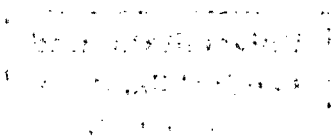


Aus der Intervet Innovation GmbH
Betreuer: Prof. Dr. T. Ilg
Eingereicht über das Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**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 <i>ace-3'</i> -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	<i>In vitro</i> -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 Matrice.....	75
4.5.3.3	Gewinnung des <i>ace-3'</i> -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 <i>ace</i>	80
4.5.6.2	Sequenzvergleich für <i>gluch</i>	83
4.5.6.3	Sequenzvergleich für <i>adp/atp</i>	84
4.5.6.4	Sequenzvergleiche für <i>his3</i> / <i>HIS 3</i>	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