

Aus der Intervet Innovation GmbH
Betreuer: Prof. Dr. T. Ilg
Eingereicht über das Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Untersuchungen zur Genexpressionshemmung
durch Doppelstrang-RNA-Interferenz in Larven 3
von *Lucilia cuprina***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Heike Williams
geborene Dohrmann
Tierärztin aus Offenbach am Main

Gießen 2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Veterinärmedizinische Bedeutung von Arthropoden	3
2.1.1	Ektoparasitika: Substanzklassen und Wirkstoffbeispiele	4
2.2	Forschungsansätze früher und heute	7
2.2.1	Mögliche Werkzeuge der <i>Target</i> -Identifizierung im Insekt	8
2.3	RNA-Interferenz: ein Werkzeug zur Untersuchung der Genfunktion	11
2.3.1	RNAi: Entdeckung und Mechanismus	11
2.3.2	RNAi: Vergleich <i>D. melanogaster</i> – <i>C. elegans</i>	14
2.3.3	Anwendung der RNAi im Arthropoden	17
2.4	Erprobung der RNA-Interferenz im Ektoparasiten <i>L. cuprina</i>	19
2.4.1	<i>L. cuprina</i> als neuer Modellorganismus	20
2.4.2	Auswahl von Genen und Genfragmenten zur Genexpressionshemmung an <i>L. cuprina</i> -L ₃	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Versuchsorganismus <i>L. cuprina</i>	23
3.2	Vektoren	25
3.3	Bakterienstämme	25
3.4	Enzyme	25
3.5	Primer	26
3.6	Medien	28
3.7	Puffer und Lösungen	29
3.8	Geräte und Materialien	30
3.9	Molekularbiologische Methoden	32
3.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA	32
3.9.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus L ₃ und Adulten von <i>L. cuprina</i>	32
3.9.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus einzelnen, adulten <i>L. cuprina</i>	33
3.9.2	Isolierung von Poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA	34
3.9.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.9.3.1	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	36
3.9.3.2	PCR mit cDNA als Template	38
3.9.3.3	Kolonien-PCR und Amplifikation mit Plasmid-DNA	40
3.9.4	Agarose-Gelelektrophorese	42
3.9.5	Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen	43
3.9.6	Ligation	44
3.9.6.1	Ligation mit TOPO TA Cloning® Kit	44
3.9.6.2	Ligation mit pGEM®-T Vector System	45
3.9.7	Transformation	46
3.9.7.1	Umklonierung	46
3.9.7.2	Auswahl der Bakterienklone nach Blau-Weiß-Selektion	47
3.9.8	Anzucht und Selektion plasmidtragender Bakterienklone	48

3.9.8.1	Anzucht der Bakterien.....	48
3.9.8.2	Herstellung von Glycerolkulturen	48
3.9.9	Plasmid-Reinigung	48
3.9.10	Behandlungen mit Restriktionsendonukleasen	51
3.9.10.1	Kontrollverdau	51
3.9.10.2	Linearisierung der Plasmide.....	52
3.9.10.3	Gewinnung des ace-3'-Endfragments.....	52
3.9.11	Identifizierung klonierter Gen-Fragmente durch Sequenzierung.....	53
3.9.12	Phenol-Chloroform-Extraktion	53
3.9.13	Fällung von DNA und RNA.....	54
3.9.13.1	Ethanol-Fällung	54
3.9.13.2	Isopropanol-Fällung	54
3.9.13.3	Fällung mit Pellet Paint® Co-Precipitant	55
3.9.14	In vitro-Transkription	55
3.9.15	Annealing einzelsträngiger RNA-Transkripte zur dsRNA	56
3.9.16	Synthese des RNAi-Kontrollfragments.....	57
3.10	Biochemische Methoden	59
3.10.1	Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität	59
3.10.2	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	60
3.11	RNAi-Experiment	60
3.11.1	Aufbau des Injektionssystems	61
3.11.2	Injektionsprotokoll	62
3.11.3	Vorversuche zur Injektion von <i>L. cuprina</i> -L ₃	63
3.11.4	Auswertung nach RNAi-Induktion	64
3.11.4.1	Bestimmung der Schlupfrate	64
3.11.4.2	Semiquantitative Bestimmung der Acetylcholinesterase-mRNA-Menge nach RNAi-Induktion	64
4	ERGEBNISSE.....	66
4.1	Etablierung eines Injektionssystems für <i>L. cuprina</i>	66
4.2	Injektion von Lösemitteln in <i>L. cuprina</i> -L ₃	67
4.3	Injektion von Markersubstanzen in <i>L. cuprina</i> -L ₃	68
4.4	Injektion unspezifischer DNA und RNA in <i>L. cuprina</i> -L ₃	72
4.5	Bereitstellung von genspezifischer doppelsträngiger RNA basierend auf <i>L. cuprina</i> Gensequenzen (RNAi-Konstrukte).....	73
4.5.1	Gewinnung von Gesamt-RNA aus <i>L. cuprina</i>	73
4.5.2	Isolierung von Poly(A)-RNA	74
4.5.3	Isolierung von Genen und Herstellung von Gen-Fragmenten	74
4.5.3.1	Amplifikation von Genen und Gen-Fragmenten mittels RT-PCR.....	74
4.5.3.2	Amplifikation von Gen-Fragmenten mit cDNA und Plasmid-DNA als Matrize	75
4.5.3.3	Gewinnung des ace-3'-Endfragments mittels Restriktionsendonukleasen.....	76
4.5.4	Kontrolle der Klonierung mittels Kolonien-PCR.....	77
4.5.5	Kontrolle der Plasmide mittels Restriktionsenzymverdau	78
4.5.6	Identifizierung der Gene und Gen-Fragmente durch Sequenzierung.....	79
4.5.6.1	Sequenzvergleich für ace	80
4.5.6.2	Sequenzvergleich für gluch	83
4.5.6.3	Sequenzvergleich für adp/atp	84
4.5.6.4	Sequenzvergleiche für his3 / HIS 3	85
4.5.7	Linearisierung der Plasmide als Vorbereitung der <i>in vitro</i> -Transkription	87

4.5.8	<i>In vitro</i> -Transkripte und Herstellung doppelsträngiger RNA	87
4.5.9	RT-PCR mit 2 Primerpaaren	90
4.6	Versuch des RNAi-Genexpressionsknockdown an <i>L. cuprina</i> -L ₃	91
4.7	Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität in adulten <i>L. cuprina</i>	96
4.8	Semiquantitative Bestimmung der <i>ace</i> -mRNA-Menge in einzelnen adulten <i>L. cuprina</i> nach RNAi-Induktion	98
5	DISKUSSION	102
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	110
7	SUMMARY	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	114

DANKSAGUNG