erhöht war. Alaten hatten mit Werten von 3,76 und 24,33 die höchste relative AST-A Expression, weibliche Alaten wiesen dabei eine höhere relative AST-A Expression auf als männliche.

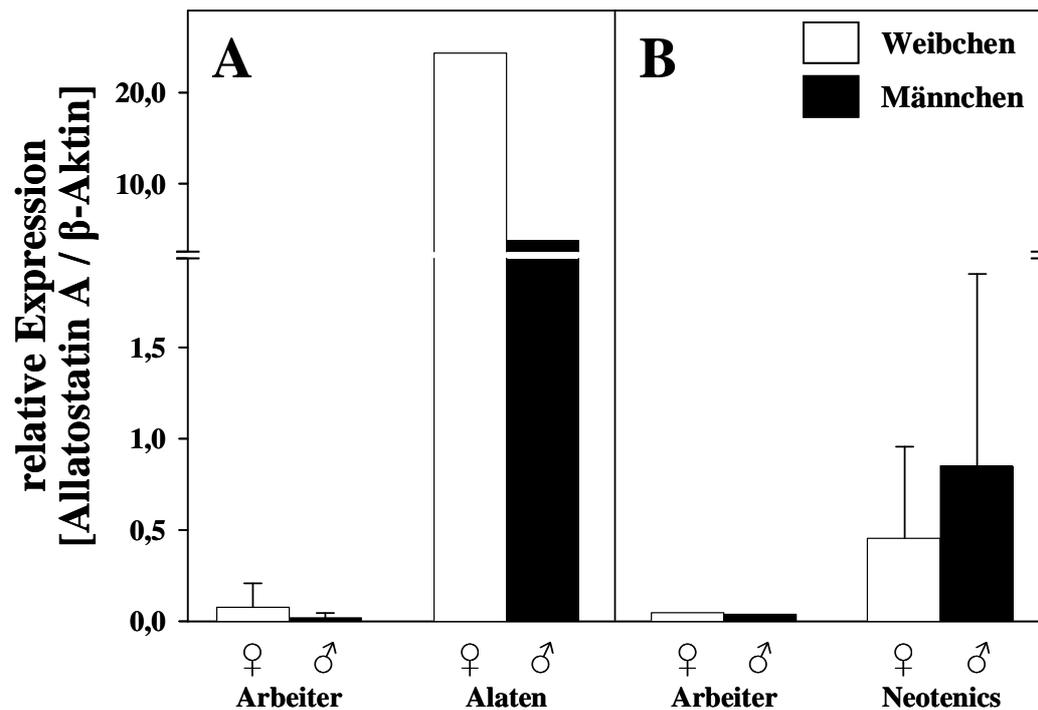


Abb. 43: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion „adulter“ Stadien von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Die y-Achse wurde für bessere Übersichtlichkeit geteilt. (A) Arbeiter und primäre Geschlechtstiere (Alaten) von gesunden Kolonien, (B) Arbeiter und sekundäre Geschlechtstiere (Neotenicus) von zwei absterbenden Kolonien. Daten für (A) aus Abb. 42. n = 1 – 3 (je 12 bis 36 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

5.4.3 Expression verschiedener Referenzgene bei *Mastotermes darwiniensis*

Zusätzlich zur Expression des AST-A Gens wurde die Expression von potentiellen Referenzgenen in verschiedenen Geweben von *Mastotermes*-Arbeitern untersucht. Die Normalisierung der Expression des untersuchten Gens mit einem Referenzgen sorgt dafür, mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen RNA-Proben hinsichtlich der Reinheit und der Abbaurrate der RNA auszugleichen. Dafür sollte ein Gen verwendet werden, welches möglichst stabil exprimiert wird, unabhängig von Faktoren wie Alter der Tiere, Gewebetyp oder Behandlung. Es wurden drei Gene auf ihre Stabilität getestet – β -Aktin sowie NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 und 4 (ND3 und ND4). Diese konnten in dieser Studie bei *M. darwiniensis* identifiziert werden (siehe 5.2.3).

Zu Beginn der Experimente wurden Vortests zur Optimierung der Reaktion mit einem linearisierten Plasmidstandard durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Amplifikation des ND4-Fragments keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte (nicht dargestellt). Im weiteren Verlauf wurde das Gen ND4 daher von den Untersuchungen ausgeschlossen und es wurde nur mit β -Aktin und ND3 weitergearbeitet.

Die Expression der beiden Gene wurde im Gehirn und den drei Darmabschnitten von unbehandelten männlichen und weiblichen Arbeitern bestimmt (Abb. 44). Beide Gene zeigten starke Unterschiede bezüglich der Expression zwischen den einzelnen Geweben. Bei β -Aktin (Abb. 44A) wurden im Gehirn und im Mitteldarm (0,04 bis 0,1 pg mRNA/ng cDNA) geringere Expressionswerte ermittelt als im Vorder- und Hinterdarm (0,77 bis 0,99 pg mRNA/ng cDNA). Zwischen Männchen und Weibchen gab es kaum Unterschiede. Die Expression von ND3 (Abb. 44B) war im Gehirn niedrig (0,26 pg mRNA/ng cDNA). In den Darmabschnitten lag die Expression von ND3 zwischen 0,29 und 1,02 pg mRNA pro ng cDNA. Die Expression von ND3 war im Vorderdarm besonders hoch, aber anders als β -Aktin wurde ND3 fast ebenso stark im Mitteldarm, dafür weniger stark im Hinterdarm exprimiert. Es gab Unterschiede zwischen den Geschlechtern, besonders im Mitteldarm war der Unterschied stark ausgeprägt.

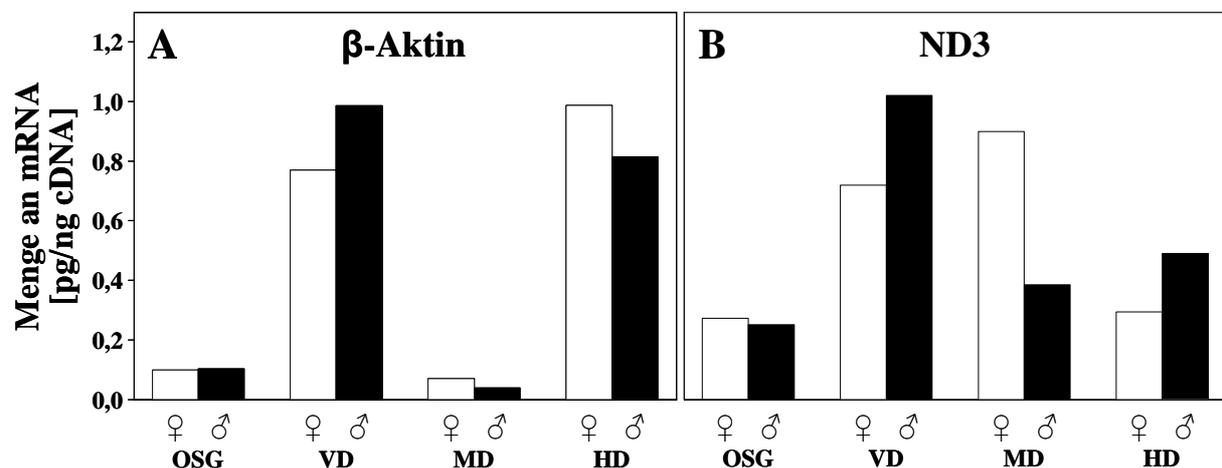


Abb. 44: Expression der Referenzgene (A) β -Aktin und (B) NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3) in verschiedenen Geweben weiblicher (weiß) und männlicher (schwarz) Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis*.

Das Maß für die Expression ist die Menge von amplifizierter mRNA pro eingesetzter Gesamt-cDNA. Analyzierte Gewebe: Oberschlundganglion (OSG), Vorderdarm (VD), Mitteldarm (MD) und Hinterdarm (HD). NADH = Nicotinamidadeninindinukleotid. n = 1 (je 20 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2x gemessen).

Die Normalisierung der AST-A Expression in den verschiedenen Geweben mit jeweils einem der beiden Referenzgene zeigte leichte Unterschiede (Abb. 45). Die relative Expression von AST-A war nach Normalisierung mit β -Aktin oder ND3 im Gehirn am stärksten und in den drei Darmabschnitten geringer. Allerdings war die relative AST-A Expression im Mitteldarm nach Normalisierung mit β -Aktin ca. 20x höher als im Vorder- und Hinterdarm (Abb. 45A). Nach Normalisierung mit ND3 war dies nicht der Fall, in allen Darmabschnitten war die relative AST-A Expression ungefähr auf gleichem Niveau (Abb. 45B).

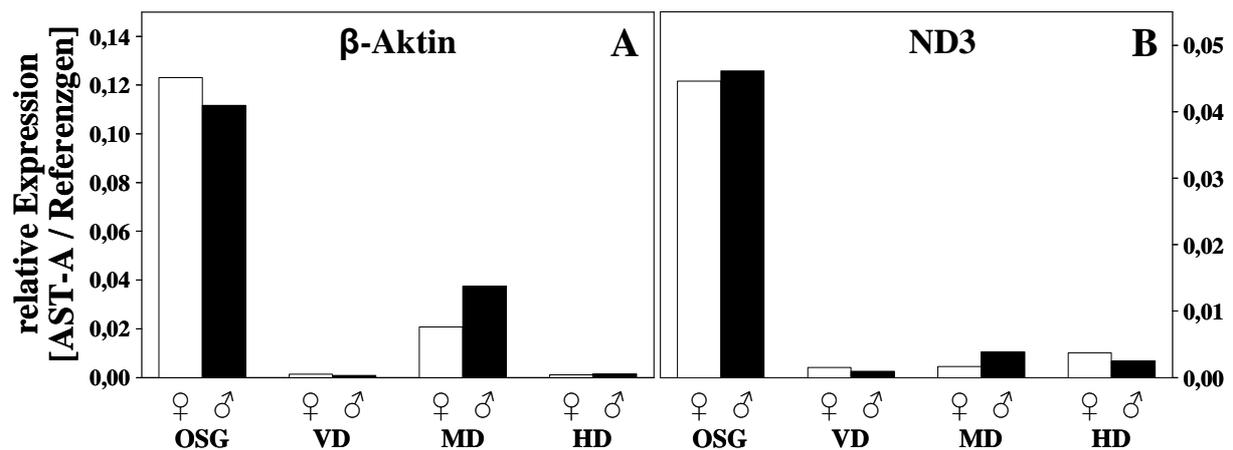


Abb. 45: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher (weiß) und männlicher (schwarz) Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* nach Normalisierung mit der Expression von (A) β -Aktin oder (B) NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3).

Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der mRNA-Menge des jeweiligen Referenzgens normalisiert. Analysierte Gewebe: Oberschlundganglion (OSG), Vorderdarm (VD), Mitteldarm (MD) und Hinterdarm (HD). NADH = Nicotinamidadenindinukleotid. Daten für (A) aus Abb. 40. n = 1 (je 20 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2x gemessen).

Die Kombination beider Referenzgene bietet eine weitere Möglichkeit, die Expressionsdaten von AST-A zu normalisieren. Dafür wurde der Mittelwert der Expression von β -Aktin und ND3 gebildet und die Expression des AST-A Gens mit diesem normalisiert. Die dadurch ermittelte relative AST-A Expression zeigte ca. 25x höhere Werte im Gehirn im Vergleich zu den einzelnen Darmabschnitten (Abb. 46). Die relative AST-A Expression im Mitteldarm war mit ca. 0,005 nur leicht erhöht im Vergleich zum Vorderdarm (0,001) und Hinterdarm (0,002).

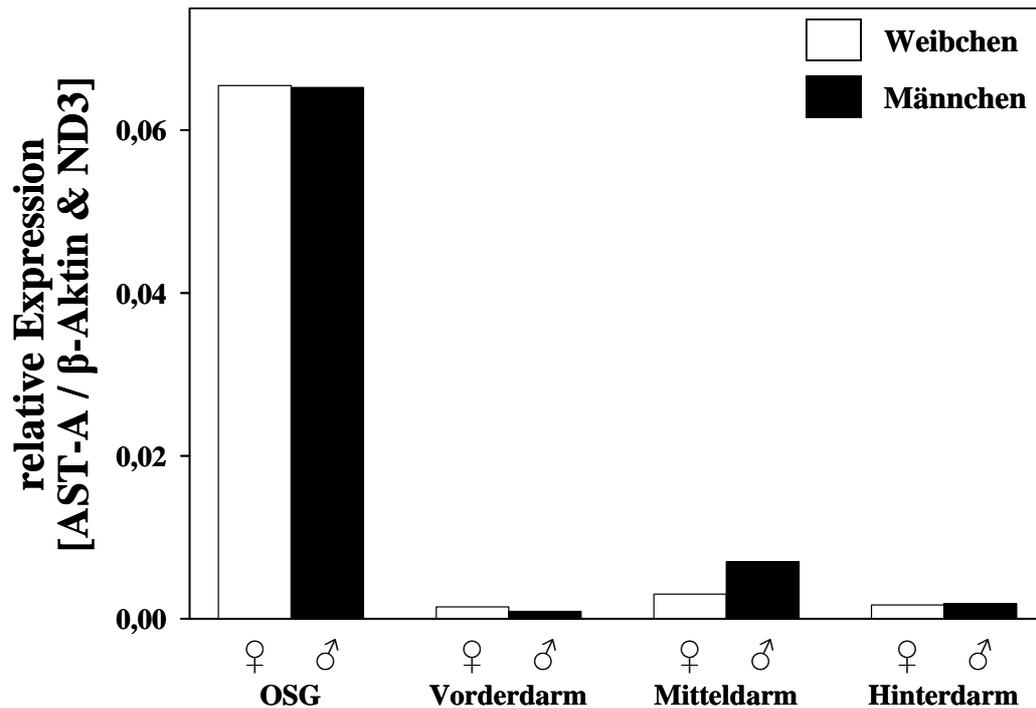


Abb. 46: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* nach Normalisierung mit β -Aktin und NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3).

Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit dem Mittelwert der mRNA-Menge beider Referenzgene normalisiert. NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, OSG = Oberschlundganglion. n = 1 (je 20 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2x gemessen).

Eine Analyse der Stabilität der Expression von ND3 und β -Aktin mit den Programmen BestKeeper© v1.0 (Pfaffl *et al.* 2004), geNorm v3.5 (Vandesompele *et al.* 2002) und NormFinder v20.0 (Andersen *et al.* 2004) zeigte eine geringfügig stabilere Expression von ND3 (Tab. 49, Anhang S. 266). Generell wiesen beide Referenzgene nur eine geringe Stabilität auf. Bei der Analyse mit BestKeeper© zeigte sich eine Standardabweichung der C_T -Werte von > 1 , was laut Pfaffl *et al.* (2004) auf eine nicht-konstante Expression hindeutet. Auch bei der Analyse mit geNorm wurden Stabilitätswerte von $M > 2$ für beide Gene berechnet, während Gene mit stabiler Expression einen Stabilitätswert von $M < 1,5$ aufweisen (Vandesompele *et al.* 2002; Van Hiel *et al.* 2009).

5.5 Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens bei *Mastotermes darwiniensis*

Die namensgebende Funktion der AST-A Peptide ist die Hemmung der JH-Biosynthese der *Corpora allata in vitro* (Review in Tobe & Stay 1985). Für die Funktionsanalyse des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* wurde daher der Zusammenhang zwischen AST-A und JH III untersucht. Dafür wurden zwei verschiedener Ansätze verwendet. Zum einen wurde die Expression des AST-A Gens analysiert und auf einen Zusammenhang mit dem JH III-Gehalt getestet. Zum anderen wurde die Expression des AST-A Gens in Arbeitern von *M. darwiniensis* mittels RNA-Interferenz unterdrückt und die Wirkung auf den JH III-Hämolymphtiter untersucht.

5.5.1 Vergleich der Expression von Allatostatin A mit dem Hämolymphtiter von Juvenilhormon III

Die Analyse der AST-A Expression im Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* (5.4.2) erfolgte an denselben Individuen wie die Messung des JH III-Hämolymphtiters (5.1.1.1). Daher konnten beide Messvariablen auf einen möglichen direkten Zusammenhang getestet werden. Zwischen der AST-A Expression im Gehirn und dem JH III-Hämolymphtiter bestand eine signifikant negative Korrelation (nicht dargestellt; Spearman-Rangkorrelation: $n = 26$; $r_s = -0,483$; $P = 0,012$). Für den JH III-Titer konnten Werte zwischen 33,7 und 853,6 pg pro μl Hämolymphe ermittelt werden. Der höchste Wert (853,6 pg/ μl) wich dabei extrem von den anderen Werten (zwischen 33,7 und 448,1 pg/ μl) ab. Zudem war er mit einer niedrigen AST-A Expression verbunden (8,7 fg mRNA/ng cDNA). Diese Probe wurde daher ausgeschlossen, um eine zu starke Beeinflussung des Ergebnisses zu verhindern. Die verbliebenen Werte zeigten dennoch eine signifikant negative Korrelation zwischen der AST-A Expression im Gehirn und dem JH III-Titer (Abb. 47; Spearman-Rangkorrelation: $n = 25$; $r_s = -0,539$; $P = 0,005$).

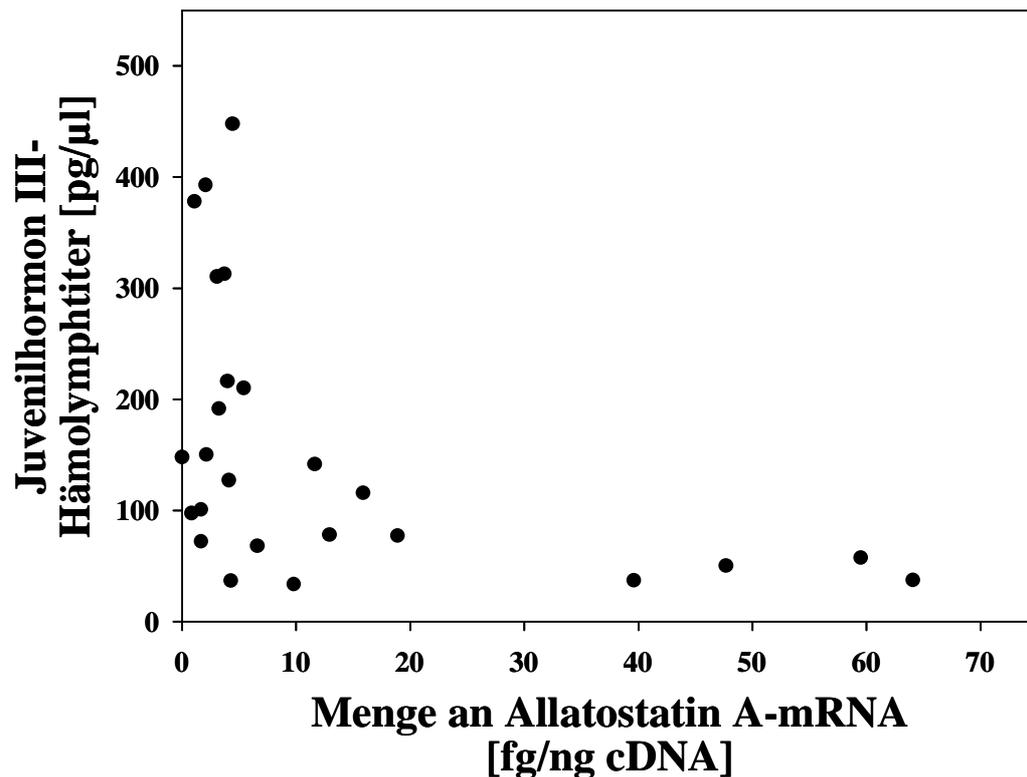


Abb. 47: Korrelation der Expression von Allatostatin A (AST-A) im Gehirn und dem Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren und nymphalen Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Das Maß für die Expression ist die Menge an amplifizierter AST-A mRNA pro eingesetzter Menge an Gesamt-cDNA. Es besteht ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Expression von AST-A und dem JH III-Titer (Spearman-Rangkorrelation: $r_s = -0,539$; $P = 0,005$). $n = 25$.

Die relative AST-A Expression nach Normalisierung mit dem Referenzgen β -Aktin wurde ebenfalls auf eine potentielle Korrelation mit dem JH III-Hämolymphtiter untersucht. Da die Datensätze nicht normalverteilt waren, wurde eine Transformation der Daten durch Bildung des dekadischen Logarithmus durchgeführt. Anschließend wurde die Korrelation nach Pearson mit den transformierten Datensätzen berechnet. Dabei konnte ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen beiden Messvariablen nachgewiesen werden (nicht dargestellt; Pearson: $n = 26$; $r^2 = 0,37$; $P = 0,001$). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch zu hohe Werte zu verhindern, wurden erneut zwei Proben ausgeschlossen. Zum einen wurde die Probe mit dem höchsten JH III-Titer (853,6 pg/ μ l) aus dem Datensatz entfernt, zum anderen die mit der höchsten relativen AST-A Expression. Diese wies einen Wert von 24,33 auf und zeigte damit eine starke Abweichung zu den anderen Proben (zwischen 0,0001 und 3,76). Zudem war sie verbunden mit dem niedrigsten JH III-Titer (33,7 pg/ μ l). Die verbliebenen Werte zeigten dennoch eine signifikant negative Korrelation zwischen dem JH III-Hämolymphtiter und der relativen AST-A Expression im Gehirn (Abb. 48; Daten für Berechnung transformiert mit $\lg(x)$; Pearson: $n = 24$; $r^2 = 0,354$; $P = 0,002$).

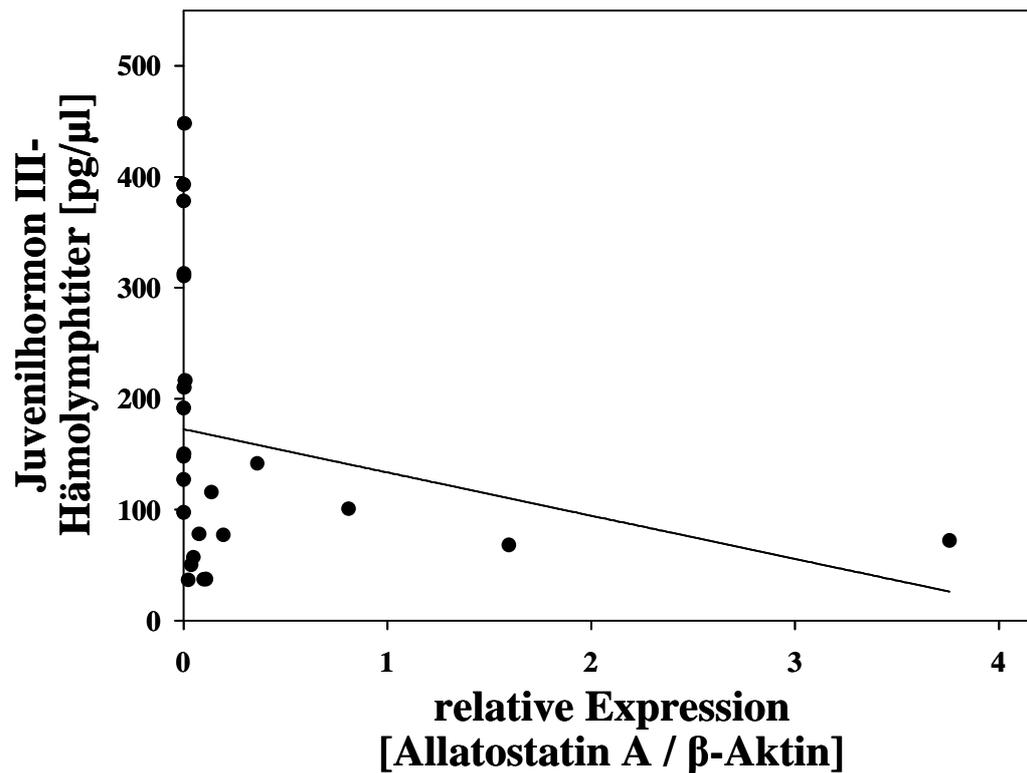


Abb. 48: Korrelation zwischen der relativen Expression von Allatostatin A (AST-A) im Gehirn und dem Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in verschiedenen Entwicklungsstadien der apteren und nymphalen Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Für die relative Expression wurde die Menge der AST-A mRNA auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Zwischen dem JH III-Titer und der relativen Expression von AST-A besteht ein signifikant negativer Zusammenhang (Daten für Berechnung transformiert mit $\lg(x)$; Pearson: $r^2 = 0,354$; $P = 0,002$). $n = 24$.

5.5.2 Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens mittels RNA-Interferenz

Für die weitere Funktionsanalyse von AST-A wurde versucht, die Expression des AST-A Gens mittels der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) durch Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu unterdrücken. Anschließend wurde die Wirkung auf den JH III-Titer in der Hämolymphe analysiert.

5.5.2.1 Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz

Da es bisher noch keine Versuche mit der RNAi-Methode bei *M. darwiniensis* gab, mussten einige Voruntersuchungen durchgeführt werden. Als erstes wurde die Verteilung der Injektionsflüssigkeit im Körper der Termiten untersucht. Anschließend wurde überprüft, ob die Injektion von Ringerlösung oder doppelsträngiger RNA einen Einfluss auf die Mortalität der Termiten und die Expression des AST-A Gens hat. Zum Abschluss wurde getestet, ob die

injizierte dsRNA mittels qPCR direkt nachweisbar ist. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen sind im Folgenden zusammengefasst.

Verteilung der Injektionslösung im Körper der Termiten

Die Injektion der Lösungen zur Auslösung der RNAi sollte in den Hämolympdraum des Abdomens erfolgen. Von der Injektionsstelle ausgehend muss die injizierte Lösung im gesamten Körper verteilt werden, um eine Wirkung auch in weiter entfernten Geweben auszulösen. Durch Injektion eines Farbstoffes wurde die Ausbreitung der Injektionslösung verfolgt. Arbeiter von *M. darwiniensis* haben eine dünne und an manchen Stellen fast durchsichtige Kutikula, so dass der Farbstoff auch ohne Präparation gut sichtbar war. Nach der Injektion breitete sich der Farbstoff von der Injektionsstelle in alle Richtungen aus und war bereits nach 5 min in allen Bereichen des Körpers zu sehen (Abb. 49).

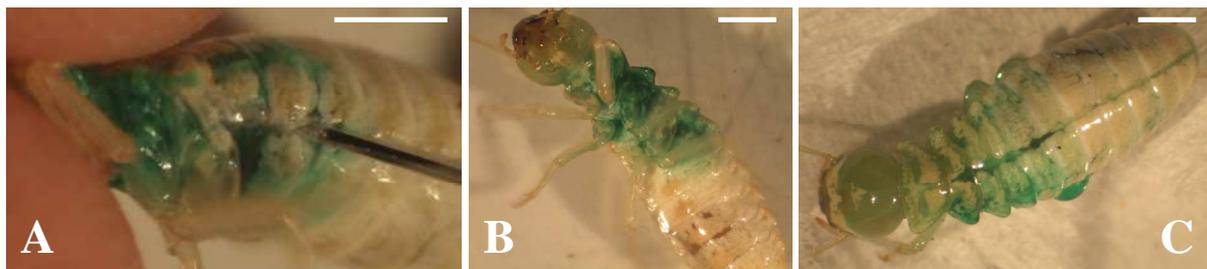


Abb. 49: Verteilung von grüner Lebensmittelfarbe gelöst in 2 μ l sterilem Wasser nach Injektion in einen Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis*.

(A) Injektion lateral ins Abdomen, (B) Arbeiter unmittelbar nach der Injektion, (C) Arbeiter nach 5 min. Der Balken auf allen Grafiken entspricht 0,2 cm.

Auswirkung der Injektion von Termitenringer auf die Expression von Allatostatin A in verschiedenen Geweben

Für die Auslösung der RNAi sollten Arbeiter von *M. darwiniensis* mit dsRNA injiziert werden. Aufgrund des relativ großen Injektionsvolumens (2 μ l) im Vergleich zur Gesamtmenge an Hämolymphe im Individuum (2 – 5 μ l) sollte diese in steriler Ringerlösung gelöst werden. Daher wurde zunächst der Einfluss der Injektion von Termitenringer auf die Expression des AST-A Gens untersucht. Die Ringer-injizierten Tiere wurden dafür mit unbehandelten Arbeitern verglichen (Abb. 50). Wie zuvor (siehe 5.4.1) zeigte sich innerhalb einer Behandlung die höchste relative AST-A Expression im Gehirn, gefolgt vom Mitteldarm. Im Vorder- und Hinterdarm wurden nur geringe Expressionswerte ermittelt (Abb. 50). Beim

Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungen zeigte sich, dass die relative AST-A Expression bei Ringer-injizierten Arbeitern signifikant erhöht war im Vergleich zu unbehandelten Arbeitern (Mann-Whitney U-Test: $U = 13$; $Z = -2,935$; $P = 0,003$). Im Gehirn war die Expression bei Ringer-injizierten Arbeitern ca. 20x höher als bei unbehandelten Arbeitern ($2,342 \pm 2,404$ vs. $0,117 \pm 0,008$), bei den verschiedenen Darmabschnitten sogar bis zu 44x höher. Innerhalb der Gewebe wurde aufgrund der geringen Stichprobenzahl jedoch keine statistische Analyse durchgeführt.

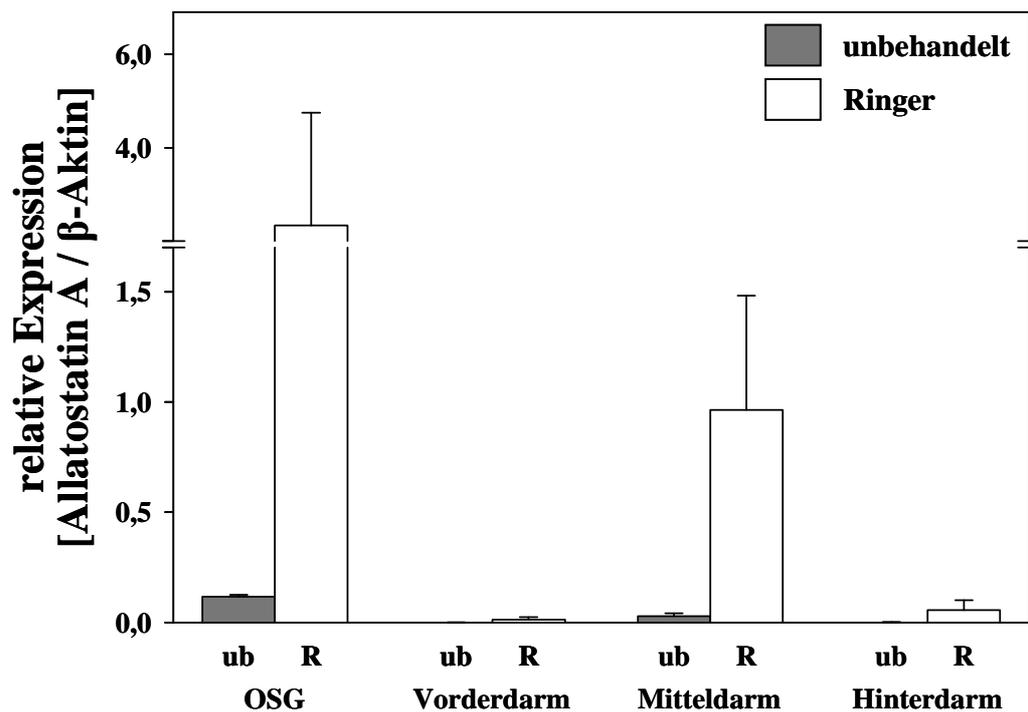


Abb. 50: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern zwei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer im Vergleich zu unbehandelten Arbeitern.

Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung. Die y-Achse wurde für bessere Übersichtlichkeit geteilt. Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Zusammenfassung der Daten von Männchen und Weibchen. R = Ringer; ub = unbehandelt. OSG = Oberschlundganglion. Daten für ub aus Abb. 40. $n = 2$ (bei OSG-R: $n = 8$) (je 17 bis 22 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2 – 3x gemessen).

Einfluss der Injektion von Termitenringer und AST-A dsRNA auf die Mortalität und die Expression des AST-A Gens im Oberschlundganglion

In einem weiteren Experiment wurde Arbeitern von *M. darwiniensis* entweder Ringerlösung oder AST-A dsRNA in unterschiedlicher Menge (0,5 – 2 μ g) injiziert. Dadurch sollte der Einfluss der verschiedenen Injektionslösungen auf die Mortalität und die AST-A Expression

analysiert werden. Zudem sollte die optimale Menge an AST-A dsRNA für nachfolgende RNAi-Experimente bestimmt werden. Die Mortalität und die Expression des AST-A Gens im Gehirn wurde drei Tage nach der Injektion untersucht. Als Vergleichsgruppe dienten Arbeiter, die ebenfalls für drei Tage von der Kolonie isoliert gehalten wurden, ansonsten aber unbehandelt waren.

Bei den unbehandelten Tieren überlebten alle die Umstellung der Haltung. Die injizierten Tiere dagegen wiesen mit einer Mortalitätsrate von 19 bis 30% eine signifikant höhere Mortalität auf als die unbehandelten Arbeiter (Abb. 51; Mann-Whitney U-Test: $U = 0$; $Z = -3,05$; $P < 0,001$). Es konnten keine Unterschiede zwischen der Injektion von Ringerlösung und AST-A dsRNA bezüglich der Mortalität beobachtet werden (Mann-Whitney U-Test: $U = 15,5$; $Z = -1,588$; $P = 0,112$).

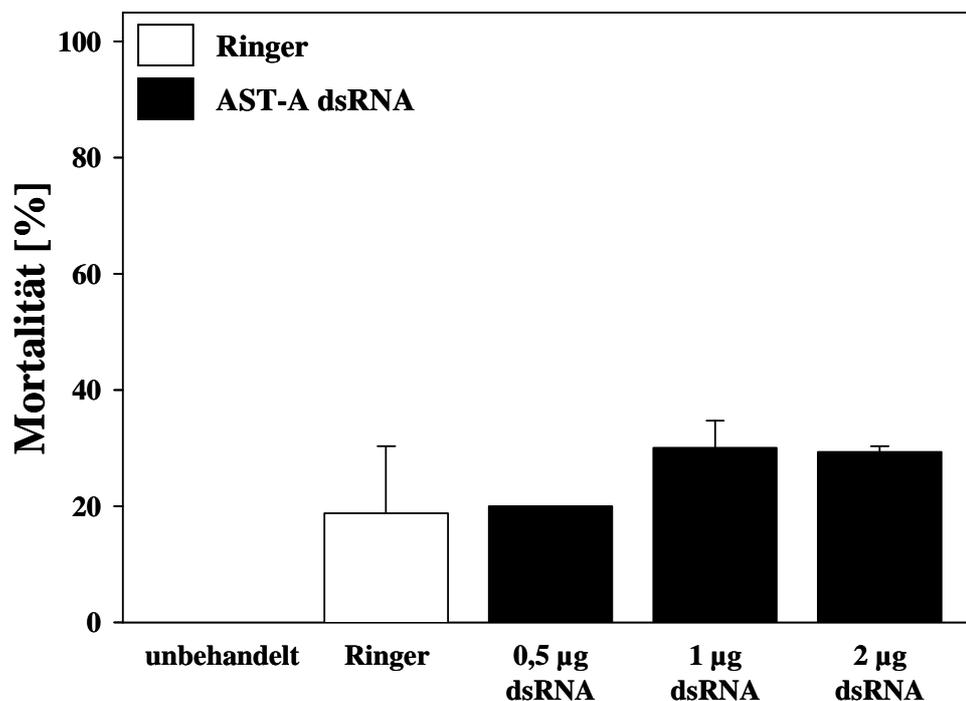


Abb. 51: Mortalität von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von Ringerlösung oder verschiedenen Mengen doppelsträngiger RNA abgeleitet vom Allatostatin A-Gen (AST-A dsRNA).

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, Zusammenfassung der Daten von Weibchen und Männchen. Die Haltung erfolgte für 3 Tage getrennt von der Kolonie in Gruppen von 20 – 22 Individuen. Injektion: 2 µl Termitenringer (Ringer) oder AST-A dsRNA (0,5 µg; 1 µg; 2 µg) gelöst in 2 µl Termitenringer. $n = 4$ (unbehandelt), 10 (Ringer), 2 (dsRNA).

Die Bestimmung der AST-A Expression im Gehirn erfolgte mittels qPCR. Bei den Ringerinjizierten Arbeitern war die relative AST-A Expression drei Tage nach der Injektion im

Vergleich zu den unbehandelten Arbeitern erhöht (2,6 vs. 0,6; Abb. 52). Die mit AST-A dsRNA injizierten Arbeiter zeigten – im Gegensatz zu den Erwartungen – die höchste relative AST-A Expression im Gehirn (3,4 – 33,9). Die Arbeiter, denen mit 2 µg die größte Menge an dsRNA injiziert worden war, wiesen die höchste relative AST-A Expression auf. Eine Auswertung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode führte zu einem identischen Ergebnis (nicht dargestellt).

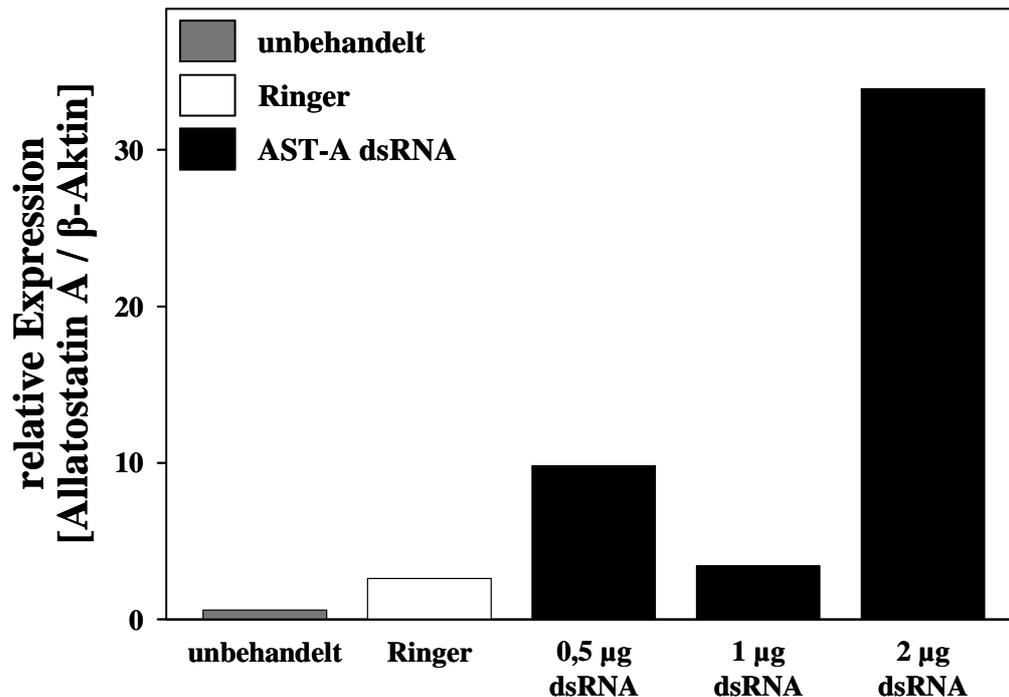


Abb. 52: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) im Oberschlundganglion von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von Ringerlösung oder verschiedenen Mengen doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom AST-A Gen.

Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β-Aktin mRNA normalisiert. Die Haltung erfolgte für 3 Tage getrennt von der Kolonie in Gruppen von 20 – 22 Tieren. Injektion: 2 µl Termitenringer (Ringer) oder AST-A dsRNA (0,5 µg; 1 µg; 2 µg) gelöst in 2 µl Termitenringer. n = 1 (je 16 bis 29 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

Direkter Nachweis von doppelsträngiger RNA mittels qPCR

Das vorangegangene Experiment zeigte eine erhöhte relative Expression von AST-A im Gehirn von dsRNA-injizierten Arbeitern im Vergleich zu unbehandelten und Ringer-injizierten Arbeitern. Zudem konnte der größte Expressionswert in den Arbeitern, denen die größte Menge an AST-A dsRNA injiziert worden war, nachgewiesen werden (Abb. 52). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der erwarteten Reduktion der AST-A Expression

durch RNAi. Daher wurde überprüft, ob die injizierte (und eventuell nicht prozessierte) dsRNA direkt mittels qPCR amplifiziert – und damit nachgewiesen – wurde.

Bei einer Injektion von 2 µg dsRNA pro Tier können in 500 ng Gesamt-RNA, die für die Reverse Transkription eingesetzt wurden, maximal 8 ng dsRNA enthalten sein (Berechnung siehe Anhang, S. 267). Diese Menge an AST-A dsRNA wurde direkt für eine Reverse Transkription eingesetzt und mittels qPCR amplifiziert. Die Fragmente zur Ableitung der dsRNA (Fragment Mda_AS8F bis Mda_AS13R; nt 580 – 1059; AST-A dsRNA1) und zur Amplifikation mittels qPCR (Fragment AstA_RTF bis AstA_RTR; nt 823 – 982) überschneiden sich. Daher wurde zusätzlich eine weitere dsRNA getestet, die sich von einem anderen Fragment des AST-A Gens ableitete (Fragment Mda_AS140F bis Mda_AS9R; nt 362 – 645; AST-A dsRNA2). Die für die Voruntersuchungen verwendete AST-A dsRNA1 ließ sich – wie bereits vermutet wurde – auch direkt mittels qPCR nachweisen (Abb. 53A). Im Gegensatz dazu konnte die AST-A dsRNA2 mit den verwendeten Oligonukleotiden und Parametern der Reaktion nicht mittels qPCR amplifiziert werden. Bei der AST-A dsRNA1 konnte jedoch auch nur die geringe Menge von 0,09 fg AST-A RNA pro ng cDNA (bezogen auf die theoretisch eingesetzte Menge an cDNA einer „normalen“ qPCR) nachgewiesen werden. Der Vergleich mit der Expression bei injizierten Arbeitern (Abb. 53B) zeigt jedoch, dass bei den mit 2 µg dsRNA injizierten Tieren die gemessene Menge an AST-A mRNA etwa 10.000x höher war (1112 fg/ng cDNA). Daher ließ sich die erhöhte relative AST-A Expression der mit dsRNA injizierten Tiere nicht mit einer direkten Amplifikation der dsRNA während der qPCR erklären. Um diesen Effekt aber grundsätzlich auszuschließen, wurde für die nachfolgenden Experimente zur RNAi die AST-A dsRNA2 verwendet.

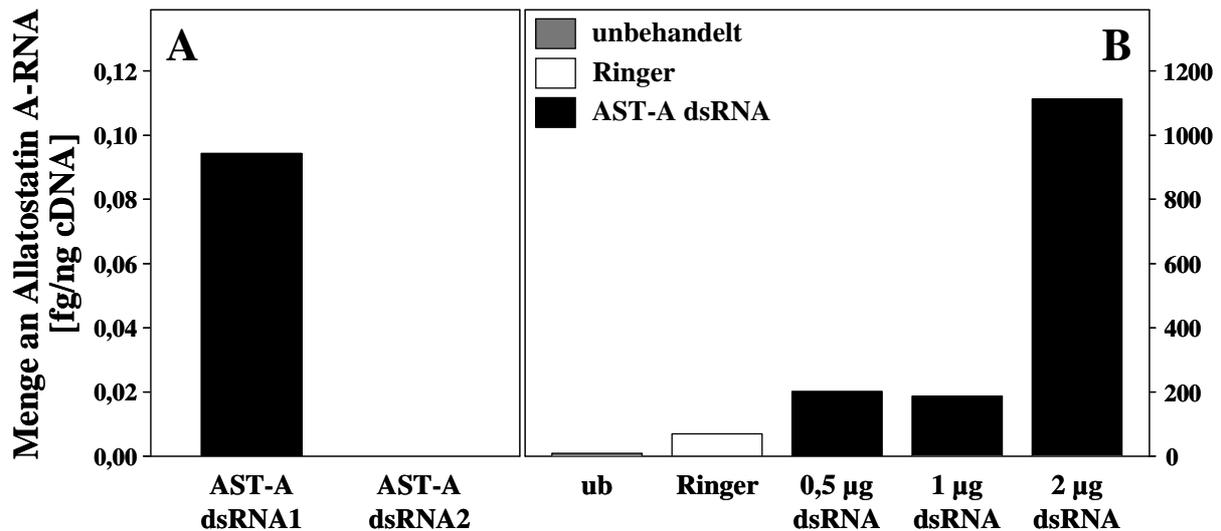


Abb. 53: Nachweis der Amplifikation von Allatostatin A (AST-A)-RNA nach Umschreibung in cDNA mittels quantitativer real-time PCR.

Die Menge der AST-A RNA wurde auf die theoretisch eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen. (A) Direkte Amplifikation von doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom AST-A Gen von *Mastotermes darwiniensis*. AST-A dsRNA1 = abgeleitet vom Fragment Mda_AS8F bis Mda_AS13R; AST-A dsRNA2 = abgeleitet vom Fragment Mda_AS140F bis Mda_AS9R. n = 1. (B) Menge an AST-A mRNA im Gehirn von *M. darwiniensis*-Arbeitem drei Tage nach der Injektion verschiedener Lösungen, Daten aus Abb. 52. Injektion: 2 µl Termitenringer (Ringer) oder AST-A dsRNA (0,5 µg; 1 µg; 2 µg) gelöst in 2 µl Termitenringer. ub = unbehandelt. n = 1 (je 16 bis 29 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

5.5.2.2 Experimente zur Suppression der Allatostatin A-Expression durch RNA-Interferenz

Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchung wurde für die nachfolgenden RNAi-Versuche die AST-A dsRNA2 verwendet (s. 5.5.2.1). Arbeiter von *M. darwiniensis* wurden mit jeweils 1 µg AST-A dsRNA2 gelöst in 2 µl Termitenringer injiziert. Als Kontrolle dienten Ringer-injizierte Arbeiter. Bei 1 µg dsRNA zeigte sich in den Voruntersuchungen nur eine geringe Abweichung bezüglich der AST-A Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die anderen getesteten Konzentrationen (0,5 und 2 µg) führten dagegen zu einer stark erhöhten AST-A Expression bei dsRNA-injizierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren (siehe Abb. 52, S. 160), was den Erwartungen einer Reduktion der AST-A Expression durch RNAi widersprach. Zudem hat sich eine Menge von 1 µg dsRNA bereits in Versuchen mit anderen Insektenarten als wirkungsvoll erwiesen, z. B. bei den Schmetterlingen *Bombyx mori* (Tomita & Kikuchi 2009) und *Spodoptera frugiperda* (Griebler *et al.* 2008) sowie bei der Schabe *Blattella germanica* (Cruz *et al.* 2007).

Es wurden insgesamt vier Experimente durchgeführt. Bei den ersten beiden wurde die Expression des AST-A Gens in verschiedenen Geweben von behandelten und Kontrolltieren

analysiert. In den Experimenten 2 bis 4 wurde die Auswirkung der Injektion von AST-A dsRNA auf den Hormongehalt der Hämolymphe untersucht. Die Analyse der Expression und des Hormongehaltes erfolgte jeweils drei Tage nach der Injektion.

Einfluss der Injektion von Termitenringer und AST-A dsRNA auf die Mortalität

Zunächst wurde der Einfluss der verschiedenen Injektionslösungen auf die Mortalität überprüft. Die Mortalität lag sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit dsRNA injizierten Tieren durchschnittlich bei ca. 40% (Abb. 54) und war damit höher als bei den Voruntersuchungen (vergl. Abb. 51, S. 159). Zwischen den verschiedenen Behandlungen gab es keine Unterschiede bezüglich der Mortalität (Abb. 54A: Kruskal-Wallis H-Test: $H = 0,58$; $df = 3$; $P = 0,901$; Abb. 54B: Mann-Whitney U-Test: $U = 29,5$; $Z = -0,263$; $P = 0,793$). Die Weibchen wiesen bei beiden Behandlungen eine etwas geringere Mortalität im Vergleich zu den Männchen auf (Abb. 54A und C: ♀: $36 \pm 22\%$; ♂: $44 \pm 25\%$). In der Zusammenfassung aller Weibchen und Männchen unabhängig von der Behandlung zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern (Abb. 54C; Mann-Whitney U-Test: $U = 25,5$; $Z = -0,683$; $P = 0,495$).

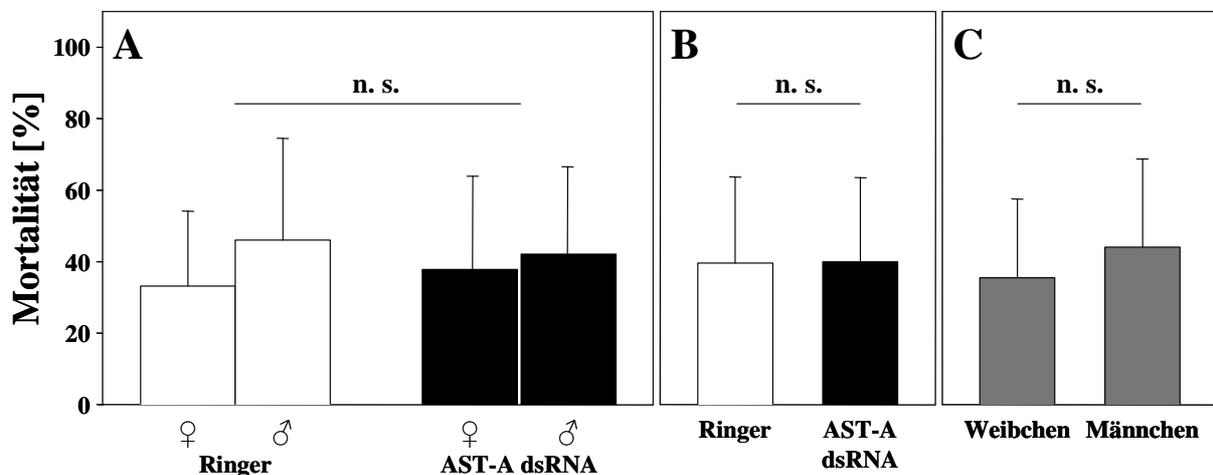


Abb. 54: Mortalität weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* drei Tage nach Injektion von Termitenringer oder doppelsträngiger RNA abgeleitetet vom Allatostatin A-Gen (AST-A dsRNA).

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung. Behandlung: Injektion von 2 μ l Ringer (weiß) oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Ringer (schwarz), Haltung für drei Tage separat von der Kolonie. n. s. = kein signifikanter Unterschied zwischen den Datensätzen. (A) Mortalität in Abhängigkeit von der Behandlung und dem Geschlecht. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 0,58$; $df = 3$; $P = 0,901$. $n = 4$. (B) Zusammenfassung der Mortalität aller Ringer- und dsRNA-injizierten Arbeiter unabhängig vom Geschlecht. Mann-Whitney U-Test: $U = 29,5$; $Z = -0,263$; $P = 0,793$. $n = 8$. (C) Zusammenfassung der Mortalität aller Weibchen und Männchen unabhängig von der Behandlung. Mann-Whitney U-Test: $U = 25,5$; $Z = -0,683$; $P = 0,495$. $n = 8$.

Auffällig war, dass die Mortalität zwischen den vier Experimenten stark schwankte. Während die Mortalität in den ersten beiden Experimenten durchschnittlich bei $24 \pm 19\%$ lag, war die Mortalität im Experiment 3 und 4 mit $55 \pm 15\%$ signifikant höher (nicht dargestellt; Mann-Whitney U-Test: $U = 6$; $Z = -2,733$; $P = 0,006$).

Expression von Allatostatin A in verschiedenen Geweben nach Injektion von Termitenringer und AST-A dsRNA

Der Einfluss der Injektion von AST-A dsRNA auf die Expression des AST-A Gens wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Ergebnisse beider Experimente unterschieden sich teilweise deutlich, daher wurden sie zunächst getrennt ausgewertet und anschließend zusammengefasst.

Im ersten Experiment mussten die Gewebe der weiblichen und männlichen Arbeiter aufgrund der geringen Anzahl der Tiere vereinigt und gemeinsam analysiert werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine veränderte relative AST-A Expression der dsRNA-injizierten Tiere. Dabei konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben beobachtet werden. Im Oberschlundganglion war die Expression bei den dsRNA-injizierten Tieren um 73% höher als bei den Kontrolltieren (Abb. 55). Die relative AST-A Expression in den untersuchten Darmabschnitten war in den dsRNA-injizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erwartungsgemäß reduziert. Dabei ging die Expression im Mitteldarm am stärksten zurück (Reduktion um 89%), beim Vorder- und Hinterdarm war die Reduktion geringer (-71% bzw. -56%; Abb. 55).

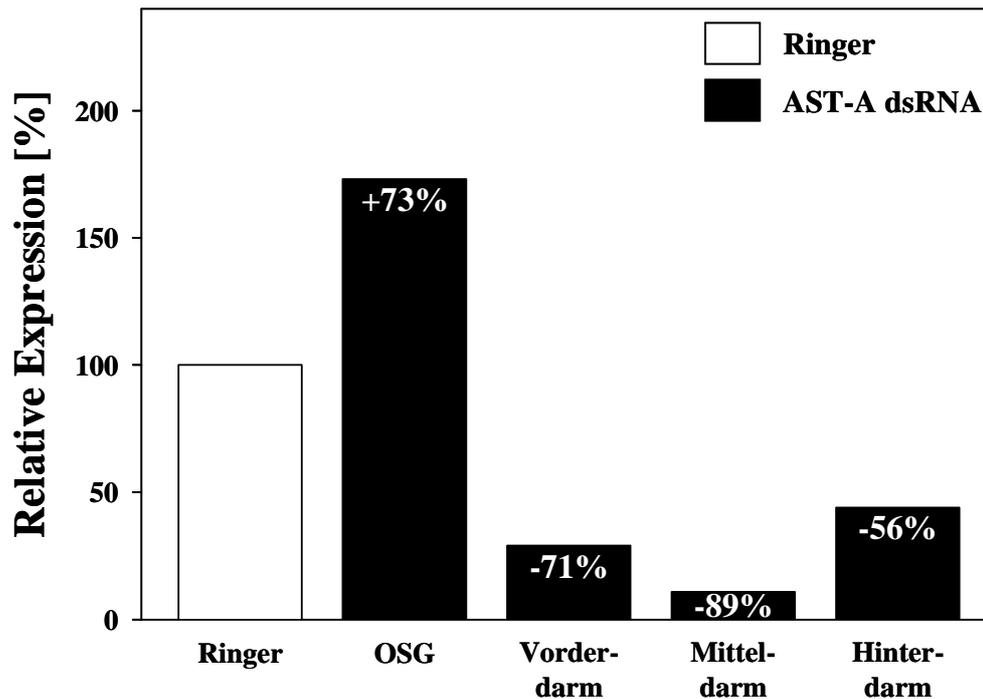


Abb. 55: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 µl Termitenringer oder 1 µg AST-A dsRNA gelöst in 2 µl Termitenringer (1. RNAi-Experiment).

Nach der Injektion wurden die Arbeiter separat von der Kolonie gehalten und nach drei Tagen analysiert. Für die Analyse wurden die Gewebe von Weibchen und Männchen vereinigt. Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und danach mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Anschließend wurde die relative Expression der Gewebe der Ringer-injizierten Tiere auf 100% gesetzt und die relative Expression der Gewebe der dsRNA-injizierten Tiere prozentual dazu ausgedrückt. OSG = Oberschlundganglion n = 1 (je 16 (Ringer) bzw. 14 (AST-A dsRNA) Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

Beim zweiten Experiment konnten die Gewebe der männlichen und weiblichen Arbeiter getrennt analysiert werden. Drei Tage nach der Injektion zeigte sich sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen in allen untersuchten Geweben eine Reduktion der relativen AST-A Expression bei den dsRNA-injizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 56). Wie auch schon im ersten Experiment gezeigt wurde, war die Ausprägung der Reduktion abhängig vom Gewebe. Die größte Reduktion zeigte sich im Mitteldarm (-92% bzw. -80%) und im Gehirn (-56% bzw. 81%). Im Vorder- (-16% bzw. -54%) und Hinterdarm (-11% bzw. -45%) dagegen war die AST-A Expression nicht so stark reduziert. Die Männchen zeigten in allen Geweben – mit Ausnahme des Mitteldarms – eine stärkere Reduktion der relativen AST-A Expression nach Injektion von AST-A dsRNA als die Weibchen. Im Vergleich zum ersten Experiment war die Reduktion der Expression im Vorder- und Hinterdarm im zweiten Experiment nicht so stark ausgeprägt (vergl. Abb. 55; VD: -71% vs. -35%; HD: -56% vs. -28%).

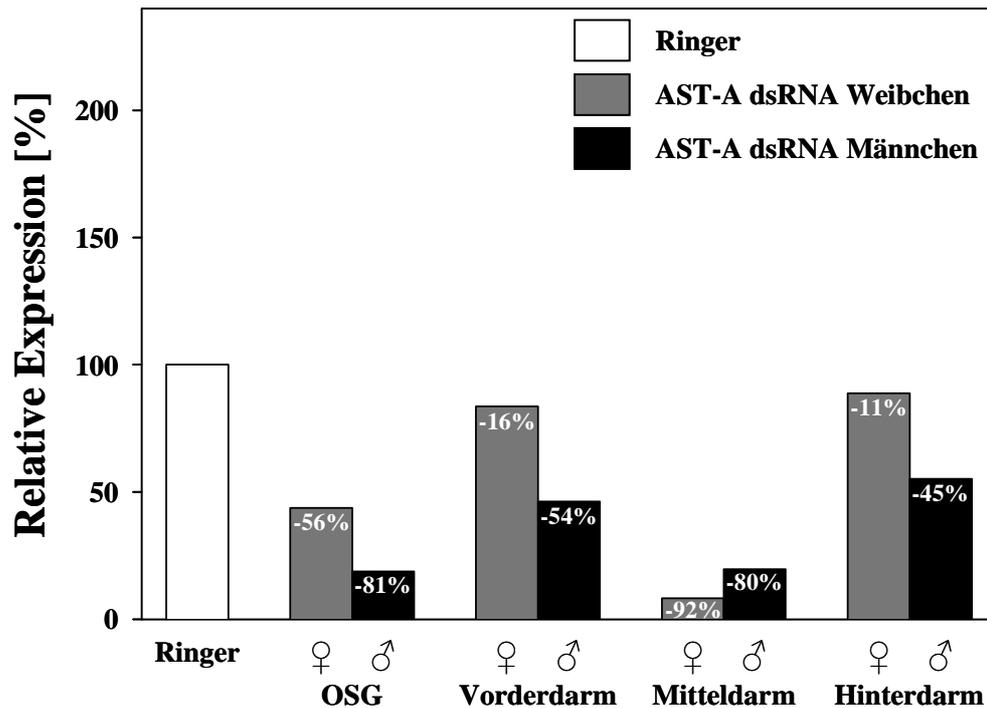


Abb. 56: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* drei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Termitenringer (2. RNAi-Experiment).

Nach der Injektion wurden die Arbeiter separat von der Kolonie gehalten und nach drei Tagen analysiert. Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und danach mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Anschließend wurde die Expression in den Geweben der Ringer-injizierten Tiere auf 100% gesetzt und die Expression in den Geweben der dsRNA-injizierten Tiere prozentual dazu ausgedrückt. OSG = Oberschlundganglion. n = 1 (je 12 bis 14 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten und zweiten Experiments zeigt eine Reduktion der relativen Expression von AST-A in allen Geweben nach Injektion von AST-A dsRNA im Vergleich zu Ringer-injizierten Kontrolltieren (Abb. 57). Im Gehirn war die Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren um 21% reduziert (nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test: U = 3; Z = -0,696; P = 0,487). Die Expression in den einzelnen Darmabschnitten war im Vergleich zu den Kontrolltieren bei den dsRNA-injizierten Tieren signifikant reduziert (jeweils Mann-Whitney U-Test: U = 0; Z = -2,087; P = 0,037). Insgesamt war die Reduktion der Expression im Mitteldarm mit einem Wert von 87% am stärksten ausgeprägt. Die Auswertung beider Experimente mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode führte zu nahezu identischen Ergebnissen (nicht dargestellt).

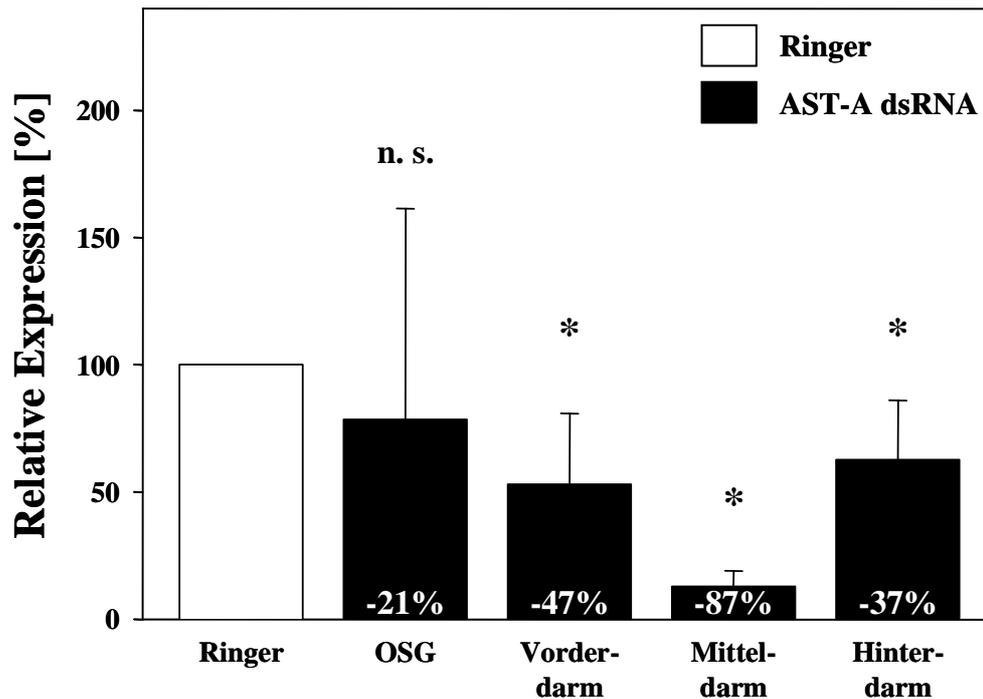


Abb. 57: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Termitenringer (Zusammenfassung 1. und 2. RNAi-Experiment).

Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung, Zusammenfassung der Daten von Weibchen und Männchen Nach der Injektion wurden die Arbeiter separat von der Kolonie gehalten und nach drei Tagen analysiert. Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und danach mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Anschließend wurde die Expression in den Geweben der Ringer-injizierten Tiere auf 100% gesetzt und die Expression in den Geweben der dsRNA-injizierten Tiere prozentual dazu ausgedrückt. OSG = Oberschlundganglion. n. s. = kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression im OSG bei dsRNA-injizierten und Kontrolltieren (Mann-Whitney U-Test: $U = 3$; $Z = -0,696$; $P = 0,487$). * = signifikanter Unterschied der Expression in den einzelnen Darmabschnitten zwischen dsRNA-injizierten und Kontrolltieren (jeweils Mann-Whitney U-Test: $U = 0$; $Z = -2,087$; $P = 0,037$). Daten aus Abb. 55 und 56. $n = 3$ (je 12 bis 16 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 3x gemessen).

Einfluss der Injektion von AST-A dsRNA auf den Hormontiter in der Hämolymphe

Um die Funktion von AST-A bei *M. darwiniensis* zu untersuchen, sollte die AST-A Genexpression durch Injektion von AST-A dsRNA unterdrückt werden. Anschließend wurde die Auswirkung der Injektion auf den Hormontiter der Hämolymphe untersucht. Der JH III-Titer war dabei von besonderem Interesse. Dieser wurde in drei unabhängigen Experimenten überprüft und mit dem JH III-Titer der Kontrolltiere verglichen (Abb. 58). Bei den weiblichen mit dsRNA-injizierten Arbeitern war der JH III-Titer im Vergleich zu den Kontrolltieren um 12% reduziert. Zwischen den mit dsRNA injizierten männlichen Arbeitern und den Kontrolltieren konnten keine Unterschiede bezüglich des JH III-Titers beobachtet werden. Die

statistische Auswertung zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Kruskall-Wallis H-Test: $H = 0,423$; $df = 2$; $P = 0,809$).

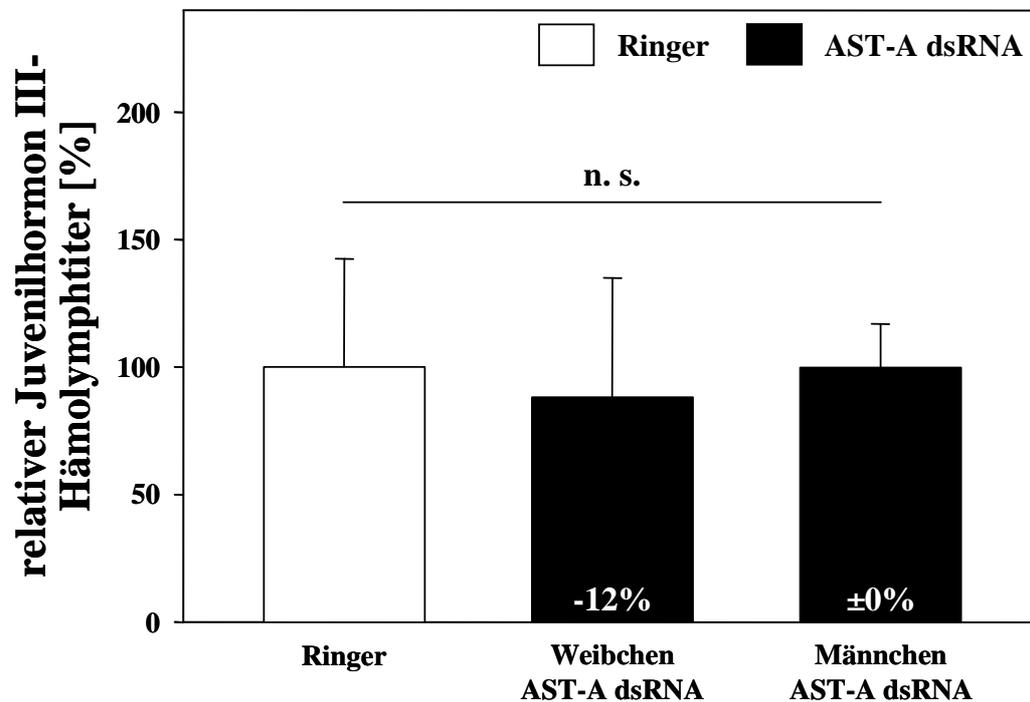


Abb. 58: Relativer Juvenilhormon III (JH III)-Hämolymphtiter in weiblichen und männlichen Arbeitern von *Mastotermes darwiniensis* drei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Termitenringer.

Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung. Der JH III-Titer wurde in pg pro μ l Hämolymphe bestimmt. Anschließend wurde der JH III-Titer der Ringer-injizierten Tiere auf 100% gesetzt und der JH III-Titer der dsRNA-injizierten Tiere darauf bezogen. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 0,423$; $df = 2$; $P = 0,809$ (n. s. = nicht signifikant). $n = 14$ (Ringer), 5 (Weibchen AST-A dsRNA), 7 (Männchen AST-A dsRNA) (je 2 bis 7 Individuen pro Probe).

Beim Vergleich des JH III-Titers zwischen den verschiedenen RNAi-Experimenten fiel auf, dass der JH III-Titer der Arbeiter insgesamt im Experiment 2 höher war als in den Experimenten 3 und 4 (Abb. 59). Der JH III-Titer des zweiten Experiments lag bei durchschnittlich 219 ± 50 pg pro μ l Hämolymphe (unabhängig von der Behandlung und dem Geschlecht der Tiere), bei den Experimenten 3 und 4 wies er lediglich Werte von 33 ± 14 bzw. 25 ± 10 pg pro μ l Hämolymphe auf. Auch die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten (Kruskall-Wallis H-Test: $H = 16,96$; $df = 2$; $P < 0,001$).

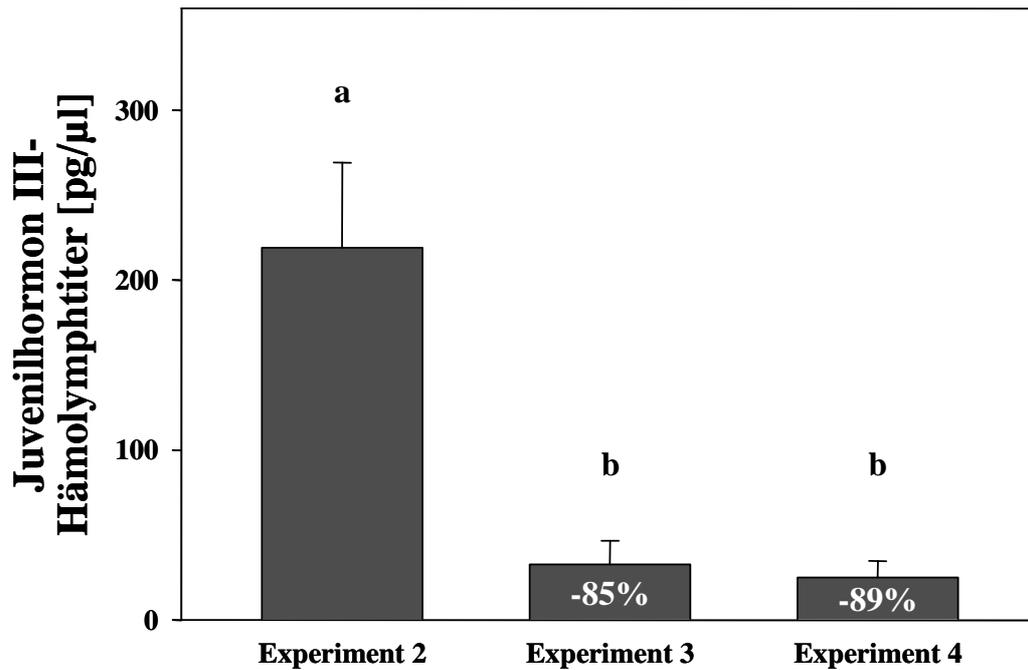


Abb. 59: Juvenilhormon III-Hämolymphtiter von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern drei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer oder 1 μ g AST-A dsRNA gelöst in 2 μ l Termitenringer in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Experiments.

Zusammenfassung aller Werte eines Experiments unabhängig von der Behandlung und dem Geschlecht der Tiere. Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 16,96$; $df = 2$; $P < 0,001$. *Post hoc*-Test: Mann-Whitney U-Test mit sequenzieller Bonferroni-Korrektur, unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Daten aus Abb. 58. $n = 8$ (Experiment 2), 11 (Experiment 3), 7 (Experiment 4).

Zusätzlich zum JH III-Titer wurde in allen Proben der Ecdysteroidgehalt der Hämolymphe bestimmt. In keiner der Proben war Ecdyson nachweisbar. 20-Hydroxyecdysol konnte dagegen in mehreren Proben gemessen werden. Dabei trat 20-HE nur in Proben der Experimente 3 und 4 auf, im Experiment 2 konnte kein 20-HE nachgewiesen werden. In Abb. 60 sind daher nur die Ergebnisse der Experimente 3 und 4 dargestellt. Die Kontrolltiere wiesen einen signifikant niedrigeren 20-HE-Titer auf als die mit AST-A dsRNA injizierten Tiere (Abb. 60B; Mann-Whitney U-Test: $U = 14$; $Z = -2,536$; $P = 0,011$). Innerhalb einer Behandlung zeigten die Männchen einen geringeren 20-HE-Titer als die Weibchen (Abb. 60A). Bei männlichen Kontrolltieren war kein 20-HE nachweisbar. Der höchste 20-HE-Titer konnte mit einem Wert von $8,7 \pm 1,8$ pg pro μ l bei dsRNA-injizierten Weibchen ermittelt werden. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Kruskal-Wallis H-Test: $H = 8,616$; $df = 3$; $P = 0,035$), durch die angewendete sequenzielle Bonferroni-Korrektur konnten jedoch in *post hoc*-Vergleichen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 60A).

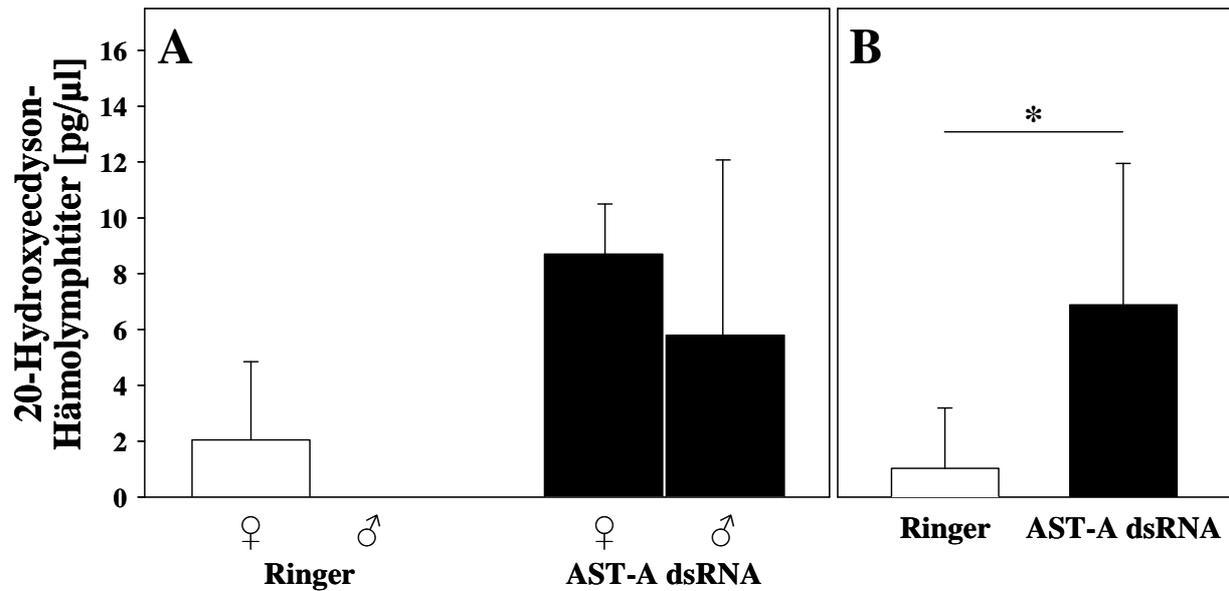


Abb. 60: 20-Hydroxyecdysone (20-HE)-Hämolymphtiter weiblicher und männlicher Arbeiter von *Mastotermes darwiniensis* drei Tage nach Injektion von Termitenringer oder AST-A dsRNA (RNAi-Experimente 3 und 4).

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung. Injektion: 2 μ l Termitenringer (weiß) oder 1 μ g AST-A dsRNA in 2 μ l Termitenringer (schwarz). (A) 20-HE-Titer in Abhängigkeit von Behandlung und Geschlecht. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 8,616$; $df = 3$; $P = 0,035$. *Post hoc*-Test: Mann-Whitney U-Test mit sequenzieller Bonferroni-Korrektur; es konnten keine signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. $n = 5$ (Weibchen AST-A dsRNA: $n = 3$). (B) 20-HE-Titer in Abhängigkeit von der Behandlung. * = signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mann-Whitney U-Test: $U = 14$; $Z = -2,536$; $P = 0,011$). $n = 10$ (Ringer) bzw. 8 (AST-A dsRNA).

6 Diskussion

6.1 Angewendete Methoden

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Methoden erstmals bei der Termiten *Mastotermes darwiniensis* angewendet. Dazu gehörten Expressionsstudien mittels qPCR, die Validierung geeigneter Referenzgene sowie die Methode der RNA-Interferenz. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen und Methodenentwicklung sollen im Folgenden diskutiert werden.

6.1.1 Identifikation eines geeigneten Referenzgens

Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben zu gewährleisten, muss bei der Untersuchung der Expression eines Gens eine Normalisierung der Messwerte stattfinden. Häufig wird dafür eine interne Referenz verwendet, ein sogenanntes Referenzgen, das in allen Proben und unter verschiedenen Versuchsbedingungen eine stabile Expression aufweist (Thellin *et al.* 1999). Bei älteren semiquantitativen Methoden zur Expressionsbestimmung wurden häufig sogenannte „Housekeeping“-Gene verwendet, die eine hohe Expression in allen Zellen aufwiesen und somit gleichzeitig eine gute Positivkontrolle bildeten. Diese „klassischen“ Referenzgene weisen bei modernen Methoden der Expressionsbestimmung jedoch häufig eine zu hohe Variabilität auf. Eine Validierung des verwendeten Referenzgens ist daher notwendig (Huggett *et al.* 2005).

Für Expressionsstudien bei Termiten wurden bisher verschiedene Referenzgene verwendet. Häufig genutzte Referenzgene sind β -Aktin (z. B. Scharf *et al.* 2003, 2005a; Liénard *et al.* 2006; Korb *et al.* 2009b; Maekawa *et al.* 2010), NADH-Dehydrogenase (z. B. Zhou *et al.* 2006b, c; Schwinghammer *et al.* 2011), HSP-70 („heat shock protein“; z. B. Zhou *et al.* 2006c, 2008) und 18S-rRNA (z. B. Koshikawa *et al.* 2005; Cornette *et al.* 2006; Weil *et al.* 2007, 2009). Untersuchungen zur Stabilität der Expression der verwendeten Referenzgene führen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es konnte gezeigt werden, dass dabei verschiedene Faktoren beeinflussend wirken – wie das Entwicklungsstadium der Tiere, die Behandlung oder der verwendete Algorithmus zur Berechnung (Scharlaken *et al.* 2008; Hojo *et al.* 2009, 2011; Van Hiel *et al.* 2009; Ponton *et al.* 2011). Aus diesem Grund sollte für jedes Experiment das optimale Referenzgen bestimmt werden. Noch besser ist die Verwendung

mehrerer Referenzgene (Vandesompele *et al.* 2002). Generell wurden β -Aktin, GAPDH, NADH-Dehydrogenase und EF1 α in den verschiedenen Studien als relativ stabil exprimierte Referenzgene identifiziert.

Für die Identifikation eines geeigneten Referenzgens bei *M. darwiniensis* sollten die genannten vier Gene untersucht werden. Die Identifikation der Gene GAPDH und EF1 α schlug fehl, so dass nur β -Aktin und NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3) auf ihre Eignung als Referenzgen getestet werden konnten. In verschiedenen Geweben männlicher und weiblicher Arbeiter von *M. darwiniensis* wurde die Stabilität der Expression von β -Aktin und ND3 untersucht. Beide zeigten eine eher geringe Stabilität, die aber noch über der des ebenfalls getesteten AST-A Gens lag. Das ND3-Gen zeigte eine minimal größere Stabilität als β -Aktin und scheint daher als Referenzgen etwas besser geeignet zu sein. Eine schwankende Expression beider Gene konnte auch bei Arbeitern von *Reticulitermes flavipes* als Antwort auf hormonelle und chemische Behandlung oder Veränderung des sozialen Umfelds beobachtet werden (Tarver *et al.* 2010). Enzyme der Atmungskette, zu denen die NADH-Dehydrogenase gehört, wurden auch während der Kastendifferenzierung unterschiedlich exprimiert (Scharf *et al.* 2003; Liénard *et al.* 2006). Eine Regulation der Expression von Proteinen des Zytoskeletts, zu denen auch das β -Aktin gehört, wurde während der Kastendifferenzierung ebenfalls beobachtet (Ishikawa *et al.* 2010).

Die Ergebnisse der durchgeführten Validierung konnten β -Aktin und ND3 – eventuell auch aufgrund der geringen Stichprobengröße – nicht als stabil exprimierte Referenzgene bestätigen. Vor zukünftigen Experimenten mit *M. darwiniensis* sollte daher erneut eine Validierung stattfinden. Unter Einbeziehung einer größeren Stichprobengröße und einer größeren Anzahl von potentiellen Referenzgenen könnten so die am besten passenden Referenzgene gefunden werden.

6.1.2 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz hat sich in den letzten Jahren zu einer beliebten Methode zur Identifikation oder Verifizierung der Funktionen bekannter Gene entwickelt. Der Mechanismus der posttranskriptionalen Genstilllegung durch doppelsträngige RNA ist besonders nützlich bei der Untersuchung von Nicht-Modellorganismen oder Organismen, die nicht genetisch transformiert werden können. Der Effekt ist meist systemisch, d. h. eine an bestimmter Stelle injizierte dsRNA kann sich im Körper ausbreiten und an anderen Stellen

wirken (Review in Bellés 2010). RNAi konnte auch bei Termiten bereits erfolgreich angewendet werden. Untersuchungen erfolgten an *Reticulitermes flavipes* und *Cryptotermes secundus*, die dsRNA wurde mittels Injektion oder Verfütterung verabreicht (z. B. Zhou *et al.* 2006c, 2008; Korb *et al.* 2009b; Schwinghammer *et al.* 2011).

Bei *M. darwiniensis* sollte die RNAi mittels dsRNA abgeleitet vom AST-A Gen ausgelöst werden. Es waren zunächst einige Voruntersuchungen notwendig. Dadurch sollten die genauen Parameter für die RNAi-Versuche bestimmt werden.

Es konnte eine erhöhte Mortalität durch die Injektion beobachtet werden. Diese war unabhängig von der Zusammensetzung der Injektionslösung und wurde wahrscheinlich durch Stress, die Verletzung und das damit verbundene erhöhte Infektionsrisiko hervorgerufen. Die AST-A dsRNA verursachte – unabhängig von der verwendeten Konzentration – keine weitere Erhöhung der Mortalität. Eine dosisabhängige Mortalität konnte dagegen in anderen Insekten nachgewiesen werden, z. B. bei *Spodoptera frugiperda* (Griebler *et al.* 2008; Griebler 2009).

Die Injektion von Ringerlösung führte bei *M. darwiniensis* zu einer bis zu 44x höheren AST-A Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren. In anderen Studien konnten durch Injektion von Ringerlösung reduzierte JH-Titer nachgewiesen werden (Lorenz *et al.* 1998; Griebler *et al.* 2008). Diese Reduktion des JH-Titers könnte ebenfalls durch eine erhöhte AST-A Expression verursacht worden sein. Da die unbehandelten Tiere in diesem Experiment direkt aus der Kolonie entnommen wurden, könnte die Erhöhung der AST-A Expression in Ringer-injizierten Tieren aber auch durch die Isolation der Tiere von der Kolonie ausgelöst worden sein. Die Isolation führt zu einer signifikant veränderten Expression einiger Gene (Zhou *et al.* 2007). Trotz Auswirkungen auf die Genexpression wurde dennoch Ringerlösung gegenüber sterilem Wasser als Injektionslösung bevorzugt, da ein relativ großes Injektionsvolumen verwendet wurde. Kontrolltiere wurden daher ebenfalls mit Ringerlösung injiziert und von der Kolonie isoliert gehalten, um vergleichbare Bedingungen zu den behandelten Tieren zu schaffen.

Injektionen von verschiedenen Mengen an dsRNA zur Bestimmung der optimalen Injektionsmenge führten zu einem unerwarteten Ergebnis. Es wurde eine Erhöhung der AST-A Expression statt der erwarteten Reduktion nachgewiesen. Diese war am stärksten ausgeprägt bei der Injektion der größten Menge an dsRNA. Da sich die AST-A Fragmente für die Herstellung der dsRNA und für die Quantifizierung der Expression überschneiden, wurde vermutet, dass das injizierte (und nicht abgebaute) dsRNA-Fragment während der qPCR ebenfalls detektiert wurde. In einem Versuch zum direkten Nachweis der AST-A dsRNA

mittels qPCR konnte das dsRNA-Fragment später – wie bereits vermutet – tatsächlich nachgewiesen werden. Auch bei Injektion von Vitellogenin-dsRNA in Honigbienen wurde die injizierte RNA nach 15 Tagen noch detektiert (Amdam *et al.* 2003). Abgebaute Fragmente der dsRNA („small interfering RNA“; siRNA) sollten dagegen in der qPCR aufgrund der geringen Größe (21 – 23 bp) nicht nachweisbar sein. Das Vorkommen nicht abgebauter dsRNA deutet auf eine zu hohe eingesetzte Menge von dsRNA hin. Diese überstieg wahrscheinlich die Kapazität des Enzyms Dicer (Amdam *et al.* 2003), das die dsRNA zu siRNA abbaut (Review in Bellés 2010; Terenius *et al.* 2011). Die Aufnahme der dsRNA in die Zellen erfolgt vermutlich über einen passiven Prozess durch das Protein SID-1 („systemic RNAi defective“), das einen Kanal für die dsRNA bildet. Dieser Prozess ist diffusionslimitiert und konzentrationsabhängig, d. h. die Aufnahme erfolgt schneller bei höherer extrazellulärer Konzentration (Shih *et al.* 2009; Shih & Hunter 2011). AST-A dsRNA mit der höchsten Konzentration (2 µg/2 µl) würde demnach am schnellsten in die Zellen aufgenommen werden und sich dort ansammeln, ohne zu siRNAs abgebaut zu werden. Die beim Direktnachweis mittels qPCR bestimmte Konzentration der dsRNA war jedoch sehr viel geringer als die Konzentration beim Experiment zur Bestimmung der optimalen Injektionsmenge. Dies lässt auf die Beteiligung weiterer Prozesse an der Erhöhung der AST-A Expression nach Injektion von AST-A dsRNA schließen. Um den Nachweis der injizierten dsRNA in der qPCR generell auszuschließen, wurde in nachfolgenden Experimenten dennoch ein anderes Fragment für die Herstellung der dsRNA verwendet, welches sich nicht mit dem Fragment für die Quantifizierung der AST-A Expression überlappte.

6.2 Identifikation des Allatostatin A-Gens

Die AST-A Gene der beiden untersuchten Arten *M. darwiniensis* und *C. darwini* konnten zum größten Teil identifiziert werden. Dabei zeigten sich an einzelnen Positionen gravierende Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen. Andererseits konnten aber auch zahlreiche identische oder ähnliche Sequenzabschnitte beobachtet werden, was auf eine enge Verwandtschaft der beiden Arten hindeutet.

6.2.1 Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Mastotermes darwiniensis*

Das identifizierte AST-A Gen von *M. darwiniensis* hat eine Länge von 1238 bp. Der ORF erstreckt sich über 1098 bp und kodiert ein Translationsprodukt von 365 Aminosäuren. Es wurden keine Introns innerhalb des ORF identifiziert. Der Aufbau des AST-A Gens von *M. darwiniensis* ähnelt dem der bereits bekannten AST-A Gene der Blattaria (Donly *et al.* 1993; Ding *et al.* 1995; Belles *et al.* 1999), Orthoptera (Vanden Broeck *et al.* 1996; Meyering-Vos *et al.* 2001) und der Termiten *Reticulitermes flavipes* (Elliott *et al.* 2009b). Bei Diptera und Lepidoptera dagegen sind Introns innerhalb des ORF vorhanden (East *et al.* 1996; Davey *et al.* 1999; Lenz *et al.* 2000b). Das Translationsprodukt des AST-A Gens ist ein Präproallatostatin-Polypeptid, welches aminoterminal mit einem Signalpeptid beginnt. Die Identifikation eines Signalpeptids deutet darauf hin, dass es sich bei dem Prohormonvorläufer um ein sekretorisches Polypeptid handelt. Das Signalpeptid wird während des Transports des Polypeptids durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten (von Heijne 1990). Mit nur neun Aminosäuren ist das identifizierte Signalpeptid relativ kurz. Zudem konnten die drei charakteristischen Regionen eines Signalpeptids – positiv geladen, hydrophob und polar (von Heijne 1990) – nicht eindeutig identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass das als Translationsstartpunkt identifizierte Methionin an Position 28-30 eventuell nicht den Startpunkt der Translation darstellt. Es könnte noch ein weiteres Methionin in der unbekanntenen Sequenz in 5'-Richtung vorhanden sein.

Das Translationsprodukt weist dibasische endoproteolytische Schnittstellen auf, die die Freisetzung mehrerer Peptide aus dem Prohormonvorläufer ermöglichen. Diese werden fast immer gebildet von den Aminosäuren Lysin und Arginin (Loh & Gainer 1983; Veenstra 2000). Bei *M. darwiniensis* finden sich zusätzlich zwei Schnittstellen aus Arg-Arg und eine aus Lys-Lys. Weiterhin gibt es am Ende der identifizierten Sequenz eine monobasische Schnittstelle aus einem Lys. Ob an den dibasischen Schnittstellen tatsächlich eine Abspaltung vorkommt, ist unklar. Laut Veenstra (2000) werden Paarungen aus Lys-Arg immer geschnitten, wenn an Position +1 keine aliphatische Aminosäure (Met, Leu, Ile, Val) folgt. Die Prozessierung an Schnittstellen aus Arg-Arg und aus Lys-Arg mit einer aliphatischen Aminosäure an Position +1 ist unterschiedlich. Bei Paarungen von Lys-Lys sind Spaltungen bei Insekten sehr selten. An monobasischen Schnittstellen aus Arg kommt es zur Spaltung, wenn an Position -8, -6 oder -4 eine weitere basische Aminosäure (Arg, Lys oder His) zu finden ist. Bei monobasischen Schnittstellen aus Lys konnte dies bisher nicht gezeigt werden (Veenstra 2000). Neben den dibasischen Schnittstellen, die die potentiellen Peptide

flankieren, finden sich zwei zusätzliche innerhalb der potentiellen AST-A Peptide. Die Schnittstelle innerhalb von Masda-AST-2 wurde in allen bisher untersuchten Vertretern der Blattaria, Isoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera und Orthoptera gefunden. Durch die Schnittstelle wird die Prozessierung in zwei potentielle Peptide mit allatostater Funktion ermöglicht – das lange AST-2 und das kurze AST-2b. Beide Peptide konnten bisher bei *Schistocerca gregaria* (Veelaert *et al.* 1996a, b), *Periplaneta americana* (Predel *et al.* 1999); *Cydia pomonella* und *Helicoverpa armigera* (Duve *et al.* 1997c) nachgewiesen werden. Bei *Calliphora vomitoria* kommt hingegen ausschließlich die kurze Form vor (Duve *et al.* 1996). AST-2b zeigt im Vergleich zu AST-2 eine reduzierte Wirkung auf die JH-Biosynthese *in vitro* (Pratt *et al.* 1991; Veelaert *et al.* 1996b), ist aber als Myoinhibitor des Vorderdarms von *C. pomonella* aktiv (Duve *et al.* 1997a). Die Schnittstelle innerhalb von Masda-AST-11 wird durch Arg-Arg gebildet. Ob an dieser Stelle eine Abspaltung stattfindet, ist nicht bekannt. Die Prozessierung an Schnittstellen aus Arg-Arg ist unterschiedlich und nicht eindeutig vorhersehbar. Auch partielle Abspaltungen wurden beobachtet (Veenstra 2000).

Wenn die Nutzung der genannten Schnittstellen erfolgt, können aus dem Prohormonvorläufer 14 (15 bis 16 bei Nutzung der internen Schnittstellen in Masda-AST-2 und 11) potentielle Peptide abgespalten werden. Davon weisen neun die für AST-A Peptide charakteristische C-terminale Sequenz Y/FXFGL auf. Im Peptid Masda-AST-7 erfolgte ein Austausch des terminalen Leu mit Val. Dies konnte auch bei je einem Peptid von *Gryllus bimaculatus* (Meyering-Vos *et al.* 2001) und *Schistocerca gregaria* (Vanden Broeck *et al.* 1996) gezeigt werden. Im Peptid Masda-AST-11 war Met statt Leu die C-terminale Aminosäure. Met-Allatostatine wurden auch bei *C. vomitoria* nachgewiesen. Die biologische Aktivität der Met-Allatostatine als allatoregulierende Peptide konnte durch die inhibitorische Wirkung auf die CA von *Diploptera punctata* und *Periplaneta americana* nachgewiesen werden (Duve *et al.* 1993, 1994). Weiterhin wurde eine inhibierende Wirkung auf die Hinterdarmkontraktion bei *C. vomitoria* gezeigt (Duve *et al.* 1994, 1995). Durch Identifikation des AST-A Gens von *C. vomitoria* wurde jedoch nachgewiesen, dass die Met-Allatostatine nicht auf dem AST-A Gen kodiert werden. Es wurde daher vermutet, dass *C. vomitoria* – im Gegensatz zu allen anderen Insekten mit identifiziertem AST-A Gen – zwei AST-A Gene aufweist (East *et al.* 1996). Drei weitere potentielle Peptide des AST-A Prohormonvorläufers von *M. darwiniensis* (Masda-AST-1, 5 und 14) zeigten ebenfalls eine Abweichung von der Y/FXFGL-Struktur der AST-A Peptide. Bei allen drei Peptiden kam es wahrscheinlich durch jeweils eine Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure (jeweils zwei bei Masda-AST-1). Die Bedeutung dieses C-terminalen Endes für die Bioaktivität wurde beim Peptid AST-4 von

D. punctata (Dippu-AST-4) bestimmt. Ein Austausch der Aminosäuren Phe, Gly und Leu des C-terminalen Endes jeweils durch Ala führte zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung auf die CA. Der Austausch von Tyr durch Ala führte zu einer starken Reduktion der inhibitorischen Wirkung auf die CA (Hayes *et al.* 1994). Besonders das Phe scheint wichtig für die Rezeptorbindung zu sein (Hayes *et al.* 1994; Nachman *et al.* 1998). Der Austausch von Leu gegen Ile, welches ebenfalls häufig in AST-A Peptiden zu finden ist, führt dagegen nicht zu einer Verringerung der Bioaktivität (Pratt *et al.* 1991). Bei AST-A Peptiden mit Val statt Leu am C-Terminus kann aufgrund der ebenfalls aliphatischen Natur von Val auf eine vorhandene Bioaktivität geschlossen werden. Kai *et al.* (2011) konnten dagegen eine deutliche Verringerung der Bioaktivität durch Austausch von Leu gegen Val, Ile oder Met beobachten. Die Auswirkung des Austauschs von Aminosäuren auf andere Funktionen der AST-A Peptide (z. B. Inhibition der Kontraktion viszeraler Muskulatur) wurde bisher nicht untersucht. Die veränderte Struktur der potentiellen Peptide Masda-AST-1, 5 und 14 lässt darauf schließen, dass sie keine wirksamen Inhibitoren der JH-Biosynthese darstellen. Auch die Benennung als potentielle AST-A Peptide sollte überdacht werden, da die drei Peptide nicht die charakteristische C-terminale Struktur Y/FXFGL bzw. Y/FXFGL/I/V aufweisen. Zudem wird Masda-AST-14 von einer monobasischen Schnittstelle flankiert, an der eventuell keine Abspaltung stattfindet (Veenstra 2000).

Nach dem C-Terminus der potentiellen AST-A Peptide folgt normalerweise ein Glycin. Die Aminosäure Glycin ermöglicht die Amidierung der Peptide durch die Peptidylglycin- α -Amidierung-Monooxygenase (Bradbury *et al.* 1982; Murthy *et al.* 1986; Eipper *et al.* 1992). Laut Pratt *et al.* (1989) und Kai *et al.* (2011) ist die Amidierung der AST-A Peptide notwendig für die allatostate Aktivität. Kein Gly findet sich dagegen bei den potentiellen Peptiden Masda-AST-5, 9, 10 und 14. Eine Prozessierung an diesen Stellen des AST-A Prohormonvorläufers würde demnach zu nicht-amidierten Peptiden führen, die keine Wirkung auf die JH-Biosynthese der CA hätten. Die Peptide Masda-AST-5 und 14 weisen zudem nicht die charakteristische C-terminale Sequenz der AST-A Peptide auf. Eine Wirkung der Amidierung auf andere Funktionen der AST-A Peptide wurde nicht untersucht. Bei anderen Peptiden wurde die Notwendigkeit der Amidierung für die Bioaktivität jedoch ebenfalls gezeigt (Mains *et al.* 1983; Manning *et al.* 1984). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch verschiedene Punktmutationen bei *M. darwiniensis* die Funktionalität einiger Peptide des Prohormonvorläufers verlorengegangen ist. Die Bioaktivität der potentiellen Peptide wurde bisher nicht überprüft. AST-A Peptide von *M. darwiniensis* wurden noch nicht direkt isoliert.

6.2.2 Sequenz des Allatostatin A-Gens von *Cryptocercus darwini*

Die bisher identifizierte Teilsequenz des AST-A Gens von *C. darwini* ist 1137 bp lang. Sie enthält den Translationsstartpunkt und den größten Teil des ORF. Das 3'-Ende und ein Teil des ORF mit einer Länge von ca. 30 Nukleotiden konnten bisher noch nicht sequenziert werden. Ebenso wie beim AST-A Gen von *M. darwiniensis* wurden keine Introns identifiziert. Bei *Diploptera punctata* und *Periplaneta americana*, ebenfalls Blattaria, dagegen konnten Introns außerhalb des ORF am 5'-Ende des Gens nachgewiesen werden (Ding *et al.* 1995). Das Translationsprodukt besteht aus 366 Aminosäuren und beginnt aminoterminal mit einem 27 AS langen Signalpeptid. Dieses wird während des Transports des Polypeptids durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten (von Heijne 1990). Im Gegensatz zur Sequenz von *M. darwiniensis* scheint das Signalpeptid bei *C. darwini* vollständig identifiziert worden zu sein.

Das Translationsprodukt des AST-A Gens von *C. darwini* enthält wie bei *M. darwiniensis* zahlreiche dibasische endoproteolytische Schnittstellen. Fast immer bestehen diese aus den Aminosäuren Lys-Arg. Lediglich eine Schnittstelle wird gebildet von Arg-Arg und eine weitere von Arg-Lys. Letztere befindet sich innerhalb des dritten sauren Spacers. Laut Veenstra (2000) ist die Spaltung bei einer Paarung von Arg-Lys bei Insekten jedoch noch nicht beobachtet wurden. Innerhalb des potentiellen Peptids Cryda-AST-2 befindet sich eine weitere dibasische Schnittstelle. Dies entspricht den bisher untersuchten AST-A Sequenzen der Blattaria, Isoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera und Orthoptera. Ob eine Spaltung an dieser Stelle bei *C. darwini* stattfindet, ist bisher ungeklärt.

Unter Berücksichtigung aller Schnittstellen können aus dem identifizierten Prohormonvorläufer von *C. darwini* 13 (14 mit Cryda-AST-2b) potentielle AST-A Peptide abgespalten werden. Alle Peptide weisen die für AST-A charakteristische C-terminale Sequenz Y/FXFGL auf. Ein potentielles 14. (bzw. 15.) AST-A Peptid befindet sich am C-terminalen Ende des bisher identifizierten Prohormonvorläufers. Die Sequenz des Peptids ist nicht vollständig, endet aber mit YDF, was den Beginn des C-terminalen Endes YDFGI/L darstellen könnte. Eine Kombination bekannter Sequenzen von anderen Blattaria und Isoptera zeigt ein C-terminales Peptid mit der Konsensussequenz I/L/V-P-I/M-Y-D-F-G-I/L, welche der vermuteten Sequenz IPMYDFGI/L von Cryda-AST-14 entspricht. Der Prohormonvorläufer von *C. darwini* enthält demnach wahrscheinlich 14 (bis 15) potentielle AST-A Peptide.

Nach allen potentiellen AST-A Peptidsequenzen von *C. darwini* folgt ein Glycin. Dieses wird während der Amidierung der Peptide durch die Peptidylglycin- α -Amidierungs-Monooxygenase abgespalten (Bradbury *et al.* 1982; Murthy *et al.* 1986; Eipper *et al.* 1992). Alle potentiellen AST-A Peptide von *C. darwini* könnten demnach amidiert sein und biologische Aktivität als allatogulierende Neuropeptide aufweisen (Pratt *et al.* 1989; Kai *et al.* 2011). Trotz vorhandener Amidierung (Pratt *et al.* 1989) und C-terminaler AST-A Sequenz (Hayes *et al.* 1994) weisen dennoch nicht alle bisher isolierten AST-A Peptide die gleiche biologische Aktivität auf. So konnte gezeigt werden, dass einige Peptide besonders gute Inhibitoren der JH-Biosynthese darstellen, andere dagegen die Kontraktion der Darmmuskulatur besonders effektiv hemmen (Bendena *et al.* 1997). Die Bioaktivität der potentiellen AST-A Peptide von *C. darwini* wurde bisher nicht überprüft.

6.3 Phylogenetische Sequenzanalyse des Allatostatin A-Gens

Der Vergleich der Sequenzen des AST-A Prohormonvorläufers von *C. darwini* und *M. darwiniensis* mit bekannten AST-A Sequenzen anderer Dictyoptera zeigt große Ähnlichkeiten hinsichtlich der Länge und Organisation des Prohormonvorläufers. Die Anzahl und Anordnung der Peptide und Spacer ist fast identisch. Dabei weist der Prohormonvorläufer hoch konservierte und variable Regionen auf. Zu den konservierten Regionen zählen die einzelnen AST-A Peptidsequenzen, die Spacerregionen sind dagegen eher variabel. Innerhalb der AST-A Peptidsequenzen kommt es zwischen allen Dictyoptera zu einer Übereinstimmung von 78 bis 99%. Die größte Ähnlichkeit zeigen die AST-A Sequenzen von *C. darwini* und *M. darwiniensis* zu den Sequenzen der Termiten *Reticulitermes flavipes* und der Schaben *Blatta orientalis* und *Periplaneta americana* (beide Familie Blattidae). Dies spiegelt sich auch in den Stammbäumen wider, in denen diese fünf Arten fast immer zusammengruppiert wurden.

In beiden Stammbäumen zur Phylogenie der Dictyoptera bildeten die Familien Blaberidae und Blattidae jeweils eine monophyletische Gruppe. Dies entspricht der gängigen Phylogenie der Blattaria (Kambhampati 1995; Inward *et al.* 2007a; Lo *et al.* 2007a; Ware *et al.* 2008; Roth *et al.* 2009). Die Familien Blaberidae und Blattellidae (Überfamilie Blaberoidea) gruppieren zusammen. Die Blattellidae waren dabei – wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde – entweder monophyletisch (Abb. 35, S. 140; Kambhampati 1995; Lo *et al.* 2007a) oder paraphyletisch (Abb. 36, S. 141; Inward *et al.* 2007a; Ware *et al.* 2008; Roth *et al.* 2009)

in Bezug auf die Blaberidae. *M. darwiniensis* gruppierte entweder mit der Termitenart *R. flavipes* und beide Termiten bildeten die Schwestergruppe von *C. darwini* oder *M. darwiniensis* gruppierte mit der Schabe *C. darwini*. Dies ist ein weiterer Beleg für die enge Verwandtschaft der Termiten mit der Familie Cryptocercidae, die bereits im Jahr 1934 von Cleveland *et al.* aufgrund ähnlicher endosymbiontischer Darmflagellaten vermutet wurde. Trotz gegenteiliger Meinungen (z. B. Thorne & Carpenter 1992; Bandi *et al.* 1995; Gäde *et al.* 1997a) gilt die enge Verwandtschaft zwischen Termiten und Cryptocercidae heutzutage als gesichert (z. B. Klass & Meier 2006; Inward *et al.* 2007a; Legendre *et al.* 2008; Davis *et al.* 2009). Die zentrale Stellung beider Termitenarten innerhalb der Blattaria bestätigt zusätzlich die Paraphylie der Blattaria und die Monophylie der Blattodea (Hennig 1981).

Der Vergleich der AST-A Gene und Prohormonvorläufer von Vertretern verschiedener Insektenordnungen offenbarte eine Veränderung der Organisation im Lauf der Evolution. Bei höher entwickelten Insektenordnungen – wie Diptera, Hymenoptera und Lepidoptera – kam es zur Reduktion der Anzahl der AST-A Peptide. Gleichzeitig wurde die Anzahl der Exons und Introns im AST-A Gen erhöht (Martínez-Pérez *et al.* 2009).

Die phylogenetische Analyse des AST-A Gens dieser 42 Arten zeigte erneut die enge Verwandtschaft der Blattaria und Isoptera und bestätigte die Position der Isoptera innerhalb der Blattaria. *Gryllus bimaculatus* (Ensifera) bildete in beiden Stammbäumen die Schwestergruppe der Blattodea. Dies deutet auf die Eignung von *G. bimaculatus* als Außengruppe für die Untersuchung der Phylogenie der Dictyoptera hin (Maekawa *et al.* 1999; Ware *et al.* 2008). Eine enge Verwandtschaft zwischen *Schistocerca gregaria* (Caelifera) und *G. bimaculatus* konnte dagegen nicht bestätigt werden. Die Ordnungen Ensifera und Caelifera – oft als „Orthoptera“ zusammengefasst – wurden in anderen Studien meist als Schwestergruppen identifiziert (z. B. Maekawa *et al.* 1999; Kjer 2004; Zandawala *et al.* 2012). Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der AST-A Peptide bei *S. gregaria* (10) und *G. bimaculatus* (14) ist die fehlende Gruppierung jedoch nicht überraschend.

Die Vertreter der Diptera wurden in den beiden Untergruppen Brachycera (Fliegen) und Nematocera (Mücken) zusammengefasst. Innerhalb der Brachycera gruppierten alle Arten der Gattung *Drosophila* zusammen und bildeten die Schwestergruppe zu den restlichen Arten. Eine klare Trennung der Diptera in Nematocera und Brachycera ist auch in anderen Stammbäumen zu finden (z. B. Martínez-Pérez *et al.* 2009; Meusemann *et al.* 2010; Zandawala *et al.* 2012). Die Anordnung der beiden Untergruppen zueinander unterschied sich jedoch zwischen den Stammbäumen. Im Stammbaum, der anhand von Aminosäuresequenzen

berechnet wurde, gruppierten beide zusammen. Beim Stammbaum der Nukleotidsequenzen dagegen bildeten die Nematocera die Schwestergruppe des Blattodea/Ensifera-Komplexes. Die Lepidoptera und Hymenoptera wurden – im Gegensatz zu den Diptera – in beiden Stammbäumen jeweils als monophyletische Gruppen identifiziert. Sie zeigten eine enge Verwandtschaft zueinander und zu den Diptera. Alle drei Ordnungen – Diptera, Lepidoptera und Hymenoptera – zählen zu den Holometabola und damit zu den am weitesten evolvierten Insekten (z. B. Kjer 2004; Davis *et al.* 2010; Ishiwata *et al.* 2011). Die beiden Hemiptera-Arten *Rhodnius prolixus* und *Acyrtosiphon pisum* hatten keine feste Position im Stammbaum und zeigten keine Verwandtschaft zueinander. Ein Vergleich der AST-A Prohormonvorläufer zeigte zwar eine ähnliche Peptidanzahl bei beiden (7 bzw. 8), ansonsten aber eher geringe Ähnlichkeit. Die eher basale Position der Hemiptera wurde dennoch bestätigt (z. B. Kjer 2004; von Reumont *et al.* 2009; Meusemann *et al.* 2010).

Alle Stammbäume unterschieden sich teilweise deutlich in ihrer Topologie. Dies wurde auch von Bellés *et al.* (1999) beobachtet, die ebenfalls AST-A Aminosäure- und Nukleotidsequenzen für die Berechnung der Phylogenie der Blattaria verwendeten. Neben der Studie von Bellés *et al.* (1999) gab es bisher zwei weitere, die AST-A Sequenzen für phylogenetische Stammbauberechnungen nutzten (Martínez-Pérez *et al.* 2009; Zandawala *et al.* 2012). Der Vergleich der beiden mit den hier vorliegenden Stammbäumen zeigte ähnliche, aber nicht identische Ergebnisse. Dies liegt zum einem an der unterschiedlichen Größe der Datensätze (hier: 42 Arten; Martínez-Pérez *et al.* 2009: 28 Arten; Zandawala *et al.* 2012: 21 Arten), zum anderen an den unterschiedlichen Methoden der Stammbauberechnung. Zudem wurden unterschiedliche Außengruppen zum Wurzeln der Stammbäume gewählt. Der große Einfluss der gewählten Außengruppe und auch der gewählten Innengruppen auf die Topologie von Stammbäumen konnte bereits bei Untersuchungen der Phylogenie der Dictyoptera gezeigt werden (Grandcolas & D'Haese 2001; Ware *et al.* 2008). Hier wurde der Ruderfußkrebs *Calanus finmarchicus* als Außengruppe gewählt, da dieser als Vertreter der Crustacea eine nahe Verwandtschaft zu den untersuchten Insekten aufweist (von Reumont *et al.* 2009; Meusemann *et al.* 2010). Zudem ist der Prohormonvorläufer mit nur sieben potentiellen AST-A Peptiden den Prohormonvorläufern von Insekten ähnlicher als die anderer Crustacea mit mehr als 30 potentiellen AST-A Peptiden (Yin *et al.* 2006; Christie *et al.* 2008). Neben der Auswahl der untersuchten Taxa, der Außengruppe und der Methodik hat auch die Länge der Sequenzen einen Einfluss auf die Topologie von Stammbäumen (Grandcolas & D'Haese 2001).

Einer der wichtigsten Punkte bei phylogenetischen Analysen ist jedoch die Auswahl eines geeigneten Gens. Für Stammbaumberechnungen häufig verwendete Gene gehören entweder zu den mitochondrialen Genen (mtDNA) oder zu den nuklear lokalisierten Genen der ribosomalen RNA (rDNA). Beispiele für häufig verwendete Gene sind Cytochromoxidase I und II, NADH-Dehydrogenase 5, 16S-rDNA, 12S-rDNA (mtDNA) oder 28S-rDNA (Review in Caterino *et al.* 2000; Carapelli *et al.* 2006). Mitochondriale Gene evolvieren schnell und sind daher eher geeignet, nah verwandte Arten zu vergleichen (Lin & Danforth 2004; Ware *et al.* 2008). Protein-kodierende nukleare Gene sind dagegen eher konserviert und eignen sich für phylogenetische Untersuchungen entfernt verwandter Arten (Lin & Danforth 2004; Carapelli *et al.* 2006; Ware *et al.* 2008). Das Alignment – als kritischer Faktor bei phylogenetischen Untersuchungen (Swofford *et al.* 1996; Inward *et al.* 2007a) – ist zudem bei protein-kodierenden Genen einfacher, da die Nukleotide in Triplets angeordnet sind (Carapelli *et al.* 2006). Beispiele für protein-kodierende nuklear lokalisierte Gene in Stammbaumanalysen sind EF1 α , RNA Polymerase II oder Histon H3 (Review in Caterino *et al.* 2000; Lin & Danforth 2004; Carapelli *et al.* 2006). Über die Eignung von Neuropeptidgenen in phylogenetischen Analysen wurde ebenfalls bereits spekuliert. Da Neuropeptide als Liganden in ihre Rezeptoren passen müssen, weisen Neuropeptidgene konservierte Bereiche auf. Gleichzeitig gibt es variable Abschnitte, so dass phylogenetische Analysen zwischen näher und weiter entfernt verwandten Arten möglich sind (Roth *et al.* 2009). AST-A Gene weisen diese Merkmale ebenfalls auf und scheinen daher für phylogenetische Untersuchungen gut geeignet zu sein (Belles *et al.* 1999; Roth *et al.* 2009). Das Alignment von AST-A Genen unterschiedlicher Insektenordnungen war jedoch schwierig durch die unterschiedliche Länge und die unterschiedliche Anzahl der Peptide. Die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der verwendeten Methoden (NJ und BI) und die geringe statistische Absicherung einiger Abzweigungen lässt sich dadurch erklären. Für gesicherte Aussagen zur Phylogenie scheint das AST-A Gen alleine daher nicht geeignet. Eine Kombination verschiedener Gene mit dem AST-A Gen würde hingegen die Qualität des phylogenetischen Vergleichs erhöhen (Review in Carapelli *et al.* 2006).

6.4 Hormongehalt und Expression des Allatostatin A-Gens während der Kastendifferenzierung von *Mastotermes darwiniensis*

Um den Einfluss des Hormongehaltes auf die Kastendifferenzierung von *M. darwiniensis* zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden verwendet. Es erfolgte die Bestimmung des Gehalts von Ecdysteroiden und Juvenilhormonen in der Hämolymphe und in Ganztierextrakten verschiedener Entwicklungsstadien. Zusätzlich wurde die Expression des Allatostatin A-Gens bei einzelnen Entwicklungsstadien analysiert, da dieses den JH-Gehalt durch Regulation der Biosynthese beeinflussen kann. Ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen JH und AST-A bei *M. darwiniensis* besteht, wurde ebenfalls untersucht.

6.4.1 Hormongehalt von *Mastotermes darwiniensis*

Der Hormongehalt der einzelnen Kasten und Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* wurde mittels HPLC-MS ermittelt. Dafür wurden die fünf Hormone 20-Hydroxyecdysol, Ecdysol, JH III, JH II und JH I quantifiziert. Generell sind Aussagen über den Einfluss der gemessenen Hormone auf die Kastendifferenzierung anhand der gewonnenen Daten schwierig. Es konnten nur Momentaufnahmen von Individuen unbekanntes Alters in einzelnen Entwicklungsstadien und Kasten untersucht werden. Der Verlauf des Hormongehalts innerhalb eines Stadiums und die Weiterentwicklung der untersuchten Individuen konnten dagegen nicht bestimmt werden. Auch innerhalb eines Stadiums können jedoch große Schwankungen des Hormontiters auftreten (Riddiford 1994; Korb *et al.* 2012).

6.4.1.1 Juvenilhormon

Alle Proben enthielten JH III. JH II und JH I konnten dagegen in keiner Probe nachgewiesen werden. JH III ist das dominante JH-Homolog bei den meisten Insekten (Nijhout 1994) und wurde bisher in allen untersuchten Termitenarten als einziges JH-Homolog nachgewiesen (z. B. Meyer *et al.* 1976; Park & Raina 2004; Yagi *et al.* 2005; Maekawa *et al.* 2010). Die gemessenen Werte lagen zwischen 30 und 850 pg JH III pro μl Hämolymphe. Diese Werte entsprechen JH III-Messungen bei den Termiten *Hodotermopsis sjostedti* (Messung mittels HPLC-MS; Cornette *et al.* 2008; Gotoh *et al.* 2008) und *Cryptotermes secundus* (Messung mittels Radioimmunoassay; Korb *et al.* 2009a, 2012). Bei den Ganzkörperextrakten wurden

durchschnittliche Werte von 1 bis 35 pg JH III pro mg Frischgewicht ermittelt. Untersuchungen an *Coptotermes formosanus* zeigten dagegen einen höheren JH III-Gehalt. Dieser lag bei Arbeitern und Soldaten von *C. formosanus* zwischen 13 und 60 pg pro mg Frischgewicht (Park & Raina 2004, 2005; Raina *et al.* 2008; Miyazaki *et al.* 2009), bei *M. darwiniensis* dagegen nur bei ca. 3 pg pro mg Frischgewicht. Vorsoldaten von *C. formosanus* wiesen einen enorm erhöhten JH III-Gehalt von 600 pg pro mg Frischgewicht auf (Park & Raina 2004). Bei *M. darwiniensis* wurden im Untersuchungszeitraum keine Vorsoldaten beobachtet und konnten daher nicht untersucht werden. Ein noch höherer JH III-Gehalt von ca. 12 ng pro mg Frischgewicht wurde bei nymphoiden Neotenics von *Reticulitermes speratus* gemessen (Maekawa *et al.* 2010). Der JH III-Gehalt kann sich demnach zwischen den verschiedenen Termitenarten deutlich unterscheiden. Zusätzlich können Unterschiede zwischen den Studien auch durch unterschiedliche Methoden der Messung und Probenvorbereitung auftreten. Die Messungen erfolgten entweder mittels HPLC-MS, Radioimmunoassay oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Schon bei Messungen an der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* konnte gezeigt werden, dass die Messung mittels HPLC-MS höhere JH III-Werte ergab als die Messung derselben Proben mittels GC-MS (Westerlund 2004). Große Unterschiede innerhalb einer Termitenart bei ähnlicher Messmethode wurden ebenfalls beobachtet (Liu *et al.* 2005a, b; Mao *et al.* 2005; Mao & Henderson 2010). Auch dafür kann es zahlreiche Ursachen geben. Einfluss auf den JH-Gehalt hat beispielsweise die Jahreszeit (Lüscher 1972, 1976; Liu *et al.* 2005a), die Gruppengröße (Mao & Henderson 2010) oder die Dauer der Haltung im Labor (Park & Raina 2005; Korb *et al.* 2009a). Unterschiede im JH-Gehalt bestehen auch zwischen verschiedenen Kolonien (Liu *et al.* 2005a; Wende & Kaib unveröffentl. Daten).

Bei *M. darwiniensis* wiesen die Tiere der apteren Linie (Larven, Arbeiter) einen höheren JH III-Gehalt auf als die Tiere der nymphalen Linie (Nymphen, Alaten). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Modell von Nijhout & Wheeler (1982) zum Einfluss von JH auf die Kastendifferenzierung. Nach Nijhout & Wheeler (1982) führt ein geringer JH-Gehalt während bestimmter JH-kritischer Phasen zur Entwicklung von Alaten über ein oder mehrere Nymphenstadien. Das Modell bezieht sich allerdings auf Termiten mit linearer Entwicklung. *M. darwiniensis* dagegen weist eine zweiästige Entwicklung mit früher Trennung in aptere und nymphale Linie auf. Daher ist eine Übertragung auf das Modell von Nijhout & Wheeler (1982) schwierig. Der JH III-Gehalt scheint bei *M. darwiniensis* von den frühen Nymphenstadien hin zur Alate abzusinken. Es ist nicht möglich, anhand der vorhandenen

Daten eine genauere Aussage bezüglich des Verlaufs des JH III-Gehalts zu treffen. Zum einen konnten von den theoretisch vorhandenen elf Nymphenstadien (Watson *et al.* 1977b) nur die ersten drei untersucht werden. Zum anderen kam es durch die Vereinigung der Proben zu einer Reduktion der Stichprobenzahl. Daher konnte für die Nymphenstadien und die Alaten nur jeweils ein Messwert ausgewertet werden. Geringe JH-Titer in Nymphen wurden auch bei *Hodotermopsis sjostedti* (Cornette *et al.* 2008) und *Cryptotermes secundus* (Korb *et al.* 2009a, 2012) nachgewiesen. Bei *C. secundus* kommt es im Verlauf der Entwicklung der einzelnen Nymphenstadien bis hin zum Adultstadium zu einer stetigen Abnahme des JH-Titers (Korb *et al.* 2009a, 2012) ähnlich wie bei der Imaginalentwicklung anderer hemimetaboler Insekten (Lanzrein *et al.* 1985a; Nijhout 1994). Der niedrige JH-Titer bei Termitennymphen wird benötigt für die Entwicklung der Adultmerkmale wie Flügelanlagen, Komplexaugen oder Pigmentierung der Kutikula (Nijhout & Wheeler 1982). Zum JH-Gehalt in Nymphen von Termiten mit zweiästigem Entwicklungsweg gibt es bisher keine Untersuchungen. Es gibt lediglich eine Studie, in der das CA-Volumen von verschiedenen Nymphenstadien bei *Macrotermes michaelseni* bestimmt wurde. Es kam zum Anstieg des CA-Volumens vom ersten zum fünften Nymphenstadium. Aufgrund der gleichzeitigen Zunahme der Kerndichte kann jedoch eine Zunahme der Aktivität ausgeschlossen werden (Okot-Kotber 1985).

M. darwiniensis-Alaten hatten mit 53 ± 27 pg/ μ l den geringsten JH III-Hämolymphtiter aller untersuchten Gruppen. Bei anderen Termitenarten war der JH-Gehalt der Alaten etwas höher als der JH-Gehalt im letzten Nymphenstadium (Korb *et al.* 2009a, 2012; Maekawa *et al.* 2010). Bei *C. secundus* wies das letzte Nymphenstadium nach kontinuierlicher Abnahme den geringsten JH-Titer auf (Korb *et al.* 2009a, 2012). Das letzte Nymphenstadium konnte bei *M. darwiniensis* nicht untersucht werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei *M. darwiniensis* der JH-Gehalt der Nymphenstadien kontinuierlich absinkt und nach der Adulthäutung wieder leicht ansteigt. Alaten sind die primären Geschlechtstiere und meist verantwortlich für die Gründung neuer Kolonien und die Reproduktion (Nutting 1969). Ein geringer JH-Gehalt in Alaten erscheint daher nicht sinnvoll, da JH für viele Aspekte der Reproduktion benötigt wird. In anderen hemimetabolen Insekten wie Grillen und Schaben kommt es nach der Adulthäutung zu einem erneuten raschen Anstieg der JH-Synthese bzw. des JH-Titers (Lanzrein *et al.* 1978, 1985a; Cruz *et al.* 2003; Westerlund 2004). Die JH-Synthese bzw. der JH-Titer korreliert dabei mit dem Wachstum und der Reifung der Oozyten (Engelmann 1957; Tobe & Stay 1977; Lanzrein *et al.* 1978; Schal *et al.* 1997). Bei Alaten von Termiten ist vor dem Verlassen des Nests noch keine Ovaraktivität zu erkennen, es sind keine reifen Oozyten vorhanden (Watson 1972; Brent *et al.* 2005). Auch die Kopulation findet erst

nach dem Ausschwärmen an einem geeigneten Nistplatz statt (Nutting 1969; Stuart 1969). Bei anderen Insekten konnte in unverpaarten Individuen im Vergleich zu verpaarten ein geringerer JH-Titer nachgewiesen werden (Edwards *et al.* 1995; Weaver *et al.* 1995; Griebler 2009). Der geringe JH-Titer von Alaten innerhalb der maternalen Kolonie erklärt sich daher wahrscheinlich durch geringe Ovaraktivität und nicht erfolgte Verpaarung. In *H. sjostedti* dagegen zeigten weibliche Alaten schon vor dem Ausschwärmen einen 12-fach erhöhten JH-Titer im Vergleich zu Nymphen des letzten Stadiums. Eventuell kommt es bei dieser Art zu einer vorzeitigen Reifung der Ovarien. Der JH-Titer der männlichen Alaten war deutlich niedriger (Cornette *et al.* 2008). Bei *M. darwiniensis* zeigten die männlichen Alaten einen höheren JH-Titer als die Weibchen, aufgrund der geringen Stichprobengröße lässt sich jedoch darüber keine gesicherte Aussage treffen.

Primäre Königinnen und Könige – d. h. Alaten nach Koloniegründung – konnten bei *M. darwiniensis* in dieser Studie nicht untersucht werden und sind auch in der Natur selten zu finden (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Watson & Abbey 1985; Goodisman & Crozier 2003). Bei anderen Termitenarten wurde – abhängig von der Art – ein variierender JH-Gehalt nachgewiesen. Bei physogastrischen Königinnen der Gattung *Macrotermes* wurden sehr hohe JH-Titer bis 5000 pg pro μ l Hämolymphe gemessen (Lüscher 1976; Meyer *et al.* 1976; Lanzrein *et al.* 1985b; Wende & Kaib unveröffentl. Daten). Diese Königinnen haben sehr große Ovarien und können mehrere Zehntausend Eier pro Tag legen (Nutting 1969). Bei den niederen Termiten hingegen wurden nur geringe JH-Titer in Königinnen von *C. secundus* (Korb *et al.* 2009a) und *Reticulitermes speratus* (Maekawa *et al.* 2010) nachgewiesen. Reproduzierende Königinnen von *Zootermopsis angusticollis* hatten allerdings eine erhöhte JH-Synthese und einen hohen JH-Titer (Brent *et al.* 2005). Eine Erklärung dafür könnte eine zyklische Ovaraktivität bei Königinnen der niederen Termiten sein. Zyklische Ovaraktivität kommt beispielsweise bei den eng verwandten Schaben vor und ist korreliert mit der JH-Synthese bzw. dem JH-Titer (Engelmann 1957; Tobe & Stay 1977; Lanzrein *et al.* 1978; Schal *et al.* 1997). Bei Termiten konnten diese Ovipositionszyklen mit Eiablage- und Ruhephasen ebenfalls beobachtet werden (Review in Weesner 1969; Maekawa *et al.* 2010). Die Ovaraktivität scheint bei Termiten ebenfalls mit dem JH-Titer korreliert zu sein (Brent *et al.* 2005; Elliott & Stay 2007; Ishitani & Maekawa 2010; Maekawa *et al.* 2010). Physogastrische Königinnen der höheren Termiten können durch ihre stark erhöhte Anzahl von Ovariolen (Review in Weesner 1969) jedoch kontinuierlich Eier produzieren und ablegen, weshalb ein konstant hoher JH-Titer benötigt wird. Primäre Könige haben einen

geringeren JH-Titer als die Königinnen (Lanzrein *et al.* 1985b; Wende & Kaib unveröffentl. Daten).

Die in dieser Studie untersuchten Neotenicis von *M. darwiniensis* können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen konnte eine große Anzahl von Neotenicis beobachtet werden, die sich innerhalb sehr kurzer Zeit in zwei absterbenden Kolonien entwickelten. Zum anderen wurden drei einzelne Neotenicis in einer „normalen“ Kolonie während der Probennahme für die Ganzkörperextrakte entdeckt. Die Neotenicis der ersten Gruppe wiesen einen geringeren JH III-Gehalt als die Arbeiter einer „normalen“ Kolonie auf. Die drei Neotenicis der zweiten Gruppe dagegen hatten einen ca. 10x höheren JH III-Gehalt als die Arbeiter. Hohe JH-Titer in Neotenicis konnten bereits bei *Cryptotermes secundus* (Korb *et al.* 2009a) und *Reticulitermes speratus* (Maekawa *et al.* 2010) nachgewiesen werden. Der JH-Titer der Neotenicis überstieg den Wert von aktiv reproduzierenden primären Königinnen deutlich (Korb *et al.* 2009a; Maekawa *et al.* 2010). Die JH-Syntheserate der Neotenicis von *Reticulitermes flavipes* war gegenüber allen anderen Kasten ebenfalls erhöht (Yagi *et al.* 2005, 2008). Neotenicis von *Hodotermopsis sjostedti* wiesen dagegen nur einen sehr geringen JH-Titer auf, der unter dem JH-Titer der Arbeiter, Nymphen und Alaten lag (Cornette *et al.* 2008). Die weiblichen Neotenicis von *H. sjostedti* waren reproduktiv aktiv (Cornette *et al.* 2008), während die Ovaraktivität bzw. Oviposition bei *C. secundus* und *R. flavipes* nicht untersucht wurde (Yagi *et al.* 2005, 2008; Korb *et al.* 2009a). Neotenicis von *R. speratus* legten im Untersuchungszeitraum keine Eier, enthielten keine vitellogenen Oozyten und wiesen nur eine geringe Vitellogenin-Genexpression auf (Maekawa *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass die Entwicklung der Neotenicis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei *C. secundus*, *R. flavipes* und *R. speratus* eventuell noch nicht abgeschlossen war (Maekawa *et al.* 2010). Dafür spricht die Vergrößerung der CA (Kaiser 1956; Lüscher 1957, 1958) sowie der kurze Anstieg der JH-Synthese kurz vor und nach der Häutung zum Neotenic (Greenberg & Tobe 1985; Elliott & Stay 2008). Auch an Alaten von *Zootermopsis angusticollis* konnte gezeigt werden, dass die JH-Synthese bzw. der JH-Titer nach Isolation von der Kolonie erst auf einem konstanten mittleren Level bleibt, dann absinkt und schließlich simultan mit der Reifung der Oozyten ansteigt. Eventuell wird ein Absinken des JH-Titers vor dem erneuten Anstieg für die Fertigstellung der Entwicklung zum reproduktiven Geschlechtstier benötigt (Brent *et al.* 2005). Ein geringer JH-Titer soll auch bei Schaben für die Induktion der Vitellogeninsynthese notwendig sein. Erst nach der Induktion kommt es zum Anstieg des JH-Titers in der frühen Vitellogenese (Lüscher & Lanzrein 1975; Lanzrein *et al.* 1978). Andererseits führte die

Verfütterung von JH III in hoher Dosierung bei *R. flavipes* ebenfalls zu einer Erhöhung der Vitellogenin-Genexpression. Dabei wurde die aufgenommene JH III-Dosis nicht quantifiziert, diese war allerdings hoch genug, um die Bildung von Vorsoldaten auszulösen (Scharf *et al.* 2005a). Der Vergleich der drei Studien ist schwierig, da bei Lüscher & Lanzrein (1975) bzw. Lanzrein *et al.* (1978) die Bestimmung von JH-Titer und Vitellogeninsynthese nicht zur gleichen Zeit und an denselben Individuen durchgeführt wurde. Bei Scharf *et al.* (2005a) spielte das Vitellogenin dagegen eventuell eine untergeordnete Rolle als Dotterprotein, sondern fungierte eher als JH-bindendes Protein. Eine weitere Erklärung für den hohen JH-Gehalt bei Neotenicis von *C. secundus* und *R. flavipes* könnte sein, dass diese zum Zeitpunkt der Untersuchung eventuell mitten in der Vitellogenese waren. Während dieser Zeit ist die JH-Synthese bei *R. flavipes* besonders hoch (Elliott & Stay 2007). Die Neotenicis von *H. sjostedti* könnten dagegen am Ende der Vitellogenese bzw. in der Phase der Oviposition gewesen sein, eine Phase, in der die JH-Synthese bei Termiten und Schaben niedrig ist (Schal *et al.* 1997; Elliott & Stay 2007).

Bei den beobachteten Neotenicis von *M. darwiniensis* wurde die Ovaraktivität ebenfalls nicht untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden weder in den absterbenden Kolonien noch in der „normalen“ Kolonie Eier entdeckt. Es ist aber möglich, dass in der „normalen“ Kolonie Eier vorhanden waren. Diese sind aufgrund ihrer geringen Größe und farblichen Ähnlichkeit zum sie umgebenden Substrat nur schwer zu entdecken. Bei *M. darwiniensis* sollen definierte Brutkammern in Feldkolonien vorhanden sein (Hill 1942; Watson & Howick 1975), diese konnten im Labor jedoch nicht identifiziert werden. Zudem sind neotene Geschlechtstiere bei *M. darwiniensis* im Gegensatz zu z. B. physogastrischen Königinnen bei *Macrotermes* sehr mobil und im gesamten Nest zu finden (Watson *et al.* 1975). Daher könnten vorhandene Eier übersehen worden sein. Das Vorkommen aller Larvenstadien in der „normalen“ Kolonie deutet darauf hin, dass schon Eier abgelegt wurden. Es wurden keine weiteren Geschlechtstiere oder Nymphen gefunden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die beobachteten drei Neotenicis die reproduktiven Anführer (Königinnen und König) der Kolonie darstellten. Auch in der Natur werden Kolonien von *M. darwiniensis* fast immer von mehreren Neotenicis angeführt (Hill 1942; Gay & Calaby 1970; Watson & Abbey 1985). Normalerweise gibt es dabei mehr neotene Könige als Königinnen (Howick *et al.* 1975; Watson *et al.* 1977a). Alle drei Individuen wiesen einen sehr hohen JH III-Gehalt auf. Die beiden Weibchen waren wahrscheinlich in einer Phase mit hoher Ovaraktivität bzw. mitten in der Vitellogenese. Eine synchronisierte Eireifung beider Weibchen erscheint allerdings unwahrscheinlich. Die Ovarien konnten leider nicht untersucht werden, da die Tiere

als Ganzkörperextrakt für die Bestimmung des Hormongehalts verwendet wurden. Das Männchen hatte einen höheren JH III-Gehalt als die beiden Weibchen. In anderen Studien wurde stets ein geringerer JH-Titer bei Männchen gefunden – sowohl bei Alaten (Cornette *et al.* 2008) als auch bei reproduzierenden Königen (Lanzrein *et al.* 1985b; Wende & Kaib unveröffentl. Daten). Bei Männchen spielt JH eine Rolle bei der Entwicklung und Proteinsynthese der akzessorischen Drüsen (Wigglesworth 1936; Piulachs *et al.* 1992). Untersuchungen an der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* zeigten ebenfalls einen erhöhten JH-Titer der Männchen im Vergleich zu den Weibchen in den ersten sechs Tagen nach der Adulthäutung. Danach sank der JH-Titer auf ein konstant niedriges Niveau (Westerlund 2004). Der hohe JH-Titer des männlichen Neotenicus könnte daher mit der Entwicklung seiner akzessorischen Drüsen zusammenhängen.

Kolonien von *M. darwiniensis* sind abhängig von ihrer Größe und Zusammensetzung relativ anfällig für verschiedene Veränderungen wie z. B. Veränderungen der klimatischen Bedingungen (Howick *et al.* 1975; eigene Beobachtungen). In zwei Fällen kam es wahrscheinlich dadurch zum Absterben der Kolonien. Die genaue Ursache konnte jedoch nicht spezifiziert werden. Vor dem endgültigen Absterben wurden sehr viele Neotenicus gebildet. Im Untersuchungszeitraum entwickelten sich ca. 30 – 50% der Arbeiter zu Neotenicus. Die Bildung dieser großen Zahl von Neotenicus beruht auf einem innerhalb der Termiten einzigartigen Mechanismus bei *M. darwiniensis* – der Induktion der Neotenicbildung durch vorhandene Neotenicus. Dadurch kann es in der Natur zu einer raschen Ausbreitung bei günstigen Umweltbedingungen kommen, indem neue Kolonien durch Knospung gebildet werden (Hill 1942; Watson *et al.* 1975; Watson & Abbey 1985). Die gebildeten Neotenicus hatten genau wie die verbliebenen Arbeiter einen geringeren JH-Titer als Arbeiter einer „normalen“ Kolonie. Der geringe JH-Titer der Arbeiter deutet darauf hin, dass sich diese ebenfalls in der Entwicklung zum Neotenic befanden. Die bereits gebildeten Neotenicus wiesen wahrscheinlich noch keine hohe Ovaraktivität auf, diese wurde jedoch nicht untersucht. Wahrscheinlich sollten durch die Entstehung der Neotenicus neue Tochterkolonien gebildet werden, um den ungünstigen Bedingungen innerhalb der Mutterkolonie zu entgehen. Eine Verpaarung und Eiproduktion vor dem Finden eines geeigneten Nistplatzes scheint daher unwahrscheinlich. Frisch gehäutete Neotenicus können sich im Labor nach ca. einer Woche paaren (Watson *et al.* 1975). Der Zeitpunkt der Kopulation bei Kolonienneugründung durch Neotenicus sowie die Dauer der Oozytenreifung ist bei *M. darwiniensis* jedoch nicht bekannt.

Die untersuchten Eier von *M. darwiniensis* wiesen einen hohen JH III-Gehalt auf, der bei der Zusammenfassung der Ganzkörperextrakte über dem aller anderen Stadien (mit Ausnahme der Neotenic) lag. Ein sehr hoher JH III-Gehalt konnte auch bei Schabenembryos nachgewiesen werden (Imboden *et al.* 1978; Lanzrein *et al.* 1985a). Dieser lag während der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung zunächst unter der Nachweisgrenze, stieg nach dem Dorsalschluss (Tanaka 1976) aber sehr stark an. Anschließend sank der JH III-Gehalt bis zum Schlupf wieder auf einen nicht messbaren Wert (Imboden *et al.* 1978; Lanzrein *et al.* 1985a; Maestro *et al.* 2010). Auch in Termiteneiern konnte JH III bereits nachgewiesen werden, wobei der JH-Gehalt zwischen verschiedenen Jahreszeiten variierte. Ein Einfluss auf die Kastendifferenzierung bei Termiten mit zweiästigem Entwicklungsweg wurde vermutet (Lüscher 1976; Lanzrein *et al.* 1985b). Die Herkunft des JH ist nicht eindeutig geklärt, es könnte maternalen oder embryonalen Ursprungs sein. Dabei gibt es bei maternalem Ursprung zwei verschiedene Möglichkeiten – die „Kontamination“ der Eier mit Anflüssigkeit der Königin oder die Einlagerung von JH aus der Hämolymphe der Königin. Bei *Macrotermes michaelseni* waren der JH III-Gehalt von Eiern und Königinnenhämolymphe positiv korreliert, eine Einlagerung scheint daher wahrscheinlich (Lanzrein *et al.* 1985b). Die Anflüssigkeit zeigte bei Lanzrein *et al.* (1985b) nur geringe JH-Titer, eine „Kontamination“ wurde daher von den Autoren ausgeschlossen. In aktuellen Untersuchungen konnte jedoch ein vergleichbarer JH III-Gehalt in Eiern und Anflüssigkeit von *M. michaelseni* gefunden werden (Wende & Kaib unveröffentl. Daten). Beide Möglichkeiten des maternalen Ursprungs scheinen daher in Frage zu kommen. Eine weitere Möglichkeit ist die aktive Produktion von JH III durch den Embryo, der bereits biologisch aktive CA haben kann (Lanzrein *et al.* 1984; Bürgin & Lanzrein 1988; Stay *et al.* 2002). Das JH III in den Eiern von *M. darwiniensis* könnte wie bei *M. michaelseni* eine Rolle bei der Kastendifferenzierung spielen (Lüscher 1976; Lanzrein *et al.* 1985b), da beide Termitenarten einen zweiästigen Entwicklungsweg aufweisen.

In den ersten vier von insgesamt fünf Larvenstadien von *M. darwiniensis* wurde ein hoher JH III-Gehalt nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine hohe Variation zwischen den Proben besonders innerhalb der ersten zwei Larvenstadien. Große Variabilität zwischen verschiedenen Tieren innerhalb eines Stadiums konnte auch bei Schaben und anderen Termitenarten nachgewiesen werden (Lanzrein *et al.* 1978; Gotoh *et al.* 2008). Im L₁-Stadium wird die hohe Variation vermutlich durch den zweiästigen Entwicklungsweg von *M. darwiniensis* hervorgerufen. Dieser ist gekennzeichnet durch eine frühe Trennung in aptere

und nymphale Linie. Laut Watson *et al.* (1977b) findet die Trennung nach der ersten Häutung statt, so dass im L₁-Stadium Individuen beider Linien zu finden sind. Dabei ist zu beachten, dass die genaue Einteilung der Individuen in die entsprechenden Larvalstadien sehr schwierig ist. Mögliche Bestimmungsmerkmale wie die Kopfkapsel- oder Prothoraxbreite oder die Länge der Metatibia können sehr stark variieren. Das verlässlichste Bestimmungsmerkmal ist die Anzahl der Antennensegmente, aber auch da gibt es Überschneidungen zwischen den einzelnen Larvalstadien (Watson 1971; Watson *et al.* 1977b). Eine genaue Zuteilung der Individuen zu den einzelnen juvenilen Stadien vor und nach der Trennung in aptere und nymphale Linie ist daher schwierig. Kaum gefärbte und wenig behaarte Individuen mit mindestens zwölf Antennensegmenten können aber mit großer Wahrscheinlichkeit als der apteren Linie zugehörig betrachtet werden.

Individuen des L₂-Stadiums zeigten ebenfalls große Variabilität hinsichtlich des JH-Gehalts. Während die meisten Individuen des L₂-Stadiums einen JH III-Gehalt zwischen 5 und 30 pg pro mg KG aufwiesen, konnte bei wenigen Individuen (8 von insgesamt 76) ein JH-Gehalt von über 40 bis zu maximal 120 pg pro mg KG gemessen werden. Dies könnte auf eine bevorstehende Entwicklung dieser Individuen zu Soldaten hindeuten, da die Bildung von Vorsoldaten und Soldaten im Normalfall mit hohen JH-Titern verbunden ist (Nijhout & Wheeler 1982; Park & Raina 2004; Cornette *et al.* 2008). Individuen im L₂-Stadium haben 12 bis 13 Antennensegmente. Pro Häutung kommen ein bis zwei Segmente dazu (Lüscher 1952; Watson *et al.* 1977b). Die Bildung von Soldaten ist mit zwei Häutungen verbunden, erst erfolgt die Häutung zum Vorsoldaten, anschließend die Häutung zum Soldaten. Soldaten, die aus Individuen des L₂-Stadiums entstanden sind, müssten demnach 16 bis 17 Antennensegmente aufweisen. Diese konnten hier und auch von Watson (1974) nur in geringer Zahl beobachtet werden. Die meisten Soldaten sollen 20 bis 26 Antennensegmente haben (Watson 1971, 1974). Soldaten dieser Studie wiesen 17 bis 22 Antennensegmente auf, ca. 80% der Soldaten hatten 19 bis 20 Antennensegmente. Da sich Soldaten nicht weiter häuten können (Lüscher 1960; Thorne 1996) und demnach keine weitere Vergrößerung der Antennensegmentzahl stattfindet, scheint sich der größte Teil der Soldaten dieser Studie aus Larven des dritten oder vierten Stadiums entwickelt zu haben. Der JH III-Gehalt im L₃- und L₄-Stadium war ebenfalls hoch, jedoch geringer als im L₂-Stadium. Individuen mit besonders hohem JH III-Gehalt konnten in L₃ und L₄ nicht beobachtet werden. Das signifikant geringere Gewicht der Soldaten (48 ± 4 mg) im Vergleich zu Arbeitern (61 ± 11 mg) spricht jedenfalls dafür, dass sich die Soldaten aus kleineren Larvenstadien (L₂ – L₄) entwickelt haben als die Arbeiter (Abb. 70, Anhang S. 268). Vorsoldaten, das Zwischenstadium während der

Soldatenbildung, welches sich durch besonders hohe JH-Titer auszeichnet (Park & Raina 2004; Cornette *et al.* 2008), wurden im Untersuchungszeitraum nicht beobachtet und konnten daher in dieser Studie leider nicht untersucht werden.

Larven des fünften Stadiums wiesen einen signifikant niedrigeren JH III-Gehalt auf als die Larven der ersten vier Stadien. Aufgrund ihrer 18 bis 19 Antennensegmente wurden sie nach Watson (1971) als fünftes Larvalstadium identifiziert. Watson *et al.* (1977b) ordneten Tiere mit 18 bis 19 Antennensegmenten jedoch dem ersten einer nicht definierten Anzahl von Arbeiterstadien zu. Da die Tiere des L₅-Stadiums aber sowohl einen signifikant niedrigeren JH III-Gehalt als auch ein signifikant höheres Körpergewicht als die Arbeiter aufwiesen (Abb. 70, Anhang S. 268), können sie dennoch als separates letztes Larvalstadium betrachtet werden.

Die Soldaten wiesen ebenso wie die Arbeiter einen geringeren JH III-Gehalt als die Larven der ersten vier Larvalstadien auf. Dieser wird bei Soldaten von *Coptotermes formosanus* mit der Bildung der Frontaldrüse assoziiert (Park & Raina 2005). Frontaldrüsen kommen jedoch nur bei den Rhinotermitidae, Serritermitidae und Termitidae vor (Prestwich 1979). Der geringe JH-Gehalt der Soldaten ist daher vermutlich eher auf mangelnde reproduktive Aktivität zurückzuführen. Eine auffällige Besonderheit der Proben von Soldaten war die Rosafärbung in verschiedenen Abstufungen. Es wurde vermutet, dass diese durch das in den Speicheldrüsen produzierte Wehrsekret hervorgerufen wurde. Da die Hämolympfabnahme zwischen Kopf und Thorax erfolgte, ist eine Verletzung der Speicheldrüsen und Überführung des Wehrsekrets in die Proben möglich. Hämolympfproben von Arbeitern mit künstlich hinzugefügtem Wehrsekret wiesen einen erhöhten JH III-Titer gegenüber denen ohne Wehrsekret auf (Abb. 72, Anhang S. 270; Wilcoxon-Test: $Z = -2,201$; $n = 6$; $P = 0,028$). Der wahre JH III-Gehalt der Soldaten könnte demnach geringer sein. Das Wehrsekret der Soldaten könnte außerdem eine Rolle in der Kastendifferenzierung bei *M. darwiniensis* spielen.

6.4.1.2 Ecdysteroide

Die untersuchten freien Ecdysteroide 20-Hydroxyecdysol und Ecdysol konnten in mehreren Stadien von *M. darwiniensis* nachgewiesen werden. 20-HE war dabei das dominante Ecdysteroid. Dieses wurde als das eigentliche Häutungshormon bei Arthropoden identifiziert, obwohl Ecdysol das Biosyntheseprodukt der Prothoraxdrüsen darstellt (Review in Gäde *et al.* 1997b; Spindler 2003). Die Dominanz von 20-HE wurde sowohl bei hemimetabolen als auch

bei holometabolen Insekten gezeigt (Lanzrein *et al.* 1985a; Okot-Kotber *et al.* 1993; Griebler 2009; Oostr *et al.* 2011). Bei Königinnen und in Eiern von *Macrotermes* konnte hingegen signifikant mehr Ecdyson als 20-HE nachgewiesen werden (Wilcoxon-Test: $Z = -3,772$; $n = 27$; $P < 0,001$; Wende & Kaib unveröffentl. Daten; Delbecque *et al.* 1978; Lanzrein *et al.* 1985b). Die Funktion als Häutungshormon kann zumindest bei den Königinnen jedoch ausgeschlossen werden.

Beide Ecdysteroide waren bei *M. darwiniensis* vor allem in den juvenilen Stadien vorhanden. Auch in den Eiern konnten beide Ecdysteroide nachgewiesen werden. Die Ecdysteroide sind wahrscheinlich maternalen Ursprungs und werden als Konjugate in die Eier eingelagert (Delbecque *et al.* 1978; Gäde *et al.* 1997b). Bei Schaben konnte die Synchronisation embryonaler Ecdysteroidpeaks mit der Bildung embryonaler Kutikulas nachgewiesen werden (Maestro *et al.* 2005, 2010). Bei Termiten wurde eine Wirkung auf die Kastendifferenzierung vermutet, da Ecdysteroide u. a. auch bei der Kastendifferenzierung von Ameisen eine wichtige Rolle spielen (Suzzoni *et al.* 1980). Diese Idee wurde jedoch aufgrund nur geringer Schwankungen des Ecdysteroidgehalts in Eiern trotz Entwicklung verschiedener Kasten wieder verworfen (Lanzrein *et al.* 1985b). Die Ecdysteroide in Eiern von *M. darwiniensis* haben daher vermutlich keinen Bezug zur Kastendifferenzierung, sondern sind notwendig für die Embryonalentwicklung.

Ecdysteroide sind oft nicht dauerhaft in einem Stadium vorhanden, sondern nur zu definierten Zeitpunkten (meist kurz vor der Häutung) in hoher Konzentration nachweisbar (Review in Riddiford 1994). Die untersuchten Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* enthielten Individuen, die ein unterschiedliches Alter hatten bzw. in verschiedenen Phasen des Zwischenhäutungsintervalls waren. Ein einheitlicher Ecdysteroidgehalt ist demnach sehr unwahrscheinlich. Daher kommt es zu großen Schwankungen zwischen den Proben, da einige Tiere kurz vor einer Häutung stehen und einen hohen Ecdysteroidgehalt aufweisen, während bei anderen Tieren keine Ecdysteroide nachweisbar sind. Bei den juvenilen Stadien L₁ bis L₃ ist das Zwischenhäutungsintervall kürzer als bei älteren Stadien (Watson *et al.* 1977b). Zusätzlich konnte in diesen Stadien eine größere Stichprobenzahl untersucht werden. Beide Faktoren führten zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, einige Tiere kurz vor der Häutung zu analysieren. Dies erklärt die durchschnittlich hohen Werte und die große Streuung bei Ecdysteroiden der juvenilen Stadien.

Eine mögliche Rolle von Ecdysteroiden bei der Kastendifferenzierung wurde nicht nur bei den Eiern vermutet, sondern auch bei der Differenzierung von Nymphen. Diese wiesen stark vergrößerte Prothoraxdrüsen auf, was auf eine verstärkte Aktivität hindeuten kann (Kaiser 1956; Okot-Kotber 1980b, 1985). Auch bei der Häutung zum Neotenic wurden vergrößerte Prothoraxdrüsen beobachtet (Kaiser 1956; Noirot 1969b). Bei *M. darwiniensis* konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. Es wurde kein bestimmtes Muster beim Vergleich des Ecdysteroidgehalts zwischen Larven und Nymphen nachgewiesen, was jedoch hauptsächlich an der geringen Stichprobengröße lag.

Die Prothoraxdrüsen degenerieren in Neotenic und Alaten nach der Häutung. Bei Arbeitern und Soldaten ist das nicht der Fall (Lüscher 1952, 1974b; Okot-Kotber 1980b; Noirot & Pasteels 1987). Arbeiter bei Termiten sind kein Adultstadium, sie können sich beispielsweise zum Neotenic häuten oder stationäre Häutungen durchlaufen (Review in Korb & Hartfelder 2008). Das Häutungshormon wird demnach weiter benötigt. Soldaten dagegen können sich nicht weiter häuten, ein Häutungshormon ist daher überflüssig. Es wird vermutet, dass die Prothoraxdrüsen bei Soldaten die Reifung der Gonaden verhindern, da gezeigt werden konnte, dass bei Alaten eine Reifung der Gonaden erst nach Degeneration der Prothoraxdrüsen stattfindet (Noirot 1969b; Lüscher 1974b). Soldaten von *M. darwiniensis* wiesen nur einen sehr geringen Ecdysteroidgehalt auf. In Alaten und Neotenic wurden in keinem Fall Ecdysteroiden nachgewiesen. Bei adulten Individuen sind die Ovarien die wahrscheinlichste Quelle für Ecdysteroiden (Review in Gäde *et al.* 1997b; Spindler 2003). Das Fehlen von Ecdysteroiden bei gleichzeitig niedrigem JH-Gehalt ist ein weiteres Indiz für die mangelnde Geschlechtsreife der Alaten und Neotenic. Die beiden neotenen Königinnen der „normalen“ Kolonie wiesen einen hohen JH-Gehalt und keinen nachweisbaren Ecdysteroidgehalt auf. Während der Oozytenreifung kommt es zur Induktion der Choriogenese durch Ecdysteroiden (Lanzrein *et al.* 1985a; Bellés *et al.* 1993). Zu diesem Zeitpunkt liegt ein geringer JH-Titer vor (Lanzrein *et al.* 1985a). Die neotenen Königinnen befanden sich wahrscheinlich mitten in der Vitellogenese und noch nicht in der Chorionbildung. Ein niedriger Ecdysteroidgehalt zu diesem Zeitpunkt kann daher angenommen werden.

6.4.2 Allatostatin A-Expression bei *Mastotermes darwiniensis*

Mittels quantitativer real-time PCR konnte die Expression des Allatostatin A-Gens bestimmt werden. Diese wurde mit der Expression des Referenzgens β -Aktin normalisiert. Die AST-A Expression wurde in verschiedenen Geweben männlicher und weiblicher Arbeiter von *M. darwiniensis* bestimmt. Zusätzlich wurde die AST-A Expression im Oberschlundganglion verschiedener Kasten und Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* analysiert.

6.4.2.1 Allatostatin A-Expression in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*

Die Expression des AST-A Gens konnte bei Arbeitern von *M. darwiniensis* in vier verschiedenen Geweben analysiert werden – im Oberschlundganglion (Gehirn) sowie im Vorder-, Mittel- und Hinterdarm. Zusätzlich wurde mit dem Fettkörper ein weiteres Gewebe untersucht. Aufgrund der geringen Reinheit der aus dem Fettkörper isolierten RNA (A_{260nm} zu A_{280nm} zwischen 0,4 und 1,0) konnte jedoch das untersuchte AST-A Fragment nicht amplifiziert werden. Weitere Gewebe, die bei der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* anhand ihrer AST-A Expression analysiert wurden (Meyering-Vos & Hoffmann 2003), wurden aufgrund mangelnder Größe nicht untersucht. Dazu gehörten die Gonaden und die akzessorischen Drüsen, die bei Termitenarbeitern nur verkümmert vorliegen (Thorne 1996). Bei *G. bimaculatus* untersuchte Ganglien wie Abdominal- und Thorakalganglien sowie das Unterschlundganglion wurden bei *M. darwiniensis* ebenfalls nicht präpariert. Mittels immunozytochemischer Untersuchungen mit einem AST-A Antikörper konnte bei *Reticulitermes flavipes* jedoch bereits starke Immunoreaktivität in den genannten Ganglien nachgewiesen werden (Elliott *et al.* 2009a).

Die höchste AST-A Expression wurde bei *M. darwiniensis* im Gehirn ermittelt. Diese war ungefähr 100x höher als im Vorder- und Hinterdarm und ca. 4x höher als im Mitteldarm. Eine stark erhöhte Expression des AST-A Gens im Gehirn im Vergleich zu anderen Geweben wurde auch schon bei Schaben (Yu *et al.* 1995; Garside *et al.* 2001, 2002; Aguilar *et al.* 2003) und Grillen (Meyering-Vos & Hoffmann 2003) nachgewiesen. Ebenso konnten im Gehirn höhere AST-A Peptidkonzentrationen als in anderen Geweben gemessen werden (Yu *et al.* 1995; Vilaplana *et al.* 1999a). Eine geringere AST-A Expression wurde dagegen im Gehirn von *Bombyx mori* gefunden (Secher *et al.* 2001). AST-A Peptide konnten mittels

immunozytochemischer Methoden auch im Gehirn der Termiten *Reticulitermes flavipes* in Zellen des Pars lateralis und Pars intercerebralis nachgewiesen werden (Yagi *et al.* 2005; Elliott *et al.* 2009a). Diese werden innerhalb des Gehirns und zu den CA weitergeleitet, wo sie eine Rolle als Neuromodulator und bei der Regulation der JH-Biosynthese spielen (Stay *et al.* 1992; Bendena *et al.* 1999; Yagi *et al.* 2005; Elliott *et al.* 2009a).

Das AST-A Gen zeigte eine mittlere Expression im Mitteldarm von *M. darwiniensis*. Dies konnte auch bei *G. bimaculatus* (Meyering-Vos & Hoffmann 2003), *Blattella germanica* (Aguilar *et al.* 2003) und *Diploptera punctata* (Garside *et al.* 2001, 2002) nachgewiesen werden. Bei *B. mori* zeigte sich im Mitteldarm hingegen die höchste AST-A Expression (Secher *et al.* 2001). Die AST-A Expression im Mitteldarm beschränkt sich wahrscheinlich auf die wenigen endokrinen Zellen, in denen mRNA (Reichwald *et al.* 1994; Davey *et al.* 1999) und auch AST-A Peptide (Yu *et al.* 1995; Schoofs *et al.* 1998; Elliott *et al.* 2009a) nachgewiesen werden konnten.

Im Vorder- und Hinterdarm von *M. darwiniensis*-Arbeitern war die AST-A Expression vergleichbar gering. Bei *G. bimaculatus* und *B. mori* zeigte dagegen der Hinterdarm eine höhere AST-A Expression als der Vorderdarm (Secher *et al.* 2001; Meyering-Vos & Hoffmann 2003). Bei *Helicoverpa armigera* konnte weder im Vorder- noch im Hinterdarm AST-A Expression nachgewiesen werden (Davey *et al.* 1999). Immunofärbung von AST-A Peptiden wurde bei Termiten sowohl im Vorder- als auch im Hinterdarm gezeigt, der Hinterdarm wies dabei eine intensivere Färbung auf (Elliott *et al.* 2009a).

AST-A Peptide haben in den einzelnen Darmabschnitten verschiedene Funktionen, die miteinander im Zusammenhang stehen. Sie wirken myoinhibitorisch auf die Kontraktionen von Vorder- (Duve *et al.* 1999), Mittel- (Fusé *et al.* 1999) und Hinterdarm (Duve & Thorpe 1994; Lange *et al.* 1995; Duve *et al.* 1996; Aguilar *et al.* 2003). Außerdem konnte eine Stimulation der Freisetzung von Verdauungsenzymen wie Amylase oder Invertase im Mitteldarm gezeigt werden (Fusé *et al.* 1999; Aguilar *et al.* 2003; Woodring *et al.* 2009). Die Expression des AST-A Gens bzw. die Menge der AST-A Peptide ist zudem negativ mit der Nahrungsaufnahme korreliert (Yu *et al.* 1995; Aguilar *et al.* 2003). Bei Nahrungsmangel kommt es dadurch zu einer Erhöhung der AST-A Peptidkonzentration und zu einer Verringerung der Darmkontraktion. Durch den verlangsamten Transport der Nahrung im Verdauungstrakt und die erhöhte Freisetzung von Verdauungsenzymen kann es zu einer besseren Verwertung der Nährstoffe kommen (Aguilar *et al.* 2003).

Bei Termiten gibt es bisher keine Untersuchungen zur Funktion der AST-A Peptide im Verdauungstrakt. AST-A Peptide könnten bei *M. darwiniensis* ebenfalls eine Rolle bei der Freisetzung von Enzymen zur Verdauung von Kohlenhydraten spielen. Anders als bei Schaben und Grillen (Fusé *et al.* 1999; Aguilar *et al.* 2003; Woodring *et al.* 2009) sind bei Termiten aufgrund der holzfressenden Lebensweise hauptsächlich Zellulasen für die Kohlenhydratverdauung zuständig. Frühere Studien gingen davon aus, dass die Verdauung von Zellulose hauptsächlich im Hinterdarm durch die Endosymbionten erfolgt (Cleveland *et al.* 1934, Noirot & Noirot-Timotheé 1969; Breznak & Brune 1994). In neueren Untersuchungen konnten jedoch auch endogene Zellulaseenzyme nachgewiesen werden, die hauptsächlich im Mitteldarm und in den Speicheldrüsen exprimiert werden (Watanabe *et al.* 1998; Li *et al.* 2003a; Tokuda *et al.* 2004). Die erhöhte Expression von AST-A im Mitteldarm und in den Speicheldrüsen (Abb. 73, Anhang S. 273) im Vergleich zum Vorder- und Hinterdarm bei *M. darwiniensis* deutet auf einen möglichen Einfluss von AST-A auf die Freisetzung dieser endogenen Zellulaseenzyme hin. Neben der Verwertung des komplexen Nahrungsinhaltsstoffes Lignozellulose ist der Termitendarm ebenfalls wichtig für die Entstehung und Beibehaltung der eusozialen Lebensweise. Zum einen konnte gezeigt werden, dass auch Ernährungsfaktoren eine Rolle bei der Kastendifferenzierung von Termiten spielen (Buchli 1956; Okot-Kotber 1982). Zum anderen spielen die stomodeale und proctodeale Trophallaxis eine wichtige Rolle im Zusammenleben der Termiten (McMahan 1969). Dadurch wird der Austausch von Endosymbionten, Futterpartikeln, aber auch Hormonen und Pheromonen zwischen Individuen ermöglicht. Ein Einfluss der AST-A Peptide im Darm auf die Kastendifferenzierung ist daher möglich. Da es bei der stomodealen Trophallaxis jedoch vorwiegend zur Verfütterung von Speichel oder Regurgitat aus dem Vorderdarm und bei der proctodealen Trophallaxis zur Weitergabe von Hinterdarmflüssigkeit kommt (McMahan 1969; Noirot & Noirot-Timotheé 1969), scheint die erhöhte AST-A Expression im Mitteldarm keine Rolle bei der Trophallaxis zu spielen.

6.4.2.2 Allatostatin A-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis*

Die Analyse der AST-A Expression im Gehirn verschiedener Kasten und Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* zeigte große Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien. Juvenile Tiere hatten generell eine geringere Expression des AST-A Gens als „adulte“ Tiere wie Arbeiter, Soldaten oder Geschlechtstiere. Bisher gibt es nur

wenige Studien zur Rolle von AST-A in der Kastendifferenzierung sozialer Insekten. Messungen mittels Radioimmunoassay zeigten ähnliche Konzentrationen an AST-A Peptiden im Gehirn von Soldaten und Neotenicis. Gleichzeitig konnte durch Immunofärbungen mit einem AST-A Antikörper stärkere Immunoreaktivität in den CA von Soldaten und Neotenicis im Vergleich zu Larven und Nymphen nachgewiesen werden (Yagi *et al.* 2005). Die AST-A Expression im Gehirn von Soldaten und Neotenicis war im Vergleich zur Expression bei Larven und Nymphen bei *M. darwiniensis* in dieser Studie ebenfalls erhöht. Geschlechtsspezifische Unterschiede mit geringerer Immunofärbung in den CA weiblicher Neotenicis konnten ebenfalls gezeigt werden (Elliott *et al.* 2009a). Bei *M. darwiniensis* wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der AST-A Expression im Gehirn von Alaten, Neotenicis und Arbeitern beobachtet. Der Vergleich der Immunoreaktivität der CA von Arbeitern, Soldaten und Neotenicis bei *Reticulitermes flavipes* zeigte jeweils hohe, mittlere und geringe Intensität (Chan *et al.* 2011).

6.4.3 Zusammenhang zwischen Juvenilhormon III-Gehalt und Allatostatin A-Expression

Die Hemmung der JH-Biosynthese *in vitro* durch AST-A Peptide konnte bei Termiten bereits bewiesen werden (Yagi *et al.* 2005). Der Zusammenhang von AST-A und JH *in vivo* wurde in Termiten bisher noch nicht untersucht. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit der JH III-Hämolymphtiter und die AST-A Expression im Oberschlundganglion verschiedener Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* analysiert und auf ihren Zusammenhang überprüft. Weiterhin wurde die AST-A Expression mittels RNAi unterdrückt und die Wirkung auf den JH III-Titer untersucht.

6.4.3.1 Juvenilhormon III und Allatostatin A in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis*

Der Zusammenhang zwischen Ovaraktivität und JH-Synthese bzw. JH-Titer wurde bereits mehrfach beschrieben (Engelmann 1957; Tobe & Stay 1977; Lanzrein *et al.* 1978; Elliott & Stay 2007). Die Konzentration der AST-A mRNA bzw. der AST-A Peptide steht ebenfalls in engem Zusammenhang mit Ovaraktivität und Oozytenreifung (Vilaplana *et al.* 1999a; Aguilar *et al.* 2003; Garside *et al.* 2003; Meyering-Vos & Hoffmann 2003). JH-Titer bzw. JH-Synthese sind dabei negativ korreliert mit der AST-A Expression (Garside *et al.* 2002, 2003;

Meyering-Vos & Hoffmann 2003) oder der AST-A Peptidmenge (Yu *et al.* 1995; Vilaplana *et al.* 1999a). In Phasen mit besonders geringer JH-Synthese bzw. geringem JH-Gehalt wie zum Ende der Vitellogenese, während der Oviposition oder des Oothektransports wurde erhöhte AST-A Expression/Peptidkonzentration gezeigt. Ein negativer Zusammenhang zwischen dem JH III-Gehalt und der AST-A Expression bzw. Peptidkonzentration konnte auch bei Embryos der Schabe *Blattella germanica* nachgewiesen werden. Die höchste AST-A Expression/Peptidkonzentration trat in den Embryos zeitgleich mit einem starken Absinken des JH III-Gehalts auf (Maestro *et al.* 2010). In der Termitenart *R. flavipes* wurde ebenfalls ein negativer Zusammenhang zwischen JH III-Synthese und AST-A Immunofärbung der CA gezeigt (Elliott *et al.* 2009a; Chan *et al.* 2011).

Eine signifikant negative Korrelation zwischen dem JH III-Hämolymphtiter und der Expression des AST-A Gens im Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien konnte auch bei *M. darwiniensis* in dieser Studie nachgewiesen werden. Entwicklungsstadien mit hohem JH III-Gehalt wie L₁ bis L₄ wiesen nur eine geringe AST-A Expression auf. Individuen mit geringen JH III-Titern wie Arbeiter und Soldaten zeigten hingegen eine höhere AST-A Expression. Dieser Zusammenhang war jedoch nicht in jedem untersuchten Stadium zu beobachten. Das L₅-Stadium beispielsweise zeigte sowohl geringe JH III-Titer als auch eine geringe AST-A Expression. Im Gegensatz dazu konnte im L₁-Stadium sowohl eine höhere AST-A Expression als auch ein höherer JH III-Gehalt im Vergleich zu L₂ bis L₄ beobachtet werden. Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der AST-A Expression zeigten sich bei allen „adulten“ Stadien, wo sie entweder mit dem JH III-Titer korrelierten (Alaten, Neotenics) oder nicht (Arbeiter, Soldaten (nicht dargestellt)). In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung der AST-A Expression der drei wahrscheinlich aktiv reproduzierenden neotenen Geschlechtstiere interessant gewesen, da AST-A Peptide bei Weibchen nicht nur eine Rolle bei der Inhibition der JH-Biosynthese, sondern auch bei der Vitellogeninfreisetzung aus dem Fettkörper spielen (Martín *et al.* 1996). Da diese Tiere jedoch als Ganzkörperextrakt für die Bestimmung des Hormongehalts verwendet wurden, konnte ihre AST-A Expression nicht untersucht werden. Aus demselben Grund konnten auch die Eier nicht hinsichtlich der AST-A Expression analysiert werden. Embryos von Schaben enthalten jedoch bereits frühzeitig AST-A mRNA und Peptide, die wahrscheinlich eine Rolle bei der Verwertung des Dotters spielen (Garside *et al.* 2002; Woodhead *et al.* 2003; Maestro *et al.* 2010).

Wie bei der Analyse des JH III-Gehalts wurden auch bei der Analyse der AST-A Expression verschiedene Individuen mit unbekanntem Alter innerhalb der Entwicklungsstadien zusammengefasst. Variationen der AST-A Expression könnten daher auch zwischen den einzelnen Individuen einer Gruppe auftreten. Große Veränderungen der AST-A Expression innerhalb nur eines Tages konnten bereits bei Schaben und Grillen gezeigt werden (Aguilar *et al.* 2003; Garside *et al.* 2003; Meyering-Vos & Hoffmann 2003; Maestro *et al.* 2010).

Der Zusammenhang zwischen AST-A und JH ist zudem nicht nur einseitig zu betrachten. Es wird vermutet, dass AST-A Peptide nicht nur inhibierend auf die JH-Biosynthese wirken, sondern deren Synthese auch durch hohe JH-Titer stimuliert wird (Garside *et al.* 2003). Der JH III-Gehalt wird zudem nicht nur von der JH-Biosyntheserate beeinflusst, sondern auch vom Abbau durch JH-Esterasen und JH-Epoxidhydrolasen (Slade & Zibitt 1971, 1972).

AST-A Immunoreaktivität wurde im Gehirn von Termiten sowohl in Zellen des Pars lateralis als auch in Zellen des Pars intercerebralis nachgewiesen (Yagi *et al.* 2005; Elliott *et al.* 2009a). Die hier quantifizierte AST-A mRNA des Gehirns stammt demnach nicht nur aus Zellen, die ausschließlich zur CA projizieren (Stay *et al.* 1992). AST-A Peptide, die aus dieser AST-A mRNA synthetisiert werden, könnten daher andere Funktionen neben der Regulation der JH-Biosynthese erfüllen. Innerhalb des Gehirns wurde eine neuromodulatorische Wirkung vermutet (Bendena *et al.* 1999). Eine Freisetzung der Peptide in die Hämolymphe durch die Corpora cardiaca erfolgt vermutlich ebenfalls, wo sie humoral auf Zielgewebe wirken können (Rankin *et al.* 1986; Yu *et al.* 1993; Witek *et al.* 1999).

Demzufolge gibt es zwar einen Zusammenhang zwischen dem JH III-Gehalt und der AST-A Expression, der bei *M. darwiniensis* auch gezeigt werden konnte. Aufgrund der genannten Faktoren, die ebenfalls einen Einfluss haben können, ist es jedoch nicht möglich, direkt von einem Parameter auf den anderen zu schließen.

6.4.3.2 Funktionsanalyse des Allatostatin A-Gens mittels RNA-Interferenz

Zur weiteren Funktionsanalyse des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* wurde die Methode der RNAi mittels Injektion von AST-A dsRNA angewendet. Die AST-A Expression und der Hormongehalt der behandelten Tiere wurden mit Kontrolltieren verglichen.

Im ersten Experiment zeigte sich eine Reduktion der AST-A Expression in den mit dsRNA injizierten Tieren. Diese war jedoch auf die drei Darmabschnitte (Vorder-, Mittel- und Hinterdarm) beschränkt. Eine Erhöhung der AST-A Expression zeigte sich dagegen im Gehirn. Unterschiedliche Wirkungen der dsRNA auf die Expression in verschiedenen Geweben konnten bereits bei anderen Insekten beobachtet werden (Maestro & Bellés 2006; Meyering-Vos *et al.* 2006; Ciudad *et al.* 2007; Badisco *et al.* 2011). Die unterschiedliche Effizienz der RNAi in verschiedenen Geweben kann durch eine geringere Permeabilität der Gewebe oder durch geringere Expression der Enzyme des RNAi-Mechanismus hervorgerufen werden (Review in Bellés 2010; Jarosch & Moritz 2011). Bei *M. darwiniensis* wurde die stärkste Reduktion der AST-A Expression im Mitteldarm nachgewiesen, was auch bei der Injektion von AST-A dsRNA in *Blattella germanica* gezeigt werden konnte (Maestro & Bellés 2006). Die Erhöhung der AST-A Expression im Gehirn nach Injektion von dsRNA ist ungewöhnlich und entsprach nicht den Erwartungen. Eine mögliche Ursache könnte der Zeitpunkt der Analyse der AST-A Expression sein. Bei RNAi-Versuchen mit anderen Termitenarten konnte gezeigt werden, dass die maximale Suppression der Genexpression nach 24 h erreicht wird (Scharf *et al.* 2008; Korb *et al.* 2009b; Schwinghammer *et al.* 2011). Nach 72 h hingegen (Zeitpunkt der Untersuchungen bei *M. darwiniensis*) war die Expression wieder auf demselben Niveau wie die Expression bei Kontrolltieren (Schwinghammer *et al.* 2011) oder erhöht (Scharf *et al.* 2008). In den genannten Studien erfolgte die Gensuppression jedoch durch Injektion von siRNA, also kleinen 21 bis 23 bp langen dsRNA-Teilstücken. Bei *M. darwiniensis* wurde hingegen dsRNA mit einer Länge von ca. 300 bp injiziert. Diese wird im Organismus durch das Enzym Dicer erst zu siRNAs abgebaut (Review in Bellés 2010; Terenius *et al.* 2011), ein Prozess, der eventuell zu einer Zeitverzögerung der Gensuppression bei längerer dsRNA führen könnte. So konnte bei Verfütterung von dsRNA eine Suppression der Genexpression nach zwei Tagen nachgewiesen werden, die weitere zwei bis sechs Tage anhielt (Zhou *et al.* 2008). Auch die Injektion von AST-A dsRNA in *B. germanica* führte zu einer Reduktion der AST-A Expression für mindestens sieben Tage (Maestro & Bellés 2006). Eine weitere mögliche Ursache für die Erhöhung der AST-A Expression im Gehirn mit dsRNA injizierter Tiere könnte ein effizienter Rückkopplungsmechanismus sein, bei dem der Abbau von mRNA zu einer höheren Transkriptionsrate führt (Review in Bellés 2010).

Im zweiten Experiment war die AST-A Expression der dsRNA-injizierten Tiere in allen untersuchten Geweben erwartungsgemäß reduziert. Die stärkste Suppression wurde wieder im Mitteldarm nachgewiesen. Es gab geschlechtsspezifische Unterschiede in der Suppression, die auch schon bei Versuchen mit der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* nachgewiesen werden

konnten (Marchal *et al.* 2011). Die Reduktion der Expression des AST-A Gens lag zwischen 11 und 92%. Eine komplette Suppression des AST-A Gens konnte – wie auch in anderen Studien mit AST-A dsRNA – nicht erreicht werden (Maestro & Bellés 2006; Meyering-Vos *et al.* 2006; Meyering-Vos & Woodring 2008). Bei Honigbienen wurde hingegen die komplette Suppression des Vitellogenins durch Injektion von dsRNA beobachtet (Amdam *et al.* 2003; Guidugli *et al.* 2005). Die Effizienz der RNAi ist demnach auch abhängig vom untersuchten Gen, wobei Gene mit stärkerer Expression anfälliger zu sein scheinen (Bellés 2010; Miura & Scharf 2011; Terenius *et al.* 2011). Die Spezifität der Reduktion der AST-A Expression wurde bei *M. darwiniensis* nicht untersucht. Dafür hätte beispielsweise AST-A dsRNA abgeleitet von einer anderen Insektenart als Kontrolle injiziert werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre die Untersuchung der Expression sequenzverwandter Gene nach Injektion von AST-A dsRNA. Die Spezifität des RNAi-Mechanismus konnte jedoch bereits in anderen Studien nachgewiesen werden (Zhou *et al.* 2006c; Griebler *et al.* 2008).

Eine Injektion von AST-A Peptiden führt zur Reduktion der JH-Biosynthese bei Schaben (Woodhead *et al.* 1993) und zur Verringerung des JH-Titers bei Schaben und Grillen (Weaver *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 1998). Durch RNAi wird die spezifische mRNA abgebaut, es kann dadurch keine (oder weniger) Translation stattfinden. Aufgrund der mangelnden Aminosäuresynthese und Peptidbildung sollte auch der Peptidgehalt reduziert sein. Die Abnahme des Peptidgehalts durch RNAi wurde bereits mehrfach gezeigt (Amdam *et al.* 2003; Guidugli *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2006c). Der Peptidgehalt wird dabei über einen längeren Zeitraum reduziert als die mRNA, bei Honigbienen konnte ein reduzierter Vitellogeningehalt durch RNAi noch nach 20 Tagen nachgewiesen werden (Nelson *et al.* 2007). Bei *M. darwiniensis* wurde der AST-A Peptidgehalt nach Injektion von AST-A dsRNA nicht überprüft. Die Injektion von AST-A dsRNA führte jedoch bei *B. germanica* zu einer signifikanten Reduktion des AST-A Peptidgehalts im Gehirn und im Mitteldarm nach drei bis vier Tagen, die mindestens 14 Tage anhielt (Maestro & Bellés 2006). Ein reduzierter AST-A Peptidgehalt im Gehirn sollte zu einer Verringerung der Inhibition der JH-Biosynthese in den CA und somit zu einem erhöhten JH-Hämolymphtiter führen. Bei *M. darwiniensis* konnte jedoch keine Auswirkung der injizierten AST-A dsRNA auf den JH III-Titer nachgewiesen werden. Auch bei *B. germanica* wurde keine Wirkung auf die JH-Biosynthese *in vitro* beobachtet (Maestro & Bellés 2006). Bei der Grille *Gryllus bimaculatus* und dem Nachtfalter *Spodoptera frugiperda* dagegen führte die Injektion von AST-A dsRNA zu einer signifikanten Erhöhung des JH III-Titers nach zwei bis drei Tagen (Meyering-Vos *et al.*

2006). Der unveränderte JH III-Titer trotz Reduktion der AST-A mRNA bei *M. darwiniensis* kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen konnte die Expression des AST-A Gens nicht vollständig unterdrückt werden. Bei *B. germanica* fiel zudem die Reduktion des AST-A Peptidgehalts geringer aus als die Reduktion der AST-A mRNA (Maestro & Bellés 2006). Es ist daher möglich, dass in beiden Studien noch eine ausreichende Peptidmenge für eine Inhibition der CA vorhanden war. Die Reduktion der AST-A Peptidmenge könnte zusätzlich durch einen anderen unbekanntem Faktor kompensiert worden sein (Maestro & Bellés 2006). Der Zeitpunkt der Analyse spielt wahrscheinlich ebenfalls eine große Rolle. Nach der abdominalen Injektion der AST-A dsRNA konnte die Reduktion des AST-A Peptidgehalts im Gehirn bei *B. germanica* erstmals nach drei Tagen nachgewiesen werden (Maestro & Bellés 2006). Bei *M. darwiniensis* erfolgte die Injektion ebenfalls abdominal, die dsRNA wurde dabei in den Hämolympdraum injiziert. Obwohl die Verteilung der Injektionsflüssigkeit im Hämolympdraum des gesamten Körpers innerhalb weniger Minuten erfolgt (siehe Vortest), gibt es keine Daten über die Dauer der Aufnahme in die Gewebe. Eine vermutete Reduktion des Peptidgehalts nach drei Tagen – wie bei *B. germanica* – würde wahrscheinlich nicht zum selben Zeitpunkt bereits eine Änderung des JH III-Hämolymphtiters zur Folge haben. Die schnellere Reaktion bei *G. bimaculatus* und *S. frugiperda* liegt eventuell auch an der kürzeren Entwicklungszeit dieser Insektenarten. Die Entwicklungszeit ist bei *M. darwiniensis* besonders lang, ein Zwischenhäutungsintervall dauert ca. 80 Tage (Watson *et al.* 1977b). Eine längere Experimentdauer wäre daher vorteilhaft, um die Auswirkung der Injektion von AST-A dsRNA auf den Hormongehalt und eine eventuell dadurch ausgelöste Kastendifferenzierung zu überprüfen. Die RNAi-Methode scheint aufgrund der teilweise lang anhaltenden Effekte für solche Langzeitexperimente gut geeignet zu sein. So konnte bei *Reticulitermes flavipes* bereits nach einer einmaligen Injektion von Hexamerin-siRNA eine signifikante Wirkung auf die Vorsoldatenbildung nach 14 bis 25 Tagen gezeigt werden (Scharf *et al.* 2005c; Zhou *et al.* 2006c).

Der Vergleich der verschiedenen Experimente zur RNAi miteinander zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Experimenten, die vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben könnten. Die Mortalität war in den Experimenten 3 und 4 gegenüber den ersten beiden Experimenten stark erhöht. Der JH III-Titer dagegen war – unabhängig von der Behandlung – in den Experimenten 3 und 4 sehr viel niedriger. In Experiment 4 beispielsweise war der JH III-Titer im Vergleich zu Experiment 2 um fast 90% reduziert. Zudem wurde eine erhöhte Menge an 20-Hydroxyecdysol in den Experimenten 3 und 4

gefunden, während Ecdysteroide im zweiten Experiment nicht nachweisbar waren. Der reduzierte JH III-Titer und der erhöhte 20-HE-Gehalt wurde auch bei Arbeitern in absterbenden Kolonien gezeigt. Dies deutet auf eine kurz bevorstehende Entwicklung der Arbeiter zu Neotenicis hin. Möglicherweise konnten die vergleichsweise kurzfristigen Effekte der RNAi im Vergleich zu den langfristigen Effekten einer vorher determinierten Kastendifferenzierung somit nicht beobachtet werden. Die untersuchten Arbeiter der Experimente 3 und 4 stammten aus einer der beiden Kolonien, die einige Monate nach den Experimenten abstarb. Die reduzierte Fitness dieser Arbeiter ist dadurch ebenfalls erklärbar. Der wahrscheinlich bereits generell schlechte Zustand der Mutterkolonie, sowie die isolierte Haltung in einer homogenen Gruppe führte sehr wahrscheinlich zu einer erhöhten Anfälligkeit der Arbeiter für Infektionen und damit zu einer erhöhten Mortalität (Review in Rosengaus *et al.* 2011).

7 Ausblick

Zur weiterführenden Untersuchung des Einflusses von Juvenilhormonen, Ecdysteroiden und allatoregulierenden Neuropeptiden auf die Kastendifferenzierung von *M. darwiniensis* sollten zusätzliche Experimente durchgeführt werden. Bezüglich des Hormongehaltes fehlen weitere Daten zu Entwicklungsstadien der nymphalen Linie. Von den elf vorhandenen Nymphenstadien konnten nur drei untersucht werden. Zusätzlich könnte eine Untersuchung der Ovaraktivität der Nymphen sowie der primären und sekundären Geschlechtstiere zu weiteren Erkenntnissen über Hormonwirkungen führen. Da der Hormongehalt innerhalb eines Stadiums sehr stark schwanken kann, sollten zudem Individuen mit definiertem Alter und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Zwischenhäutungsintervalls untersucht werden. Dafür muss jedoch eine Optimierung der Haltung der Termiten in kleineren Gruppen erfolgen. Erste Versuche dazu und zur individuellen Markierung der Tiere wurden bereits in dieser Studie durchgeführt.

Auch bezüglich der Auswirkung der Expression des AST-A Gens auf die Kastendifferenzierung fehlen weitere Daten. Eine Erhöhung der untersuchten Stichprobengröße sowie die Untersuchung der Expression zu definierten Zeitpunkten innerhalb des Zwischenhäutungsintervalls wäre der nächste Schritt. Die Normalisierung der Expressionsdaten sollte dabei mit einem stabiler exprimierten Referenzgen oder mit mehreren Referenzgenen erfolgen. Zudem sollte die Identifikation der noch fehlenden Sequenzen des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* und *C. darwini* abgeschlossen werden. Um den kompletten Leserahmen zu identifizieren, könnte beispielsweise die Methode der inversen PCR angewendet werden.

Da das AST-A Gen von *M. darwiniensis* eine große Variation an den C-terminalen Enden der potentiellen Peptide aufweist, wäre eine Überprüfung der Funktionalität der kodierten Peptide sinnvoll. Dabei könnten *in vitro*-Tests zur Untersuchung der Wirkung auf die Juvenilhormonbiosynthese oder auf die Darmmotilität durchgeführt werden. Auch *in vivo*-Versuche durch direkte Injektion der einzelnen Peptide könnten erfolgen. Ein bereits durchgeführter *in vivo*-Versuch war die Injektion von AST-A dsRNA zur Auslösung von RNA-Interferenz. Diese Experimente sollten weitergeführt werden. Zur Überprüfung der Spezifität der Reduktion der AST-A Expression sollten Kontrollversuche mit artfremder AST-A dsRNA oder dsRNA sequenzverwandter Gene durchgeführt werden. Weiterhin scheint eine Überprüfung der Injektionsmethode angebracht. Andere Injektionstechniken wie Mikroinjektion oder eine Betäubung der Tiere könnten zu geringerer Mortalität führen. Die

Verfütterung der dsRNA wäre ebenfalls in Betracht zu ziehen. Um die Auswirkung der AST-A dsRNA auf den Juvenilhormontiter und die Kastendifferenzierung zu überprüfen, sollte zudem der Untersuchungszeitraum verlängert werden. Eine eventuelle Erhöhung des JH-Titers durch Behandlung mit AST-A dsRNA könnte – wie die Injektion oder Verfütterung von JH-Analoga – eine erhöhte Soldatenbildung hervorrufen. Dieser Aspekt könnte auch im Sinne der Bekämpfung von *M. darwiniensis* als Schädling interessant werden, da Soldaten nicht selber fressen können und von den Arbeitern gefüttert werden müssen. Bei einem gestörten Arbeiter-zu-Soldaten-Verhältnis kann es zum Absterben der Kolonie kommen. Die Arbeiter sind ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr in der Lage, alle Soldaten zu füttern oder überzählige Soldaten zu eliminieren, so dass die Soldaten verhungern. Zu viele tote Tiere führen zu einer mikrobiellen Kontamination und zum Absterben der Kolonie (Haverty 1979). Vor der Entwicklung RNAi-basierter Insektizide fehlen jedoch noch weitere Informationen über das Zusammenspiel von Allatostatin A-Peptiden und Juvenilhormon III bei der Kastendifferenzierung von *M. darwiniensis*.

8 Zusammenfassung

Als „ecosystem engineers“ sind Termiten in subtropischen und tropischen Ökosystemen von wichtiger ökologischer Bedeutung. Gleichzeitig gelten einige Termitenarten als Bauholz- und Agrarschädlinge, die weltweit vorkommen und enorme Schäden anrichten können. Für die Entwicklung effizienter und umweltschonender Insektizide gegen Termiten dient besonders deren Kastendifferenzierung als Ansatzpunkt. Die Mechanismen der Kastendifferenzierung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, das Juvenilhormon (JH) soll aber eine entscheidende Rolle spielen. Daher sollte in dieser Studie der Einfluss des Juvenilhormons auf die Kastendifferenzierung bei der basalen Termitenart *Mastotermes darwiniensis* untersucht werden. Die Regulation der JH-Biosynthese erfolgt über allateregulierende Neuropeptide, von denen Allatostatin A (AST-A) das am weitesten verbreitete ist. Die Expression des AST-A Gens bei *M. darwiniensis* wurde daher ebenfalls analysiert.

Zunächst musste die Sequenz des AST-A Gens von *M. darwiniensis* und die Organisation des AST-A Prohormonvorläufers identifiziert werden. Das AST-A Gen kodiert einen Prohormonvorläufer mit 14 potentiellen Peptiden, die durch vier saure Spacerregionen zu Clustern zusammengefasst werden. Dabei weisen nicht alle Peptide die charakteristische C-terminale Sequenz Y/FXFGL/I/V-amid der AST-A Peptide auf. Trotzdem zeigt der AST-A Prohormonvorläufer von *M. darwiniensis* eine starke Ähnlichkeit zu dem ebenfalls in dieser Studie identifizierten AST-A Prohormonvorläufer der nahe verwandten Schabenart *Cryptocercus darwini* sowie zu den bekannten AST-A Prohormonvorläufern anderer Schaben und einer weiteren Termitenart. Die phylogenetische Analyse der Prohormonvorläufer und des AST-A Gens bestätigte die enge Verwandtschaft der Schaben und Termiten. Durch die zentrale Einordnung der Termiten innerhalb der Schaben konnte zudem die noch umstrittene Paraphylie der Blattaria bestätigt werden. Die Stammbäume, die aus AST-A Sequenzen von acht verschiedenen Insektenordnungen berechnet wurden, zeigten generell eine Übereinstimmung mit der anerkannten Phylogenie der Insekten. Eine unterschiedliche Topologie und teilweise geringe Bootstrap-Werte sprechen allerdings gegen die Eignung von AST-A für phylogenetische Analysen.

Das AST-A Gen wird bei *M. darwiniensis* überwiegend im Gehirn exprimiert. Eine geringere Expression konnte auch in verschiedenen Teilen des Darms nachgewiesen werden, wobei der Mitteldarm höhere Expressionsraten aufwies als der Vorder- und Hinterdarm. In den

verschiedenen Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* zeigten sich ebenfalls Unterschiede bei der AST-A Expression, generell wiesen „adulte“ Stadien eine höhere Expression auf als juvenile Stadien.

Die Messung des Gehaltes von JH III und Ecdysteroiden bei den verschiedenen Entwicklungsstadien von *M. darwiniensis* erfolgte mittels HPLC-MS. Ein hoher JH III-Gehalt wurde bei Larven nachgewiesen, dieser lag über dem JH III-Gehalt der Nymphen derselben Altersgruppe. Der hohe JH III-Gehalt der mittleren Larven deutet auf die potentielle Entwicklung dieser Tiere zu Soldaten. Während der Entwicklung von Geschlechtstieren konnte nur ein geringer JH III-Gehalt gemessen werden. Dies galt sowohl für die Entwicklung von primären Geschlechtstieren aus Nymphen als auch für die Entwicklung sekundärer Geschlechtstiere aus Arbeitern. Der hohe JH III-Gehalt während der Soldatenentwicklung ebenso wie der niedrige JH III-Gehalt während der Geschlechtstierbildung stimmt mit dem Modell von Nijhout & Wheeler (1982) zum Einfluss von JH auf die Kastendifferenzierung bei Termiten überein. Dieses bezieht sich allerdings auf Termiten mit linearem Entwicklungsweg, während bei Termiten mit zweiästigem Entwicklungsweg – wie *M. darwiniensis* – bisher nur wenig zur Rolle von JH auf die Kastendifferenzierung bekannt war.

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem JH III-Hämolymphtiter und der Expression des AST-A Gens im Gehirn bei *M. darwiniensis* nachgewiesen werden. Beide Parameter waren negativ miteinander korreliert, d. h. Entwicklungsstadien mit hohem JH III-Titer zeigten überwiegend geringe AST-A Expression und umgekehrt.

Zur weiterführenden Funktionsanalyse des AST-A Gens wurde zudem versucht, die Expression des AST-A Gens in Arbeitern von *M. darwiniensis* mittels RNA-Interferenz zu unterdrücken. Durch Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom AST-A Gen konnte die Expression um bis zu 92% reduziert werden. Die Reduktion war dabei in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt. Es konnte keine vollständige Suppression der AST-A Expression erreicht werden. Drei Tage nach der Injektion von AST-A dsRNA konnte keine Auswirkung auf den JH III-Titer in der Hämolymphe der Tiere beobachtet werden.

9 Summary

As ecosystem engineers, termites play an important role in the ecology of subtropical and tropical ecosystems. At the same time, a few termite species are important pests of timber and agriculture. They are responsible for huge damage all over the world. For the development of efficient and environmentally friendly insecticides the caste differentiation of termites is of particular interest. The mechanisms of caste differentiation are not well understood but juvenile hormone (JH) is assumed to play a major role. Therefore, the influence of JH on caste differentiation in the primitive termite *Mastotermes darwiniensis* was examined in this study. Biosynthesis of JH is regulated by allatoregulating neuropeptides. Among them A-type allatostatins (AST-A) are most widely spread. Therefore, the AST-A gene expression of *M. darwiniensis* was analysed as well.

In a first step the sequence of the AST-A gene and the organisation of the AST-A prohormone precursor of *M. darwiniensis* were identified. The AST-A gene encodes a prohormone precursor with 14 putative peptides. Four acidic spacers separate clusters of individual peptides. Not all peptides contain the C-terminal ending Y/FXFGL/I/V-amide of AST-A peptides. Nevertheless, the AST-A prohormone precursor of *M. darwiniensis* is very similar to the AST-A prohormone precursor of the closely related cockroach *Cryptocercus darwini* which was identified in this study as well. Both show a high degree of similarity to known AST-A prohormone precursors of other cockroaches and another termite species. Phylogenetic analyses of the prohormone precursors and the AST-A gene proved the close relationship between cockroaches and termites. In addition, the paraphyly of Blattaria was confirmed by the placement of the termites within cockroaches. Phylogenetic trees, which were generated from AST-A sequences of eight different insect orders, are in accordance with the accepted phylogeny of insects. However, a different topology and partially low bootstrap values show that AST-A is not suitable for phylogenetic analyses.

The AST-A gene is predominantly expressed in the brain of *M. darwiniensis*. Less expression was detected in different parts of the gut, with midgut showing a higher expression than foregut and hindgut. There was a different expression of the AST-A gene in different developmental stages of *M. darwiniensis* as well. In general, “adult” stages had a higher expression than juvenile stages.

The JH and ecdysteroid hormone content of different developmental stages of *M. darwiniensis* was measured by HPLC-MS. A higher JH III content was shown in larvae than in nymphs of the same age. The high JH III level of intermediate larvae indicates their potential to develop into soldiers. During the development of reproductives JH III content was low. This was true for the development of primary reproductives from nymphs as well as for the development of secondary reproductives from workers. The high JH III content during the development of soldiers as well as the low JH III level during the development of reproductives is in agreement with the proposed model of Nijhout & Wheeler (1982). This model describes the influence of JH on caste differentiation of termites developing along the linear ontogenetic pathway. In contrast, the role of JH in caste differentiation of termites developing along the bifurcated ontogenetic pathway – such as *M. darwiniensis* – is less understood.

A significant correlation between the JH III haemolymph titre and the expression of the AST-A gene in the brain was demonstrated in *M. darwiniensis*. Both parameters were negatively correlated, i. e. developmental stages with high JH III titre mostly had a low AST-A expression and vice versa.

The method of RNA interference (RNAi) was used to further analyse the function of the AST-A gene. By RNAi, it was tried to suppress the expression of the AST-A gene in workers of *M. darwiniensis*. The expression was reduced up to 92% by injection of double stranded RNA (dsRNA) derived from the AST-A gene. There were different reduction levels in various tissues. Complete suppression of the AST-A gene expression was never reached. Three days after the injection of AST-A dsRNA the JH III titre in the haemolymph of the workers was unchanged.

10 Literatur

- ABDEL-LATIEF, 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 Biochemistry and Molecular Biology*, **33**(5): 467-476.
- ABDEL-LATIEF, M., MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, K. H. (2004a): Characterization of a novel peptide with allatotropic activity in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Regulatory Peptides*, **122**(2): 69-78.
- ABDEL-LATIEF, M., MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, M. H. (2004b): Expression and localization of the *Spodoptera frugiperda* allatotropin (Spofr-AT) and allatostatin (Spofr-AS) genes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **55**(4): 188-199.
- ABDEL-LATIEF, M., MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, M. H. (2004c): Type-A allatostatins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: Molecular cloning, expression and tissue-specific localization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **56**(3): 120-132.
- ABDEL-LATIEF, M. & HOFFMANN, K. H. (2010): Neuropeptide regulators of the juvenile hormone biosynthesis (*in vitro*) in the beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **74**(3): 135-146.
- ABE, T. (1987): Evolution of life types in termites. In: *Evolution and coadaptation in biotic communities*. ed. KAWANO, S., CONNELL, J. H. & HIDAKA, T., pp. 125-148. University of Tokyo Press, Tokyo.
- ABE, T. (1990): Evolution of worker caste in termites. In: *Social insects and the environment*. ed. VEERESH, G. K., MALLIK, B. & VIRAKTAMATH, C. A., pp. 29-30. Oxford & IBH Publishing, New Delhi.
- 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*. *Regulatory Peptides*, **115**(3): 171-177.
- AKAIKE, H. (1974): A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**(6): 716-723.
- ALDRICH, B. T., KAMBHAMPATI, S. & KRAFSUR, E. S. (2005): Population genetics of wood-feeding cockroaches in the genus *Cryptocercus*. *Journal of Heredity*, **96**(5): 572-575.
- ALVES-SILVA, J., RIBEIRO, J. M. C., VAN DEN ABEELE, J., ATTARDO, G., HAO, Z. R., HAINES, L. R., SOARES, M. B., BERRIMAN, M., AKSOY, S. & LEHANE, M. J. (2010): An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics*, **11**.
- AMDAM, G. V., SIMÕES, Z. L., GUIDUGLI, K. R., NORBERG, K. & OMHOLT, S. W. (2003): Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, **3**: 1.

- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ORNTOFT, T. F. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research, **64**(15): 5245-5250.
- AUDSLEY, N., WEAVER, R. J. & EDWARDS, J. P. (2000): Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 681-689.
- AUDSLEY, N., MATTHEWS, H. J., PRICE, N. R. & WEAVER, R. J. (2008): Allatoregulatory peptides in Lepidoptera, structures, distribution and functions. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 969-980.
- AUERSWALD, L., BIRGUL, N., GADE, G., KREIENKAMP, H. J. & RICHTER, D. (2001): Structural, functional, and evolutionary characterization of novel members of the allatostatin receptor family from insects. Biochemical and Biophysical Research Communications, **282**(4): 904-909.
- BADISCO, L., MARCHAL, E., VAN WIELENDAELE, P., VERLINDEN, H., VLEUGELS, R. & VANDEN BROECK, J. (2011): RNA interference of insulin-related peptide and neuroparsins affects vitellogenesis in the desert locust *Schistocerca gregaria*. Peptides, **32**(3): 573-580.
- BANDI, C., SIRONI, M., DAMIANI, G., MAGRASSI, L., NALEPA, C. A., LAUDANI, U. & SACCHI, L. (1995): The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **259**(1356): 293-299.
- BECCALONI, G. W. (2007). Blattodea Species File Online. Version 1.0/4.0.
- BELL, W. J. & BARTH, R. H. (1971): Initiation of yolk deposition by juvenile hormone. Nature-New Biology, **230**(15): 220-222.
- BELLES, X., MAESTRO, J. L., PIULACHS, M. D., JOHNSEN, A. H., DUVE, H. & THORPE, A. (1994): Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) - Identification, immunolocalization and activity. Regulatory Peptides, **53**(3): 237-247.
- BELLES, X., GRAHAM, L. A., BENDENA, W. G., DING, Q. I., EDWARDS, J. P., WEAVER, R. J. & TOBE, S. S. (1999): The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches. Peptides, **20**(1): 11-22.
- BELLÉS, X., CASSIER, P., CERDÁ, X., PASCUAL, N., ANDRÉ, M., ROSSO, Y. & PIULACHS, M. D. (1993): Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the german cockroach. Tissue & Cell, **25**(2): 195-204.
- BELLÉS, X. (2010): Beyond *Drosophila*: RNAi *in vivo* and functional genomics in insects. Annual Review of Entomology, **55**: 111-128.

- BENDENA, W. G., GARSIDE, C. S., YU, C. G. & TOBE, S. S. (1997): Allatostatins: Diversity in structure and function of an insect neuropeptide family. Annals of the New York Academy of Sciences, **814**(1): 53-66.
- BENDENA, W. G., DONLY, B. C. & TOBE, S. S. (1999): Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. Neuropeptides: Structure and Function in Biology and Behavior, **897**: 311-329.
- BENDTSEN, J. D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G. & BRUNAK, S. (2004): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology, **340**(4): 783-795.
- BIGNELL, D. E. & EGGLETON, P. (2000): Termites in ecosystems. In: Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. ed. ABE, T., BIGNELL, D. E. & HIGASHI, M., pp. 363-387. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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 Journal, **18**(21): 5892-5900.
- BLACKBURN, M. B., WAGNER, R. M., KOCHANSKY, J. P., HARRISON, D. J., THOMASLAEMONT, 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*. Regulatory Peptides, **57**(3): 213-219.
- BOBYLEVA, N. N. (1975): Morphology and evolution of intestinal parasitic flagellates of the far-eastern roach *Cryptocercus relictus*. Acta Protozoologica, **14**: 109-160.
- BORDEREAU, C. (1975): Caste determination in higher termites - Evidence for a royal control on formation of sexual caste in *Macrotermes bellicosus* Smeathman (Isoptera, Termitidae). Insectes Sociaux, **22**(4): 363-373.
- BORDEREAU, C. (1985): The role of pheromones in termite caste differentiation. In: Caste differentiation in social insects. ed. WATSON, J. A. L., OKOT-KOTBER, B. M. & NOIROT, C., pp. 221-226. Pergamon Press, Oxford & New York.
- BORDEREAU, C. & HAN, S. H. (1986): Stimulatory influence of the queen and king on soldier differentiation in the higher termites *Nasutitermes lujae* and *Cubitermes fungifaber*. Insectes Sociaux, **33**(3): 296-305.
- BRADBURY, A. F., FINNIE, M. D. & SMYTH, D. G. (1982): Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. Nature, **298**(5875): 686-688.
- BRENT, C. S., SCHAL, C. & VARGO, E. L. (2005): Endocrine changes in maturing primary queens of *Zootermopsis angusticollis*. Journal of Insect Physiology, **51**(11): 1200-1209.
- BREZNAK, J. A. & BRUNE, A. (1994): Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annual Review of Entomology, **39**(1): 453-487.

- BROWN, T. A. (2007): Gentechnologie für Einsteiger. 5. Auflage. Elsevier GmbH, München.
- BUCHLI, H. (1956): Die Neotenie bei *Reticulitermes*. Insectes Sociaux, **3**(1): 131-143.
- BÜRGIN, C. & LANZREIN, B. (1988): Stage-dependent biosynthesis of methylfarnesoate and juvenile hormone III and metabolism of juvenile hormone III in embryos of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. Insect Biochemistry, **18**(1): 3-9.
- BURNSIDE, C. A., SMITH, P. T. & KAMBHAMPATI, S. (1999): Three new species of the wood roach, *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae), from the eastern United States. World Wide Web Journal of Biology, **4**(1).
- BUSTIN, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, **25**(2): 169-193.
- BUTENANDT, A. & KARLSON, P. (1954): Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. Zeitschrift für Naturforschung Section B - A Journal of Chemical Sciences, **9**(6): 389-391.
- CAMERON, S. L., LO, N., BOURGUIGNON, T., SVENSON, G. J. & EVANS, T. A. (2012): A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitoidae): Robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. Molecular Phylogenetics and Evolution, **65**(1): 163-173.
- CARAPELLI, A., NARDI, F., DALLAI, R. & FRATI, F. (2006): A review of molecular data for the phylogeny of basal hexapods. Pedobiologia, **50**(2): 191-204.
- CASTLE, G. B. (1934): The experimental determination of caste differentiation in termites. Science, **80**(2075): 314.
- CATERINO, M. S., CHO, S. & SPERLING, F. A. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annual Review of Entomology, **45**: 1-54.
- CHAN, K. K., ABEL, D. S. & STAY, B. (2011): Fine structure of corpora allata of castes with different rates of juvenile hormone production in the termite *Reticulitermes flavipes*. Arthropod Structure & Development, **40**(1): 26-38.
- CHANG, E. S. (1993): Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and crustaceans. Annual Review of Entomology, **38**: 161-180.
- CHEN, F. & DIXON, R. A. (2007): Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nature Biotechnology, **25**(7): 759-761.
- CHINTAPALLI, V. R., WANG, J. & DOW, J. A. T. (2007): Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. Nature Genetics, **39**(6): 715-720.
- CHIPPENDALE, G. M. & YIN, C. M. (1973): Endocrine activity retained in diapause insect larvae. Nature, **246**(5434): 511-513.

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, **162**(1): 156-159.
- CHRISTIE, A. E. (2008): In silico analyses of peptide paracrines/hormones in Aphidoidea. General and Comparative Endocrinology, **159**(1): 67-79.
- CHRISTIE, A. E., SOUSA, G. L., RUS, S., SMITH, C. M., TOWLE, D. W., HARTLINE, D. K. & DICKINSON, P. S. (2008): Identification of A-type allatostatins possessing -YXFGI/Vamide carboxy-termini from the nervous system of the copepod crustacean *Calanus finmarchicus*. General and Comparative Endocrinology, **155**(3): 526-533.
- CHRISTIE, A. E., MCCOOLE, M. D., HARMON, S. M., BAER, K. N. & LENZ, P. H. (2011): Genomic analyses of the *Daphnia pulex* peptidome. General and Comparative Endocrinology, **171**(2): 131-150.
- CIUDAD, L., BELLES, X. & PIULACHS, M. D. (2007): Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. Bmc Molecular Biology, **8**: 53.
- CLARK, L., LANGE, A. B., ZHANG, J. R. & TOBE, S. S. (2008): The roles of Dippu-allatostatin in the modulation of hormone release in *Locusta migratoria*. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 949-958.
- CLEVELAND, L. R., HALL, S. K., SANDERS, E. P. & COLLIER, J. (1934): The wood feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. Memoirs of the American Academy of Arts and Sciences, **17**(2): 185-342.
- CNAANI, J., ROBINSON, G. E. & HEFETZ, A. (2000): The critical period for caste determination in *Bombus terrestris* and its juvenile hormone correlates. Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology, **186**(11): 1089-1094.
- CORNETTE, R., KOSHIKAWA, S., HOJO, M., MATSUMOTO, T. & MIURA, T. (2006): Caste-specific cytochrome P450 in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae). Insect Molecular Biology, **15**(2): 235-244.
- CORNETTE, R., GOTOH, H., KOSHIKAWA, S. & MIURA, T. (2008): Juvenile hormone titers and caste differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae). Journal of Insect Physiology, **54**(6): 922-930.
- CRUZ, J., MARTÍN, D., PASCUAL, N., MAESTRO, J. L., PIULACHS, M. D. & BELLÉS, X. (2003): Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **33**(12): 1219-1225.
- CRUZ, J., MARTÍN, D. & BELLÉS, X. (2007): Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. Mechanisms of Development, **124**(3): 180-189.
- CUSSON, M. & MCNEIL, J. N. (1989): Involvement of juvenile hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. Science, **243**(4888): 210-211.

- CUSSON, M., MCNEIL, J. N. & TOBE, S. S. (1990): *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone by corpora allata of *Pseudaletia unipuncta* virgin females as a function of age, environmental conditions, calling behavior and ovarian development. Journal of Insect Physiology, **36**(2): 139-146.
- DASCH, G. A., WEISS, E. & CHANG, K. P. (1984): Endosymbionts of insects. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. ed. HOLT, J. G., pp. 881-883. Williams & Wilkins, Baltimore.
- DAVEY, M., DUVE, H., THORPE, A. & EAST, P. (1999): Characterisation of the helicostatin peptide precursor gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, **29**(12): 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. Journal of Comparative Neurology, **385**(2): 265-284.
- DAVIS, R. B., BALDAUF, S. L. & MAYHEW, P. J. (2009): Eusociality and the success of the termites: insights from a supertree of dictyopteran families. Journal of Evolutionary Biology, **22**(8): 1750-1761.
- DAVIS, R. B., BALDAUF, S. L. & MAYHEW, P. J. (2010): Many hexapod groups originated earlier and withstood extinction events better than previously realized: inferences from supertrees. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **277**(1687): 1597-1606.
- DE KORT, C. A. D. & GRANGER, N. A. (1996): Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **33**(1): 1-26.
- DE WILDE, J. & DE BOER, J. A. (1961): Physiology of diapause in the adult colorado beetle - II: Diapause as a case of pseudo-allatectomy. Journal of Insect Physiology, **6**(2): 152-161.
- DEITZ, L. L., NALEPA, C. A. & KLASS, K. D. (2003): Phylogeny of the Dictyoptera re-examined (Insecta). Entomologische Abhandlungen, **61**(1): 69-91.
- DELBECQUE, J. P., LANZREIN, B., BORDEREAU, C., IMBODEN, H., HIRN, M., O'CONNOR, J. D., NOIROT, C. & LÜSCHER, M. (1978): Ecdysone and ecdysterone in physogastric termite queens and eggs of *Macrotermes bellicosus* and *Macrotermes subhyalinus*. General and Comparative Endocrinology, **36**(1): 40-47.
- DELIGNE, J., QUENNEDEY, A. & BLUM, M. S. (1981): The enemies and defense mechanisms of termites. In: Social insects Vol. 2. ed. HERMANN, H. R., pp. 1-76. Academic Press, New York & London.
- DING, Q., DONLY, B. C., TOBE, S. S. & BENDENA, W. G. (1995): Comparison of the allatostatin neuropeptide precursors in the distantly related cockroaches *Periplaneta americana* and *Diploptera punctata*. European Journal of Biochemistry, **234**(3): 737-746.

- DIRCKSEN, H., SKIEBE, P., ABEL, B., AGRICOLA, H., BUCHNER, K., MUREN, J. E. & NASSEL, D. R. (1999): Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*. Peptides, **20**(6): 695-712.
- DONG, S. L., MAO, L. & HENDERSON, G. (2009): Physical contact between soldier and worker is essential in soldier self-regulation of *Coptotermes formosanus* (Isoptera, Rhinotermitidae). Insectes Sociaux, **56**(1): 28-34.
- 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**(19): 8807-8811.
- DONOHUE, K. V., KHALIL, S. M. S., ROSS, E., GROZINGER, C. M., SONENSHINE, D. E. & ROE, R. M. (2010): Neuropeptide signaling sequences identified by pyrosequencing of the American dog tick synganglion transcriptome during blood feeding and reproduction. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **40**(1): 79-90.
- DONOVAN, S. E., JONES, D. T., SANDS, W. A. & EGGLETON, P. (2000): Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). Biological Journal of the Linnean Society, **70**(3): 467-513.
- DONOVAN, S. E., EGGLETON, P., DUBBIN, W. E., BATCHELDER, M. & DIBOG, L. (2001): The effect of a soil-feeding termite, *Cubitermes fungifaber* (Isoptera: Termitidae) on soil properties: termites may be an important source of soil microhabitat heterogeneity in tropical forests. Pedobiologia, **45**(1): 1-11.
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**(6): 2456-2460.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., SCOTT, A. G., EAST, P. & THORPE, A. (1994): [Hyp(3)]Met-callatostatin - Identification and biological properties of a novel neuropeptide from the blowfly *Calliphora vomitoria*. Journal of Biological Chemistry, **269**(33): 21059-21066.
- DUVE, H. & THORPE, A. (1994): Distribution and functional significance of Leu-callatostatins in the blowfly *Calliphora vomitoria*. Cell and Tissue Research, **276**(2): 367-379.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., SCOTT, A. G. & THORPE, A. (1995): Isolation, identification and functional significance of [Hyp(2)]Met-callatostatin and des Gly-Pro Met-callatostatin, two further posttranslational modifications of the blowfly neuropeptide Met-callatostatin. Regulatory Peptides, **57**(3): 237-245.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., MAESTRO, J. L., SCOTT, A. G., EAST, P. D. & THORPE, A. (1996): Identification of the dipteran Leu-callatostatin peptide family: The pattern of precursor processing revealed by isolation studies in *Calliphora vomitoria*. Regulatory Peptides, **67**(1): 11-19.

- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., MAESTRO, J. L., SCOTT, A. G., CROOK, N., WINSTANLEY, D. & THORPE, A. (1997a): Identification, tissue localisation and physiological effect *in vitro* of a neuroendocrine peptide identical to a dipteran Leu-callatostatin in the codling moth *Cydia pomonella* (Tortricidae: Lepidoptera). Cell and Tissue Research, **289**(1): 73-83.
- 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*. European Journal of Biochemistry, **250**(3): 727-734.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., MAESTRO, J. L., SCOTT, A. G., WINSTANLEY, D., DAVEY, M., EAST, P. D. & THORPE, A. (1997c): Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. Peptides, **18**(9): 1301-1309.
- DUVE, H., EAST, P. D. & THORPE, A. (1999): Regulation of lepidopteran foregut movement by allatostatins and allatotropin from the frontal ganglion. Journal of Comparative Neurology, **413**(3): 405-416.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., SCOTT, A. G. & THORPE, A. (2002): Allatostatins of the tiger prawn, *Penaeus monodon* (Crustacea: Penaeidea). Peptides, **23**(6): 1039-1051.
- EAST, P., TREGENZA, K., DUVE, H. & THORPE, A. (1996): Identification of the dipteran Leu-callatostatin peptide family: Characterisation of the prohormone gene from *Calliphora vomitoria* and *Lucilia cuprina*. Regulatory Peptides, **67**(1): 1-9.
- EDWARDS, J. P., CORBITT, T. S., MCARDLE, H. F., SHORT, J. E. & WEAVER, R. J. (1995): Endogenous levels of insect juvenile hormones in larval, pupal and adult stages of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. Journal of Insect Physiology, **41**(8): 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**(2): 255-261.
- EGGLETON, P. (2001): Termites and trees: a review of recent advances in termite phylogenetics. Insectes Sociaux, **48**(3): 187-193.
- EGGLETON, P., BECCALONI, G. & INWARD, D. (2007): Save Isoptera: A comment on Inward *et al.* - Response to Lo *et al.* Biology Letters, **3**(5): 564-565.
- EIPPER, B. A., STOFFERS, D. A. & MAINS, R. E. (1992): The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annual Review of Neuroscience, **15**: 57-85.
- ELEKONICH, M. M. & HORODYSKI, F. M. (2003): Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla. Peptides, **24**(10): 1623-1632.
- ELLIOTT, K. L. & STAY, B. (2007): Juvenile hormone synthesis as related to egg development in neotenic reproductives of the termite *Reticulitermes flavipes*, with observations on urates in the fat body. General and Comparative Endocrinology, **152**(1): 102-110.

- ELLIOTT, K. L. & STAY, B. (2008): Changes in juvenile hormone synthesis in the termite *Reticulitermes flavipes* during development of soldiers and neotenic reproductives from groups of isolated workers. Journal of Insect Physiology, **54**(2): 492-500.
- ELLIOTT, K. L., CHAN, K. K., TEESCH, L., CLOR, O. & STAY, B. (2009a): Identification of Phe-Gly-Leu-amide type allatostatin-7 in *Reticulitermes flavipes*: Its localization in tissues and relation to juvenile hormone synthesis. Peptides, **30**(3): 495-506.
- ELLIOTT, K. L., HEHMAN, G. L. & STAY, B. (2009b): Isolation of the gene for the precursor of Phe-Gly-Leu-amide allatostatins in the termite *Reticulitermes flavipes*. Peptides, **30**(5): 855-860.
- EMERSON, A. E. (1965): A review of the Mastotermitidae (Isoptera), including a new fossil genus from Brazil. American Museum Novitates, **2236**: 1-46.
- ENGEL, M. S. & KRISHNA, K. (2004): Family-group names for termites (Isoptera). American Museum Novitates, **3432**: 1-9.
- ENGEL, M. S., GRIMALDI, D. A. & KRISHNA, K. (2009): Termites (Isoptera): Their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. American Museum Novitates, **3650**: 1-27.
- ENGELMANN, F. (1957): Die Steuerung der Ovarfunktion bei der ovoviviparen Schabe *Leucophaea maderae* (Fabr.). Journal of Insect Physiology, **1**(3): 257-278.
- ENGELMANN, F. (1969): Female specific protein: biosynthesis controlled by corpus allatum in *Leucophaea maderae*. Science, **165**(3891): 407-409.
- EVANS, J. D. & WHEELER, D. E. (2001): Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. Bioessays, **23**(1): 62-68.
- EWING, B. & GREEN, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. Genome Research, **8**(3): 186-194.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C. & GREEN, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. Genome Research, **8**(3): 175-185.
- FALLON, A. M., HAGEDORN, H. H., WYATT, G. R. & LAUFER, H. (1974): Activation of vitellogenin synthesis in mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. Journal of Insect Physiology, **20**(9): 1815-1823.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, **39**(4): 783-791.
- FORSCHLER, B. T. (2000): Termites as structural pests in North America. In: Termite biology and management workshop. ed. FAO & UNEP, pp. 23-27. UNEP Chemicals, Genf.
- FRENCH, J. R. J. (1974): A juvenile hormone analogue inducing caste differentiation in the Australian termite, *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). Journal of the Australian Entomological Society, **13**(4): 353-355.

- FROHMAN, M. A., DUSH, M. K. & MARTIN, G. R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **85**(23): 8998-9002.
- 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. Journal of Comparative Neurology, **493**(4): 607-626.
- FUCHS, A., SCHREYER, A., FEUERBACH, S. & KORB, J. (2004): A new technique for termite monitoring using computer tomography and endoscopy. International Journal of Pest Management, **50**(1): 63-66.
- FUJITA, A., MIURA, T. & MATSUMOTO, T. (2008): Differences in cellulose digestive systems among castes in two termite lineages. Physiological Entomology, **33**(1): 73-82.
- 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**(11): 1285-1293.
- GÄDE, G., GRANDCOLAS, P. & KELLNER, R. (1997a): Structural data on hypertrehalosaemic neuropeptides from *Cryptocercus punctulatus* and *Therea petiveriana*: How do they fit into the phylogeny of cockroaches? Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, **264**(1382): 763-768.
- GÄDE, G., HOFFMANN, K. H. & SPRING, J. H. (1997b): Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. Physiological Reviews, **77**(4): 963-1032.
- GÄDE, G. & HOFFMANN, K. H. (2005): Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. Physiological Entomology, **30**(2): 103-121.
- GÄDE, G., MARCO, H. G., RICHTER, D. & WEAVER, R. J. (2008): Structure-activity studies with endogenous allatostatins from *Periplaneta americana*: Expressed receptor compared with functional bioassay. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 988-996.
- GARD, A. L., LENZ, P. H., SHAW, J. R. & CHRISTIE, A. E. (2009): Identification of putative peptide paracrines/hormones in the water flea *Daphnia pulex* (Crustacea; Branchiopoda; Cladocera) using transcriptomics and immunohistochemistry. General and Comparative Endocrinology, **160**(3): 271-287.
- GARSIDE, C. S., BENDENA, W. G. & TOBE, S. S. (2001): Quantification of allatostatin mRNA in the midgut of *Diploptera punctata*. In: Perspective in comparative endocrinology: Unity and diversity. ed. GOOS, H. J. T., K., R. R., VAUDRY, H. & PIERANTONI, R., pp. 893-898. Monduzzi Editore, Bologna.
- GARSIDE, C. S., KOLADICH, P. M., BENDENA, W. G. & TOBE, S. S. (2002): Expression of allatostatin in the oviducts of the cockroach *Diploptera punctata*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **32**(9): 1089-1099.

- GARSDIE, C. S., BENDENA, W. G. & TOBE, S. S. (2003): Quantification and visualization of Dippu-AST mRNA in the brain of adult *Diploptera punctata*: mated females vs. virgin females vs. males. Journal of Insect Physiology, **49**(4): 285-291.
- GAY, F. J. (1969): Species introduced by man. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 459-494. Academic Press, New York & London.
- GAY, F. J. & CALABY, J. H. (1970): Termites of the Australian region. In: Biology of termites II. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 393-448. Academic Press, New York & London.
- GILBERT, L. I., GRANGER, N. A. & ROE, R. M. (2000): The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 617-644.
- GILSBACH, R., KOUTA, M., BÖNISCH, H. & BRÜSS, M. (2006): Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. Biotechniques, **40**(2): 173-177.
- GOODISMAN, M. A. D. & CROZIER, R. H. (2003): Association between caste and genotype in the termite *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera : Mastotermitidae). Australian Journal of Entomology, **42**: 1-5.
- GOODMAN, W. G. & GRANGER, N. A. (2005): The juvenile hormones. In: Comprehensive molecular insect science - 3. Endocrinology. ed. GILBERT, L. I., IASTROU, K. & GILL, S., pp. 319-408. Elsevier Pergamon, Oxford.
- GOTOH, H., CORNETTE, R., KOSHIKAWA, S. & MIURA, T. (2008): Effects of precocenes on the corpora allata and the JH titer in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera: Termopsidae). Sociobiology, **52**(2): 345-356.
- GRANDCOLAS, P. (1994): Phylogenetic systematics of the subfamily Polyphaginae, with the assignment of *Cryptocercus* Scudder, 1862 to this taxon (Blattaria, Blaberoidea, Polyphagidae). Systematic Entomology, **19**(2): 145-158.
- GRANDCOLAS, P. (1996): The phylogeny of cockroach families: a cladistic appraisal of morpho-anatomical data. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie, **74**(3): 508-527.
- GRANDCOLAS, P. & DELEPORTE, P. (1996): The origin of protistan symbionts in termites and cockroaches: A phylogenetic perspective. Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society, **12**(1): 93-98.
- GRANDCOLAS, P. & D'HAESE, C. (2001): The phylogeny of cockroach families: Is the current molecular hypothesis robust? Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society, **17**(1): 48-55.
- GRASSÉ, P. P. & NOIROT, C. (1947): Le polymorphisme social du termite à cou jaune (*Calotermes flavicollis* F.). Les faux-ouvriers ou pseudergates et les mues régressives. Comptes Rendus de Academie des Sciences, **224**: 219-221.

- GREENBERG & TOBE, S. S. (1985): Adaptation of a radiochemical assay for juvenile hormone biosynthesis to study caste differentiation in a primitive termite. Journal of Insect Physiology, **31**(5): 347-352.
- 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. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 997-1007.
- GRIEBLER, M. (2009): Auswirkungen der RNA-Interferenz auf allatoregulierende Neuropeptide und Lokalisation der B- Typ Allatostatine bei *Spodoptera frugiperda*. Dissertation, pp. 196. Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- GRIMALDI, D. & ENGEL, M. S. (2005): Evolution of the insects. Cambridge University Press, Cambridge.
- GUIDUGLI, K. R., NASCIMENTO, A. M., AMDAM, G. V., BARCHUK, A. R., OMHOLT, S., SIMOES, Z. L. P. & HARTFELDER, K. (2005): Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. Febs Letters, **579**(22): 4961-4965.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol, **52**(5): 696-704.
- HAGEDORN, H. H., OCONNOR, J. D., FUCHS, M. S., SAGE, B., SCHLAEGER, D. A. & BOHM, M. K. (1975): Ovary as a source of alpha-ecdysone in an adult mosquito. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **72**(8): 3255-3259.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, **41**: 95-98.
- HAMMOCK, B. D. (1985): Regulation of juvenile hormone titer: Degradation. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology: Volume 7 – Endocrinology I. ed. KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I., pp. 431-472. Pergamon Press, Oxford.
- HANUS, R., VRKOSLAV, V., HRDÝ, I., CVAČKA, J. & ŠOBOTNÍK, J. (2010): Beyond cuticular hydrocarbons: evidence of proteinaceous secretion specific to termite kings and queens. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **277**(1684): 995-1002.
- HAPP, G. M. (1992): Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. Annual Review of Entomology, **37**: 303-320.
- HARITOS, V. S., FRENCH, J. R. J. & AHOKAS, J. T. (1994): Cytochrome P450 monooxygenase and glutathione S-transferase activity of two Australian termites: *Mastotermes darwiniensis* and *Coptotermes acinaciformis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **24**(9): 929-935.

- HARTFELDER, K. (2000): Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **33**(2): 157-177.
- HARTFELDER, K. H. (1987): Rates of juvenile hormone synthesis control caste differentiation in the stingless bee *Scaptotrigona postica depilis*. Roux's Archives of Developmental Biology, **196**(8): 522-526.
- HAUSER, F., NEUPERT, S., WILLIAMSON, M., PREDEL, R., TANAKA, Y. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2010): Genomics and peptidomics of neuropeptides and protein hormones present in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Journal of Proteome Research, **9**(10): 5296-5310.
- HAVERTY, M. I. (1979): Soldier production and maintenance of soldier proportions in laboratory experimental groups of *Coptotermes formosanus* Shiraki. Insectes Sociaux, **26**(1): 69-84.
- HAVERTY, M. I. & HOWARD, R. W. (1981): Production of soldiers and maintenance of soldier proportions by laboratory experimental groups of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Reticulitermes virginicus* (Banks) (Isoptera, Rhinotermitidae). Insectes Sociaux, **28**(1): 32-39.
- HAYASHI, Y., LO, N., MIYATA, H. & KITADE, O. (2007): Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. Science, **318**(5852): 985-987.
- HAYES, T. K., GUAN, X. C., JOHNSON, V., STREY, A. & TOBE, S. S. (1994): Structure-activity studies of allatostatin 4 on the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by corpora allata: the importance of individual side chains and stereochemistry. Peptides, **15**(7): 1165-1171.
- HENNIG, W. (1981): Insect phylogeny. John Wiley & Sons, Chichester.
- HIGASHI, M., YAMAMURA, N., ABE, T. & BURNS, T. P. (1991): Why don't all termite species have a sterile worker caste? Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, **246**(1315): 25-29.
- HILL, G. F. (1942): Termites (Isoptera) from the Australian region. Council for Scientific and Industrial Research, Melbourne.
- HIMURO, C., YOKOI, T. & MATSUURA, K. (2011): Queen-specific volatile in a higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). Journal of Insect Physiology, **57**(7): 962-965.
- HOJO, M., TOGA, K., ITAI, I. & MAEKAWA, K. (2009): Reference genes for real-time quantitative reverse transcriptase-PCR in the higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae) comparing soldiers with minor workers. Sociobiology, **54**(2): 509-520.
- HOJO, M., TOGA, K., WATANABE, D., YAMAMOTO, T. & MAEKAWA, K. (2011): High-level expression of the Geranylgeranyl diphosphate synthase gene in the frontal gland of soldiers in *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **77**(1): 17-31.

- HOLM, S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scandinavian Journal of Statistics, **6**(2): 65-70.
- HONIGBERG, B. M. (1970): Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: Biology of termites II. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 1-36. Academic Press, New York & London.
- HOWARD, R. & HAVERTY, M. I. (1981): Seasonal variation in caste proportions of field colonies of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera, Rhinotermitidae). Environmental Entomology, **10**(4): 546-549.
- HOWARD, R. W. & HAVERTY, M. I. (1979): Termites and juvenile hormone analogues: A review of methodology and observed effects. Sociobiology, **4**(2): 269-278.
- HOWICK, C. D., CREFFIELD, J. W. & LENZ, M. (1975): Field collection and laboratory maintenance of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae) for biological assessment studies. Australian Journal of Entomology, **14**(2): 155-160.
- HRDÝ, I. & KŘEČEK, J. (1972): Development of superfluous soldiers induced by juvenile hormone analogs in the termite, *Reticulitermes lucifugus santonensis*. Insectes Sociaux, **19**(2): 105-109.
- HUA, Y. J., BYLEMANS, D., DELOOF, A. & KOOLMAN, J. (1994): Inhibition of ecdysone biosynthesis in flies by a hexapeptide isolated from vitellogenic ovaries. Molecular and Cellular Endocrinology, **104**(1): R1-R4.
- 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*. Journal of Biological Chemistry, **274**(44): 31169-31173.
- HUBER, R. & HOPPE, W. (1965): Zur Chemie des Ecdysons: VII. Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. Chemische Berichte, **98**(7): 2403-2424.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. (2001): MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, **17**(8): 754-755.
- HUELSENBECK, J. P., RONQUIST, F., NIELSEN, R. & BOLLBACK, J. P. (2001): Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science, **294**(5550): 2310-2314.
- HUGGETT, J., DHEDA, K., BUSTIN, S. & ZUMLA, A. (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity, **6**(4): 279-284.
- HUMMON, A. B., RICHMOND, T. A., VERLEYEN, P., BAGGERMAN, G., HUYBRECHTS, J., EWING, M. A., VIERSTRAETE, E., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., SCHOOF, L., ROBINSON, G. E., ET AL. (2006): From the genome to the proteome: Uncovering peptides in the *Apis* brain. Science, **314**(5799): 647-649.

- IMBODEN, H., LANZREIN, B., DELBECQUE, J. P. & LÜSCHER, M. (1978): Ecdysteroids and juvenile hormone during embryogenesis in the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. General and Comparative Endocrinology, **36**(4): 628-635.
- INWARD, D., BECCALONI, G. & EGGLETON, P. (2007a): Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. Biology Letters, **3**(3): 331-335.
- INWARD, D. J. G., VOGLER, A. P. & EGGLETON, P. (2007b): A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. Molecular Phylogenetics and Evolution, **44**(3): 953-967.
- ISHIKAWA, Y., AONUMA, H. & MIURA, T. (2008): Soldier-specific modification of the mandibular motor neurons in termites. PLoS One, **3**(7): e2617.
- ISHIKAWA, Y., OKADA, Y., ISHIKAWA, A., MIYAKAWA, H., KOSHIKAWA, S. & MIURA, T. (2010): Gene expression changes during caste-specific neuronal development in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti*. BMC Genomics, **11**: 314.
- ISHITANI, K. & MAEKAWA, K. (2010): Ovarian development of female-female pairs in the termite, *Reticulitermes speratus*. Journal of Insect Science, **10**: 194.
- ISHIWATA, K., SASAKI, G., OGAWA, J., MIYATA, T. & SU, Z. H. (2011): Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, **58**(2): 169-180.
- JAROSCH, A. & MORITZ, R. F. (2011): Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: Tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. Journal of Insect Physiology, **57**(7): 851-857.
- JESUDASON, P., ANSPAUGH, D. D. & ROE, R. M. (1992): Juvenile-hormone metabolism in the plasma, integument, midgut, fat-body, and brain during the last instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **20**(2): 87-105.
- JONES, D. T., TAYLOR, W. R. & THORNTON, J. M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences, **8**(3): 275-282.
- JUCCI, C. (1952): Symbiosis and phylogenesis in the Isoptera. Nature, **169**(4307): 837.
- JUDY, K. J., SCHOOLEY, D. A., DUNHAM, L. L., HALL, M. S., BERGOT, B. J. & SIDDALL, J. B. (1973): Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta* - (organ culture/corpora allata/high-resolution liquid chromatography/tobacco hornworm). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **70**(5): 1509-1513.

- KAI, Z. P., XIE, Y., HUANG, J. A., TOBE, S. S., ZHANG, J. R., LING, Y., ZHANG, L., ZHAO, Y. C. & YANG, X. L. (2011): Peptidomimetics in the discovery of new insect growth regulators: Studies on the structure-activity relationships of the core pentapeptide region of allatostatins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **59**(6): 2478-2485.
- KAI, M. (2000): Ecology and biology of termites in East Africa - Diversity and communication. In: Termite biology and management workshop. ed. FAO & UNEP, pp. 31. UNEP Chemicals, Genf.
- KAISER, P. (1956): Die Hormonalorgane der Termiten im Zusammenhang mit der Entstehung ihrer Kasten. Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut, **54**: 129-178.
- KAMBHAMPATI, S. (1995): A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA-sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **92**(6): 2017-2020.
- KAMBHAMPATI, S., KJER, K. M. & THORNE, B. L. (1996): Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. Insect Molecular Biology, **5**(4): 229-238.
- KARLSON, P. & LÜSCHER, M. (1959): Pheromones - new term for a class of biologically active substances. Nature, **183**(4653): 55-56.
- KARLSON, P., HOPPE, W., HUBER, R. & HOFFMEISTER, H. (1963): Zur Chemie des Ecdysons. Justus Liebig Annalen der Chemie, **662**: 1-20.
- KARLSON, P., HOFFMEISTER, H., HUMMEL, H., HOCKS, P. & SPITELLER, G. (1965): Zur Chemie des Ecdysons: VI. Reaktionen des Ecdysonmoleküls. Chemische Berichte, **98**(7): 2394-2402.
- 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**(4897): 1481-1483.
- KE, J., SUN, J. Z., NGUYEN, H. D., SINGH, D., LEE, K. C., BEYENAL, H. & CHEN, S. L. (2010): In-situ oxygen profiling and lignin modification in guts of wood-feeding termites. Insect Science, **17**(3): 277-290.
- KING, D. S. & MARKS, E. P. (1974): Secretion and metabolism of alpha-ecdysone by cockroach *Leucophaea maderae* tissues *in vitro*. Life Sciences, **15**(1): 147-154.
- KJER, K. M. (2004): Aligned 18S and insect phylogeny. Syst Biol, **53**(3): 506-514.
- KJER, K. M., CARLE, F. L., LITMAN, J. & WARE, J. (2006): A molecular phylogeny of Hexapoda. Arthropod Systematics and Phylogeny, **64**(1): 35-44.
- KLASS, K.-D. (1998): The proventriculus of the Dicondylia, with comments on evolution and phylogeny in Dictyoptera and Odonata (Insecta). Zoologischer Anzeiger, **237**(1): 15-42.

- KLASS, K. D. (2003): Relationships among the principal lineages of Dictyoptera inferred from morphological data. Entomologische Abhandlungen, **61**(2): 134-137.
- KLASS, K. D. & MEIER, R. (2006): A phylogenetic analysis of Dictyoptera (Insecta) based on morphological characters. Entomologische Abhandlungen, **63**(1-2): 3-50.
- KLASS, K. D., NALEPA, C. & LO, N. (2008): Wood-feeding cockroaches as models for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): *Cryptocercus* vs. *Parasphaeria boleiriana*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **46**(3): 809-817.
- KNIPPERS, R. (2006): Molekulare Genetik. 9. komplett überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- KNOOP, V. & MÜLLER, K. (2009): Gene und Stammbäume: Ein Handbuch zur Molekularen Phylogenetik. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KOCH, A. (1938): Symbiosestudien III: Die intrazelluläre Bakteriensymbiose von *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Zoomorphology, **34**(4): 584-609.
- KORB, J., ROUX, E. A. & LENZ, M. (2003): Proximate factors influencing soldier development in the basal termite *Cryptotermes secundus* (Hill). Insectes Sociaux, **50**(4): 299-303.
- KORB, J. & KATRANTZIS, S. (2004): Influence of environmental conditions on the expression of the sexual dispersal phenotype in a lower termite: implications for the evolution of workers in termites. Evolution & Development, **6**(5): 342-352.
- KORB, J. & HARTFELDER, K. (2008): Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. Biological Reviews, **83**(3): 295-313.
- KORB, J., HOFFMANN, K. & HARTFELDER, K. (2009a): Endocrine signatures underlying plasticity in postembryonic development of a lower termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae). Evolution & Development, **11**(3): 269-277.
- KORB, J., WEIL, T., HOFFMANN, K., FOSTER, K. R. & REHLI, M. (2009b): A gene necessary for reproductive suppression in termites. Science, **324**(5928): 758.
- KORB, J., HOFFMANN, K. & HARTFELDER, K. (2012): Molting dynamics and juvenile hormone titer profiles in the nymphal stages of a lower termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae) - signatures of developmental plasticity. Journal of Insect Physiology, **58**(3): 376-383.
- KOSHIKAWA, S., CORNETTE, R., HOJO, M., MAEKAWA, K., MATSUMOTO, T. & MIURA, T. (2005): Screening of genes expressed in developing mandibles during soldier differentiation in the termite *Hodotermopsis sjostedti*. Febs Letters, **579**(6): 1365-1370.
- KOTAKI, T., SHINADA, T., KAIHARA, K., OHFUNE, Y. & NUMATA, H. (2009): Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. Organic Letters, **11**(22): 5234-5237.

- KOTAKI, T., SHINADA, T., KAIHARA, K., OHFUNE, Y. & NUMATA, H. (2011): Biological activities of juvenile hormone III skipped bisepoxide in last instar nymphs and adults of a stink bug, *Plautia stali*. Journal of Insect Physiology, **57**(1): 147-152.
- 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **88**(21): 9458-9462.
- KRISHNA, K. & EMERSON, A. E. (1983): A new fossil species of termite from Mexican amber, *Mastotermes electromexicus* (Isoptera, Mastotermitidae). American Museum Novitates, **2767**: 1-8.
- KRISTENSEN, N. P. (1975): The phylogeny of hexapod 'orders'. A critical review of recent accounts. Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung, **13**(1): 1-44.
- KRISTENSEN, N. P. (1981): Phylogeny of insect orders. Annual Review of Entomology, **26**: 135-157.
- LAGUEUX, M., HETRU, C., GOLTZENE, F., KAPPLER, C. & HOFFMANN, J. A. (1979): Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. Journal of Insect Physiology, **25**(9): 709-723.
- LANGE, A. B., BENDENA, W. G. & TOBE, S. S. (1995): The effect of the thirteen Dip-allatostatins on myogenic and induced contractions of the cockroach (*Diploptera punctata*) hindgut. Journal of Insect Physiology, **41**(7): 581-588.
- LANZREIN, B., GENTINETTA, V., FEHR, R. & LUSCHER, M. (1978): Correlation between hemolymph juvenile hormone titer, corpus allatum volume, and corpus allatum *in vivo* and *in vitro* activity during oocyte maturation in a cockroach (*Nauphoeta cinerea*). General and Comparative Endocrinology, **36**(3): 339-345.
- LANZREIN, B., IMBODEN, H., BÜRGIN, C., BRÜNING, E. & GFELLER, H. (1984): On titers, origin, and functions of juvenile hormone III, methylfarnesoate, and ecdysteroids in embryonic development to the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. In: Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones. ed. HOFFMANN, J. & PORCHET, M., pp. 454-465. Springer, Heidelberg.
- LANZREIN, B., GENTINETTA, V., ABEGGLEN, H., BAKER, F. C., MILLER, C. A. & SCHOOLEY, D. A. (1985a): Titers of ecdysone, 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone III throughout the life cycle of a hemimetabolous insect, the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. Experientia, **41**(7): 913-917.
- LANZREIN, B., GENTINETTA, V. & FEHR, R. (1985b): Titres of juvenile hormone and ecdysteroids in reproductives and eggs of *Macrotermes michaelseni*: Relation to caste determination? In: Caste Differentiation in Social Insects. ed. WATSON, J. A. L., OKOT-KOTBER, B. M. & NOIROT, C., pp. 307-327. Pergamon Press, Oxford & New York.

- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., ET AL. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, **23**(21): 2947-2948.
- LAVELLE, P. (1997): Faunal activities and soil processes: Adaptive strategies that determine ecosystem function. Advances in Ecological Research, **27**: 93-132.
- LE PECQ, J. B. & PAOLETTI, C. (1966): A new fluorometric method for RNA and DNA determination. Analytical Biochemistry, **17**(1): 100-107.
- LE PECQ, J. B. & PAOLETTI, C. (1967): A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids - Physical-chemical characterization. Journal of Molecular Biology, **27**(1): 87-106.
- LEE, K. E. & WOOD, T. G. (1971): Termites and soils. Academic Press, London.
- 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*. Journal of Experimental Biology, **201**(22): 3067-3074.
- LEE, K. Y., CHAMBERLIN, M. E. & HORODYSKI, F. M. (2002): Biological activity of *Manduca sexta* allatotropin-like peptides, predicted products of tissue-specific and developmentally regulated alternatively spliced mRNAs. Peptides, **23**(11): 1933-1941.
- LEFEUVE, P. & BORDEREAU, C. (1984): Soldier formation regulated by a primer pheromone from the soldier frontal gland in a higher termite, *Nasutitermes lujae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, **81**(23): 7665-7668.
- LEGENDRE, F., WHITING, M. F., BORDEREAU, C., CANCELLO, E. M., EVANS, T. A. & GRANDCOLAS, P. (2008): The phylogeny of termites (Dictyoptera : Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: Implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. Molecular Phylogenetics and Evolution, **48**(2): 615-627.
- LELIS, A. T. & EVERAERTS, C. (1993): Effects of juvenile hormone analogs upon soldier differentiation in the termite *Reticulitermes santonensis* (Rhinotermitidae, Heterotermitinae). Journal of Morphology, **217**(2): 239-261.
- LENZ, C., SONDERGAARD, L. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2000a): Molecular cloning and genomic organization of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to mammalian galanin receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications, **269**(1): 91-96.
- LENZ, C., WILLIAMSON, M. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2000b): Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **273**(3): 1126-1131.

- LENZ, C., WILLIAMSON, M. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2000c): Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **273**(2): 571-577.
- LENZ, M. (1976): The dependence of hormone effects in termite caste determination on external factors. In: Phase and caste determination in insects. ed. LÜSCHER, M., pp. 73-89. Pergamon Press, Oxford.
- LENZ, M. (2000): Management of Australian termites in the built environment and in horticulture. In: Termite biology and management workshop. ed. FAO & UNEP, pp. 35-36. UNEP Chemicals, Genf.
- LI, B., PREDEL, R., NEUPERT, S., HAUSER, F., TANAKA, Y., CAZZAMALI, G., WILLIAMSON, M., ARAKANE, Y., VERLEYEN, P., SCHOofs, L., ET AL. (2008): Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Genome Research, **18**(1): 113-122.
- LI, L., FRÖHLICH, J., PFEIFFER, P. & KÖNIG, H. (2003a): Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryotic Cell, **2**(5): 1091-1098.
- LI, S., OUYANG, Y. C., OSTROWSKI, E. & BORST, D. W. (2005): Allatotropin regulation of juvenile hormone synthesis by the corpora allata from the lubber grasshopper, *Romalea microptera*. Peptides, **26**(1): 63-72.
- LI, Y. P., UNNITHAN, G. C., VEENSTRA, J. A., FEYEREISEN, R. & NORIEGA, F. G. (2003b): Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* *in vitro*: effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin. Journal of Experimental Biology, **206**(11): 1825-1832.
- LI, Y. P., 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*. Journal of Biological Chemistry, **281**(45): 34048-34055.
- LIÉNARD, M. A., LASSANCE, J. M. X. S., PAULMIER, I., PICIMBON, J. F. & LÖFSTEDT, C. (2006): Differential expression of cytochrome c oxidase subunit III gene in castes of the termite *Reticulitermes santonensis*. Journal of Insect Physiology, **52**(6): 551-557.
- LIGHT, S. F. (1944): Experimental studies on ectohormonal control of the development of supplementary reproductives in the termite genus *Zootermopsis* (formerly *Termopsis*). University of California Publications in Zoology, **43**: 413-454.
- LIN, C. P. & DANFORTH, B. N. (2004): How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. Molecular Phylogenetics and Evolution, **30**(3): 686-702.
- LIU, Y. X., HENDERSON, G., MAO, L. X. & LAINE, R. A. (2005a): Seasonal variation of juvenile hormone titers of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). Environmental Entomology, **34**(3): 557-562.

- LIU, Y. X., HENDERSON, G., MAO, L. X. & LAINE, R. A. (2005b): Effects of temperature and nutrition on juvenile hormone titers of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Annals of the Entomological Society of America, **98**(5): 732-737.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ method. Methods, **25**(4): 402-408.
- LO, N., TOKUDA, G., WATANABE, H., ROSE, H., SLAYTOR, M., MAEKAWA, K., BANDI, C. & NODA, H. (2000): Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. Current Biology, **10**(13): 801-804.
- LO, N., BANDI, C., WATANABE, H., NALEPA, C. & BENINATI, T. (2003): Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. Molecular Biology and Evolution, **20**(6): 907-913.
- LO, N., BENINATI, T., STONE, F., WALKER, J. & SACCHI, L. (2007a): Cockroaches that lack *Blattabacterium* endosymbionts: the phylogenetically divergent genus *Nocticola*. Biology Letters, **3**(3): 327-330.
- LO, N., ENGEL, M. S., CAMERON, S., NALEPA, C. A., TOKUDA, G., GRIMALDI, D., KITADE, O., KRISHNA, K., KLASS, K. D., MAEKAWA, K., ET AL. (2007b): Save Isoptera: A comment on Inward *et al.* Biology Letters, **3**(5): 562-563.
- LO, N., HAYASHI, Y. & KITADE, O. (2009): Should environmental caste determination be assumed for termites? The American Naturalist, **173**(6): 848-853.
- LOH, Y. P. & GAINER, H. (1983): Biosynthesis and processing of neuropeptides. In: Brain Peptides. ed. KRIEGER, D. T., BROWNSTEIN, M. J. & MARTIN, J. B., pp. 79-116. Wiley-Interscience, New York.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, M. J., NEEF, A., PERETÓ, J., PATINO-NAVARRETE, R., PIGNATELLI, M., LATORRE, A. & MOYA, A. (2009): Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. PLoS Genetics, **5**(11): e1000721.
- LORENZ, J. I., LORENZ, M. W. & HOFFMANN, K. H. (1997): Factors regulating juvenile hormone and ecdysteroid biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). European Journal of Entomology, **94**(3): 369-379.
- 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. Regulatory Peptides, **57**(3): 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*. Journal of Biological Chemistry, **270**(36): 21103-21108.
- LORENZ, M. W., LORENZ, J. I., TREIBLMAYR, K. & HOFFMANN, K. H. (1998): *In vivo* effects of allatostatins in crickets, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **38**(1): 32-43.

- LORENZ, M. W., KELLNER, R., HOFFMANN, K. H. & GADE, G. (2000): Identification of multiple peptides homologous to cockroach and cricket allatostatins in the stick insect *Carausius morosus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 711-718.
- LUNGCHUKIET, P., DONLY, B. C., ZHANG, J. R., TOBE, S. S. & BENDENA, W. G. (2008a): Molecular cloning and characterization of an allatostatin-like receptor in the cockroach *Diploptera punctata*. Peptides, **29**(2): 276-285.
- LUNGCHUKIET, P., ZHANG, J. R., TOBE, S. S. & BENDENA, W. G. (2008b): Quantification of allatostatin receptor mRNA levels in the cockroach, *Diploptera punctata*, using real-time PCR. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 981-987.
- LÜSCHER, M. (1952): Die Produktion und Elimination von Ersatzgeschlechtstieren bei der Termiten *Kaloterme flavicollis* Fabr. Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie, **34**(2): 123-141.
- LÜSCHER, M. (1955): Zur Frage der Übertragung sozialer Wirkstoffe bei Termiten. Naturwissenschaften, **42**(7): 186-186.
- LÜSCHER, M. (1956): Die Entstehung von Ersatzgeschlechtstieren bei der Termiten *Kaloterme flavicollis* Fabr. Insectes Sociaux, **3**(1): 119-128.
- LÜSCHER, M. (1957): Ersatzgeschlechtstiere bei Termiten und die Beeinflussung ihrer Entstehung durch die Corpora allata. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Entomologie, **14**: 144-150.
- LÜSCHER, M. (1958): Über die Entstehung der Soldaten bei Termiten. Revue Suisse de Zoologie, **65**(20): 372-377.
- LÜSCHER, M. (1960): Hormonal control of caste differentiation in termites. Annals of the New York Academy of Sciences, **89**(3): 549-563.
- LÜSCHER, M. & SPRINGHETTI, A. (1960): Untersuchungen über die Bedeutung der Corpora allata für die Differenzierung der Kasten bei der Termiten *Kaloterme flavicollis* F. Journal of Insect Physiology, **5**(3-4): 190-212.
- LÜSCHER, M. (1962): Hormonal regulation of development in termites. Symposia Genetica et Biologica Italica, **10**: 1-11.
- LÜSCHER, M. (1972): Environmental control of juvenile hormone (JH) secretion and caste differentiation in termites. General and Comparative Endocrinology Supplement, **3**: 509-514.
- LÜSCHER, M. (1974a): Die Kompetenz zur Soldatenbildung bei Larven (Pseudergäten) der Termiten *Zootermopsis angusticollis*. Revue Suisse de Zoologie, **81**(3): 710-714.
- LÜSCHER, M. (1974b): Kasten und Kastendifferenzierung bei niederen Termiten. In: Sozialpolymorphismus bei Insekten. ed. SCHMIDT, G. H., pp. 694-739. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

- LÜSCHER, M. (1975): Pheromones and polymorphism in bees and termites. In: Pheromones and defensive secretions in social insects. ed. NOIROT, C., HOWSE, P. E. & LE MASNE, G., pp. 123-141. French Section of the IUSI, Dijon.
- LÜSCHER, M. & LANZREIN, B. (1975): Differential effects of the three juvenile hormones in the cockroach *Nauphoeta cinerea*. Colloque International du Centre National de la Recherche Scientifique, **251**.
- LÜSCHER, M. (1976): Evidence for an endocrine control of caste determination in higher termites. In: Phase and caste determination in insects, endocrine aspects. ed. LÜSCHER, M., pp. 91-103. Pergamon Press, Oxford & New York.
- MAEKAWA, K., KITADE, O. & MATSUMOTO, T. (1999): Molecular phylogeny of orthopteroid insects based on the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. Zoological Science, **16**(1): 175-184.
- MAEKAWA, K., ISHITANI, K., GOTOH, H., CORNETTE, R. & MIURA, T. (2010): Juvenile hormone titre and vitellogenin gene expression related to ovarian development in primary reproductives compared with nymphs and nymphoid reproductives of the termite *Reticulitermes speratus*. Physiological Entomology, **35**(1): 52-58.
- MAESTRO, J. L. & BELLÉS, X. (2006): Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **62**(2): 73-79.
- MAESTRO, J. L., PASCUAL, N., TREIBLMAYR, K., LOZANO, J. & BELLÉS, X. (2010): Juvenile hormone and allatostatins in the German cockroach embryo. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **40**(9): 660-665.
- MAESTRO, O., CRUZ, J., PASCUAL, N., MARTÍN, D. & BELLÉS, X. (2005): Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hermetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). Molecular and Cellular Endocrinology, **238**(1-2): 27-37.
- MAINS, R. E., EIPPER, B. A., GLEMBOTSKI, C. C. & DORES, R. M. (1983): Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. Trends in Neurosciences, **6**(6): 229-235.
- MANDO, A. (2000): Termites in the ecology and productivity of soils with special reference to the Sahelian conditions. In: Termite biology and management workshop. ed. FAO & UNEP, pp. 38. UNEP Chemicals, Genf.
- MANNING, M., OLMA, A., KLIS, W., KOŁODZIEJCZYK, A., NAWROCKA, E., MISICKA, A., SETO, J. & SAWYER, W. H. (1984): Carboxy terminus of vasopressin required for activity but not binding. Nature, **308**(5960): 652-653.
- MAO, L. X., HENDERSON, G., LIU, Y. X. & LAINE, R. A. (2005): Formosan subterranean termite (Isoptera : Rhinotermitidae) soldiers regulate juvenile hormone levels and caste differentiation in workers. Annals of the Entomological Society of America, **98**(3): 340-345.

- MAO, L. X. & HENDERSON, G. (2010): Group size effect on worker juvenile hormone titers and soldier differentiation in Formosan subterranean termite. Journal of Insect Physiology, **56**(7): 725-730.
- MARCHAL, E., VANDERSMISSEN, H. P., BADISCO, L., VAN DE VELDE, S., VERLINDEN, H., IGA, M., VAN WIELENDAELE, P., HUYBRECHTS, R., SIMONET, G., SMAGGHE, G., ET AL. (2010): Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: a review. Peptides, **31**(3): 506-519.
- MARCHAL, E., BADISCO, L., VERLINDEN, H., VANDERSMISSEN, T., VAN SOEST, S., VAN WIELENDAELE, P. & VANDEN BROECK, J. (2011): Role of the *Halloween* genes, *Spook* and *Phantom* in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Journal of Insect Physiology, **57**(9): 1240-1248.
- MARTÍN, D., PIULACHS, M. D. & BELLÉS, X. (1996): Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach. Molecular and Cellular Endocrinology, **121**(2): 191-196.
- MARTÍNEZ-PÉREZ, F., BENDENA, W. G., CHANG, B. S. & TOBE, S. S. (2009): FGLamide Allatostatin genes in Arthropoda: introns early or late? Peptides, **30**(7): 1241-1248.
- MATSUURA, K., TANAKA, C. & NISHIDA, T. (2000): Symbiosis of a termite and a sclerotium-forming fungus: Sclerotia mimic termite eggs. Ecological Research, **15**(4): 405-414.
- MATSUURA, K., HIMURO, C., YOKOI, T., YAMAMOTO, Y., VARGO, E. L. & KELLER, L. (2010): Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **107**(29): 12963-12968.
- MCMAHAN, E. A. (1969): Feeding relationships and radioisotope techniques. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 387-406. Academic Press, New York & London.
- MEUSEMANN, K., VON REUMONT, B. M., SIMON, S., ROEDING, F., STRAUSS, S., KUCK, P., EBERSBERGER, I., WALZL, M., PASS, G., BREUERS, S., ET AL. (2010): A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. Molecular Biology and Evolution, **27**(11): 2451-2464.
- MEYER, A. S., SCHNEIDEHA, HANZMANN, E. & KO, J. H. (1968): The two juvenile hormones from cecropia silk moth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **60**(3): 853-860.
- MEYER, D. R., LANZREIN, B., LÜSCHER, M. & NAKANISHI, K. (1976): Isolation and identification of a juvenile hormone (JH) in termites. Experientia, **32**(6): 773-773.
- MEYERING-VOS, M., WU, X., HUANG, J., JINDRA, M., HOFFMANN, K. H. & SEHNAL, F. (2001): The allatostatin gene of the cricket *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae). Molecular and Cellular Endocrinology, **184**(1-2): 103-114.

- MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, K. H. (2003): Expression of allatostatins in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **136**(2): 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 Biochemistry and Molecular Biology, **36**(6): 492-504.
- MEYERING-VOS, M. & WOODRING, J. (2008): A-Typ Allatostatine und Sulfakinine als Sättigungseffektoren in der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus*. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, **16**: 409-412.
- MICHENER, C. D. (1969): Comparative social behavior of bees. Annual Review of Entomology, **14**: 299-342.
- MIURA, T., KOSHIKAWA, S. & MATSUMOTO, T. (2003): Winged presoldiers induced by a juvenile hormone analog in *Zootermopsis nevadensis*: implications for plasticity and evolution of caste differentiation in termites. Journal of Morphology, **257**(1): 22-32.
- MIURA, T. & SCHARF, M. E. (2011): Molecular basis underlying caste differentiation in termites. In: Biology of termites: A modern synthesis. ed. BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N., pp. 211-253. Springer, Dordrecht.
- MIYAZAKI, M., MAO, L. X., HENDERSON, G. & LAINE, R. A. (2009): Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometric quantitation of juvenile hormone III in whole body extracts of the Formosan subterranean termite. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **877**(27): 3175-3180.
- MOORE, B. P. (1968): Studies on chemical composition and function of cephalic gland secretion in Australian termites. Journal of Insect Physiology, **14**(1): 33-39.
- MORIYAMA, H., NAKANISHI, K., KING, D. S., OKAUCHI, T., SIDDALL, J. B. & HAFFERL, W. (1970): On origin and metabolic fate of alpha-ecdysone in insects. General and Comparative Endocrinology, **15**(1): 80-87.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M. & LADISCH, M. (2005): Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, **96**(6): 673-686.
- MÜLHARDT, C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, **51**: 263-273.

- MUNOZ-TORRES, M. C., REESE, J. T., CHILDERS, C. P., BENNETT, A. K., SUNDARAM, J. P., CHILDS, K. L., ANZOLA, J. M., MILSHINA, N. & ELSIK, C. G. (2010): Hymenoptera Genome Database: Integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. Nucleic Acids Research, **39**(Database issue): D658-662.
- MURTHY, A. S. N., MAINS, R. E. & EIPPER, B. A. (1986): Purification and characterization of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase from bovine neurointermediate pituitary. Journal of Biological Chemistry, **261**(4): 1815-1822.
- MYLES, T. G. (1999): Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. Sociobiology, **33**(1): 1-87.
- NACHMAN, R. J., MOYNA, G., WILLIAMS, H. J., TOBE, S. S. & SCOTT, A. I. (1998): Synthesis, biological activity, and conformational studies of insect allatostatin neuropeptide analogues incorporating turn-promoting moieties. Bioorganic & Medicinal Chemistry, **6**(8): 1379-1388.
- NAGIN, R. (1972): Caste determination in *Neotermes jouteli* (Banks). Insectes Sociaux, **19**(1): 39-61.
- NALEPA, C. A. (1984): Colony composition, protozoan transfer and some life-history characteristics of the woodroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Dictyoptera, Cryptocercidae). Behavioral Ecology and Sociobiology, **14**(4): 273-279.
- NALEPA, C. A. & LENZ, M. (2000): The ootheca of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae): homology with cockroach oothecae. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, **267**(1454): 1809-1813.
- NALEPA, C. A., BIGNELL, D. E. & BANDI, C. (2001): Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera. Insectes Sociaux, **48**(3): 194-201.
- NELSON, C. M., IHLE, K. E., FONDRK, M. K., PAGE, R. E. & AMDAM, G. V. (2007): The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. Plos Biology, **5**(3): 673-677.
- NEUHÄUSER, T., SORGE, D., STAY, B. & HOFFMANN, K. H. (1994): Responsiveness of the adult cricket (*Gryllus bimaculatus* and *Acheta domestica*) retrocerebral complex to allatostatin-1 from a cockroach, *Diploptera punctata*. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology, **164**(1): 23-31.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. & VON HEIJNE, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng, **10**(1): 1-6.
- NIELSEN, H. & KROGH, A. (1998): Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In: Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. ed. GLASGOW, J., LITTLEJOHN, T., MAJOR, F., LATHROP, R., SANKOFF, D. & SENSEN, C., pp. 122-130. The AAAI Press, Montréal.

- NIJHOUT, H. F. & WHEELER, D. E. (1982): Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. Quarterly Review of Biology, **57**(2): 109-133.
- NIJHOUT, H. F. (1994): Insect hormones. Princeton University Press, Princeton.
- NIJHOUT, H. F. (1999): When developmental pathways diverge. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **96**(10): 5348-5350.
- NIJHOUT, H. F. (2003): Development and evolution of adaptive polyphenisms. Evolution & Development, **5**(1): 9-18.
- NOIROT, C. (1969a): Glands and secretions. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 89-123. Academic Press, New York & London.
- NOIROT, C. (1969b): Formation of castes in the higher termites. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 311-350. Academic Press, New York & London.
- NOIROT, C. & NOIROT-TIMOTHÉE, C. (1969): The digestive system. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 49-88. Academic Press, New York & London.
- NOIROT, C. & PASTEELS, J. M. (1987): Ontogenic development and evolution of the worker caste in termites. Experientia, **43**(8): 851-860.
- NUTTING, W. L. (1969): Flight and colony foundation. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 233-282. Academic Press, New York & London.
- OEH, U., LORENZ, M. W., DYKER, H., LOSEL, P. & HOFFMANN, K. H. (2000): Interaction between *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 719-727.
- OHKUMA, M. (2003): Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. Applied Microbiology and Biotechnology, **61**(1): 1-9.
- OHKUMA, M., YUZAWA, H., AMORNSAK, W., SORNNUWAT, Y., TAKEMATSU, Y., YAMADA, A., VONGKALUANG, C., SARNTHOY, O., KIRTIBUTR, N., NOPARATNARAPORN, N., ET AL. (2004): Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial COII sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, **31**(2): 701-710.
- OKOT-KOTBER, B. M. (1980a): Competence of *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Macrotermitinae) larvae to differentiate into soldiers under the influence of juvenile hormone analogue (ZR-515, Methoprene). Journal of Insect Physiology, **26**(10): 655-659.
- OKOT-KOTBER, B. M. (1980b): Histological and size changes in corpora allata and prothoracic glands during development of *Macrotermes michaelseni* (Isoptera). Insectes Sociaux, **27**(4): 361-376.

- OKOT-KOTBER, B. M. (1980c): The influence of juvenile hormone analogue on soldier differentiation in the higher termite, *Macrotermes michaelseni*. Physiological Entomology, **5**: 407-416.
- OKOT-KOTBER, B. M. (1982): Correlation between larval weights, endocrine gland activities and competence period during differentiation of workers and soldiers in *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Termitidae). Journal of Insect Physiology, **28**(11): 905-911.
- OKOT-KOTBER, B. M. (1985): Mechanisms of caste determination in a higher termite, *Macrotermes michaelseni* (Isoptera, Macrotermitinae). In: Caste differentiation in social insects. ed. WATSON, J. A. L., OKOT-KOTBER, B. M. & NOIROT, C., pp. 267-306. Pergamon Press, Oxford & New York.
- OKOT-KOTBER, B. M., PRESTWICH, G. D., STRAMBI, A. & STRAMBI, C. (1993): Changes in morphogenetic hormone titers in isolated workers of the termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). General and Comparative Endocrinology, **90**(3): 290-295.
- OOSTRA, V., DE JONG, M. A., INVERGO, B. M., KESBEKE, F., WENDE, F., BRAKEFIELD, P. M. & ZWAAN, B. J. (2011): Translating environmental gradients into discontinuous reaction norms via hormone signalling in a polyphenic butterfly. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **278**(1706): 789-797.
- PAEMEN, L., TIPS, A., SCHOOF, 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**(1): 7-10.
- PAGE, R. D. (1996): TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, **12**(4): 357-358.
- PAN, M. L. & WYATT, G. R. (1971): Juvenile hormone induces vitellogenin synthesis in monarch butterfly. Science, **174**(4008): 503-505.
- PARK, Y. I. & RAINA, A. (2003): Factors regulating caste differentiation in the Formosan subterranean termite with emphasis on soldier formation. Sociobiology, **41**(1A): 49-60.
- PARK, Y. I. & RAINA, A. K. (2004): Juvenile hormone III titers and regulation of soldier caste in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of Insect Physiology, **50**(6): 561-566.
- PARK, Y. I. & RAINA, A. K. (2005): Regulation of juvenile hormone titers by soldiers in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. Journal of Insect Physiology, **51**(4): 385-391.
- PELLENS, R., D'HAESE, C. A., BELLES, X., PIULACHS, M. D., LEGENDRE, F., WHEELER, W. C. & GRANDCOLAS, P. (2007): The evolutionary transition from subsocial to eusocial behaviour in Dictyoptera: Phylogenetic evidence for modification of the "shift-independent-care" hypothesis with a new subsocial cockroach. Molecular Phylogenetics and Evolution, **43**(2): 616-626.

- PFAFFL, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, **29**(9): e45.
- PFAFFL, M. W. (2003): Livestock transcriptomics: Quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology. Habilitation, pp. 42. Department of Animal Science, Technische Universität München - Weihenstephan, Freising.
- PFAFFL, M. W. (2004a): Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of quantitative PCR. ed. BUSTIN, S. A., pp. 87-112. International University Line, La Jolla, CA.
- PFAFFL, M. W. (2004b): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOspektrum, **10**(1): 92-95.
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters, **26**(6): 509-515.
- PIULACHS, M. D., MAESTRO, J. L. & BELLES, X. (1992): Juvenile hormone production and accessory reproductive gland development during sexual maturation of male *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology, **102**(3): 477-480.
- PONTON, F., CHAPUIS, M. P., PERNICE, M., SWORD, G. A. & SIMPSON, S. J. (2011): Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology, **57**(6): 840-850.
- POSADA, D. (2008): jModelTest: Phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, **25**(7): 1253-1256.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E., SIEGEL, N. R., FOK, K. F. & FEYEREISEN, R. (1989): Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **163**(3): 1243-1247.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E., FOK, K. F., SIEGEL, N. R., MCCORMACK, A. L., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. & FEYEREISEN, R. (1991): Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains - an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **88**(6): 2412-2416.
- PREDEL, R., KELLNER, R., RAPUS, J. & GADE, G. (1999): Allatostatins from the retrocerebral complex and antennal pulsatile organ of the American cockroach: structural elucidation aided by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Regulatory Peptides, **82**(1-3): 81-89.
- PREDEL, R., RAPUS, J. & ECKERT, M. (2001): Myoinhibitory neuropeptides in the American cockroach. Peptides, **22**(2): 199-208.
- PRESTWICH, G. D. (1979): Chemical defense by termite soldiers. Journal of Chemical Ecology, **5**(3): 459-480.

- PRESTWICH, G. D. (1984): Defense mechanisms of termites. Annual Review of Entomology, **29**: 201-232.
- 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**(4): 787-794.
- RACHINSKY, A., STRAMBI, C., STRAMBI, A. & HARTFELDER, K. (1990): Caste and metamorphosis - Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. General and Comparative Endocrinology, **79**(1): 31-38.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 729-737.
- RAINA, A., PARK, Y. I. & GELMAN, D. (2008): Molting in workers of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. Journal of Insect Physiology, **54**(1): 155-161.
- RANKIN, S. M., STAY, B., AUCOIN, R. R. & TOBE, S. S. (1986): *In vitro* inhibition of juvenile hormone synthesis by corpora allata of the viviparous cockroach, *Diploptera punctata*. Journal of Insect Physiology, **32**(2): 151-156.
- RANKIN, S. M., STAY, B., CHAN, K. & JACKSON, E. S. (1998): Cockroach allatostatin-immunoreactive neurons and effects of cockroach allatostatin in earwigs. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **38**(4): 155-165.
- REES, H. H. (1995): Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. European Journal of Entomology, **92**(1): 9-39.
- REICHWALD, K., UNNITHAN, G. C., DAVIS, N. T., AGRICOLA, H. & FEYEREISEN, R. (1994): Expression of the allatostatin gene in endocrine cells of the cockroach midgut. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **91**(25): 11894-11898.
- RICHARD, D. S., WATKINS, N. L., SERAFIN, R. B. & GILBERT, L. I. (1998): Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. Journal of Insect Physiology, **44**(7-8): 637-644.
- RICHARD, D. S., JONES, J. M., BARBARITO, M. R., CERULA, S., DETWEILER, J. P., FISHER, S. J., BRANNIGAN, D. M. & SCHESWOHL, D. M. (2001): Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdysteroids and juvenile hormones. Journal of Insect Physiology, **47**(8): 905-913.
- RICHARDS, S., GIBBS, R. A., GERARDO, N. M., MORAN, N., NAKABACHI, A., STERN, D., TAGU, D., WILSON, A. C. C., MUZNY, D., KOVAR, C., ET AL. (2010): Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Plos Biology, **8**(2).

- RIDDIFORD, L. M. (1994): Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. Advances in Insect Physiology, **24**: 213-274.
- 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**(5591): 172-175.
- ROBINSON, G. E. (1992): Regulation of division-of-labor in insect societies. Annual Review of Entomology, **37**: 637-665.
- RODRÍGUEZ, F., OLIVER, J. L., MARÍN, A. & MEDINA, J. R. (1990): The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology, **142**(4): 485-501.
- ROISIN, Y. (2000): Diversity of evolution and caste patterns. In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. ed. ABE, T., BIGNELL, D. E. & HIGASHI, M., pp. 95-120. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ROISIN, Y. & KORB, J. (2011): Social organisation and the status of workers in termites. In: Biology of termites: A modern synthesis. ed. BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N., pp. 133-164. Springer, Dordrecht.
- RÖLLER, H., DAHM, K. H., SWEELY, C. C. & TROST, B. M. (1967): Structure of juvenile hormone. Angewandte Chemie-International Edition, **6**(2): 179-180.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, **19**(12): 1572-1574.
- ROSENGAUS, R. B., TRANIELLO, J. F. A. & BULMER, M. S. (2011): Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites. In: Biology of termites: A modern synthesis. ed. BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N., pp. 165-191. Springer, Dordrecht.
- ROTH, S., FROMM, B., GADE, G. & PREDEL, R. (2009): A proteomic approach for studying insect phylogeny: CAPA peptides of ancient insect taxa (Dictyoptera, Blattoptera) as a test case. BMC Evol Biol, **9**: 50.
- ROUX, E. A. & KORB, J. (2004): Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: a validation of the intrinsic benefit hypothesis. Journal of Evolutionary Biology, **17**(4): 869-875.
- ROY, R. (1999): Morphology and taxonomy. In: The praying mantids. ed. PRETE, F. R., WELLS, H., WELLS, P. H. & HURD, L. E., pp. 19-40. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- SACCHI, L., NALEPA, C. A., BIGLIARDI, E., CORONA, S., GRIGOLO, A., LAUDANI, U. & BANDI, C. (1998a): Ultrastructural studies of the fat body and bacterial endosymbionts of *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Blattaria: Cryptocercidae). Symbiosis, **25**(1-3): 251-269.

- SACCHI, L., NALEPA, C. A., BIGLIARDI, E., LENZ, M., BANDI, C., CORONA, S., GRIGOLO, A., LAMBIASE, S. & LAUDANI, U. (1998b): Some aspects of intracellular symbiosis during embryo development of *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae). Parassitologia, **40**(3): 309-316.
- SACCHI, L., NALEPA, C. A., LENZ, M., BANDI, C., CORONA, S., GRIGOLO, A. & BIGLIARDI, E. (2000): Transovarial transmission of symbiotic bacteria in *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae): ultrastructural aspects and phylogenetic implications. Annals of the Entomological Society of America, **93**(6): 1308-1313.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, **4**(4): 406-425.
- SALIHAN, Z. (1982): The cuticular structures lining the alimentary canal of termites and their phylogenetic significance. PhD thesis, pp. 364. Department of Zoology, University of the Punjab, Lahore - Pakistan.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning - a laboratory manual, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **74**(12): 5463-5467.
- SCHAEFER, M., PICCIOTTO, M. R., KREINER, T., KALDANY, R. R., TAUSSIG, R. & SCHELLER, R. H. (1985): *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. Cell, **41**(2): 457-467.
- SCHAL, C., HOLBROOK, G. L., BACHMANN, J. A. S. & SEVALA, V. L. (1997): Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: Juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **35**(4): 405-426.
- SCHARF, M. E., WU-SCHARF, D., PITTENDRIGH, B. R. & BENNETT, G. W. (2003): Caste- and development-associated gene expression in a lower termite. Genome Biology, **4**(10): R62.
- SCHARF, M. E., RATLIFF, C. R., WU-SCHARF, D., ZHOU, X. G., PITTENDRIGH, B. R. & BENNETT, G. W. (2005a): Effects of juvenile hormone III on *Reticulitermes flavipes*: changes in hemolymph protein composition and gene expression. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **35**(3): 207-215.
- SCHARF, M. E., WU-SCHARF, D., ZHOU, X., PITTENDRIGH, B. R. & BENNETT, G. W. (2005b): Gene expression profiles among immature and adult reproductive castes of the termite *Reticulitermes flavipes*. Insect Molecular Biology, **14**(1): 31-44.
- SCHARF, M. E., ZHOU, X. G. & BENNETT, G. W. (2005c): Application of molecular genomics in addressing questions on termite biology. In: Fifth International Conference on Urban Pests. ed. LEE, C. Y. & ROBINSON, W. H., pp. 19-27.

- SCHARF, M. E. & TARTAR, A. (2008): Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. Biofuels Bioproducts & Biorefining (Biofpr), **2**(6): 540-552.
- SCHARF, M. E., ZHOU, X. & SCHWINGHAMMER, M. A. (2008): Application of RNA interference in functional genomics studies of a social insect. In: Methods in molecular biology: siRNA, shRNA and miRNA protocols, vol. 442. ed. BARIK, S., pp. 205-229. Humana Press, Totowa.
- SCHARF, M. E. & BOUCIAS, D. G. (2010): Potential of termite-based biomass pre-treatment strategies for use in bioethanol production. Insect Science, **17**(3): 166-174.
- SCHARLAKEN, B., DE GRAAF, D. C., GOOSSENS, K., BRUNAIN, M., PEELMAN, L. J. & JACOBS, F. J. (2008): Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. Journal of Insect Science, **8**: 33.
- SCHARRER, B. (1946): Section of the nervi corporis cardiaci in *Leucophaea maderae* (Orthoptera). Anatomical Record, **96**(4): 577.
- SCHARRER, B. (1952): Neurosecretion XI. The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect *Leucophaea maderae*. Biological Bulletin, **102**(3): 261-272.
- SCHMITTGEN, T. D. & ZAKRAJSEK, B. A. (2000): Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **46**(1-2): 69-81.
- SCHOOF, L., HOLMAN, G. M., HAYES, T. K., NACHMAN, R. J. & DE LOOF, A. (1991): Isolation, identification and synthesis of locustamyoinhibiting peptide (Lom-MIP), a novel biologically active neuropeptide from *Locusta migratoria*. Regulatory Peptides, **36**(1): 111-119.
- SCHOOF, L., JANSSEN, I., VEELAERT, D., VANDEN BROECK, J., TOBE, S. S. & DE LOOF, A. (1998): Ecdysiotatins and allatostatins in *Schistocerca gregaria*. In: Trends in comparative endocrinology and neurobiology - from molecular to integrative biology, vol. 839. ed. VAUDRY, H., TONON, M. C., ROUBOS, E. W. & DE LOOF, A., pp. 301-305. Annals of the New York Academy of Sciences, New York.
- SCHWINGHAMMER, M. A., ZHOU, X. G., KAMBHAMPATI, S., BENNETT, G. W. & SCHARF, M. E. (2011): A novel gene from the *takeout* family involved in termite trail-following behavior. Gene, **474**(1-2): 12-21.
- 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*. Journal of Biological Chemistry, **276**(50): 47052-47060.
- SEELINGER, G. & SEELINGER, U. (1983): On the social organization, alarm and fighting in the primitive cockroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder. Zeitschrift für Tierpsychologie, **61**(4): 315-333.

- SHIH, J. D., FITZGERALD, M. C., SUTHERLIN, M. & HUNTER, C. P. (2009): The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. RNA - a publication of the RNA Society, **15**(3): 384-390.
- SHIH, J. D. & HUNTER, C. P. (2011): SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. RNA - a publication of the RNA Society, **17**(6): 1057-1065.
- SHUMAN, S. (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. Journal of Biological Chemistry, **269**(51): 32678-32684.
- SILLAM-DUSSÈS, D., SÉMON, E., LACEY, M. J., ROBERT, A., LENZ, M. & BORDEREAU, C. (2007): Trail-following pheromones in basal termites, with special reference to *Mastotermes darwiniensis*. Journal of Chemical Ecology, **33**(10): 1960-1977.
- SIMON, S., SCHIERWATER, B. & HADRY, H. (2010): On the value of Elongation factor-1alpha for reconstructing pterygote insect phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution, **54**(2): 651-656.
- SLADE, M. & ZIBITT, C. H. (1971): Metabolism of cecropia juvenile hormone in lepidopterans. In: Proceedings of the Second International IUPAC Congress of Pesticide Chemistry. ed. TAHORI, A. S., pp. 45-58. Gordon & Breach Science Publishers.
- SLADE, M. & ZIBITT, C. H. (1972): Metabolism of cecropia juvenile hormone in insects and mammals. In: Insect juvenile hormones: Chemistry and action. ed. MENN, J. J. & BEROZA, M., pp. 155-176. Academic Press, New York & London.
- SMITH, R. F., WIESE, B. A., WOJZYNSKI, M. K., DAVISON, D. B. & WORLEY, K. C. (1996): BCM Search Launcher - an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. Genome Research, **6**(5): 454-462.
- SNODGRASS, R. E. (1993): Principles of insect morphology. Cornell University Press, Ithaca & London.
- ŠOBOTNÍK, J., WEYDA, F. & HANUS, R. (2003): Ultrastructure of epidermal glands in neotenic reproductives of the termite *Prorhinotermes simplex* (Isoptera : Rhinotermitidae). Arthropod Structure & Development, **32**(2-3): 201-208.
- ŠOBOTNÍK, J., JIROŠOVÁ, A. & HANUS, R. (2010): Chemical warfare in termites. Journal of Insect Physiology, **56**(9): 1012-1021.
- SPINDLER, K.-D. (2003): Endokrinologie. In: Lehrbuch der Entomologie. ed. DETTNER, K. & PETERS, W., pp. 345-356. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin.
- SPRINGHETTI, A. (1969): Influenza dei reali sulla differenziazione dei soldati di *Kaloterme flavicollis* Fabr. In: Proc. 6th Congr. IUSSI, pp. 267-273, Bern.
- SPRINGHETTI, A. (1972): The competence of *Kaloterme flavicollis* pseudergates to differentiate into soldiers. Monitore Zoologico Italiano New Series, **6**: 97-111.

- STAY, B., JOSHI, S. & WOODHEAD, A. P. (1991): Sensitivity to allatostatins of corpora allata from larval and adult female *Diploptera punctata*. Journal of Insect Physiology, **37**(1): 63-70.
- STAY, B., CHAN, K. K. & WOODHEAD, A. P. (1992): Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of adult *Diploptera punctata*. Cell and Tissue Research, **270**(1): 15-23.
- 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**(11): 1981-1990.
- STUART, A. M. (1969): Social behavior and communication. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 193-232. Academic Press, New York & London.
- SU, N. Y. & SCHEFFRAHN, R. H. (1998): A review of subterranean termite control practices and prospects for integrated pest management programmes. Integrated Pest Management Reviews, **3**(1): 1-13.
- SUÁREZ, M. E. & THORNE, B. L. (2000): Rate, amount, and distribution pattern of alimentary fluid transfer via trophallaxis in three species of termites (Isoptera : Rhinotermitidae, Termopsidae). Annals of the Entomological Society of America, **93**(1): 145-155.
- SUZZONI, J. P., PASSERA, L. & STRAMBI, A. (1980): Ecdysteroid titer and caste determination in the ant, *Pheidole pallidula* (Nyl) (Hymenoptera: Formicidae). Experientia, **36**(10): 1228-1229.
- SVENSON, G. J. & WHITING, M. F. (2004): Phylogeny of Mantodea based on molecular data: evolution of a charismatic predator. Systematic Entomology, **29**(3): 359-370.
- SVENSON, G. J. & WHITING, M. F. (2009): Reconstructing the origins of praying mantises (Dictyoptera, Mantodea): the roles of Gondwanan vicariance and morphological convergence. Cladistics, **25**(5): 468-514.
- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., WADDELL, P. J. & HILLIS, D. M. (1996): Phylogenetic inference. In: Molecular systematics. ed. HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K., pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- TAMURA, K. & NEI, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, **10**(3): 512-526.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, **24**(8): 1596-1599.
- TANAKA, A. (1976): Stages in the embryonic development of the German cockroach, *Blattella germanica* Linné (Blattaria, Blattellidae) Japanese Journal of Entomology, **44**(4): 512-525.

- TARVER, M. R., SCHMELZ, E. A., ROCCA, J. R. & SCHARF, M. E. (2009): Effects of soldier-derived terpenes on soldier caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes*. Journal of Chemical Ecology, **35**(2): 256-264.
- TARVER, M. R., ZHOU, X. G. & SCHARF, M. E. (2010): Socio-environmental and endocrine influences on developmental and caste-regulatory gene expression in the eusocial termite *Reticulitermes flavipes*. Bmc Molecular Biology, **11**: 28.
- TARVER, M. R., SCHMELZ, E. A. & SCHARF, M. E. (2011): Soldier caste influences on candidate primer pheromone levels and juvenile hormone-dependent caste differentiation in workers of the termite *Reticulitermes flavipes*. Journal of Insect Physiology, **57**(6): 771-777.
- TAVARÉ, S. (1986): Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences, **17**: 57-86.
- TAYLOR, P. A., BHATT, T. R. & HORODYSKI, F. M. (1996): Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin. European Journal of Biochemistry, **239**(3): 588-596.
- TERENIUS, O., PAPANICOLAOU, A., GARBUTT, J. S., ELEFThERIANOS, I., HUVENNE, H., KANGINAKUDRU, S., ALBRECHTSEN, M., AN, C. J., AYMERIC, J. L., BARTHEL, A., ET AL. (2011): RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. Journal of Insect Physiology, **57**(2): 231-245.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A. & HEINEN, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol, **75**(2-3): 291-295.
- THISTLETON, B. M., NEAL, M., PEKI, M. & DOBUNABA, J. (2007): *Mastotermes darwiniensis* in the Lae area of PNG: an assessment of current and potential status of the incursion, and options for management. Australian Centre for International Agricultural Research. pp. 48.
- THOMPSON, G. J., KITADE, O., LO, N. & CROZIER, R. H. (2000): Phylogenetic evidence for a single, ancestral origin of a 'true' worker caste in termites. Journal of Evolutionary Biology, **13**(6): 869-881.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, **22**(22): 4673-4680.
- THORNE, B. L. (1990): A case for ancestral transfer of symbionts between cockroaches and termites. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **241**(1300): 37-41.
- THORNE, B. L. (1991): Ancestral transfer of symbionts between cockroaches and termites: an alternative hypothesis. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, **246**(1317): 191-195.

- THORNE, B. L. & CARPENTER, J. M. (1992): Phylogeny of Dictyoptera. Systematic Entomology, **17**(3): 253-268.
- THORNE, B. L. (1996): Termite terminology. Sociobiology, **28**(3): 253-263.
- THORNE, B. L. (1997): Evolution of eusociality in termites. Annual Review of Ecology and Systematics, **28**: 27-54.
- TILLYARD, R. J. (1936): Are termites descended from true cockroaches? Nature, **137**(3468): 655.
- TOBE, S. S. & STAY, B. (1977): Corpus allatum activity *in vitro* during reproductive cycle of viviparous cockroach, *Diploptera punctata* (Eschscholtz). General and Comparative Endocrinology, **31**(1): 138-147.
- TOBE, S. S. & STAY, B. (1985): Structure and regulation of the corpus allatum. Advances in Insect Physiology, **18**: 305-432.
- TODAKA, N., INOUE, T., SAITA, K., OHKUMA, M., NALEPA, C. A., LENZ, M., KUDO, T. & MORIYA, S. (2010): Phylogenetic analysis of cellulolytic enzyme genes from representative lineages of termites and a related cockroach. PLoS One, **5**(1): e8636.
- TOKUDA, G., LO, N., WATANABE, H., ARAKAWA, G., MATSUMOTO, T. & NODA, H. (2004): Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. Molecular Ecology, **13**(10): 3219-3228.
- TOMITA, S. & KIKUCHI, A. (2009): *Abd-B* suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. Developmental Biology, **328**(2): 403-409.
- TOUHARA, K., BONNING, B. C., HAMMOCK, B. D. & PRESTWICH, G. D. (1995): Action of juvenile hormone (JH) esterase on the JH-JH binding protein complex - an *in vitro* model of JH metabolism in a caterpillar. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **25**(6): 727-734.
- TRICARICO, C., PINZANI, P., BIANCHI, S., PAGLIERANI, M., DISTANTE, V., PAZZAGLI, M., BUSTIN, S. A. & ORLANDO, C. (2002): Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. Analytical Biochemistry, **309**(2): 293-300.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology, **30**(8-9): 691-702.
- VAN HIEL, M. B., VAN WIELENDAELE, P., TEMMERMAN, L., VAN SOEST, S., VUERINCKX, K., HUYBRECHTS, R., VANDEN BROECK, J. & SIMONET, G. (2009): Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. Bmc Molecular Biology, **10**: 56.

- VANDEN BROECK, J., VEELAERT, D., BENDENA, W. G., TOBE, S. S. & DE LOOF, A. (1996): Molecular cloning of the precursor cDNA for schistostatins, locust allatostatin-like peptides with myoinhibiting properties. Molecular and Cellular Endocrinology, **122**(2): 191-198.
- VANDEN BROECK, J. (2001): Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. Peptides, **22**(2): 241-254.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, **3**(7): research0034.
- VEELAERT, D., SCHOOF, L., TOBE, S. S., YU, C. G., VULLINGS, H. G. B., COULLAUD, F. & DE LOOF, A. (1995): Immunological evidence for an allatostatin-like neuropeptide in the central nervous system of *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria* and *Neobellieria bullata*. Cell and Tissue Research, **279**(3): 601-611.
- VEELAERT, D., DEVREESE, B., SCHOOF, L., VAN BEEUMEN, J., VANDEN BROECK, J., TOBE, S. S. & DE LOOF, A. (1996a): Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: New members of the cockroach allatostatin family. Molecular and Cellular Endocrinology, **122**(2): 183-190.
- VEELAERT, D., DEVREESE, B., VANDEN BROECK, J., YU, C. G., SCHOOF, L., VAN BEEUMEN, J., TOBE, S. S. & DE LOOF, A. (1996b): Isolation and characterization of schistostatin-2(11-18) from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: A truncated analog of schistostatin-2. Regulatory Peptides, **67**(3): 195-199.
- VEENSTRA, J. A., LEHMAN, H. K. & DAVIS, N. T. (1994): Allatotropin is a cardioacceleratory peptide in *Manduca sexta*. Journal of Experimental Biology, **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, **18**(7): 937-942.
- 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**(10): 1145-1151.
- VEENSTRA, J. A. (2000): Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **43**(2): 49-63.
- VEENSTRA, J. A. (2009): Allatostatin C and its paralog allatostatin double C: The arthropod somatostatins. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **39**(3): 161-170.
- VEENSTRA, J. A. (2011): Neuropeptide evolution: neurohormones and neuropeptides predicted from the genomes of *Capitella teleta* and *Helobdella robusta*. General and Comparative Endocrinology, **171**(2): 160-175.

- VILAPLANA, L., MAESTRO, J. L., PIULACHS, M. D. & BELLÉS, X. (1999a): Determination of allatostatin levels in relation to the gonadotropic cycle in the female of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Physiological Entomology, **24**(3): 213-219.
- VILAPLANA, L., MAESTRO, J. L., PIULACHS, M. D. & BELLÉS, X. (1999b): Modulation of cardiac rhythm by allatostatins in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Journal of Insect Physiology, **45**(12): 1057-1064.
- VON HEIJNE, G. (1983): Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. European Journal of Biochemistry, **133**(1): 17-21.
- VON HEIJNE, G. (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Research, **14**(11): 4683-4690.
- VON HEIJNE, G. (1990): The signal peptide. Journal of Membrane Biology, **115**(3): 195-201.
- VON REUMONT, B. M., MEUSEMANN, K., SZUCSICH, N. U., DELL'AMPIO, E., GOWRI-SHANKAR, V., BARTEL, D., SIMON, S., LETSCH, H. O., STOCSITS, R. R., LUAN, Y. X., ET AL. (2009): Can comprehensive background knowledge be incorporated into substitution models to improve phylogenetic analyses? A case study on major arthropod relationships. BMC Evol Biol, **9**: 119.
- WALLER, D. A. & LA FAGE, J. P. (1988): Environmental influence on soldier differentiation in *Coptotermes formosanus* Shiraki (Rhinotermitidae). Insectes Sociaux, **35**(2): 144-152.
- WANG, J. (2004): Isolation and characterization of the B-type allatostatin gene of *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). Dissertation, pp. 117. Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- WARE, J. L., LITMAN, J., KLASS, K. D. & SPEARMAN, L. A. (2008): Relationships among the major lineages of Dictyoptera: the effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology. Systematic Entomology, **33**(3): 429-450.
- WATANABE, D., GOTOH, H., MIURA, T. & MAEKAWA, K. (2011): Soldier presence suppresses presoldier differentiation through a rapid decrease of JH in the termite *Reticulitermes speratus*. Journal of Insect Physiology, **57**(6): 791-795.
- WATANABE, H., NODA, H., TOKUDA, G. & LO, N. (1998): A cellulase gene of termite origin. Nature, **394**(6691): 330-331.
- WATSON, J. A. L. (1971): The development of "workers" and reproductives in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Insectes Sociaux, **18**(3): 173-176.
- WATSON, J. A. L. (1972): Ovarian activity during development of incipient colonies of the termite, *Hodotermes mossambicus*. Journal of Insect Physiology, **18**(3): 603-607.
- WATSON, J. A. L. (1974): Development of soldiers in incipient colonies of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Insectes Sociaux, **21**(2): 181-190.

- WATSON, J. A. L. & HOWICK, C. D. (1975): The rediscovery of *Mastopsenius australis* Seevers (Coleoptera: Staphylinidae). Journal of the Australian Entomological Society, **14**(1): 19-21.
- WATSON, J. A. L., METCALF, E. C. & SEWELL, J. J. (1975): Preliminary studies on control of neotenic formation in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Insectes Sociaux, **22**(4): 415-426.
- WATSON, J. A. L., BARRETT, R. A. & ABBEY, H. M. (1977a): Caste ratios in a long-established neotenic-headed laboratory colony of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Australian Journal of Entomology, **16**(4): 469-470.
- WATSON, J. A. L., METCALF, E. C. & SEWELL, J. J. (1977b): A re-examination of the development of castes in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera). Australian Journal of Zoology, **25**(1): 25-42.
- WATSON, J. A. L. & ABBEY, H. M. (1985): Development of neotenic castes in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt: An alternative strategy. In: Caste differentiation in social insects. ed. WATSON, J. A. L., OKOT-KOTBER, B. M. & NOIROT, C., pp. 107-124. Pergamon Press, Oxford & New York.
- WATSON, J. A. L. & SEWELL, J. J. (1985): Caste development in *Mastotermes* and *Kaloterme*s: Which is primitive? In: Caste differentiation in social insects. ed. WATSON, J. A. L., OKOT-KOTBER, B. M. & NOIROT, C., pp. 27-40. Pergamon Press, Oxford & New York.
- WATSON, J. A. L. & ABBEY, H. M. (1987): Maternal determination of reproductive vs sterile castes in *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). Insectes Sociaux, **34**(4): 291-297.
- WEAVER, R. J., FREEMAN, Z. A., PICKERING, M. G. & EDWARDS, J. P. (1994): Identification of two allatostatins from the CNS of the cockroach *Periplaneta americana* - Novel members of a family of neuropeptide inhibitors of insect juvenile hormone biosynthesis. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology, **107**(1): 119-127.
- 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*. Journal of Insect Physiology, **41**(2): 117-125.
- WEAVER, R. J. & AUDSLEY, N. (2009): Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis structures, functions, distribution, and unanswered questions. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology, **1163**: 316-329.
- WEESNER, F. M. (1969): The reproductive system. In: Biology of termites I. ed. KRISHNA, K. & WEESNER, F. M., pp. 125-160. Academic Press, New York & London.
- WEIL, T., REHLI, M. & KORB, J. (2007): Molecular basis for the reproductive division of labour in a lower termite. BMC Genomics, **8**: 198.

- WEIL, T., KORB, J. & REHLI, M. (2009): Comparison of queen-specific gene expression in related lower termite species. Molecular Biology and Evolution, **26**(8): 1841-1850.
- WESTERLUND, S. A. (2004): Measuring juvenile hormone and ecdysteroid titers in insect haemolymph simultaneously by LC-MS: The basis for determining the effectiveness of plant-derived alkaloids as insect growth regulators. Dissertation, pp. 102. Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- 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). Analytical and Bioanalytical Chemistry, **379**(3): 540-543.
- WHEELER, W. C., WHITING, M., WHEELER, Q. D. & CARPENTER, J. M. (2001): The phylogeny of the extant hexapod orders. Cladistics, **17**(2): 113-169.
- WHITMORE, E. & GILBERT, L. I. (1972): Haemolymph lipoprotein transport of juvenile hormone. Journal of Insect Physiology, **18**(6): 1153-1167.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1934): The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and 'metamorphosis'. Quarterly Journal of Microscopical Science, **77**(2): 191-222.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1936): The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). Quarterly Journal of Microscopical Science, **79**(1): 91-121.
- WILLIAMSON, M., LENZ, C., WINTHER, A. M. E., NASSEL, D. R. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2001a): Molecular cloning, genomic organization, and expression of a B-type (cricket-type) allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **281**(2): 544-550.
- WILLIAMSON, M., LENZ, C., WINTHER, A. M. E., NASSEL, D. R. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2001b): Molecular cloning, genomic organization, and expression of a C-type (*Manduca sexta*-type) allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **282**(1): 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). European Journal of Entomology, **96**(3): 279-285.
- WOOD, T. G., JOHNSON, R. A. & ANDERSON, J. M. (1983): Modification of soils in nigerian savanna by soil-feeding *Cubitermes* (Isoptera, Termitidae). Soil Biology & Biochemistry, **15**(5): 575-579.
- WOOD, T. G. (1988): Termites and the soil environment. Biology and Fertility of Soils, **6**(3): 228-236.
- WOOD, T. G. (1996): The agricultural importance of termites in the tropics. Agricultural Zoology Reviews, **7**: 117-155.

- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **86**(15): 5997-6001.
- WOODHEAD, A. P., ASANO, W. Y. & STAY, B. (1993): Allatostatins in the hemolymph of *Diploptera punctata* and their effect *in vivo*. Journal of Insect Physiology, **39**(12): 1001-1005.
- WOODHEAD, A. P., THOMPSON, M. E., CHAN, K. K. & STAY, B. (2003): Allatostatin in ovaries, oviducts, and young embryos in the cockroach *Diploptera punctata*. Journal of Insect Physiology, **49**(12): 1103-1114.
- WOODRING, J., DIERSCH, S., LWALABA, D., HOFFMANN, K. H. & MEYERING-VOS, M. (2009): Control of the release of digestive enzymes in the caeca of the cricket *Gryllus bimaculatus*. Physiological Entomology, **34**(2): 144-151.
- YAGI, K. J., KWOK, R., CHAN, K. K., SETTER, R. R., MYLES, T. G., TOBE, S. S. & STAY, B. (2005): Phe-Gly-Leu-amide allatostatin in the termite *Reticulitermes flavipes*: Content in brain and corpus allatum and effect on juvenile hormone synthesis. Journal of Insect Physiology, **51**(4): 357-365.
- YAGI, K. J., ELLIOTT, K. L., TEESCH, L., TOBE, S. S. & STAY, B. (2008): Isolation of cockroach Phe-Gly-Leu-amide allatostatins from the termite *Reticulitermes flavipes* and their effect on juvenile hormone synthesis. Journal of Insect Physiology, **54**(6): 939-948.
- 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**(6): 1241-1250.
- YU, C. G., STAY, B., JOSHI, S. & TOBE, S. S. (1993): Allatostatin content of brain, corpora allata and hemolymph at different developmental stages of the cockroach, *Diploptera punctata*: Quantitation by ELISA and bioassay. Journal of Insect Physiology, **39**(2): 111-122.
- YU, C. G., STAY, B., DING, Q., BENDENA, W. G. & TOBE, S. S. (1995): Immunochemical identification and expression of allatostatins in the gut of *Diploptera punctata*. Journal of Insect Physiology, **41**(12): 1035-1043.
- ZANDAWALA, M., LYTUVYN, Y., TAIKINA, D. & ORCHARD, I. (2012): Cloning of the cDNA, localization, and physiological effects of FGLamide-related allatostatins in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **42**(1): 10-21.
- ZHOU, X., SONG, C., GRZYMALA, T. L., OI, F. M. & SCHARF, M. E. (2006a): Juvenile hormone and colony conditions differentially influence cytochrome P450 gene expression in the termite *Reticulitermes flavipes*. Insect Molecular Biology, **15**(6): 749-761.

- ZHOU, X., TARVER, M. R., BENNETT, G. W., OI, F. M. & SCHARF, M. E. (2006b): Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: Sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. Gene, **376**(1): 47-58.
- ZHOU, X. G., OI, F. M. & SCHARF, M. E. (2006c): Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **103**(12): 4499-4504.
- ZHOU, X. G., TARVER, M. R. & SCHARF, M. E. (2007): Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. Development, **134**(3): 601-610.
- ZHOU, X. G., WHEELER, M. M., OI, F. M. & SCHARF, M. E. (2008): RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. Insect Biochemistry and Molecular Biology, **38**(8): 805-815.

11 Anhang

11.1 Flussdiagramme zur Experimentübersicht

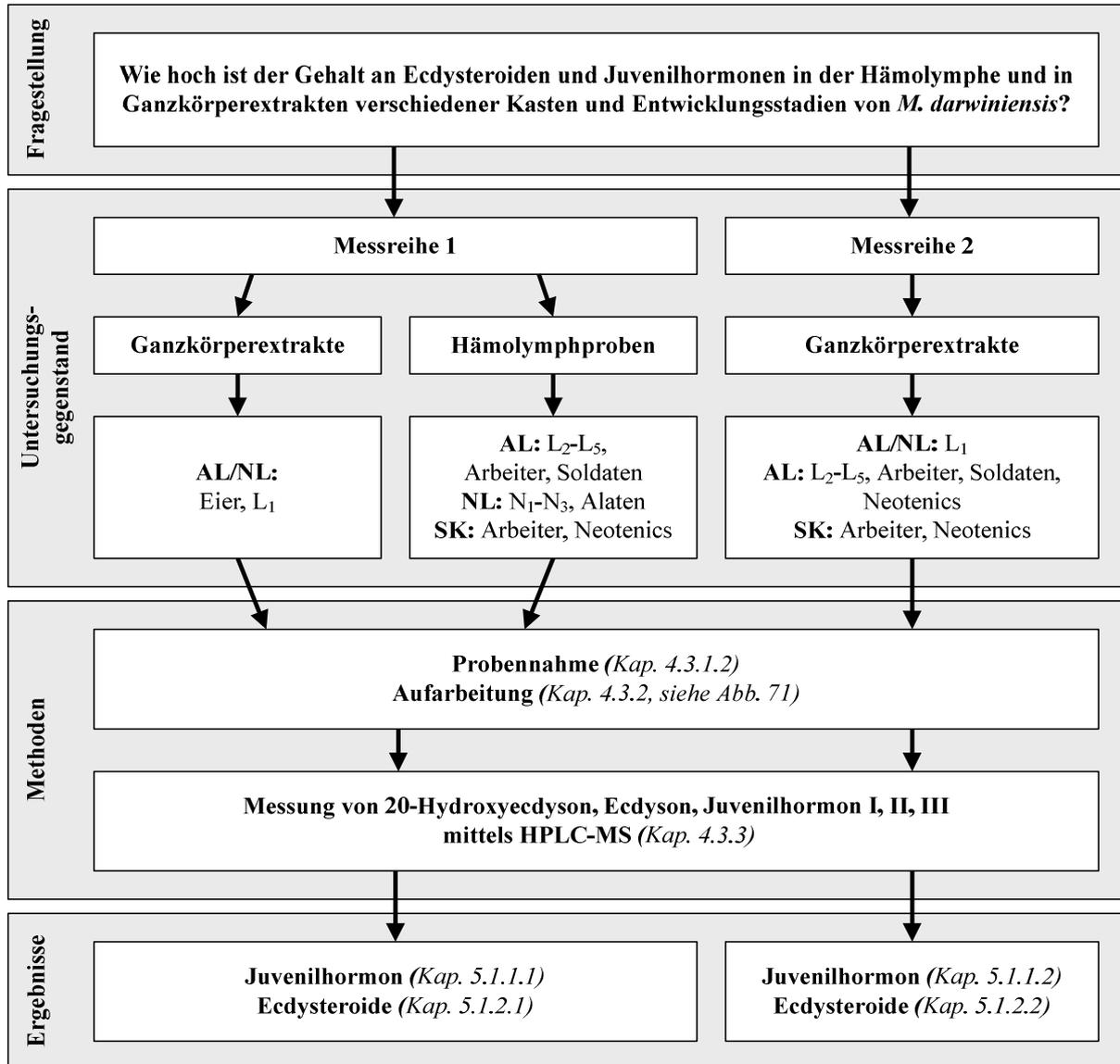


Abb. 61: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Bestimmung des Hormongehaltes bei *Mastotermes darwiniensis* (Fragestellung 1).

AL = aptere Linie, HPLC-MS = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, $L_n = n$. Larvenstadium, NL = nymphale Linie, $N_n = n$. Nymphenstadium, SK = absterbende Kolonien.

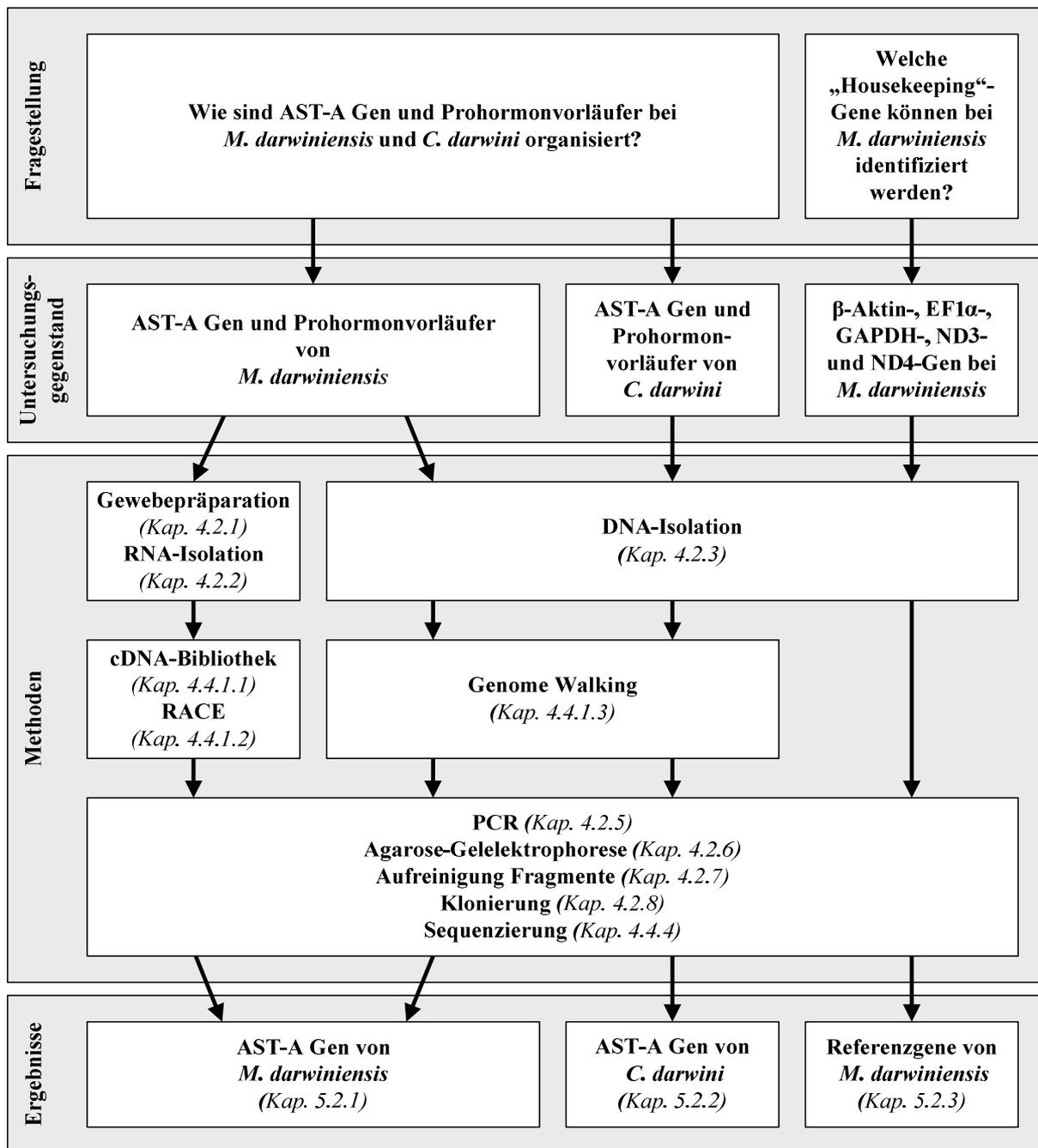


Abb. 62: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Identifikation des Allatostatin A-Gens und Prohormonvorläufers von *Mastotermes darwiniensis* und *Cryptocercus darwini* sowie zur Identifikation von „Housekeeping“-Genen bei *M. darwiniensis* (Fragestellungen 2 und 7.1).

AST-A = Allatostatin A, EF1α = Elongationsfaktor 1 alpha, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ND3/ND4 = Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3/4, PCR = Polymerasekettenreaktion, RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends.

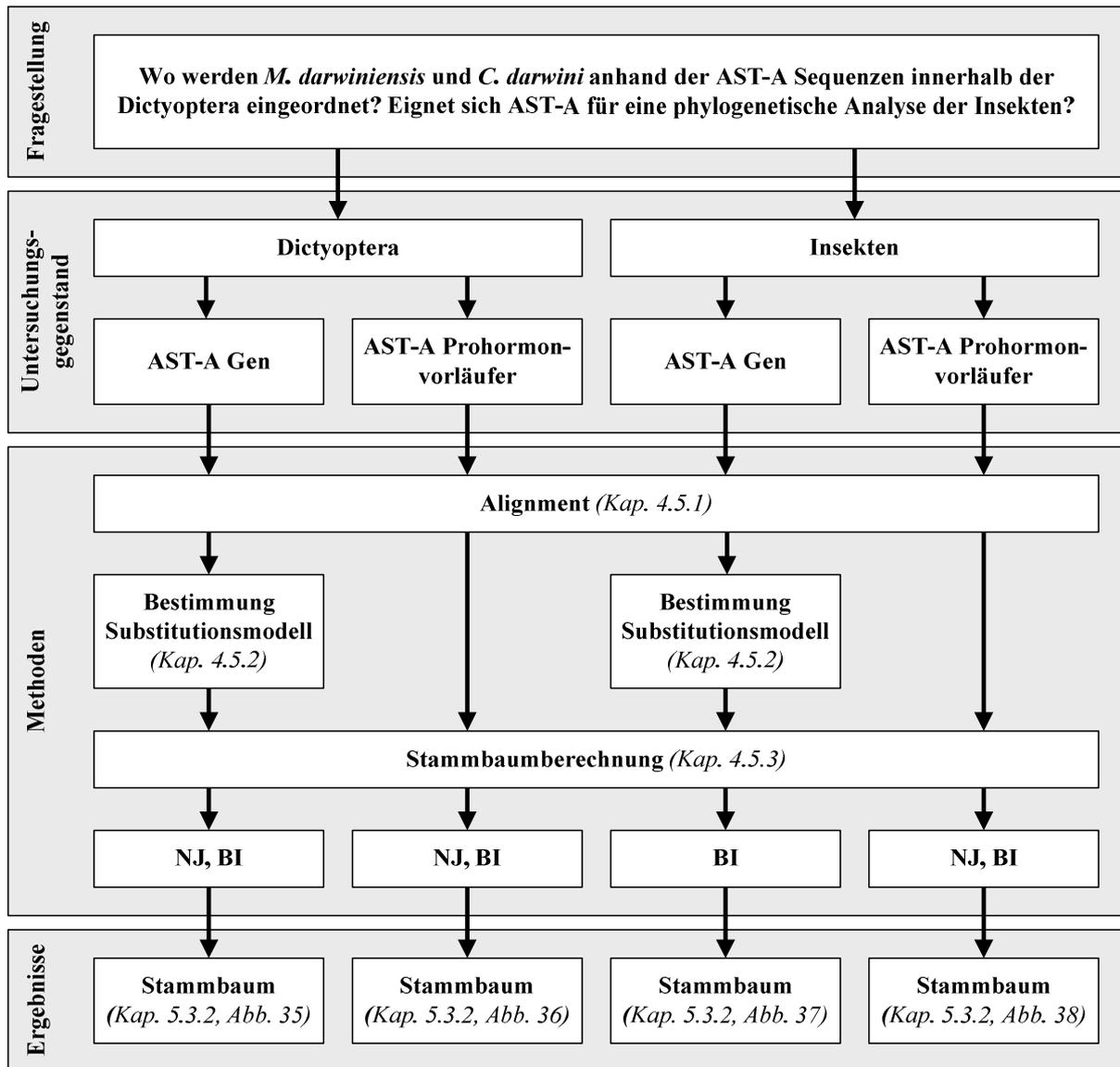


Abb. 63: Flussdiagramm über durchgeführte Berechnungen zur Phylogenie der Dictyoptera und „aller“ Insekten mit Sequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Gens und Prohormonvorläufers (Fragestellung 3).

Untersuchte Gruppen: Dictyoptera (Vertreter der Blattaria und Isoptera sowie Ensifera als Außengruppe), Insekten (Vertreter der Blattaria, Caelifera, Diptera, Ensifera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera und Lepidoptera sowie Crustacea als Außengruppe). BI = Bayesian Inference, NJ = Neighbor-Joining.

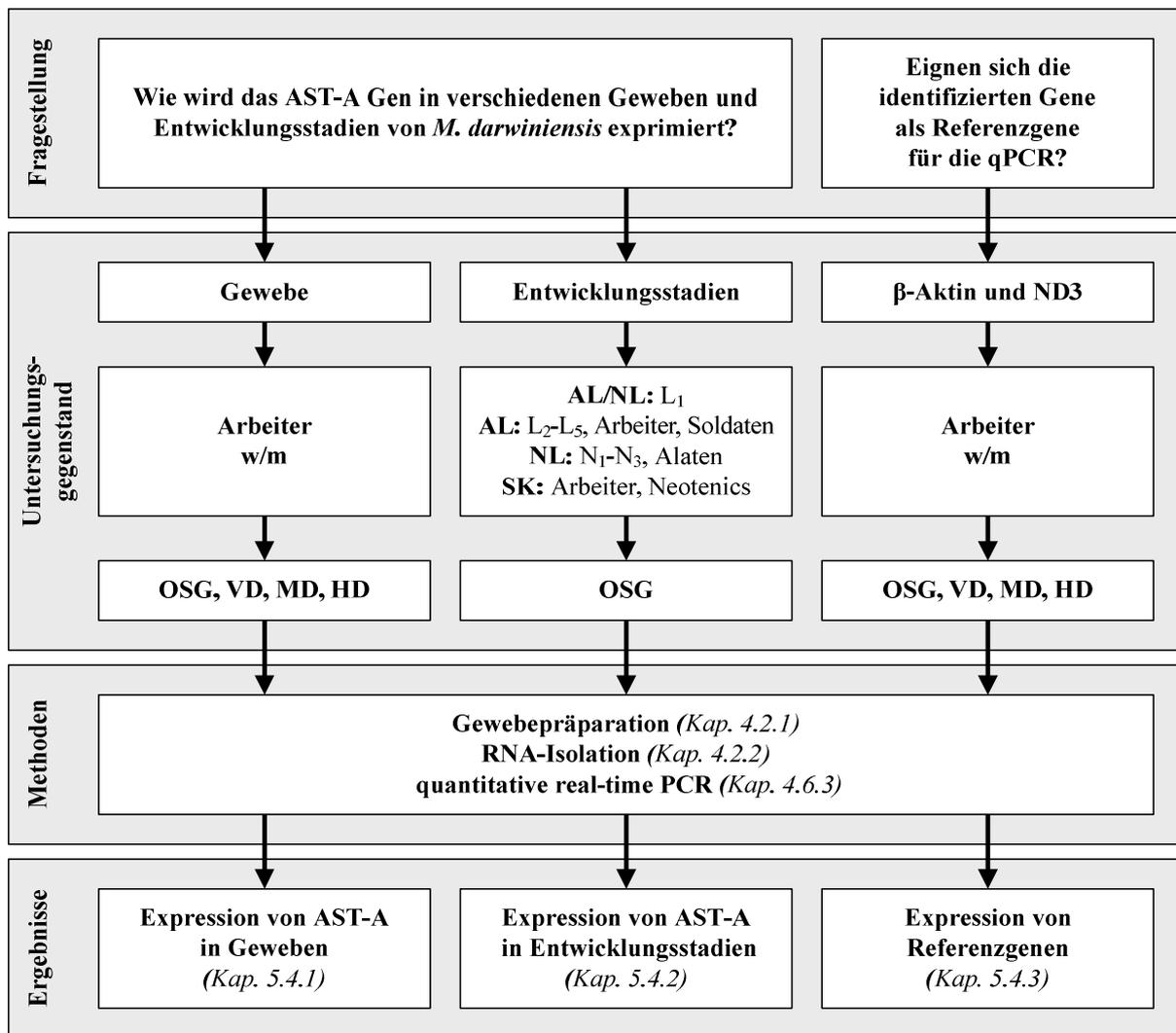


Abb. 64: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Bestimmung der Expression des Allatostatin A-Gens in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sowie zweier Referenzgene bei *Mastotermes darwiniensis* (Fragestellungen 4 und 7.2).

Analysierte Gene: AST-A = Allatostatin A, β-Aktin, ND3 = Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3. Untersuchte Stadien: Arbeiter (m = männlich, w = weiblich); AL = aptere Linie, L_n = n. Larvenstadium, NL = nymphale Linie, N_n = n. Nymphenstadium, SK = absterbende Kolonien. Analysierte Gewebe: HD = Hinterdarm, MD = Mitteldarm, OSG = Gehirn, Vd = Vorderdarm. qPCR = quantitative real-time Polymerasekettenreaktion.

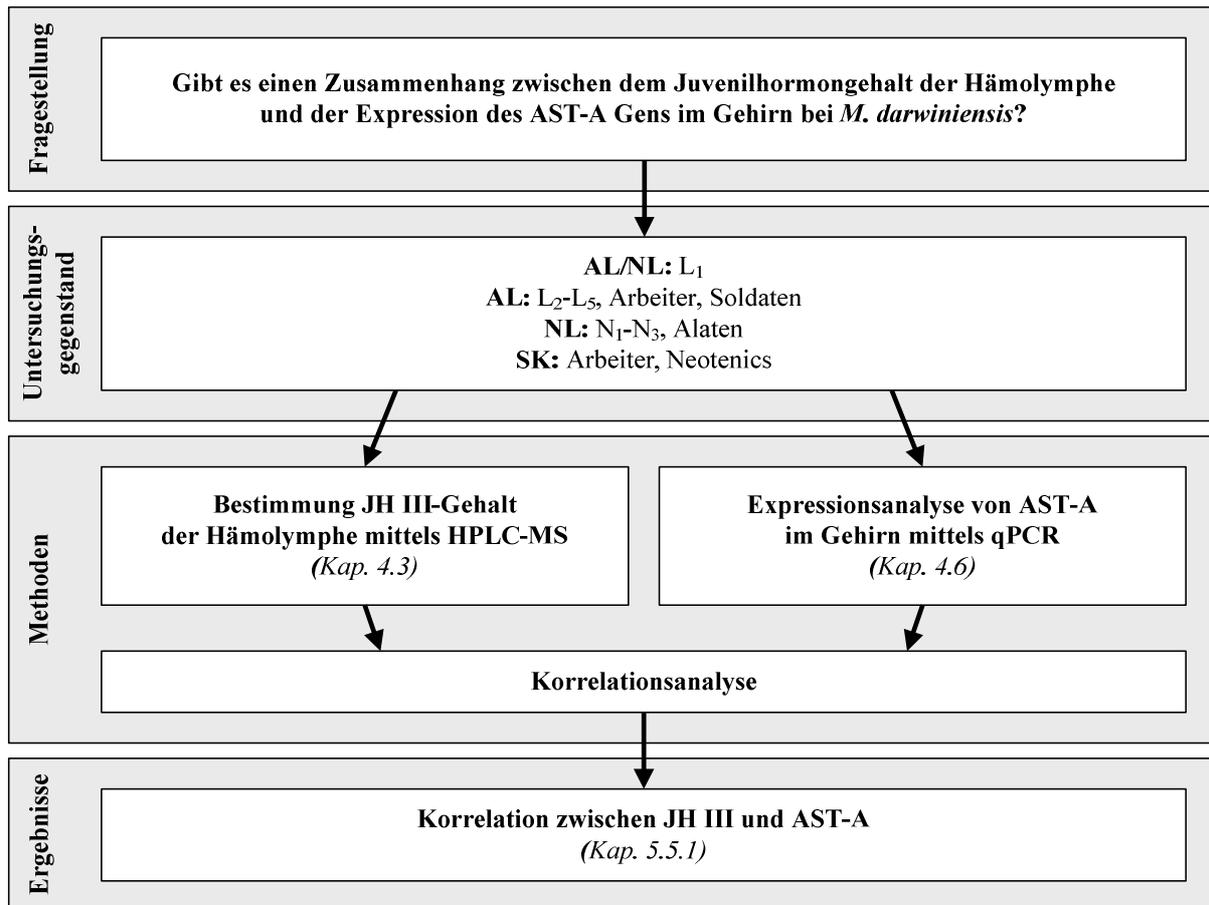


Abb. 65: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Analyse eines potentiellen Zusammenhangs zwischen dem Juvenilhormon III-Gehalt der Hämolymphe und der Expression des Allatostatin A-Gens im Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis* (Fragestellung 5).

AL = aptere Linie, AST-A = Allatostatin A, HPLC-MS = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, JH = Juvenilhormon, L_n = n. Larvenstadium, NL = nymphale Linie, N_n = n. Nymphenstadium, qPCR = quantitative real-time Polymerasekettenreaktion, SK = absterbende Kolonien.

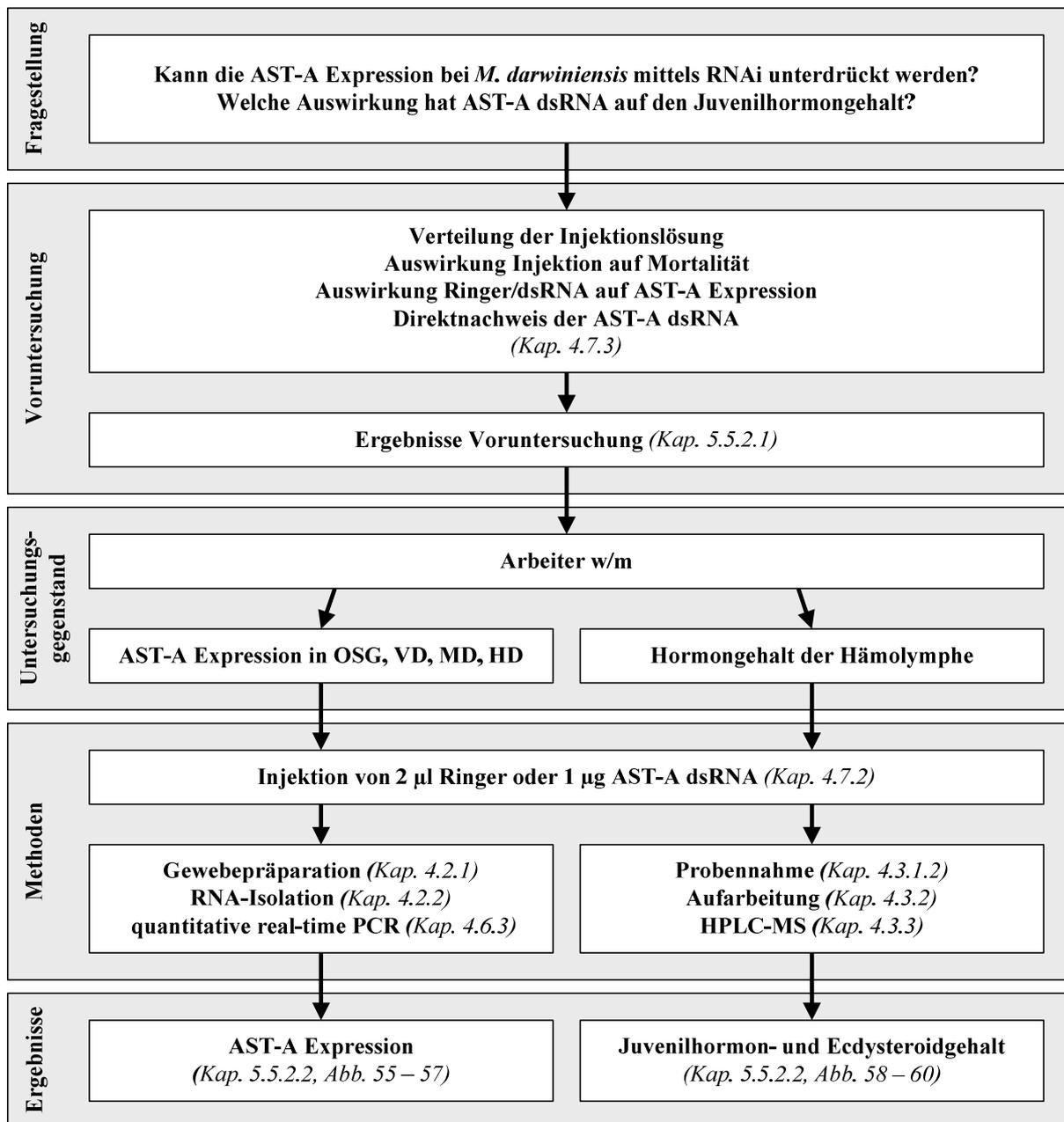


Abb. 66: Flussdiagramm über durchgeführte Experimente zur Auslösung der RNA-Interferenz (RNAi) durch Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) abgeleitet vom Allatostatin A (AST-A)-Gen bei *Mastotermes darwiniensis* (Fragestellung 6).

HD = Hinterdarm, HPLC-MS = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, m = männlich, MD = Mitteldarm, OSG = Oberschlundganglion (Gehirn), PCR = Polymerasekettenreaktion, VD = Vorderdarm, w = weiblich.

11.2 Identifikation verschiedener Gene bei *Mastotermes darwiniensis* und *Cryptocercus darwini*

*****Rfl_ActF2*****	
5'-	GGCATCACACATTCTACAATGAACTGCGAGTGGCCCCTGAGGAACACCCCATCCTGCTCACCGAA 65
	H H T F Y N E L R V A P E E H P I L L T E 21
*****Akt_RTF*****	
	GCTCCCCTCAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACG 131
	A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N T 43
**	
	CCCCTATGTACGTAGCAATCCAGGCCGTCTTGTCCCTGTACGCATCCGGCCGTACCACTGGTATC 197
	P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I 65
*****Akt_RTR*****	
	GTGCTGGATTCTGGTGATGGTGTCTCCCATACCGTTCCCATCTATGAAGGTTACGCTTTCCTCAC 263
	V L D S G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H 87
GCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCTGGCCGTGACTTGACTGACTACCTGATGAAGATCCTTACTGAG 329	
	A I L R L D L A G R D L T D Y L M K I L T E 109
*	
	CGTGGCTACAGCTTCACGACCACCGCTGAGCGGGAAATCGTACGTGATATCAAGGAGAAGCTGTGC 395
	R G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L C 131
*****Mda_Act400R*****	
	TATGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCAACTGCCGCTGCTTCCACTTCTCTCGAGAAGTCA 461
	Y V A L D F E Q E M A T A A A S T S L E K S 153
*****Rfl_ActR2*****	
	TATGAGTTGCCTGATGGCCAGGTCATCACCATTGG -3' 496
	Y E L P D G Q V I T I G 165

Abb. 67: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe, fettgedruckt) eines Teilfragments des β -Aktin Gens von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Sequenzen sind auf der rechten Seite durchnummeriert. Für die Identifikation und Expressionsbestimmung verwendete Oligonukleotide sind in Grau dargestellt.

```

*****Mda_ND31F*****      *****ND3_RTF*****
5'- TTGAGTGC GGTTTTGAGCCAAAAAGATCTGCACGACTACCTTTCTCCCTACGATTCTTCTTAATT 65
      E C G F E P K S S A R L P F S L R F F L I 21

GCTGTTATTTTCTTAATCTTCGACGTAGAAATTGCAATACTCTTACCAATAACTGTTATCATAACA 131
      A V I F L I F D V E I A M L L P M T V I M T 43

*****ND3_RTR*****      *****
ACTTCTAACCTCATATCATGAGCCCTTATTAGAGCCCTATTCTTAATTATTCTAATTGTTGGGTTA 197
      T S N L M S W A L I S A L F L I I L I V G L 65

**Mda_ND31R*****
TATCACGAATGGAACCAGGG -3' 217
      Y H E W N Q G 72

```

Abb. 68: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe; fettgedruckt) eines Teilfragments des Nicotinamidadeninukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3-Gens von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Sequenzen sind an der rechten Seite durchnummeriert. Für die Identifikation und Expressionsbestimmung verwendete Oligonukleotide sind in Grau dargestellt.

```

*****Mda_ND41F*****      *****
5'- TGGGGATATCAGTCTGAACGTCTTCAAGCCGGTATTTACTTGTGTTTATAACAGCCTCT 66
      W G Y Q S E R L Q A G I Y L L F Y T L T A S 22

*ND4_RTF*****
TTACCTTTGTTAGTTGGTATTATGTATATTTATGACGTGTATTCTACTTTGTATTTTGTGTTT 132
      L P L L V G I M Y I Y D V Y S T L Y F V L F 44

GGTAAATTTATTTTCTCCAGTAGTTTATTTTATTTATGATGGTCTTTGCTTTTTTGATTAAGATG 198
      G K F I F S S S L F Y L C M V F A F L I K M 66

*****ND4_RTR*****
*****Mda_ND41R*****
CCAATATTTTGGTTCATTTATGATTACCGAAAGCACACGTTGAAGC -3' 245
      P M F L V H L W L P K A H V E A 82

```

Abb. 69: Darstellung der Nukleotid- (obere Reihe) und Aminosäuresequenz (untere Reihe; fettgedruckt) eines Teilfragments des Nicotinamidadeninukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 4-Gens von *Mastotermes darwiniensis*.

Die Sequenzen sind an der rechten Seite durchnummeriert. Für die Identifikation und Expressionsbestimmung verwendete Oligonukleotide sind in Grau dargestellt.

Tab. 42: Sequenzierte Einzelfragmente des Allatostatin A-Gens (AST-A) von *Mastotermes darwiniensis*.

Fragmentlänge nur auf AST-A Fragmente bezogen (ohne UPM und UniP). bp = Basenpaare.

Name	Forward-Primer	Reverse-Primer	Fragmentlänge [bp]
Fragmente amplifiziert mit einer DNA-Polymerase ohne Proofreadingaktivität			
AS140F-14R1	Mda_AS140F	Mda_AS14R1	745
AS140F-14R2	Mda_AS140F	Mda_AS14R2	745
AS140F-950R	Mda_AS140F	Mda_AS950R	805
AS140F-9R	Mda_AS140F	Mda_AS9R	284
AS200F-13R	Mda_AS200F	Mda_AS13R	634
AS26F-8R	Mda_AS26F	Mda_AS8R	588
AS2aF-6R	Mda_AS2aF	Mda_AS6R	299
AS4F-200R	Mda_AS4F	Mda_AS200R	451
AS4F-8R	Mda_AS4F	Mda_AS8R	610
AS4F-9R	Mda_AS4F	Mda_AS9R	646
AS8F-13R	Mda_AS8F	Mda_AS13R	480
AS8F-950R	Mda_AS8F	Mda_AS950R	587
GWh	DW-ACP3/UniP	Mda-TSP3	284
UPM-13F	Mda_AS13F	UPM	208/209
Fragmente amplifiziert mit einer DNA-Polymerase mit Proofreadingaktivität			
AS4F-9R PR	Mda_AS4F	Mda_AS9R	646
AS8F-950R PR	Mda_AS8F	Mda_AS950R	587

Tab. 43: Sequenzierte Einzelfragmente potentieller Referenzgene bei *Mastotermes darwiniensis*.

NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, bp = Basenpaare.

Name	Forward-Primer	Reverse-Primer	Fragmentlänge [bp]
Fragmente von β-Aktin			
Akt 3.1	Rfl_ActF2	Rfl_ActR2	496
Rfl_ActF2-Act400R	Rfl_ActF2	Mda_Act400R	421
Fragment von NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3			
ND3-pJet1	Mda_ND31F	Mda_ND31R	217
Fragment von NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4			
ND4-pJet1	Mda_ND41F	Mda_ND41R	245

Tab. 44: Sequenzierte Einzelfragmente des Allatostatin A-Gens (AST-A) von *Cryptocercus darwini*.

Fragmentlänge nur auf AST-A Fragmente bezogen (ohne DW-ACP3/UniP). bp = Basenpaare.

Name	Forward-Primer	Reverse-Primer	Fragmentlänge [bp]
Fragmente amplifiziert mit einer DNA-Polymerase ohne Proofreadingaktivität			
AS10F-14R	Cd_AS10F	Cd_AS14R	450
AS2aF-14R2 Cd	Mda_AS2aF	Mda_AS14R2	893
AS2aF-6R Cd	Mda_AS2aF	Mda_AS6R	296
AS2bF-11R	Cd_AS2bF	Cd_AS11R	656
GWa	DW-ACP3/UniP	Cd-TSP3	303
GWb	DW-ACP3/UniP	Cd-TSP3	376
Fragmente amplifiziert mit einer DNA-Polymerase mit Proofreadingaktivität			
AS1F-TSP2 PR	Cd_AS1F	Cd-TSP2	386
AS2bF-14R PR	Cd_AS2bF	Cd_AS14R	847

11.3 Phylogenetische Sequenzanalyse von Allatostatin A

Tab. 45: Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers von Schaben, Termiten und der Mittelmeerfeldgrille.

Vergleich der Aminosäuresequenzen der potentiellen AST-A Peptide, der Amidierungssignale und der dibasischen Schnittstellen. Prozentsatz der Ähnlichkeit (von links nach rechts) und Gleichheit (von oben nach unten) der Sequenzen. Schaben: Blc = *Blaberus craniifer*, Blg = *Blattella germanica*, Blo = *Blatta orientalis*, Crd = *Cryptocercus darwini*, Dip = *Diploptera punctata*, Pea = *Periplaneta americana*, Sul = *Supella longipalpa*; Termiten: Mad = *Mastotermes darwiniensis*, Ref = *Reticulitermes flavipes*, Ensifera: Grb = *Gryllus bimaculatus*.

	Mad	Ref	Crd	Blc	Blo	Blg	Dip	Pea	Sul	Grb
Mad	-	86,34	86,59	81,67	86,59	81,22	82,78	85,79	83,24	78,74
Ref	81,97	-	93,26	92,74	93,26	90,56	93,3	93,96	94,19	86,71
Crd	83,8	90,45	-	90,86	92,14	88,07	92,57	92,7	92,26	87,57
Blc	78,33	89,94	87,43	-	90,91	91,01	96,67	91,11	95,27	86,71
Blo	82,68	90,45	91,01	87,5	-	88,7	93,18	99,44	93,45	84,71
Blg	77,9	88,33	85,23	89,33	85,88	-	91,57	88,95	92,94	84,89
Dip	80	90,5	89,71	96,11	90,34	89,89	-	93,33	96,45	85,55
Pea	81,97	90,66	91,57	87,78	99,44	86,19	90,56	-	93,61	85,06
Sul	81,5	91,28	90,48	92,9	91,07	91,18	94,08	91,28	-	86,5
Grb	71,26	83,24	82,25	82,66	80,59	80,81	80,93	81,03	82,21	-

Tab. 46: Spezifikation der Parameter der Substitutionsmodelle für die Stammbaumberechnung mit Sequenzen des Allatostatin A-Gens innerhalb der Dictyoptera (Abb. 35) und mit allen bisher bekannten Allatostatin A-Gensequenzen von Insekten (Abb. 37).

Verwendete Methoden: Bayesian Inference und Neighbor-Joining. GTR = „General Time Reversible Model“, TN = Tamura-Nei-Modell. Substitutionsmodelle verwendet unter Einbeziehung der Gamma-Verteilung (+G) und/oder des Anteils der invariablen Positionen (+I). A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

Parameter	Abb. 35 (Dictyoptera)	Abb. 37 („alle“ Insekten)
Bayesian Inference		
Substitutionsmodell	GTR+G	GTR+I+G
Nukleotidfrequenz [A]	0,2741	0,2963
Nukleotidfrequenz [C]	0,2422	0,2195
Nukleotidfrequenz [G]	0,2558	0,2197
Nukleotidfrequenz [T]	0,2279	0,2645
Substitutionsrate [AC]	1,6809	1,5265
Substitutionsrate [AG]	2,7235	2,5662
Substitutionsrate [AT]	1,6090	1,5720
Substitutionsrate [CG]	0,6231	1,3578
Substitutionsrate [CT]	5,2348	3,6396
Substitutionsrate [GT]	1,0000	1,0000
„Shape“-Parameter α der Gamma-Verteilung	0,8340	2,5000
Anteil invariabler Positionen	-	0,0010
Neighbor-Joining		
Substitutionsmodell	TN+G	-
„Shape“-Parameter α der Gamma-Verteilung	0,8290	-

Tab. 47: Substitutionsmodelle für die Stammbauberechnung mit Sequenzen des Allatostatin A (AST-A)-Prohormonvorläufers innerhalb der Dictyoptera (Abb. 36) und mit Sequenzen des AST-A Prohormonvorläufers acht verschiedener Insektenordnungen (Abb. 38).

Verwendete Methoden: Bayesian Inference und Neighbor-Joining. JTT = Modell nach Jones, Taylor und Thornton.

Parameter	Abb. 36 (Dictyoptera)	Abb. 38 („alle“ Insekten)
Bayesian Inference		
Abschätzung des passenden Substitutionsmodells	„model jumping“	„model jumping“
am besten passendes Substitutionsmodell	JTT	JTT
Neighbor-Joining		
Substitutionsmodell	JTT	JTT

Tab. 48: Allgemein verwendete Parameter für die Stammbauberechnung mit MrBayes v3.1.2 und MEGA v4.0.2.

Parameter gelten für alle berechneten Stammbäume aus Sequenzen des Allatostatin A-Gens und Prohormonvorläufers (Abb. 35 bis 38; S. 140ff). Verwendete Methoden: Bayesian Inference (MrBayes v3.1.2) und Neighbor-Joining (MEGA v4.0.2).

Parameter	Wert
Bayesian Inference	
Anzahl der Generationen	10.000.000
Anzahl der Läufe	2
Anzahl der simultanen Markov-Ketten	4 (3 „erhitzte“ Ketten; 1 „kalte“ Kette)
Berechnung eines Stammbaums	aller 1.000 Generationen
Anzeige der laufenden Analyse	aller 1.000 Generationen
Vergleich der Läufe auf Konvergenz	aller 10.000 Generationen
Burn-in (verworfenen Bäume der Startphase)	2.500
Neighbor-Joining	
Bootstrap-Wiederholungen	10.000

11.4 Validierung der Referenzgene

Tab. 49: Analyse der Stabilität der Expression der potentiellen Referenzgene β -Aktin und Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 3 (ND3) sowie des Zielgens Allatostatin A (AST-A) bei *Mastotermes darwiniensis*.

Verwendete Analysesoftware: BestKeeper v1.0; geNorm v3.5; NormFinder v20.0. C_T = „cycle threshold“ (Schwellenwert); x-fach = x-fache Über- oder Unterexpression individueller Proben im Vergleich zum geometrischen Mittel des C_T -Werts.

Parameter	ND3	β -Aktin	AST-A
BestKeeper Analyse			
Stichprobengröße	12	12	12
Geometrisches Mittel [C_T]	16,13	19,55	20,73
Arithmetisches Mittel [C_T]	16,22	19,69	20,85
Minimum [C_T]	13,92	16,45	17,9
Maximum [C_T]	18,93	23,02	23,43
Standardabweichung [$\pm C_T$]	1,41	2,04	2,17
Koeffizient der Varianz [% C_T]	8,69	10,36	10,42
Minimum [x-fach]	-3,67	-6,5	-5,42
Maximum [x-fach]	5,19	8,17	5,04
Standardabweichung [\pm x-fach]	2,32	3,39	3,67
Paarweise Korrelationsanalyse mit dem BestKeeper Index			
Korrelationskoeffizient (r)	0,75	0,92	-0,6
Bestimmtheitsmaß (r^2)	0,56	0,84	0,37
<i>P</i>	0,005	0,001	0,037
geNorm Analyse			
Stabilitätswert M	2,275	2,316	2,867
NormFinder Analyse			
Stabilitätswert	0,777	0,908	1,799

11.5 Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz

In den Voruntersuchungen zur RNA-Interferenz wurde eine erhöhte Allatostatin A-Expression bei mit AST-A dsRNA injizierten Arbeitern im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen (s. Abb. 52, S. 160). Dies widersprach den Erwartungen. Daher wurde überprüft, ob die injizierte dsRNA über quantitative real-time PCR direkt nachweisbar war. Vorher musste die theoretisch maximal mögliche Menge an AST-A dsRNA in der isolierten und für die nachfolgenden Reaktionen eingesetzten Gesamt-RNA berechnet werden.

Injektion:	2 µg dsRNA pro Körpergewicht (ca. 50 mg) → 2 µg/50 mg
Isolation Gewebe:	z. B. Gehirn (Gewicht ca. 0,5 mg) → Präparation von 20 Tieren → 10 mg Gewebe → 0,4 µg/10 mg
Isolation Gesamt-RNA:	ca. 50 µl Lösung (Konzentration von 0,5 µg/µl) → 25 µg Gesamt-RNA (darin 0,4 µg dsRNA)
Eingesetzte Menge an Gesamt-RNA in Reverse Transkription:	0,5 µg entspricht 1/50 der Gesamt-RNA
Theoretisch verwendete Menge an dsRNA:	1/50 von 0,4 µg = 0,008 µg → 8 ng

11.6 Gewichtsbestimmung verschiedener Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis*

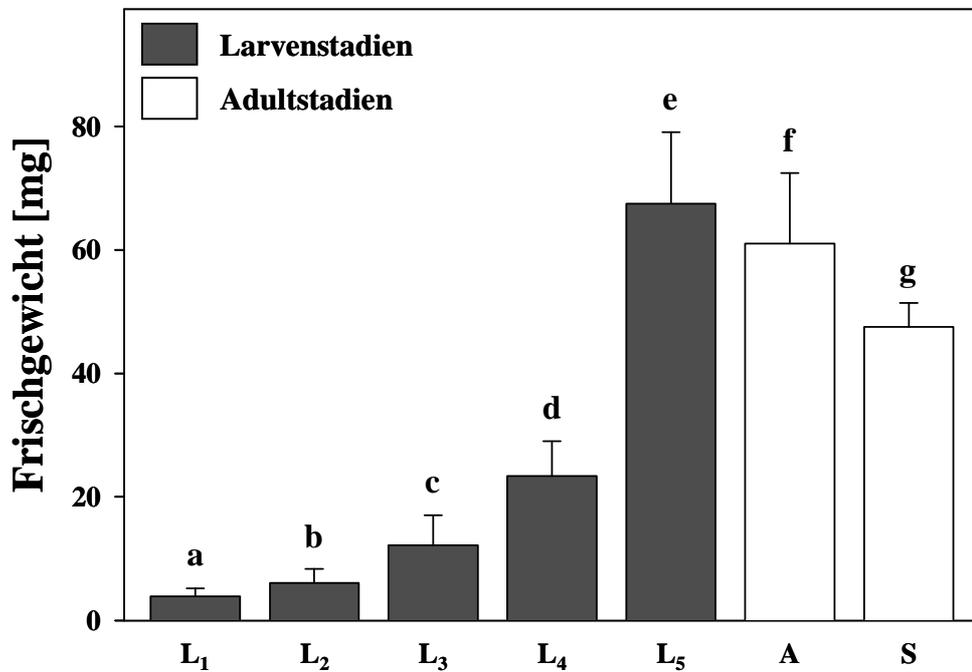


Abb. 70: Körpergewicht (Frischgewicht) der untersuchten Entwicklungsstadien der apteren Linie von *Mastotermes darwiniensis*.

Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung. $L_n = n$. Larvenstadium, A = Arbeiter, S = Soldaten. Kruskal-Wallis H-Test: $H = 247,793$; $df = 6$; $P < 0,001$. *Post hoc*-Test: Mann-Whitney U-Test mit sequenzieller Bonferroni-Korrektur; unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $n = 11 - 88$.

11.7 Messungen zur Bestimmung des Hormongehaltes bei *Mastotermes darwiniensis* mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

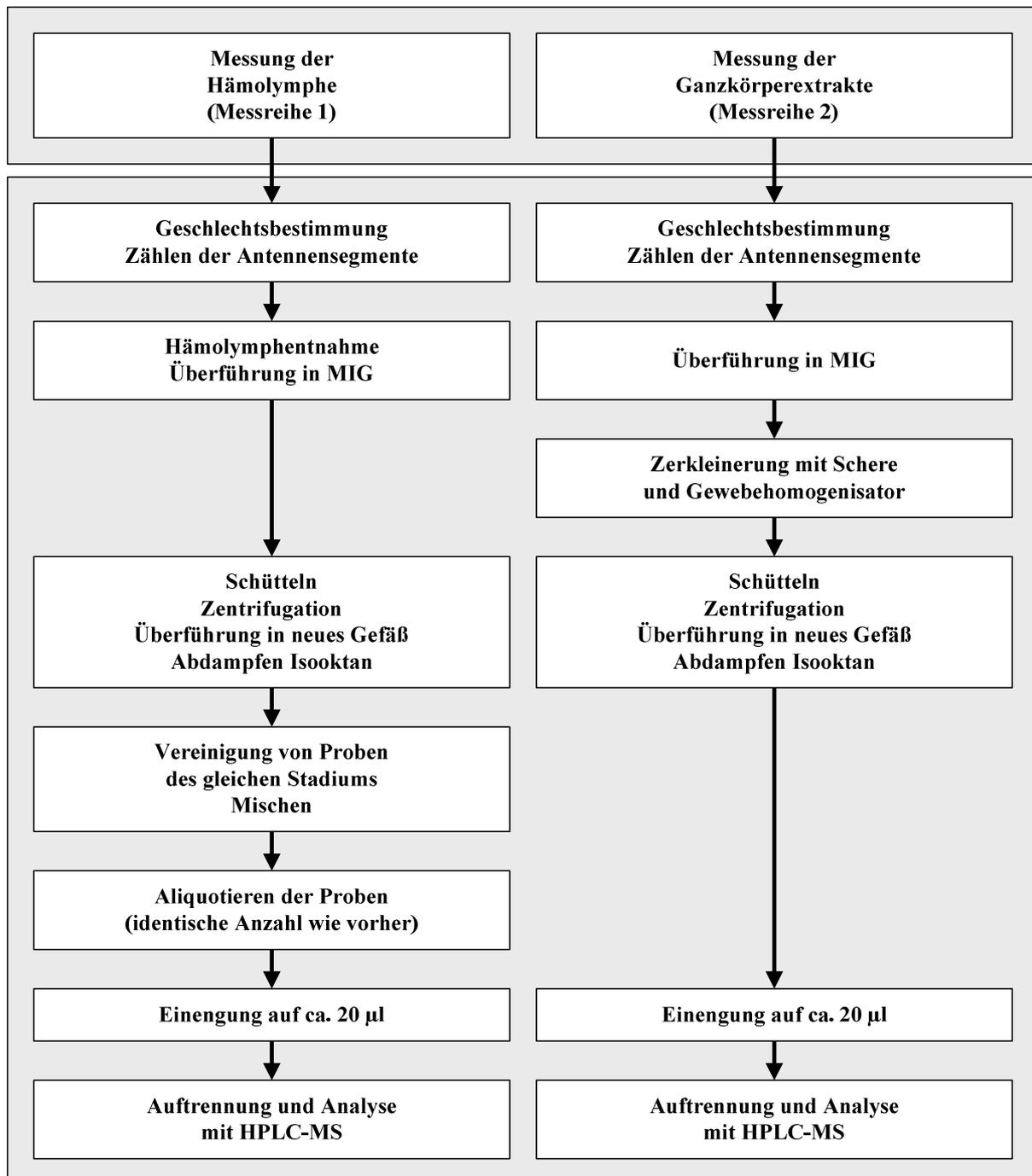


Abb. 71: Zusammenfassung der Probenaufarbeitung der Messreihen 1 und 2 zur Bestimmung des Hormongehaltes bei *Mastotermes darwiniensis*.

Messreihe 1: Messung von Hämolympfproben sowie von Ganztierextrakten aus Eiern und dem ersten Larvenstadium. Messreihe 2: Messung individueller Ganzkörperextrakte. HPLC-MS = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; MIG = Methanol-Isooktan-Gemisch.

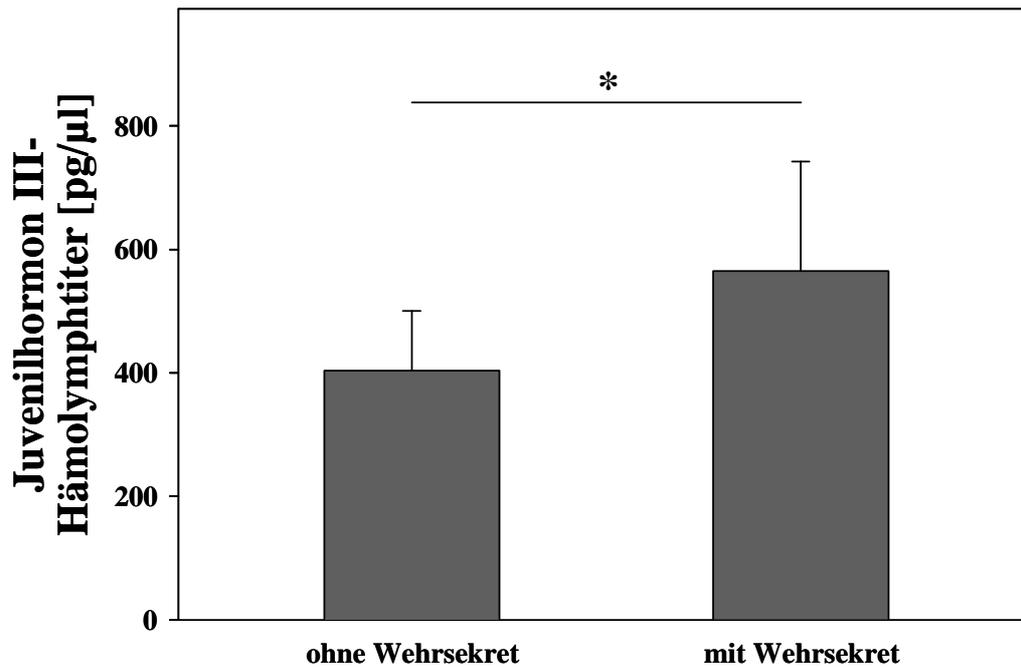


Abb. 72: Juvenilehormon III-Gehalt der Hämolymphe von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern nach Zugabe von Soldaten-Wehrsekret oder HPLC-Wasser.

Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung. Es wurden pro Probe 16 – 20 µl Hämolymphe von weiblichen oder männlichen Arbeitern vereinigt. Anschließend wurde jede Probe geteilt und je eine Hälfte mit 4,7 – 10,2 µl HPLC-H₂O („ohne Wehrsekret“) oder derselben Menge Soldaten-Wehrsekret („mit Wehrsekret“) versetzt. Abnahme und Volumenbestimmung des Wehrsekrets erfolgte mit geeichten Glaskapillaren. Pro Soldat konnten 1,5 – 5,5 µl Wehrsekret gewonnen werden. Die Aufarbeitung und Messung der Proben erfolgte wie unter 4.3.2 bis 4.3.4 beschrieben. * = signifikanter Unterschied zwischen den Proben (Wilcoxon-Test: $Z = -2,201$; $P = 0,028$). $n = 6$.

Tab. 50: Zusammenfassung der für die HPLC-MS Messungen verwendeten Entwicklungsstadien von *Mastotermes darwiniensis* nach Entwicklungslinie (aptere oder nymphale), Alter und Anzahl der Antennensegmente.

w = weiblich, m = männlich, SK = absterbende Kolonie.

Entwicklungslinie	Alter	Bezeichnung	Code	Anzahl der Antennensegmente	Art der Probe	Zeitpunkt der Messung
aptere/nymphale	juvenil	Eier	Ei	-	Ganzkörperextrakt	Juli 2007
		1. Larvenstadium	L ₁	8-11	Ganzkörperextrakt	Juli & Dezember 2007 Mai 2008 Oktober 2008 – Juni 2009
aptere	juvenil	2. Larvenstadium	L ₂	12-13	Hämolymphe	Dezember 2007 Mai 2008
					Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009
		3. Larvenstadium	L ₃	14-15	Hämolymphe	Juli & Dezember 2007
					Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009
		4. Larvenstadium	L ₄	16-17	Hämolymphe	Juli & Dezember 2007
					Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009
	5. Larvenstadium	L ₅	18-19	Hämolymphe	Juli & Dezember 2007	
				Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009	
	„adult“	Arbeiter (w/m)	A	≥ 20	Hämolymphe	März – April 2007 Juli & Dezember 2007 Mai 2008
					Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009
		Soldat	S	17-22	Hämolymphe	März – April; Juli 2007 Mai 2008
					Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009
Ersatzgeschlechtstiere (Neotenic; w/m)	Neo	-	Ganzkörperextrakt	Oktober 2008 – Juni 2009		

Entwicklungs- linie	Alter	Bezeichnung	Code	Anzahl der Antennensegmente	Art der Probe	Zeitpunkt der Messung
aptere	„adult“	Arbeiter SK (w/m)	A	≥ 20	Hämolymphe	Februar – April 2007 Mai 2010
		Arbeiter SK (w/m)	A	≥ 20	Ganzkörperextrakt	Mai 2010
		Ersatzgeschlechtstiere SK (Neotenic; w/m)	Neo	-	Hämolymphe	Februar – April 2007 Mai 2010
					Ganzkörperextrakt	Mai 2010
nymphale	juvenil	1. Nymphenstadium	N ₁	12-13	Hämolymphe	Dezember 2007
		2. Nymphenstadium	N ₂	14-15	Hämolymphe	Dezember 2007
		3. Nymphenstadium	N ₃	16-17	Hämolymphe	Dezember 2007
	adult	Geflügelte Geschlechtstiere (Alate; w/m)	Ala	-	Hämolymphe	März 2007

11.8 Expressionsanalyse des Allatostatin A-Gens in verschiedenen Geweben von Ringer-injizierten Kontrolltieren

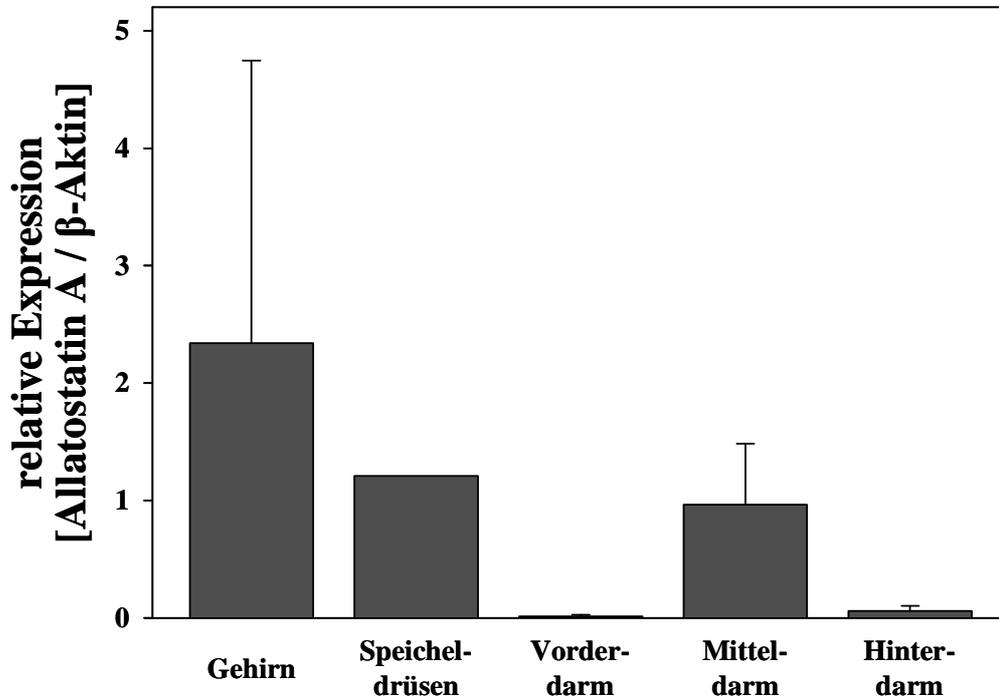


Abb. 73: Relative Expression von Allatostatin A (AST-A) in verschiedenen Geweben von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern zwei Tage nach Injektion von 2 μ l Termitenringer.

Darstellung des Mittelwerts (und teilweise der Standardabweichung). Die Menge der AST-A mRNA wurde auf die eingesetzte Menge an Gesamt-cDNA bezogen und anschließend mit der Menge an β -Aktin mRNA normalisiert. Zusammenfassung der Daten von Männchen und Weibchen. Daten für Gehirn und Darmabschnitte aus Abb. 50. n = 1 (Speicheldrüsen), 2 (Darmabschnitte) bzw. 8 (Gehirn) (je 17 bis 22 Individuen pro Probe; jede Probe wurde 2 – 3x gemessen).

Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Bei diesen möchte ich mich hiermit bedanken.

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Finanzierung, die ausdauernde Betreuung der Arbeit als Doktorvater sowie seine stete Diskussionsbereitschaft. Ein großes Dankeschön geht auch an Frau PD Dr. Martina Meyering-Vos für die sehr gute Betreuung, die häufigen fachbezogenen Diskussionen, die Denkanstöße für weitere Experimente sowie das Korrekturlesen der Arbeit. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Manfred Kaib für die Einführung in die spannende Welt der Termiten, die Betreuung der Arbeit und die fachlichen Diskussionen danken.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls Tierökologie I und der AG Kaib danke ich für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Marion Preiß und Dorothea Wiesner für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Labor sowie Antje Halwas für die Hilfe bei der Termitenhaltung, Hämolymphabnahme und -aufarbeitung. Außerdem möchte ich mich bei den (ehemaligen) Doktoranden Dr. Stefan Groß und Sandy Weidlich für zahlreiche Diskussionen zur Statistik und die Hilfe in allen Lebenslagen, bei Dr. Manuela Grötzner für die Einführung in verschiedene molekularbiologische Methoden, bei Dr. Thorin Geister für die kompetente und geduldige Anleitung zur Nutzung der HPLC-MS und bei Dr. Stefan Kuchler für die Hilfe bei der Berechnung der Stammbäume bedanken. Sie haben zudem mein Privatleben und meine Mittagspausen enorm bereichert.

Für die Hilfe bei der Datenaufnahme der RNAi-Voruntersuchungen sowie bei der Identifikation und Validierung der potentiellen Referenzgene danke ich Krasimira Sharkova, Ludmilla Galt und Katrin Greiner. PD Dr. Rüdiger Plarre und Prof. Dr. Horst Hertel (BAM Berlin) gilt mein Dank für die Bereitstellung mehrerer Kolonien von *Mastotermes darwiniensis*, Bastian Fromm (Universität Oslo) und Prof. Dr. Srinivas Kambhampati (Kansas State University) für die Bereitstellung des Exemplars von *Cryptocercus darwini*.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für den wichtigen privaten Ausgleich danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. Christel und Helmut Wende für die lebenslange Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums, sowie meinen Schwestern Berit Grünert und Prof. Dr. Kristin Weber für die Motivation und Hilfe in allen Lebenslagen. Ein besonders großes Dankeschön geht an Alexander Dockhorn, nicht nur fürs Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für seine Motivation, Unterstützung und Geduld der vergangenen Jahre.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

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

Bayreuth, den _____

Franziska Wende