

**UNTERSUCHUNGEN ZUR GENEXPRESSIONS-  
HEMMUNG DURCH DOPPELSTRANG-RNA-  
INTERFERENZ IN LARVEN 3  
VON *LUCILIA CUPRINA***

**HEIKE WILLIAMS**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Ilg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2008

**Meinen Eltern**



---

# 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 <sub>3</sub> .....	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 <sub>3</sub> 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 <sup>®</sup> Kit .....	44
3.9.6.2	Ligation mit pGEM <sup>®</sup> -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</i> -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	<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 <sub>3</sub> .....	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 <sub>3</sub> .....	67
4.3	Injektion von Markersubstanzen in <i>L. cuprina</i> -L <sub>3</sub> .....	68
4.4	Injektion unspezifischer DNA und RNA in <i>L. cuprina</i> -L <sub>3</sub> .....	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 <i>ace</i> -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 <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> / 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 <sub>3</sub> .....	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



---

## ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
ACHE	Acetylcholinesterase
<i>ace</i>	Nukleotidsequenzen die Acetylcholinesterase betreffend
ACTH	Acetylthiocholin
ADP	Adenosindiphosphat
<i>adp/atp</i>	Nukleotidsequenzen den ADP/ATP-Translokator betreffend
<i>amp</i>	Nukleotidsequenzen das Ampicillin-Resistenzgen betreffend
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BPB	Bromphenolblau
cDNA	copy-Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-cDNA	doppelsträngige cDNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid

---

EtOH	Ethanol
G	Glycin
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
<i>gluch</i>	Nukleotidsequenzen den Glutamat-gesteuerten Chloridkanal betreffend
h	Stunde
HIS 3	Proteinsequenz das Histon H3 betreffend
<i>his3</i>	Nukleotidsequenzen das Histon H3 betreffend
IGR	Insect Growth Regulator (Insekten-Wachstumsregulator)
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactosid
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
L <sub>1</sub>	Larve 1
L <sub>2</sub>	Larve 2
L <sub>3</sub>	Larve 3
LB	Luria-Bertani Medium
mg	Milligramm
min	Minute
MQ-H <sub>2</sub> O	0,2 μm sterilfiltriertes Wasser
mRNA	messenger RNA
ml	Milliliter
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
μm	Mikrometer
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

---

NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	Phosphate buffered saline
pGEM <sup>®</sup> -T	Vektor
PTGS	posttranscriptional gene silencing (posttranskriptionelle negative Genexpressionsregulation)
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA-induzierter Regulations-Komplex)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute (Drehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulfat (Natrium-Laurylsulfat)
siRNA	small interfering RNA (kleine interferierende RNA)
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA

---

U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolettes Licht
U.S.A.	United States of America
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG

Weltweit werden Arzneimittel zur Erhaltung der Gesundheit und des Wohlbefindens von Tieren eingesetzt. Wesentliche Faktoren hierfür sind neben den Belangen des Tierschutzes und dem Schutz von Menschen gegen die Übertragung tierischer Krankheitserreger vor allem die Sicherung der Produktivität und damit der Wirtschaftlichkeit von Nutztierhaltungen. Dabei zeigt die Verwendung von Tierarzneimitteln international eine steigende Tendenz. Im Jahre 2002 setzte allein die europäische Tiergesundheitsindustrie 3,3 Milliarden Euro um und erreichte damit 30,5 % des weltweit getätigten Umsatzes an Tierarzneimitteln. In Deutschland betrug dabei der Anteil der Antiparasitika im gleichen Jahr 18,3 % des nationalen Tierarzneimittelmarktes (IFAH, 2002; IFAH, 2003).

In der Pharmaindustrie steht diesen Umsatz-Zahlen erheblicher Kapitaleinsatz für die Entwicklung neuer Tierarzneimittel gegenüber, der auf den hohen Anforderungen bezüglich des Nutzens und der Sicherheit eines jeden Arzneimittels zurückzuführen ist (AMG, 1976). Wesentliche Aspekte sind neben der Wirksamkeit und gleichbleibenden, definierten Qualität eines Therapeutikums im Besonderen die gute Verträglichkeit und Sicherheit für das zu behandelnde Zieltier. Weitere Faktoren sind die Sicherheit für den Anwender, im Falle von landwirtschaftlichen Nutztieren der Verbraucherschutz, der die Unbedenklichkeit der zum menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Produkte (wie Milch, Fleisch, Eier) gewährleistet sowie die Verträglichkeit für die Umwelt. Alle diese Faktoren tragen dazu bei, dass die Entwicklung neuer Tierarzneimittel mit beachtlichen Kosten verbunden ist. Die *International Federation of Animal Health* schätzt, dass die Entwicklung eines neuen Wirkstoffes zum Tierarzneimittel für Lebensmittel liefernde Nutztiere sieben bis zehn Jahre dauert und 80 bis 100 Millionen Euro kostet (IFAH, 2002).

Vor Beginn jeder Arzneimittel-Entwicklung steht jedoch die Wirkstoffsuche und -findung und schließlich die Auswahl einer Substanz mit potenziell günstigen Eigenschaften. Die herkömmliche Strategie zur Findung geeigneter Wirkstoffe gegen Parasiten beruht auf dem sogenannten *Bioscreen*, einer *in vitro*-Testung an Organismen auf antiparasitische Wirksamkeit, die verfügbare Substanzbanken nutzt. Wirksame Stoffe können so anhand ihrer im *Bioscreen* ermittelten antiparasitischen Aktivität selektiert werden, ohne dass detaillierte Kenntnisse über den Wirkmechanismus (*Mode of action*) einer Substanz gegeben wären. Im Gegensatz hierzu beruht der erst seit jüngerer Zeit praktizierte *Target-based approach* auf der Identifizierung potenzieller Zielstrukturen (*Targets*) im Parasiten-Organismus und damit von

möglichen Angriffspunkten für Antiparasitika. Ziel des *Target-based approach* ist es, die an isolierten Zielstrukturen des Parasiten ermittelte *on-target*-Aktivität mit der *in vitro*-Aktivität am Parasiten zu korrelieren.

Für die Auswahl neuer potenzieller Angriffspunkte für Wirkstoffe (*Targets*) gegen parasitische Arthropoden und Helminthen wird in jüngerer Zeit versucht, Gene in den Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gezielt auszuschalten und die Phänotypen auf ihre Eignung zu untersuchen. Unter den zur Verfügung stehenden Methoden wurde in den letzten Jahren insbesondere die Genexpressionshemmung mittels RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt und scheint sich als Standardmethode zu etablieren. Dagegen finden sich bisher (2002) nur wenige Beispiele für den Einsatz von RNAi bei parasitischen Invertebraten, obschon Genexpressionhemmungsdaten dieser Organismen von besonderer Bedeutung für Targetsuche und -identifizierung wären.

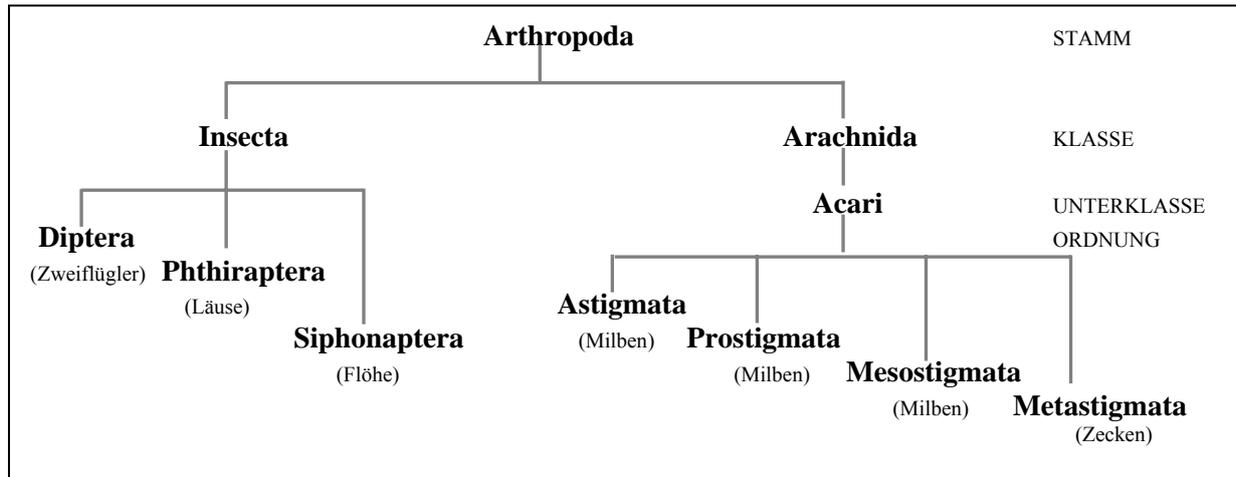
In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Genexpressionshemmung mittels RNA-Interferenz (RNAi) auf das parasitische Insekt *Lucilia cuprina* anzuwenden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Veterinärmedizinische Bedeutung von Arthropoden

Es gibt eine Vielzahl von Arthropoden, die durch ihre obligat oder fakultativ, permanent oder temporär parasitische Lebensweise als Ektoparasiten von Haus- und Nutztieren von veterinärmedizinischer Bedeutung sind. Hierzu gehört die Gruppe der Insekten mit Dipteren verschiedenster Spezies, Läusen und Flöhen sowie die Acari, zu denen unter anderem Zecken und Milben zählen (Abb. 2-1). Das Ausmaß der durch diese Ektoparasiten verursachten Schäden an den befallenen Wirtstieren reicht je nach Spezies und Befallsintensität von deren allgemeiner Beunruhigung bis zu unmittelbar lebensbedrohlichen Zuständen. Eine Reihe ektoparasitischer Arthropoden übertragen bakterielle und virale Erreger und fungieren als Vektoren für pathogene Protozoen sowie Helminthen (COLEBROOK und WALL, 2004). Durch das enge Zusammenleben mit Haustieren werden tierische Ektoparasiten auch in das unmittelbare menschliche Umfeld getragen und können bei geringer Wirtsspezifität an den Menschen weitergegeben werden. Im Falle von Nutztieren geht Parasitenbefall generell auch mit einer deutlichen Einbuße der Produktivität einher; Verluste von zum Teil großer wirtschaftlicher Bedeutung sind die Folge (COLEBROOK und WALL, 2004). So kann zum Beispiel die blutsaugende Fliege *Haematobia irritans* in den am schwersten betroffenen Gebieten der U.S.A. in Rinderbeständen eine bis zu 15 % verringerte Gewichtszunahme der Masttiere und eine bis zu 20 % reduzierte Milchleistung verursachen. In Australien werden die durch Fliegen der Spezies *L. cuprina* verursachten jährlichen Verluste in der Schafhaltung mit 200 Millionen Aus\$ beziffert. Entsprechend umfangreich ist der Antiparasitika-Markt, der ein weites Spektrum verschiedenster Produkte umfasst (Anthelmintika, Antiprotozoika, Insektizide, Akarizide). Jährlich werden weltweit insgesamt etwa 3,5 Milliarden Dollar solcher Antiparasitika umgesetzt (WESLEY, 2002).

Trotz jüngerer Ansätze, Vakzinen auch gegen parasitische Arthropoden (z.B. gegen die tropische Rinderzecke *Boophilus microplus*; WILLADSEN, 1997) zu entwickeln, beruhen die zur Bekämpfung der Ektoparasitosen ergriffenen Maßnahmen sowohl im Heim- als auch im Nutztierbereich nach wie vor weitestgehend auf dem Einsatz von Chemotherapeutika. Diese umfassen sowohl rein topisch als auch systemisch applizierbare Formulierungen einer Reihe verschiedener Substanzklassen, die im Nachfolgenden beschrieben werden.



**Abb. 2.1:** Systematik veterinärmedizinisch bedeutender Arthropoden nach WALL und SHEARER (1997)

### 2.1.1 Ektoparasitika: Substanzklassen und Wirkstoffbeispiele

Die Kontrolle von veterinärmedizinisch bedeutsamen Ektoparasiten beruht maßgeblich auf einer Anzahl verschiedener Substanzklassen, deren Wirkungsweise auf das Nervensystem des Arthropoden zielt (TAYLOR, 2001). Zu den hier aufgezählten Substanzklassen und Wirkmechanismen werden ergänzend einzelne Wirkstoffe genannt, anhand derer die gegen Ektoparasiten verfügbaren chemischen Mittel beispielhaft dargestellt werden sollen.

#### CARBAMATE

Carbamate sind reversible Inhibitoren der Acetylcholinesterase und verursachen eine durch Muskelkontraktionen vermittelte Paralyse des Ziel-Arthropoden (WESLEY, 2002). Sie sind seit über 50 Jahren im Markt. Beispiele für Wirkstoffe aus dieser chemischen Klasse sind Propoxur, Carbaryl und Bendiocarb. Sie werden in variablen Darreichungsformen (Pulver, Spray, Shampoo, Halsband) zur Zecken- und Flohbekämpfung bei Hund und Katze eingesetzt.

## ORGANOPHOSPHATE

Die Wirkung der Organophosphate beruht ebenfalls auf der Hemmung der Acetylcholinesterase und damit auf einer Blockade der Erregungsleitung im synaptischen Spalt (COATES, 1982). Organophosphate (z.B. Fenthion, Dimpylat) sind die größte Klasse der veterinärmedizinisch verwendeten Insektizide, von denen einige Vertreter auch akarizid wirksam sind und damit dem breiten Wirkungsspektrum gegen Arthropoden der Carbamate ähneln. Bereits 1965 wurden erste Resistenzen gegen Organophosphate in *L. cuprina* beobachtet (LEVOT, 1995). Durch die aufkommende Resistenzentwicklung sowie die hohe Toxizität für Warmblüter im Allgemeinen, insbesondere jedoch auch für den Anwender, wurde die Einsatzhäufigkeit von Organophosphaten in den vergangenen Jahren in deutlichem Maße negativ beeinflusst (WESLEY, 2002).

## NEONIKOTINOIDE

Vertreter dieser Substanzklasse binden als Agonisten an die post-synaptischen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren, die für die neuronale Signalübertragung im Insekt essenziell sind (KRÄMER und MENCKE, 2001). Diese Wirkstoffgruppe hat einen ausgeprägten *Knockdown*-Effekt und wird zur Flohbekämpfung im Kleintierbereich eingesetzt (z.B. Imidacloprid, Nitenpyram).

## PYRAZOLE

Pyrazole wirken durch Hemmung eines Invertebraten-Neurotransmitter-Rezeptors, des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptors, am GABA-gesteuerter Chloridkanal sowohl insektizid als auch akarizid (ISHAAYA, 2001). Der bekannteste und im Kleintiersektor erfolgreichste Wirkstoff der Pyrazole ist Fipronil (WESLEY, 2002).

## PYRETHRINE und SYNTHETISCHE PYRETHROIDE

Aus Chrysanthenen gewonnene Pyrethrine und die ihnen verwandten synthetischen Pyrethroide wirken im Ektoparasiten durch Beeinflussung des Ionentransports (spannungsgesteuerter Natriumkanal) in den neuronalen Membranen (ISHAAYA, 2001).

Deltamethrin, Permethrin, Cypermethrin und Flumethrin sind nur einige Vertreter dieser Substanzklasse, die mit ihren insektiziden und akariziden Eigenschaften ein weitreichendes

Wirkungsspektrum besitzt. Zunehmende Resistenzbildung wurde unter anderem bei tropischen Rinderzecken (z.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) beobachtet und ist ein Problem dieser Wirkstoffgruppe (MENDES et al., 2001; GOERGE et al., 2004; GRAF et al., 2004).

#### AMIDINE

Der Wirkmechanismus dieser Substanzgruppe ist nicht vollständig geklärt. Es gibt zwei mögliche Angriffspunkte, die diskutiert werden: Zum einen die Inhibition des Enzyms Monoaminoxidase, die zur Hemmung der Neurotransmitter-Übertragung in Zecken und Milben führt, zum anderen eine agonistische Wirkung am Oktopamin-Rezeptor, der die Muskelaktivität des Arthropoden beeinflusst (COATES, 1982). Der einzige Vertreter dieser chemischen Gruppe im Markt ist der Wirkstoff Amitraz, der abweichend von allen anderen Akariziden phänotypisch Hyperaktivität in Zecken verursacht. Amitraz ist ebenfalls von Resistenzbildung in tropischen Rinderzecken betroffen (GOERGE et al., 2004; GRAF et al., 2004).

#### MAKROZYKLISCHE LAKTONE

Zu der Substanzklasse der makrozyklischen Laktone gehören die Avermectine und Milbemycine, deren Derivate von Mikroorganismen (*Streptomyces*-Arten) stammen. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer Bindung des jeweiligen Wirkstoffs an den Rezeptor des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (*Glutamate-gated Chloride Channel*), wodurch ein Chlorideinstrom in die Nervenzellen verursacht wird, der zur Paralyse des Parasiten führt (ISHAAYA, 1998; ISHAAYA, 2001). Vertreter dieser Klasse, zum Beispiel Ivermectin und Selamectin, sind sowohl gegen Ekto- als auch gegen Endoparasiten aktiv und verfügen damit über ein besonders breites Wirkspektrum (WESLEY, 2002; BISHOP, 2000; SHANKS, 2003).

#### INSECT GROWTH REGULATORS (IGR)

Wachstumsregulatoren von Insekten (*Insect growth regulators*) sind keine unmittelbar letalen Insektizide, sondern unterbinden die Entwicklung oder Reproduktion des Parasiten. Hierzu gehören die Inhibitoren der Chitin-Synthese (*Chitin synthesis inhibitors*, z. B. Lufenuron), die die Kutikulabildung in Eiern und Larven hemmen (ISHAAYA, 1998).

Die Gruppe der *Juvenile hormone mimics* (z. B.: Methopren, Fenoxycarb, Pyriproxyfen) imitiert Wachstumshormone in den Jugendstadien der Parasiten und verhindern so die Entwicklung in die adulten Stadien (ISHAAYA, 1998).

Der Einsatz von IGRs erfolgt in der Regel in Verbindung mit klassischen Insektiziden und kann auch zum Durchbrechen bereits vorhandener Resistenzen genutzt werden. So wirkt zum Beispiel das Diflubenzuron, das die Kutikulasynthese hemmt, beim Schaf gegen Organophosphat-resistente Myiasis-Fliegen und Pyrethroid-resistente Läuse (WESLEY, 2002).

## 2.2 Forschungsansätze früher und heute

Das Substanzscreening von synthetisch hergestellten Stoffen und von Naturprodukten in geeigneten Ektoparasiten-Modellen (*Bioscreen*) war in der Vergangenheit und ist auch noch heute die gängige Methode zum Auffinden von Wirkstoffen mit insektizider und/oder akarizider Wirksamkeit.

Die Entwicklung von Parasiten- und -stadienspezifischen *in vitro*-Assays erbrachte dabei neben einer enormen Ersparnis der zur Testung benötigten Substanzmenge auch eine verbesserte Durchsatzrate an Testsubstanzen (persönliche Erfahrung aus der Praxis bei der Intervet Innovation GmbH). Das Prinzip des in der Regel breit angelegten Substanzscreenings beruht auf dem eher zufälligen Auffinden eines möglichen Produktkandidaten und steht nicht unerheblichen Aufwendungen gegenüber (Bereitstellung von Parasitenstadien, Labortechnik, Verbrauchsmaterial etc.).

Auf der Suche nach einem rationaleren, zielgerichteteren Ansatz zur Insektizid/Akarizid-Entwicklung als diese ‚zufällige‘ Wirkstoff-Findung, entstanden Überlegungen, Moleküle möglicher Zielstrukturen (*Targets*) durch Isolierung aus den Parasiten oder durch rekombinante DNA-Technologie mit Hilfe geeigneter Expressionssysteme (z.B. *E. coli*, Hefen, Insektenzellkulturen) in aktiver Form zu gewinnen. Im sogenannten *Target-based approach* (= auf Zielstrukturen basierender Ansatz) erfolgt dann die Wirkstoff-Findung im Hochdurchsatzscreening (*High throughput screening*, HTS) an isolierten Zielstrukturen mit erheblich verbesserter Effizienz (SELZER et al., 2001; MEINKE, 2001). Diese auf

potenziellen Zielstrukturen basierende Vorgehensweise zum Auffinden neuer Ektoparasitika ist in der Veterinärmedizin neu (Erfahrung aus der Praxis bei der Intervet Innovation GmbH).

Bei der Suche geeigneter *Targets* orientiert man sich in der Regel an solchen Strukturen, die für das Überleben (Vitalität) und/oder die Virulenz des Parasiten unverzichtbar sind. Diese zielgerichtete Auswahl solcher potenziell geeigneter *Targets* ist aufgrund bestehender biologischer, biochemischer und physiologischer Kenntnisse über den jeweiligen Parasiten noch gut möglich. Die Möglichkeiten der eindeutigen *Target*-Identifizierung im lebenden Parasiten und damit einer Bestätigung der *Target*-Eignung *in vivo*, sind im Arthropoden generell und insbesondere im parasitischen Insekt begrenzt.

### 2.2.1 Mögliche Werkzeuge der *Target*-Identifizierung im Insekt

Pharmakologisch aktive Substanzen werden bezüglich ihres *Targets* gewöhnlich im Vertebraten-Modell charakterisiert. Die Übertragung dieser *Target*-Wirkungen auf den Insektenbereich ist problematisch. Darum ist die Möglichkeit der Identifizierung eines *Targets* mit pharmakologischen Substanzen nur in Ausnahmefällen im Ektoparasiten bzw. im Parasiten gegeben (FIALA et al. 1999). Betrachtet man die Möglichkeiten der Molekularbiologie, so gibt es neben der pharmakologischen *Target*-Identifizierung einige Techniken, die in *Drosophila* und zum Teil auch in anderen Insekten Anwendung gefunden haben und deren potenzielle Eignung als *Target*-Identifizierungswerkzeug hier betrachtet werden soll.

#### MUTAGENESE DURCH ETHYLMETHANSULFONAT

Gängige Methode zur Herbeiführung einer Mutagenese in *D. melanogaster* ist die Verfütterung des mutagenen Ethylmethansulfonats (EMS) an männliche Fliegen. EMS löst durch die Modifikation von Basen Punktmutationen im Genom aus, die nach der Kreuzung mit unbehandelten *Drosophila*-Weibchen in der nächsten Folgegeneration die Genfunktion verändern können (ST. JOHNSTON, 2002). Die so auftretenden Mutationen, die je nach Ausprägung in hypomorph, hypermorph oder *loss of function*-Typ (GREENSPAN, 1997) unterschieden werden, sind jedoch nicht gezielt ausgelöst, sondern rein zufällige Resultate.

Problem der Mutagenese mit EMS ist außerdem die Entstehung sogenannter Mosaik, d.h. nicht alle Zellen eines behandelten Organismus sind Träger der gleichen Mutation(en); eine Vielzahl von Phänotypen ist die Folge (ST. JOHNSTON, 2002). Das anschließende Auffinden und die Charakterisierung des mutierten Gens durch dann notwendig werdende Kreuzungsversuche macht diese Methode zur Analyse der Genfunktion sehr aufwendig (ROBERTS, 1998). Dieses für *D. melanogaster* klassische Mutagenese-Verfahren zur Ausschaltung/Veränderung von Genfunktionen wurde in anderen Insekten bisher nicht systematisch durchgeführt.

#### P-ELEMENT-MUTAGENESE

Bei der P-Element Mutagenese macht man sich mobile, genetische Elemente, sogenannte *Transposons*, für die Charakterisierung der Genfunktion zunutze. In *D. melanogaster* wird das P-Element eingesetzt, dessen Teilabschnitt für ein Transposase-Gen kodiert. Durch die Kreuzung eines Fliegen-Stammes mit funktionsfähiger Transposase mit einem Stamm, der statt einer Transposase ein Markergen trägt, wird die Transposition erst in der Folgegeneration ermöglicht. Man erhält Nachkommen, die sowohl eine funktionale Transposase als auch ein zur Exzision geeignetes P-Element besitzen. Folglich können Transpositionen im Genom stattfinden und Mutationen entstehen (HENNIG, 1998; ST. JOHNSTON, 2002). Inzwischen stehen eine ganze Reihe charakterisierter P-Elemente für *D. melanogaster* zur Verfügung (Berkeley *Drosophila* Genome Project; SPRADLING et al., 1999). Auch diese Methode ist jedoch extrem aufwendig, denn P-Elemente sind sehr ineffiziente Mutagene und können ebenfalls keine gezielten Mutationen auslösen. Dies macht eine anschließende arbeitsintensive Lagebestimmung der Transposition im Genom notwendig (ST. JOHNSTON, 2002).

#### ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE GENE KNOCKDOWN

Ein weiteres Verfahren, das zur Charakterisierung der Genfunktion angewendet wird, ist die Verringerung der Protein-Expression eines Gens mittels *antisense*-RNA. Hierbei wird die kodierende Sequenz des zu unterdrückenden Gens in komplementärer Orientierung über einen Transformationsvektor (RUBIN et al., 1982) und Keimbahntransformation (SPRADLING et al., 1982) in das *Drosophila*-Genom inseriert. Bei der Transkription entsteht dann *antisense*-mRNA des inserierten Abschnitts sowie *sense*-mRNA des natürlich vorkommenden

(endogenen) Gens. Die gebildeten mRNA-*sense*- und -*antisense*-Stränge paaren sich zu einem Doppelstrang, der für die Translation nicht geeignet ist und abgebaut wird. Somit wird die Translation der endogenen mRNA und damit die Proteinbildung verhindert (KNIPPERS, 2001). Auch dieses Verfahren ist in der Durchführung aufwendig, da es auf der Gewinnung transgener Fliegen basiert.

Eine abgewandelte Form des *Antisense oligonucleotide gene knockdown* beschreiben FIALA et al. (1999) in der Honigbiene *Apis mellifera*. Sie verringerten die Genexpression von Proteinkinase A durch Injektion kurzer, komplementärer, einzelsträngiger RNA ins Oberschlundganglion. Vorrangig ist die Methode jedoch in einigen Vertebraten-Systemen (OGAWA et al., 1998), insbesondere im Zebrafisch (BRENT und DRAPEAU, 2002), etabliert.

#### RNA-INTERFERENZ (*RNAi gene knockdown*)

Basierend auf den bisher beschriebenen Techniken gibt es folglich keine zuverlässige und etablierte Gen-*Knockout*-Methode im Insekt. 1998 wurde jedoch erstmals über eine neue Form der gezielten Genexpressionshemmung berichtet, die RNA-Interferenz oder RNAi. Diese vollkommen neue Möglichkeit der Analyse von Genfunktionen durch deren gezielte Unterdrückung mittels spezifischer, doppelsträngiger RNA wurde erstmals im Nematoden *C. elegans* angewendet und brachte der Methode der RNA-Interferenz weitreichende Beachtung (FIRE et al., 1998). In der Folgezeit wurde diese neue Technik der Genexpressionsunterdrückung an anderen Eukaryonten erprobt und es gelang TUSCHL et al. (1999), die RNAi-Technik auch auf *D. melanogaster* zu übertragen.

Im Nachfolgenden sollen die Technik der RNA-Interferenz sowie ihre derzeitigen Anwendungsbereiche und Möglichkeiten, insbesondere im Arthropoden, betrachtet und dargestellt werden (vgl. 2.3).

## 2.3 RNA-Interferenz: ein Werkzeug zur Untersuchung der Genfunktion

### 2.3.1 RNAi: Entdeckung und Mechanismus

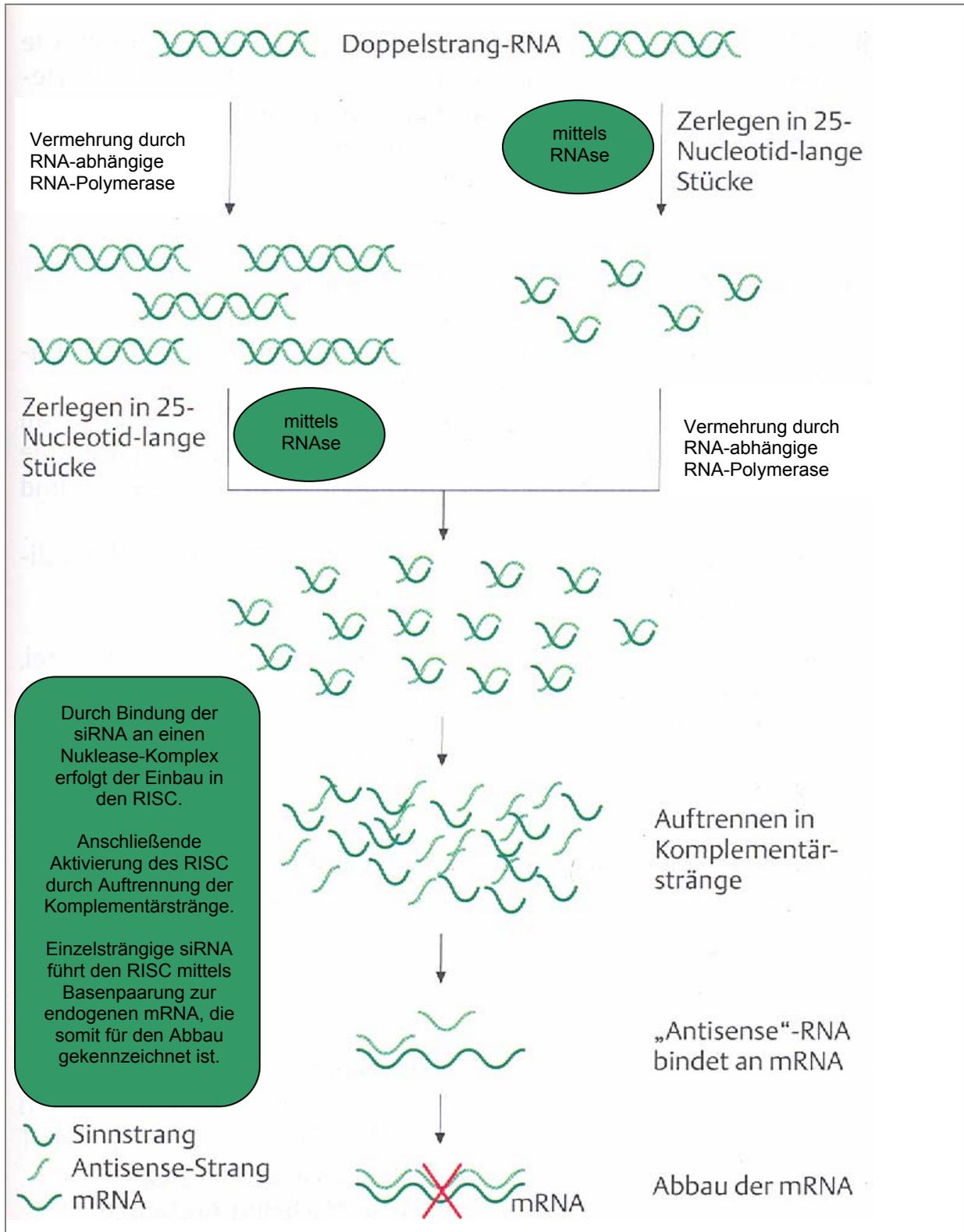
Die posttranskriptionelle Regulation der genetischen Aktivität durch spezifische doppelsträngige RNA (dsRNA) ist eine Form des *posttranscriptional gene silencing* (PTGS = posttranskriptionelle negative Genexpressionsregulation) und wird auch als RNA-Interferenz der Genexpression (RNAi) bezeichnet (KNIPPERS, 2001). Die Beeinflussung der Genfunktion durch das indirekte Einbringen von dsRNA in einen Organismus wurde zunächst in Pflanzen entdeckt (NAPOLI et al., 1990). Hier führte die Übertragung eines Gens, das für ein Pigment kodiert (Chalcon-Synthase), in Petunien nicht zur der beabsichtigten und erwarteten Verstärkung der Blütenfarbe, sondern zu einem partiellen Verlust der Färbung. Dieses Phänomen wurde als *Cosuppression* benannt, da hierbei nicht nur die Expression der induzierten Transgene, sondern auch die Ausbildung der Merkmale entsprechender homologer, endogener Gene unterdrückt wurde.

Ähnliche Effekte, in Pilzen als sogenanntes *Quelling* bezeichnet, konnte in *Neurospora crassa* beobachtet werden (COGONI et al., 2000). Schließlich demonstrierten FIRE et al. (1998) erstmals im Nematoden *C. elegans* die Unterdrückung der Genexpression durch genspezifische doppelsträngige RNA. Bereits 1999 bezeichnete FIRE das RNA-vermittelte *Silencing* als ein etabliertes Werkzeug für *Functional Genomics* in niederen Organismen wie Pflanzen, Invertebraten und Pilzen. Die Anwendungsgebiete für die posttranskriptionelle negative Genregulation erweiterten und erweitern sich stetig. So zählen neben Protozoen wie *Trypanosoma brucei* (NGO et al., 1998) Zellen einer Vielzahl von Vertebraten-Geweben (zum Beispiel von Zebrafisch und Maus, WARGELIUS et al., 1999; WIANNY et al., 2000) zu den Modellen und Organismen, in denen RNAi-Effekte demonstriert werden konnten.

Die dem Prozess der RNA-Interferenz zugrunde liegenden Funktionen und Mechanismen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Naheliegender erscheint die Annahme, dass RNA-Interferenz eine grundlegende Rolle bei der Abwehr molekularer Pathogene spielt. So tritt doppelsträngige RNA natürlicherweise insbesondere bei der Replikation vieler Viren auf, ohne jedoch von den befallenen Zellen selbst gebildet zu werden. Man nimmt an, dass als Reaktion auf die Anwesenheit der dsRNA dieser Pathogene im befallenen Organismus ein Abwehrmechanismus in Gang gesetzt wird, der schließlich zur Degradation der pathogenen mRNA führt (HANNON, 2002; PLASTERK, 2002). Einen Beleg für die Bedeutung von

PTGS und damit von RNA-Interferenz als ein natürlicher Mechanismus der zellulären Abwehr erbrachte unter anderem die Arbeitsgruppe um P. MOURRAIN. Ihr gelang es, zwei im Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* an der Ausbildung von RNAi-Effekten beteiligten Gene (SGS2 und SGS3) zu klonieren. Ferner demonstrierten sie, dass Mutanten von *A. thaliana*, denen diese Gene fehlten, eine höhere Empfänglichkeit für RNA-Virus-Infektionen zeigten (MOURRAIN et al., 2000).

Nach HUTVÁGNER et al. (2002), HAMMOND (2000) und ZAMORE (2000) lässt sich für den Prozess der RNA-Interferenz vorläufig folgendes Modell entwerfen: In einen Organismus eingebrachte genspezifische, doppelsträngige RNA wird durch eine RNase (= DICER, ist verwandt der RNase III, einer dsRNA-spezifischen Endonuklease) in kurze, ebenfalls doppelsträngige RNA-Fragmente (~21 - 25 Nukleotide) gespalten. Die entstehenden als *small interfering RNAs* (siRNA = kurze interferierende RNA) bezeichneten Fragmente werden im nächsten Schritt durch Bindung an einen Nuklease-Komplex in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC = RNA-induzierter Regulations-Komplex) eingebaut. Charakteristische Merkmale der siRNAs sind der 5'-Phosphat und der 3'-Hydroxyl-Terminus sowie zwei überhängende Nukleotide am 3'-Ende. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird die doppelsträngige siRNA entwunden, wobei die Auftrennung der Komplementärstränge in Einzelstränge zur Aktivierung des RISC führt. Die einzelsträngige siRNA des aktiven Komplexes führt den RISC mittels Basenpaarung zur komplementären endogenen mRNA. Diese wird so als Zielstelle für den Abbau durch RNAsen (Exonuklease-Aktivität des RISC) gekennzeichnet, was zu einer spezifischen Inaktivierung der jeweiligen mRNA führt. Die Folge kann eine teilweise oder auch vollständige Unterdrückung der Genexpression sein. Zur leichteren Orientierung sind in Abbildung 2.2 die wesentlichen Schritte der RNA-Interferenz in einem vereinfachten Modell dargestellt.



**Abb. 2.2:** Modell zur RNA-Interferenz der Genexpression modifiziert nach KNIPPERS (2001); das Modell wurde ergänzt nach HUTVÁGNER et al. (2002), HAMMOND (2000) und ZAMORE (2000).

siRNA: *small interfering RNA*

RISC: *RNA-induced silencing complex*

Ergänzend ist zu erwähnen, dass bereits die Injektion weniger Moleküle doppelsträngiger RNA für die komplette Ausschaltung der Expression des homologen Gens ausreichend sein kann (*C. elegans*: FIRE et al., 1998). Diese Beobachtung bleibt bei dem hier beschriebenen Modell der RNA-Interferenz bisher nur wenig berücksichtigt. Eine mögliche Erklärung für das Phänomen wäre ein im Verlauf des RNAi-Prozesses auftretender Amplifikationsschritt. So könnte das Vorkommen einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP = *RNA-dependent RNA Polymerase*) zur Vermehrung der induzierten dsRNA und der siRNA führen und damit eine Potenzierung des Interferenz-Effektes bewirken. Für *N. crassa* (COGONI und MACINO 1999), *A. thaliana* (DALMAY et al., 2000) und *C. elegans* (SMARDON et al., 2000) konnten RdRP-ähnliche Proteine gefunden werden. Nach ROIGNANT et al. (2003) und CARTHEW (2001) beinhaltet jedoch das *D. melanogaster*-Genom keine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Des Weiteren haben universelle Inhibitoren der RNA-Synthese laut CARTHEW keine Auswirkung auf RNAi-Effekte in Fliegen (CARTHEW, 2001: „Gene silencing by double-stranded RNA,: “[...] *Drosophila* does not contain an RdRP gene in the sequenced genome, and universal inhibitors of RNA synthesis have no effect on RNAi in flies.”). Obwohl LIPARI et al. (2001) von einer RdRP-Aktivität in Lysaten von *Drosophila*-Embryonen berichten, scheint das Vorkommen einer RdRP nach derzeitigem Kenntnisstand für den Ablauf von RNAi-Prozessen insbesondere in *D. melanogaster* nicht obligatorisch zu sein.

Ein zweiter Erklärungsansatz für die hohe Effektivität geringer Mengen dsRNA ist die Möglichkeit der mehrfachen Verwendung eines durch Entwindung des Doppelstranges der siRNA aktivierten RISC-Komplexes (*Multiple turnover enzyme*) (HAMMOND et al., 2001). Es gilt noch zu klären, ob RdRP und/oder *Multiple turnover* des RISC für die Potenz der RNA-Interferenz tatsächlich verantwortlich sind oder ob weitere Faktoren eine Rolle spielen.

### **2.3.2 RNAi: Vergleich *D. melanogaster* – *C. elegans***

Die angewendeten Verfahren für RNA-Interferenz sind sehr vielfältig, wobei die Ausprägung der durch sie erzielten Effekte in verschiedenen Spezies deutlich variiert. Zum besseren Verständnis der bisherigen Möglichkeiten und Grenzen von RNA-Interferenz sowie der Problematik ihrer Anwendung insbesondere im Insekt, soll zunächst kurz die Sachlage für RNAi in Nematoden betrachtet werden.

In *C. elegans* wurden verschiedenste RNAi-Techniken angewandt. Neben der Injektion von dsRNA in adulte und larvale Wurmstadien (FIRE et al., 1998) wurde diese auch durch direkte oder indirekte Fütterung (über dsRNA bildende Bakterien) verabreicht (TIMMONS und FIRE, 1998; TIMMONS et al., 2001). Des Weiteren konnte auch die Inkubation von *C. elegans* in dsRNA-haltigen Lösungen (sogenanntes *Soaking*) erfolgreich RNAi induzieren (TABARA et al., 1998; MAEDA, 2001). Bemerkenswert für die Ausprägung von RNAi-Effekten in *C. elegans* sind 2 Beobachtungen: 1) das Phänomen der transitiven RNAi, bei dem die Degradation von mRNA auch in solchen Sequenzabschnitten nachgewiesen werden konnte, die strangaufwärts (*upstream*) oder strangabwärts (*downstream*) der eigentlichen, initialen dsRNA lagen (SIJEN et al., 2001) sowie 2) die systemische Wirkung von RNAi, d.h. dsRNA, injiziert oder exprimiert in einem Gewebe, führte auch in anderen Geweben zur Unterdrückung der Genexpression (FIRE et al., 1998; WINSTON et al., 2002). Des Weiteren berichten GRISHOK und TABARA et al. (2000) sogar von einer Vererbung der Interferenz in *C. elegans* über mehrere Generationen hinweg.

Wie stellt sich das Phänomen der RNA-Interferenz im Vergleich dazu in der Taufliege *D. melanogaster* dar?

KENNERDELL und CARTHEW (1998) wählten zur Untersuchung der RNAi in *Drosophila* Gene aus, die an der embryonalen Segmentierung beteiligt sind (*ftz* und *eve*). Die dsRNA-Injektion in frühe Blastodermstadien von *Drosophila*-Embryonen erzeugte hierbei Phänotypen mit spezifischen Kutikula-Defekten, die den Erscheinungsformen der *loss of function*-Mutanten dieser Gene identisch waren. Des Weiteren konnte (wie zuvor auch in *C. elegans*) demonstriert werden, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA einen erheblich höheren Prozentsatz an Embryonen mit phänotypischen Effekten hervorbrachte als die Verwendung von einzelsträngiger *sense*- oder *antisense*-RNA.

Auch MISQUITTA und PATERSON (1999), die ebenfalls an *Drosophila*-Embryonen arbeiteten, gelang es durch die Mikroinjektion von *nautilus* dsRNA von mindestens 200 bp Länge einen entsprechenden Phänotyp, diesmal in embryonalen Muskelzellen, auszulösen. Weitere etablierte Methoden zur Induktion von RNAi-Effekten in *Drosophila* sind zellfreie Embryo-Lysate (TUSCHL et al., 1999; ELBASHIR et al., 2001) sowie Zellkulturen zum Beispiel von *Drosophila*-Schneiderzellen (CAPLEN et al., 2000), die zur erfolgreichen Anwendung von RNA-Interferenz kamen. Dagegen zeigten Fütterungsversuche an *Drosophila*, die mittels dsRNA-exprimierender Hefen durchgeführt wurden, keine Auswirkung auf die Genexpression.

Aufgrund der relativ begrenzten Wirkung von RNAi auf frühe Entwicklungsstadien (Embryo) von *Drosophila* und der Tatsache, dass bei der Injektion von Embryonen keine heritablen Effekte beobachtet werden konnten, erprobten KENNERDELL und CARTHEW (2000) eine zuvor an *C. elegans* entwickelte Methode (TAVERNARAKIS et al., 2000): Die Transformation von Fliegen durch die Insertion eines *in vivo* dsRNA-produzierenden Gens ermöglicht die stabile Vererbung der Unterdrückung von Genexpression in Embryonen und Fliegengeweben, die Rückschluss auf adulte Strukturen wie Flügel, Beine, Augen und Gehirn zulassen (KENNERDELL und CARTHEW, 2000). Hierbei führt die Expression von inserierter DNA mit *inverted repeat*-Strukturen zur Bildung von RNA, die sich aufgrund ihrer komplementären Abschnitte an beiden Enden der Sequenz durch Basenpaarung zu einer Haarnadelschleife zusammenlagert (*hairpin-loop RNA*). In *Drosophila* können solche RNAi-Konstrukte z.B. mit dem UAS-Gal4-System (UAS = *upstream activation sequence*) der Hefe *in vivo* zur Expression gebracht werden (BRAND et al., 1993; ST. JOHNSTON, 2002). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben, dass die Gewebe-spezifische Expression dieser sogenannten *inverted repeat*-Transgene lokalisierte morphologische Defekte in Adulten und lokalisierte zelluläre Defekte in Larven von *Drosophila* verursachen kann (BILLUART et al., 2001; GIORDANO et al., 2002; KALIDAS und SMITH, 2002). Die Arbeitsgruppe ROIGNANT et al. (2003) untersuchte mittels Transgen-vermittelter RNAi die Frage, ob transitive und systemische Interferenz-Effekte, wie sie *in vivo* in *C. elegans* vorkommen, auch in *D. melanogaster* in Erscheinung treten. Anhand verschiedener mRNA-Zielsequenzen zeigten sie, dass komplementäre siRNAs *up-* oder *downstream* der Ziel-Sequenz in *Drosophila* nicht detektiert werden konnten und die mittels RNAi erzielten Effekte rein auf spezifische Isoformen eines Gens begrenzt waren. Folglich scheinen transitive und systemische RNAi in Fliegen nicht konserviert zu sein. ROIGNANT et al. (2003) beschreiben RNA-Interferenz durch *inverted repeat*-Transgene in *D. melanogaster* als einen Zell-autonomen und Isoform-spezifischen Prozess, der somit die Analyse der Genfunktion in spezifischen Geweben oder Entwicklungsstadien ermöglicht.

Neben den Möglichkeiten, die transgene *Drosophila* für die Anwendung von RNAi bieten, gibt es in der Literatur auch ein Beispiel für direkte Injektion doppelsträngiger RNA in adulte Fliegen (DZITOYEVA et al., 2001). Hier wird beschrieben, dass die intra-abdominale Injektion in adulte *Drosophila* nicht nur zum Abbau der Ziel-mRNA (*lacZ*-Gen) führte, sondern auch die Expression des kodierten Proteins ( $\beta$ -Galaktosidase) deutlich inhibiert

wurde. Diese Methode eröffnete in Fliegen erstmals die Möglichkeit, die in ihrer Wirkung bisher auf Entwicklungsphänotypen begrenzte RNAi-Technik auf adulte Stadien zu erweitern.

### 2.3.3 Anwendung der RNAi im Arthropoden

Die ursprünglich angewendete Injektion von dsRNA in *Drosophila*-Embryonen erlaubte die Untersuchung vor allem embryonaler Phänotypen (KENNERDELL und CARTHEW, 1998; MISQUITTA und PATERSON, 1999; TSUDA et al., 1999). Hierbei ist sogar ein kombinatorischer Ansatz zur gleichzeitigen Ausschaltung mehrerer Genfunktionen möglich (SCHMID et al., 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings die transiente Natur der Genexpressionsunterdrückung und die daraus resultierende geringe Penetranz (phänotypische Wirkungsausprägung) im Larval- sowie Adultstadium (MISQUITTA und PATERSON, 1999). Um diese Einschränkung zu überwinden, wurde in der Folge eine endogene erbliche Form von dsRNA-Produktion in *D. melanogaster* entwickelt, die auf der Transkription von genomisch integrierten *inverted Repeats* einer Gensequenz basiert, die zu RNAi-wirksamen Haarnadelstrukturen führt (KENNERDELL und CARTHEW, 2000). Um spezifisch spät-larvale oder adulte Phänotypen beurteilen zu können, wurden später eine Reihe von induzierbaren Systemen eingeführt (LAM und THUMMEL, 2000; PICCIN et al., 2001; VAN ROESSEL et al., 2002; ST. JOHNSTON, 2002). Mit Hilfe von all diesen Werkzeugen konnte belegt werden, dass sich *Drosophila* in Bezug auf zwei wichtige Eigenschaften von anderen Modellsystemen wie zum Beispiel *C. elegans* oder Pflanzen und Pilzen unterscheidet. *D. melanogaster* besitzt weder transitive noch systemische RNAi-Mechanismen (ROIGNANT et al., 2003).

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass embryonale Injektion von dsRNA in ein synzytiales Stadium vor der Ausbildung von Zellmembranen erfolgt, was einen systemischen Phänotyp in Abwesenheit systemischer Mechanismen ermöglicht. In scheinbarem Widerspruch zur Abwesenheit systemischer RNAi wurde vom Hari Manews Laboratorium eine Reihe von Arbeiten publiziert, die über die Induktion von Genexpressionshemmung nach Injektion in adulte *Drosophila* mit dsRNA berichten (DZITOYEVA et al., 2001, 2003a, 2003b). Entsprechende Versuche mit adulten Fruchtfliegen wurden in einem weiteren Labor durchgeführt (GOTO et al., 2003). Ihre Arbeiten zeigten auch, dass sogar funktionelle Gen-

Doppel-*Knockouts* erreicht werden können, und dass das Alter der injizierten Fliegen ein kritischer Parameter für den Erfolg der Genexpressionshemmung ist. Es scheint also, dass die Injektion von dsRNA im Gegensatz zur Zell-autonomen Wirkung von endogen transkribierter Haarnadelstruktur-dsRNA systemisch wirken kann und damit die experimentellen Möglichkeiten der Genexpressionshemmung in *Drosophila* ergänzt (DZITOYEVA et al., 2003b).

Außer dem klassischen Modellorganismus der Molekularbiologie, *D. melanogaster*, kam das Verfahren der RNA-Interferenz auch in einer Reihe weiterer Arthropoden zur Anwendung. Bereits 1999 wurde die Methode zur Untersuchung der orthologen Genfunktion in entfernt verwandten Insekten angewendet (BROWN et al., 1999), wobei der in *Drosophila*-Larven induzierte Phänotyp mit dem des Reismehlkäfers *Tribolium castaneum* (*Red flour beetle*) verglichen wurde. In *T. castaneum* konnten auch sogenannte parentale RNAi-Effekte (*parental RNAi*) demonstriert werden, die, durch Injektion in die maternale Puppe induziert, erst nach der Verpaarung mit unbehandelten Männchen in der ersten Folgegeneration in Erscheinung traten (BUCHER et al., 2002).

Auch in nicht-Modell-Organismen wie der cycloraphen Fliege *Megaselia abdita*, in *Oncopeltus fasciatus* (*Milkweed bug* oder *Milchkrautwanze*) sowie in der Fleischfliege *Sarcophaga peregrina* wurden auf embryonaler Ebene Phänotypen durch RNAi induziert. So konnte in *S. peregrina* durch Injektion von spezifischer dsRNA in Larven die Ausbildung eines entsprechenden Hämozytenproteins in der Puppe erfolgreich unterdrückt werden (NISHIKAWA und NATORI, 2001). In *O. fasciatus* und *M. abdita* wurde RNAi durch die Injektion von Embryonen in Eiern getestet. In *M. abdita* blieben die erzielten Effekte auf das frühe, embryonale Entwicklungsstadium beschränkt (STAUBER et al., 2000), während in *O. fasciatus* die Interferenz mit Genen, die an der Ausbildung von Kopfanhängseln beteiligt sind (Hox-Gene), veränderte Phänotypen auch in der späteren Embryonalentwicklung induzieren konnte (HUGHES und KAUFMANN, 2000). Des Weiteren beschrieben BETTENCOURT et al. (2002) in der Seidenmotte *Hyalophora cecropia* (*Giant silkmoth* oder *Riesenseidenspinner*) nach Unterdrückung der Expression des *Hemolin*-Gens durch Injektion von spezifischer dsRNA ins Haemozoel der Puppe einen letalen Effekt in den Embryonen der Folgegeneration.

Bis auf *M. abdita* fanden parasitisch lebende Arthropoden mit besonderer veterinärmedizinischer Bedeutung bisher bei der Anwendung von RNA-Interferenz so gut wie keine Beachtung. Die Injektion von dsRNA in ein anderes Entwicklungsstadium als das des Embryos wurde bei Arthropoden selten praktiziert. Neben den bereits erwähnten Anwendungen in *Sarcophaga*-Larven (NISHIKAWA und NATORI, 2001) und der intra-abdominalen Injektion in adulte *Drosophila* (DZITOYEVA et al., 2001) erprobten BLANDIN et al. (2002) die Technik an adulten *Anopheles gambiae*, einem Vektor für Malariaerreger (*Plasmodium falciparum*). Durch intra-thorakale Injektion weiblicher Moskitos demonstrierten sie die Unterdrückung der Expression des Gens *Defensin*, das für ein antimikrobiell wirkendes Peptid kodiert. Die Interferenz in *A. gambiae* zeigte sich dabei sowohl in Form eines massiv reduzierten endogenen mRNA-Spiegels als auch in fehlender Expression des Proteins, des *Defensins*. Entsprechend der Erwartung waren solche Moskitos empfänglicher für die Infektion mit Gram-positiven Bakterien, was in erhöhten Sterblichkeitsraten resultierte (BLANDIN et al., 2002). Ähnlich den Untersuchungsmethoden von BLANDIN et al. (2002) wurden in der vorliegenden Arbeit nach der Injektion von dsRNA (*ace* 3'-Endfragment) in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> die endogenen mRNA-Spiegel mittels RT-PCR bestimmt.

## 2.4 Erprobung der RNA-Interferenz im Ektoparasiten *L. cuprina*

Die vielversprechende Anwendung von RNAi in verschiedensten Arthropoden sowie die Tatsache, dass erzielte Effekte nicht nur auf embryonaler Ebene, sondern auch im adulten Organismus beobachtet werden konnten, führte zu der Frage, ob die Methode auf andere, veterinärmedizinisch relevante Arthropoden übertragbar sei. Insbesondere die Forschungsergebnisse über RNAi in adulten *Drosophila* (DZITOYEVA et al., 2001) und in Larven von *Sarcophaga* (NISHIKAWA und NATORI, 2001) ließen zu Beginn dieser Arbeit darauf schließen, dass die Anwendung der posttranskriptionellen negativen Genregulation im Arthropoden an späteren, der Embryonalentwicklung nachfolgenden Stadien tatsächlich möglich ist. Des Weiteren führten die vielversprechenden RNAi-Experimente in Organismen wie *Tribolium* (BROWN et al., 1999), oder *Sarcophaga* (NISHIKAWA und NATORI, 2001), zu der Annahme, dass eine Anwendung auch im Ektoparasiten realisierbar sein sollte, was eine neue Möglichkeit der gezielten Untersuchung von Genfunktionen und damit der *Target-*

Identifizierung (vgl. 2.2.1) in sich bürge. Auf diesen Folgerungen basierend sollte mit der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, die Methode der RNA-Interferenz in einem parasitischen Insekt, der Goldfliege *L. cuprina*, zu etablieren und die Möglichkeiten ihres Einsatzes als innovatives Werkzeug bei der Entwicklung neuer Antiparasitika zu untersuchen.

#### **2.4.1 *L. cuprina* als neuer Modellorganismus**

*L. cuprina* (Abb. 2.3) gehört zur Familie der Calliphoridae und gilt aufgrund der fakultativ parasitischen Lebensweise während ihrer Larvenentwicklung zu den veterinärmedizinisch bedeutsamen Parasiten (TAYLOR, 2001). Durch Eiablage adulter Fliegen in Hautläsionen, aber auch auf intakter Haut z.B. des äußeren Gehörgangs, kommt es zum Krankheitsbild der Myiasis, die durch in Hautläsionen oder Körperöffnungen parasitierenden Fliegenlarven gekennzeichnet ist (MEHLHORN, DÜWEL, RAETHER, 1993).

*L. cuprina* erschien als neuer RNAi-Modellorganismus besonders interessant, da diese Spezies bei der Intervet Innovation GmbH bereits bei der Antiparasitika-Entwicklung im sogenannten *Bioscreening* zur *in vitro*-Testung von Substanzen auf insektizide Wirksamkeit Verwendung findet. Der Versuch, RNA-Interferenz an *L. cuprina*-L<sub>3</sub> (3. Larvenstadium) zu erproben, wurde zum Thema dieser Arbeit gewählt, da die RNAi-vermittelte gezielte Ausschaltung von Genen die Möglichkeit eröffnet, potenzielle Zielstrukturen von insektizid wirksamen Substanzen unmittelbar im parasitischen Insekt zu identifizieren, was bei der Entwicklung zukünftiger Antiparasitika von entscheidendem Vorteil wäre. Die Auswahl des zum RNAi-Einsatz geeigneten Entwicklungsstadiums von *L. cuprina* richtete sich dabei nach den Gegebenheiten bei der Fliegenentwicklung. Die ursprüngliche Überlegung, dem *Drosophila*-Vorbild zu folgen und Embryonen zu injizieren, wurde wegen der hohen Fragilität der *L. cuprina*-Eier verworfen, da bereits die rein manuelle Handhabung der Eier zu erheblichen Verlusten der Schlupfraten führte (ca. 50 %). Die Injektion von Imagines erschien aufgrund der ausgeprägten Chitinhülle nicht praktikabel. Das für die Durchführung dieser Arbeit ausgewählte dritte Larvenstadium (L<sub>3</sub>) von *L. cuprina* steht unmittelbar vor massiven anatomischen und metabolischen Umbauvorgängen des Insekts durch Verpuppung, Puppenruhe und Schlupf der Imago. Dies erschien für die potenzielle Ausbildung eines

phänotypischen Effektes durch RNAi als besonders vorteilhaft. Des Weiteren machte die Möglichkeit der Gewinnung Stadien-homologer Versuchskollektive *L. cuprina*-L<sub>3</sub> zum geeigneten Modellorganismus für die Durchführung von RNAi-Experimenten im Ektoparasiten.



**Abb. 2.3:** Larve 3, Puppe und Imago von *Lucilia cuprina*

#### **2.4.2 Auswahl von Genen und Genfragmenten zur Genexpressionshemmung an *L. cuprina*-L<sub>3</sub>**

Für die Durchführung der RNAi-Genexpression-Hemmungsexperimente wurden vier verschiedene Gene aus dem *L. cuprina*-Genom ausgewählt, deren Funktionen im Insekt mit hoher Wahrscheinlichkeit essenziell sind. Die mögliche Ausschaltung der hier genannten Gene durch RNAi-Induktion versprach daher die Ausbildung eines phänotypischen Effektes, wobei die Identifizierung von sogenannten Letal-Targets möglich erschien.

##### **1. ACETYLCHOLINESTERASE**

Acetylcholin ist ein Transmitter im zentralen Nervensystem und wird im synaptischen Spalt vom Enzym Acetylcholinesterase in Acetat und Cholin gespalten. Klassische Insektizide wie z.B. Phosphorsäureester hemmen das Enzym irreversibel und führen so zur toxischen Anreicherung des Acetylcholins an der postsynaptischen Membran (vgl. 2.1.1). Nach

Untersuchungen von CHEN et al. (2001) liegt das *ace*-Gen im *L. cuprina*-Genom als *Single-Copy*-Gen vor und erschien darum besonders geeignet für den Versuch der Genexpressionshemmung mittels RNAi.

## 2. GLUTAMAT-GESTEUERTER CHLORIDKANAL

Der Glutamat-gesteuerte Chloridkanal ist Zielstruktur (*Target*) der Avermectine und ihrer Derivate, die als Antiparasitika gegen Endo- und Ektoparasiten Verwendung finden (vgl. 2.1.1). Die letale Wirkung dieser Insektizide beruht vermutlich auf der permanenten Aktivierung des Ionenkanals. Das Gen des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals ist in *D. melanogaster* kloniert und liegt in einer Kopie vor (CULLY et al. 1996; KANE et al., 2000).

## 3. ADP/ATP-TRANSLOKATOR

Der ADP/ATP-Translokator ist ein mitochondriales Protein, das eine essenzielle Funktion im Energie-Haushalt der Zelle einnimmt. Da es wie das *ace*-Gen und *gluch*-Gen in *D. melanogaster* als *Single-Copy*-Gen beschrieben wird (ZHANG et al., 1999), könnte dies ebenfalls für *L. cuprina* gelten. In Hefen wurde die Genexpressionshemmung dieses Gens bereits als letal nachgewiesen (Miniphänotyp).

## 4. HISTON H3

Das Histon H3 ist ein bedeutender Baustein der Chromatin-Struktur und wird als essenziell für höhere Eukaryonten angesehen. Die Genkopienzahl dieses Histons in *L. cuprina* ist nicht bekannt. Die Sequenz-Homologie der Histonproteine ist schon im Speziesvergleich jedoch derart hoch, dass eine Hemmung dieses Histon H3-Gens das Auftreten von phänotypischen Effekten vermuten lässt. Des Weiteren diene Histon H3 als interne Kontrolle für die Messung des mRNA-Spiegels in adulten *L. cuprina* (vgl. 4.8).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Versuchsorganismus *L. cuprina*

Die Goldfliege, *L. cuprina*, ist ein in Australien und Südafrika weit verbreiteter Myiasis-Erreger, der vorzugsweise Schafe befällt (KETTLE, 1990). Sie kann relativ einfach unter Laborbedingungen gezüchtet werden (WYNIGER, 1978) und wird deshalb im breiten Umfang zur Testung von Substanzen auf insektizide Wirksamkeit (*Bioscreen*) verwendet.

##### ZUCHT VON *L. cuprina*

Die Imagines wurden in einem Kunststoffgaze Käfig (30 x 30 x 30 cm) gehalten und wöchentlich mit frischem Wasser und Futter versorgt. Dazu wurde ein Plastikbecher (750 ml) mit Leitungswasser befüllt, mit einem Fließtuch abgedeckt und kopfüber auf den Käfig gestellt. Das zur Lebenserhaltung verwendete Fliegenfutter (Traubenzucker:Milchpulver-Gemisch 2:1) wurde ebenfalls auf die Gaze-Abdeckung des Käfigs aufgelegt. So konnten die Fliegen Futter und Wasser durch die Käfiggaze aufnehmen.

Zur Stimulation der Eiablage und anschließenden Fütterung der Larven wurden etwa 2 - 4 Wochen alten Fliegen handelsübliches Hundefutter aus Dosen (alternativ Schaf- oder Rinderhackfleisch) angeboten. 3 - 4 Stunden nach Einbringen des Fleisches legten die Imagines ihre Eier in Eipaketen in die Spalten und Ritzen des zerklüfteten Fleischmediums. Der Zeitpunkt des Larvenschlupfes war temperaturabhängig. Bei 24 °C bis 29 °C Umgebungstemperatur und 60 - 95 % Luftfeuchte schlüpften die L<sub>1</sub> bereits nach 24 Stunden. Bei niedrigeren Temperaturen von ca. 20 °C erfolgte der Schlupf etwa 72 Stunden nach Eiablage. Zur weiteren Entwicklung wurden die frisch geschlüpften Larven inklusive des Fleischmediums in große Schalen (Durchmesser von ca. 20 cm) gegeben, die sich wiederum in einer mit Vermiculit<sup>®</sup> befüllten größeren Kunststoffwanne (ca. 50 x 60 cm) befanden. Vermiculit<sup>®</sup> ist ein aus Aluminium-Eisen-Magnesium-Silikat industriell hergestellter Dämmstoff (Fa. Klein, D-67308 Zellertal), der leicht zusammendrückbar und luftdurchlässig sowie feuchtigkeitaufsaugend ist. Die im weiteren Entwicklungsverlauf aus dem Fleischmedium in die Vermiculit<sup>®</sup>-Wanne auswandernden L<sub>3</sub> finden hier ideale Bedingungen zur Verpuppung.

Bei täglicher Zugabe von Hundefutter oder Muskelfleisch erfolgte die larvale Entwicklung über L<sub>2</sub> zu L<sub>3</sub> bei 24 °C bis 29 °C und 60 - 90 % Luftfeuchte. Die regelmäßige Futterzugabe und Kontrolle der Larvendichte war von wesentlicher Bedeutung, da bei nicht ausreichendem Nahrungsangebot und zu hoher Larvendichte die Larven frühzeitig das Zuchtmedium verließen, um zur Verpuppung in die Vermiculit<sup>®</sup> befüllte Wanne auszuwandern. Solche L<sub>3</sub> waren aufgrund ihrer generell niedrigeren Schlupfrate und der Entwicklung von Imagines geringerer Größe nicht für den Einsatz zur RNAi-Genexpressionshemmung geeignet. Durch ein rechtzeitiges Aufteilen der Larven auf mehrere Aufzuchtbehälter konnte diesem unerwünschten Larvenverhalten vorgebeugt werden. Nach 5 - 7 Tagen wanderten die L<sub>3</sub> aus dem feuchten Zuchtmedium ins Vermiculit<sup>®</sup>, um sich dort bei regulärer Entwicklung nach weiteren 3 - 5 Tagen zu verpuppen.

#### SYNCHRONISATION

Um Stadium-homologe L<sub>3</sub>-Versuchskollektive zu gewinnen, wurden die L<sub>3</sub> nach Einstellung der Futteraufnahme und Auswandern ins Vermiculit<sup>®</sup>-Medium abgesammelt. Für die RNAi-Genexpression-Hemmungsversuche wurden solche L<sub>3</sub> unmittelbar eingesetzt, die über Nacht (in einem Zeitraum von 15 h bis 20 h) vom Fleischmedium in eine frisch bereitgestellte Vermiculit<sup>®</sup>-Wanne ausgewandert waren.

#### HALTUNG VON L<sub>3</sub> NACH INJEKTION DOPPELSTRÄNGIGER RNA (vgl. 3.11.2)

20 ml-Probengefäße (mit Deckel) wurden etwa bis zur 10 ml-Markierung mit Vermiculit<sup>®</sup> befüllt. Um die Sauerstoffzufuhr im Gefäß zu gewährleisten, wurde der Deckel mehrfach fein gelocht (Lochung: ca. 1 bis 2 mm). Je 10 L<sub>3</sub> wurden nach Injektion mit doppelsträngiger RNA in ein so vorbereitetes Probengefäß verbracht. Um den L<sub>3</sub> günstige klimatische Bedingungen für Verpuppung und Schlupf zu bieten, wurden diese zur weiteren Entwicklung bei 24 °C bis 29 °C und 60 - 95 % Luftfeuchte im Klimaraum gehalten.

### 3.2 Vektoren

pCR <sup>®</sup> 2.1-Topo <sup>®</sup> (3.9 kb)	(Invitrogen)
pGEM <sup>®</sup> -T (3.0 kb)	(Promega)
pGEM <sup>®</sup> -9z f(-) (2.9 kb)	(Promega)

### 3.3 Bakterienstämme

JM 109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, laq qZΔM15</i> ] (IPTG-inducible T7 Polymerase)(RNase III minus)
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>

### 3.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:	BamH I	(NEB)
	EcoR V	(NEB)
	Hind III	(NEB)
	Nco I	(NEB)
	Not I	(NEB)
	Pst I	(NEB)
	Spe I	(NEB)
	Xba I	(NEB)
SP6-RNA-Polymerase	(Promega)	
T7-RNA-Polymerase	(Promega)	
Taq DNA-Polymerase	(Promega)	
RQ1-RNasefree DNase	(Promega)	

RNase A	(Qiagen)
RNase-Inhibitor	(Promega)

### 3.5 Primer

Zur Durchführung der RNAi-Genexpression-Hemmungsversuche wurden neben den 3'- und 5'-Enden ausgewählter Gene auch komplette cDNAs getestet. Die Primer zur Herstellung der PCR-Fragmente aus den Genen Acetylcholinesterase, ADP/ATP-Translokator, Glutamat-gesteuerten Chloridkanal und Histon H3 wurden anhand der gewünschten Fragmentgröße, des Guanin-Cytosin-Gehalts (GC) sowie der Schmelztemperatur ausgewählt. Mit Ausnahme des Histon H3s erfolgte die Auswahl der spezifischen Primerpaare für jedes Gen anhand der bereits bekannten *Lucilia*-Gensequenz. Spezifische und degenerierte Primer wurden von der Firma MWG-BioTech geliefert.

Zur Gewinnung von cDNA und cDNA-Fragmenten mittels RT-PCR und PCR (vgl. 3.9.3.1 und 3.9.3.2) kamen die folgenden spezifischen Primer zum Einsatz:

#### Primer für Acetylcholinesterase-Amplifikate

LuCu- <i>ace</i> -for1	5' -GCGCGTCTACTATTATGGCTCGT- 3'
LuCu- <i>ace</i> BamH I-for1	5' -TCCGGATCCATGGCTCGTTTTATAACAACA TCATCATCACCAACA- 3'
LuCu- <i>ace</i> -rev1	5' -TTTTTATTGAAAAATGCATGTGACCA- 3'
LuCu- <i>ace</i> -rev2	5' -TCGCAGACGGGCCTTTGCTGGAG- 3'

#### Primer für Glutamat-gesteuerter Chloridkanal-Amplifikate

LuCu- <i>gluch</i> -for1	5' -ATGGGAACCGGCCATTATTTTTGGG- 3'
LuCu- <i>gluch</i> -for2	5' -TGTCACCACTCTCCTAACCAATGGC- 3'
LuCu- <i>gluch</i> -rev1	5' -TTACTCATCCTCCTCTTCAC- 3'
LuCu- <i>gluch</i> -rev2	5' -CGTAGTGAACAAATTTGACGATCC- 3'

#### Primer für ADP/ATP-Translokator-Amplifikate

LuCu- <i>adp/atp</i> -for1	5' -GCAAAATGGGTAAGGAAGCTGCTGA- 3'
LuCu- <i>adp/atp</i> -for2	5' -GGTGCCACTTCCCTCTGCTTCGTC- 3'



Zur Durchführung der Kolonien-PCRs kamen neben den spezifischen Primern der jeweiligen cDNA und des cDNA-Fragments die nachfolgenden Primer zum Einsatz (vgl. 3.9.3.3):

T7-uni	5' -TAATACGACTCACTATAGGG- 3'
M13-for	5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC- 3'
M13-rev	5' -AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA- 3'

### 3.6 Medien

LB-Flüssigmedium	10 g/l Bactotrypton (Difco, Lot-Nr. 3085056) 5 g/l Bacton Yeast Extract (Fluka, Lot-Nr. 1273001) 10 g/l Natriumchlorid (Riedel de Haen)
LB-Festmedium	3 % Bacto-Agar (Difco, Lot-Nr. 1348006) in LB-Flüssigmedium; zur Herstellung des LB-Festmediums wurde das Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 3 % Bacto-Agar versetzt.
LB/Amp	100 µg/ml Ampicillin (Fluka) in LB
LB/Kana	25 µg/ml Kanamycin (Sigma) in LB
LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar	LB-Festmedium wird in der Mikrowelle verflüssigt; nach Abkühlung auf 45 °C bis 50 °C erfolgt die Zugabe von Ampicillin (10 µg/ml), IPTG (0,5 mM) und X-Gal (40 µg/ml) und das Ausgießen der Platten
SOC	20 g Bactotrypton (Difco) 5 g Yeast Extract (Fluka, Lot-Nr. 1273001) 0,5 g Natriumchlorid (Riedel de Haen) 20 mM Glukose (Merck, Chargen-Nr. K29023742 ),

(Zugabe von sterilfiltrierter (0,2 µm) Glukose erst nach dem Autoklavieren) in 1 l MQ-H<sub>2</sub>O. Das Medium wurde zum Teil als Fertigreagenz von Fluka bezogen.

Alle flüssigen Medien wurden 20 min autoklaviert. Der Zusatz von Antibiotika erfolgte nach dem Abkühlen auf unter 50 °C.

### 3.7 Puffer und Lösungen

Gel-Ladepuffer für DNA-Gele:

1) 3x SDS Sample Buffer (NEB)

2) 5 x Orange G Loading Buffer:

50 % Glycerol (Riedel de Haen)

5 mM EDTA (Fluka)

0,3 % Orange G (Merck)

2x Denaturierungspuffer für

TBE-RNA-Gele:

2 x TBE (Sigma)

13 % Ficoll 400 (Fluka),

0,01 % Bromphenolblau (Fluka),

7 M Harnstoff (Sigma)

10 x TAE-Puffer:

48,45 g/l Tris (Fluka)

27,21 g/l Natriumacetat (Sigma)

3,72 g/l EDTA (Sigma)

zur Herstellung von 1x TAE-Gebrauchslösung wurde der 10 x TAE-Puffer 1:10 mit MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt.

IPTG:

100 mM Isopropylthio-β-D-galactosid (Peqlab)  
in MQ-H<sub>2</sub>O

X-Gal:	40 mg/ml in Dimethylformamid (Sigma)
Ampicillin-Stammlösung (Fluka):	100 mg/ml in MQ-H <sub>2</sub> O
Kanamycin-Stammlösung (Sigma):	25 mg/ml in MQ-H <sub>2</sub> O
Lösung I für Plasmidschnellpräparation (Sol I):	100 mM NaOH (Riedel de Haen), 1 mM EDTA (Fluka), 0,5 % SDS (Fluka)
Lösung II für Plasmidschnellpräparation (Sol II):	3 M Natriumacetat pH 5,2 (Sigma)
Extraktionspuffer für Acetylcholinesterase-Assay (NaP <sub>i</sub> -Puffer):	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0 (Sigma) 1 mM EDTA pH 7,0 (Fluka)
Stammlösung für Acetylcholinesterase-Assay:	15,6 ml 0,1 M NaP <sub>i</sub> pH 7,0 + 0,2 ml BSA (10 mg/ml, NEB), + 2,0 ml DTNB (5 mM, Sigma)
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	(Fluka)
Heringssperma-DNA	(Sigma)
Baker's yeast tRNA	(Sigma)

### 3.8 Geräte und Materialien

Elektrophoresekammer	(BioRad)
Thermocycler Tpersonal Kombi	(Biometra)
Thermocycler T-Gradient	(Biometra)
Thermomixer	(Eppendorf)
Kühl-Tischzentrifuge 5415 R	(Eppendorf)

Tischzentrifuge 5415 D	(Eppendorf)
Tischzentrifuge Biofuge A	(Heraeus)
Zentrifuge Rotixa/AP	(Hettich)
Zentrifuge Rotina 46RS	(Hettich)
UV-Photometer GeneQuant	(Amersham Pharmacia Biotech)
Photometer LKB Ultrospec III	(Pharmacia)
Kunststoff Küvetten	(VWR)
Milli-Q Gradient A10	(Millipore)
Mikro-Dismembrator S	(Braun / Biotech International)
AIDA (Advanced Image Data Analyzer)	(Raytest)
Axiovert 135 (Kamera)	(Zeiss)
STEMI SV8 (Mikroskop)	(Zeiss)
50 ml Stehrandröhrchen	(Greiner)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	(Eppendorf)
PCR-Tubes	(Simport)
Vermiculit <sup>®</sup> , Körnung 2 (0 - 3 mm)	(Fa. Klein, D-67308 Zellertal)
20 ml-Probengefäß mit Deckel, REF 73.650)	(Sarstedt)
Mikroapplikator PAX 100 (mit Fußschalter)	(Burkard Scientific)
Sterile Einmalspritzen, 1 ml	(Dispomed)

### **Schlauchsystem**

Tygon LFL, ID: 0,38 mm;

Wanddicke: 0,91 mm;

Color Code orange/green (Merck)

### **Sterile Einmalkanülen zur Injektion**

30 G x ½, 0,39 x 12 mm (Braun)

### **Adapter**

Kunststoff-Fitting Nr. 731-8224 und Slip-Fitting (BioRad)

Kanüle 23 G x 1, 0,60 x 25 mm (Braun)

## 3.9 Molekularbiologische Methoden

### 3.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

#### 3.9.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus L<sub>3</sub> und Adulten von *L. cuprina*

TRI REAGENT™	(Sigma)
Chloroform	(Fluka)
Isopropanol	(Riedel de Haen)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)
DEPC-H <sub>2</sub> O	(Fluka)

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels TRI REAGENT™. Das dazugehörige Protokoll von Sigma diente hierbei als Grundlage, wurde jedoch teilweise leicht abgewandelt eingesetzt. TRI REAGENT™ ist eine chaotrope Denaturierungslösung, die Guanidiniumthiocyanat und Phenol enthält und für die Homogenisierung von Zellen und Gewebe eingesetzt wird. Aus derartigen Homogenaten lassen sich in einem Arbeitsgang intakte RNA und DNA, sowie denaturierte Proteine gewinnen: Durch Zugabe von Chloroform zum Gewebshomogenat und anschließender Zentrifugation erhält man drei übereinander liegende Phasen. In der untersten Phase (Phenol/CHCl<sub>3</sub>) befinden sich die Proteine, in der mittleren sogenannten Interphase die DNA und in der oberen wässrigen Phase die RNA. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung der Methode von CHROMCZYNSKI und SACCHI (1987) zur Isolierung von Gesamt-RNA.

Die frisch gewonnenen L<sub>3</sub> und die nüchternen Imagines von *L. cuprina* wurden in 50 ml-Stehrandröhrchen mit gelochtem Deckel eingewogen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit Hilfe eines durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörsers und Pistills erfolgte die zügige Homogenisierung der jeweiligen Stadien. Das homogenisierte Material wurde in 50 ml-Stehrandröhrchen überführt und sofort in 1 ml TRI REAGENT™ pro 100 mg Gewebe aufgenommen. Die RNA wurde in diesem Reagenz durch die hohen Konzentrationen von Phenol und Guanidiniumthiocyanat vor Abbau geschützt, das Homogenat konnte bei -70 °C gelagert werden (CHROMCZYNSKI und SACCHI, 1987).

Zur RNA-Anreicherung wurde die Suspension in 1 ml-Aliquote auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und mit 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Homogenat versetzt. Durch kurzes und vorsichtiges Schütteln wurden die beiden Reagenzien vermischt und dann bei 4 °C 15 min bei

13.200 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5415 R Zentrifuge). Nach der Zentrifugation wurde die RNA im wässrigen Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Das nach 10-minütiger Zentrifugation (4 °C, 13.200 rpm) geformte Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und danach an der Luft getrocknet. Die Lösung des Pellets erfolgte mit DEPC-H<sub>2</sub>O bei 57 °C im Wasserbad. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen Gesamt-RNA erfolgte UV-photometrisch bei  $\lambda = 260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$  (UV-Photometer, GeneQuant). Die Gesamt-RNA wurde bei -70 °C gelagert.

### 3.9.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus einzelnen, adulten *L. cuprina*

RNeasy Kit	(Qiagen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	(Sigma)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)

Nach der Injektion von doppelsträngiger RNA in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> (vgl 3.11) wurden geschlüpfte Fliegen täglich gezählt und so die Schlupfrate nach RNAi-Genexpressionshemmung bestimmt. Die Gruppe der mit *ace*-3'-Endfragment injizierten Fliegen sowie die unbehandelte Kontrollgruppe wurden in flüssigem Stickstoff getötet und bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus diesen Fliegen wurde das RNeasy Kit verwendet. Die Angaben des Herstellerprotokolls *RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues* wurden mit nur geringfügigen Abweichungen, die im Nachfolgenden beschrieben werden, befolgt. Die Aufreinigung der RNA erfolgt hier über Homogenisierung des Ausgangsmaterials und Denaturierung mit Guanidiniumisothiocyanat enthaltendem Puffer, der RNasen sofort inaktiviert. Die Zugabe von Ethanol-haltigem Puffer sorgt für die Bindung der RNA an Silicagel-Membranen bei gleichzeitiger Auswaschung von Kontaminationen. Mit Wasser können dann bis zu 100  $\mu\text{g}$  RNA mit einer Länge von >200 b eluiert werden. Über die genaue Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Reagenzien (RLT-Puffer, RW1-Puffer, RPE-Puffer) macht der Hersteller keine Angaben. Vor Gebrauch müssen zum RLT-Puffer  $\beta$ -Mercaptoethanol (10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -ME/1 ml RLT-Puffer) zugegeben und der RPE-Puffer mit 4 Volumen Ethanol (96 - 100 %) ergänzt werden.

Die gefrorenen Fliegen wurden für diese Prozedur einzeln auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach sofortiger Zugabe von 600 µl RLT-Puffer und 6 RNase-freien Metallbeads je Fliege wurde 2 min durch Schütteln im Mikro-Dismembrator S bei 2.500 rpm homogenisiert. Durch 3-minütige Zentrifugation bei 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 D) wurde der Überstand gewonnen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Um sämtliche Partikel aus dem Lysat zu entfernen, wurden Zentrifugation und Lysat-Gewinnung (abweichend vom Herstellerprotokoll) noch zweimal wiederholt. Je Fliege wurden 450 µl des gewonnenen Lysats zur Isolierung der Gesamt-RNA eingesetzt. Nach Zugabe und Mischen des Lysats mit einem Volumen Ethanol (70 %) wurde das Gemisch auf eine RNeasy Mini-Säule (*RNeasy Mini Column*) gegeben und 15 Sekunden lang bei  $>8.000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Gelmatrix der Säule mit 700 µl RW1-Puffer mittels Zentrifugation gewaschen (15 Sekunden,  $>8.000 \times g$ ). Es folgte die zweimalige Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule mit entsprechenden Zentrifugationsschritten, wobei der letzte auf 2 min verlängert wurde, um die RNeasy Silicagel-Membran zu trocknen. Abschließend wurde die Säule in ein frisches Röhrchen überführt, um die Gesamt-RNA einer Fliege mit jeweils 2 x 30 µl RNase freiem Wasser zu eluieren.

Zur Kontrolle der Gesamt-RNA wurden von den ersten Aufreinigungen je 2,5 µl des Eluates auf ein 1,5%iges TBE-Gel gegeben. Die Konzentration der aus jeder Einzelfliege isolierten Gesamt-RNA wurde UV-photometrisch (UV-Photometer GeneQuant) bei  $\lambda = 260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$  bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.9.2 Isolierung von Poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA

MACS mRNA Isolation Kit

(Miltenyi Biotec)

Oligotex mRNA Kit

(Qiagen)

Zur Isolierung von Poly(A)-RNA wurden zwei verschiedene Kits getestet. Dies waren das ‚MACS mRNA Isolation Kit‘ von Miltenyi Biotec sowie das ‚Oligotex mRNA Spin-Column Protocol‘ von Qiagen. Die ersten Isolierungen wurden mit dem Miltenyi Biotec Kit durchgeführt, wobei die Vorgaben des Hersteller-Protokolls genau eingehalten wurden: Es erfolgt eine Denaturierung der Gesamt-RNA durch einen Lysepuffer, der auch die Bindung an Oligo(dT) unterstützt. Nach der Zugabe von Oligo(dT)MicroBeads, welche hoch

paramagnetisch sind, kommt es zur Hybridisierung der Poly(A)-RNA an Oligo(dT). Die Microbead-Suspension wird sodann auf eine MACS-Säule, Typ M, gegeben, welche während der gesamten Isolierung einem Magnetfeld ausgesetzt ist. Die Poly(A)-RNA wird mit den Beads während der nachfolgenden Waschschriffe durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten. Erst durch die Zugabe des Elutionspuffers, der auf 65 °C erwärmt wird, löst sich die mRNA von den Beads und kann durch die Schwerkraft aus der Säule entfernt und aufgefangen werden.

Da die Ausbeute an Poly(A)-RNA jedoch im Durchschnitt sehr gering war, wurde eine weitere sich leicht davon unterscheidende Methode zur Gewinnung von mRNA herangezogen: Beim ‚Oligotex mRNA Spin-Column Protocol‘ von Qiagen wird die Poly(A)-RNA ebenfalls durch die Ausnutzung des Poly(A)-Schwanzes an eine feste Oligo(dT)-Matrix (‚Oligotex-Suspension‘) gebunden. Im Gegensatz zum Miltenyi-Kit werden hier das Waschen und die Elution der mRNA über Zentrifugationsschritte durchgeführt. Auch hier wurden die Vorgaben des Hersteller-Protokolls befolgt: RNase-freies Wasser, Bindungspuffer (OBB) und Oligotex Suspension wurden entsprechend der Anleitungen zur in Wasser gelösten Gesamt-RNA zugegeben und für 3 min in einem 70 °C heißem Wasserbad inkubiert. Die anschließende Hybridisierung des Poly(A)-Schwanzes der mRNAs mit den Partikeln der Oligotex Suspension erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in Waschpuffer (OW2) resuspendiert und in eine Spin-Säule (*Spin Column*) überführt. Nach der Zentrifugation erfolgte eine weitere Waschung mit OW2-Puffer in gleicher Weise. Der auf 70 °C erwärmte Elutionspuffer (OEB) wurde auf die Säulenmatrix gegeben, um dann die mRNA durch erneute Zentrifugation in einem frischen Reaktionsgefäß zu sammeln. Zur Erhöhung der Poly(A)-RNA-Ausbeute wurde abweichend vom Herstellerprotokoll die Elution mit 3 x 50 µl erwärmten Elutionspuffer (70 °C) durchgeführt.

### **3.9.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

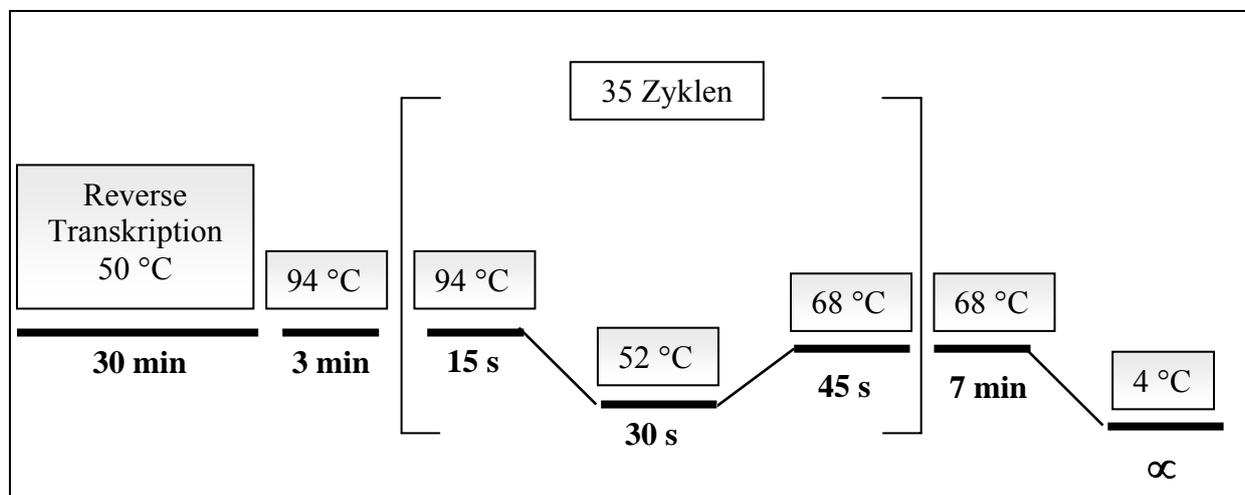
In dieser Arbeit wurden neben der RT-PCR eine Standard-PCR und eine Kolonien-PCR durchgeführt. Für die RT-PCR wurde das Titan One Tube RT-PCR System (Roche) verwendet. Das Expand High Fidelity PCR System (Roche) diente für die Standard- und

Kolonien-PCR. Die eingesetzten Primer von MWG-Biotech wurden nach deren Vorgabe (100 pmol/ $\mu$ l) in sterilem, RNase- und DNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und in der in den jeweiligen Protokollen angegebenen Menge eingesetzt. Als Thermocycler kamen der TGradient und der TPersonal Kombi zum Einsatz.

### 3.9.3.1 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

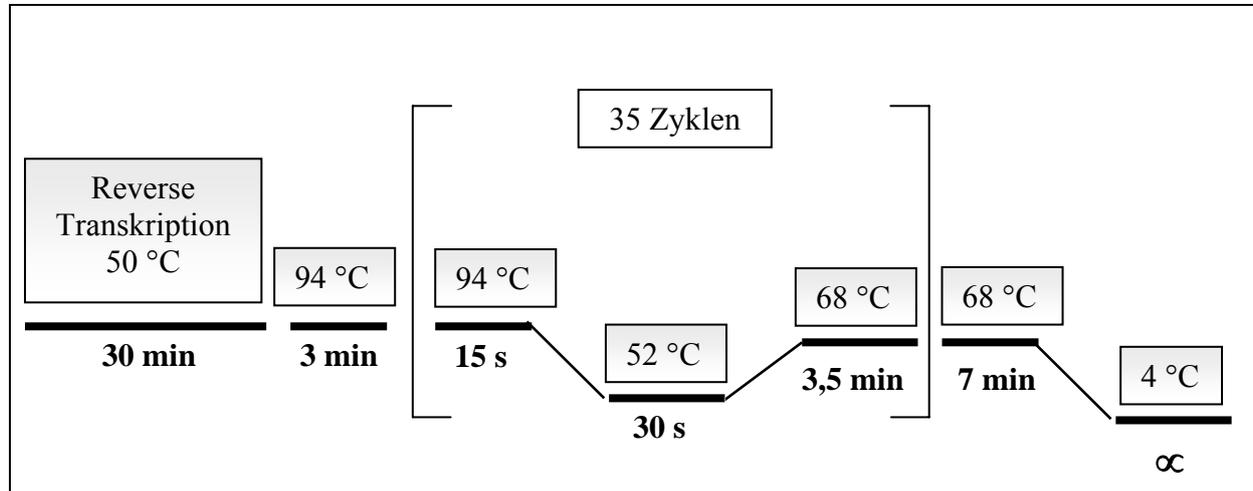
Titan One Tube PCR System	(Roche)
RNAsin (40 U/ $\mu$ l)	(Promega / Roche)
Primer	(vgl. 3.5)
dNTPs (20 mM)	(NEB)

Das Titan One Tube PCR System arbeitet mit der AMV-Reversen Transkriptase, eine DNA-Polymerase, die sowohl mit RNA als auch DNA als Matrize DNA synthetisieren kann. Des Weiteren besitzt sie eine DNA-Exonuklease-Aktivität und RNase H-Aktivität. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 42 °C; sie kann für kurze Zeit jedoch auch bei bis zu 60 °C zur reversen Transkription eingesetzt werden. Zusammen mit der Taq-Polymerase oder anderen thermotoleranten DNA-Polymerasen ist es mit diesem System möglich, die Erststrangsynthese und die eigentliche PCR ohne Unterbrechung in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Der Ansatz der RT-PCR wurde entsprechend den Angaben des Herstellers gestaltet. Als *Template* dienten 500 ng Gesamt-RNA oder 50 ng Poly(A)-RNA von *L. cuprina*-L<sub>3</sub> oder -Adulten. Der Aufbau des RT-PCR-Programms für Fragmente <1 kb erwarteter Länge ist im Schema 1 dargestellt.



**Schema 1:** Aufbau des RT-PCR-Programms für Fragmente <1 kb erwarteter Länge

Zur Amplifizierung von größeren Fragmenten mit mehr als 1 kb wurde der Elongationsschritt (68 °C) bis auf 3,5 min verlängert. Das entsprechende RT-PCR-Programm ist in Schema 2 dargestellt.



**Schema 2:** Aufbau des RT-PCR-Programms für Fragmente >1 kb erwarteter Länge

#### RT-PCR MIT 2 PRIMERPAAREN

Aus mit doppelsträngiger RNA behandelten Fliegen wurde Gesamt-RNA gewonnen, die als *Template* für eine RT-PCR mit 2 Primerpaaren diente. Das Protokoll des Titan One Tube RT-PCR Systems wurde, mit der zusätzlichen Zugabe des zweiten Primerpaares, befolgt. Wie auch bei der Durchführung mit nur einem Primerpaar, wurden 0,1 µl jedes Primers zur Reaktion zugegeben und der Ansatz abschließend auf 25 µl Gesamtvolumen mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Das RT-PCR-Programm (vgl. 3.9.3.1, Schema 1) konnte ebenso übernommen werden, wobei die Zahl der Zyklen auf 28 reduziert wurde.

In einer vorab auf identische Weise durchgeführten sequenziellen PCR wurde diese Zyklenzahl zuvor ermittelt. Dabei wurden nach 24, 26, 28, 30, 32 und 34 Zyklen jeweils 2,5 µl des Ansatzes entnommen und sofort auf Eis gestellt. Die entnommenen Proben wurden sodann nebeneinander auf ein TAE-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese beurteilt (vgl. 3.9.4). Es wurde schließlich die Zyklenzahl gewählt, bei der die Reaktion einen linearen Verlauf zeigte (28 Zyklen).

### 3.9.3.2 PCR mit cDNA als Template

DNA-Fragmente >1 kb ließen sich zum Teil nicht mittels oben beschriebener RT-PCR (vgl. 3.9.3.1) amplifizieren. In diesem Fall wurde der Reaktionsschritt der reversen Transkription gesondert durchgeführt und erst die vorab synthetisierte cDNA (1.) in eine Polymerasekettenreaktion (2.) eingesetzt.

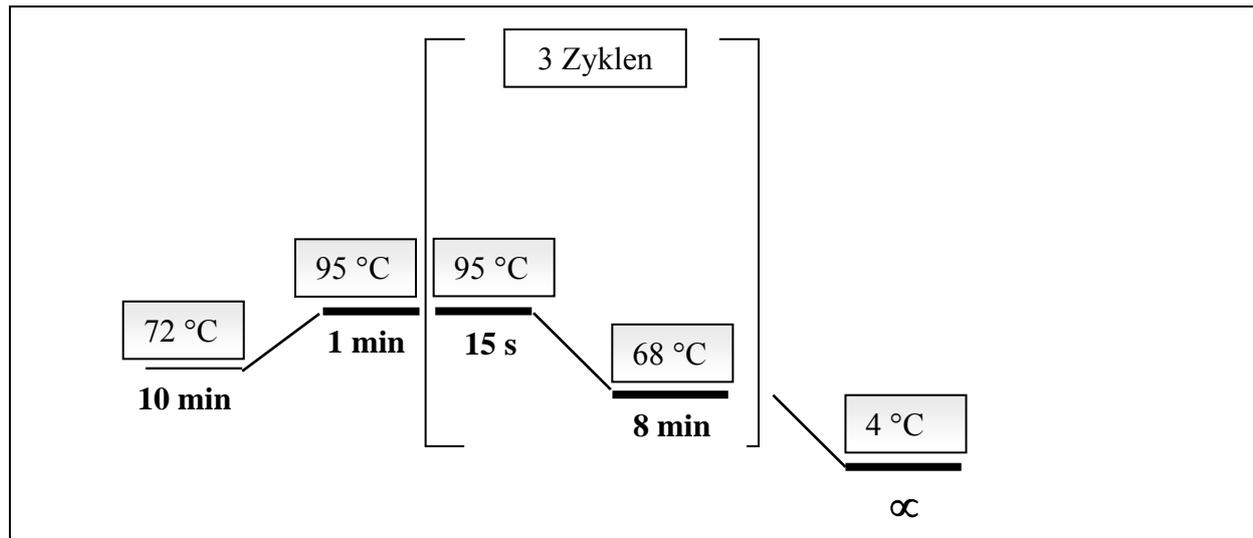
#### 1. HERSTELLUNG VON cDNA

Creator<sup>TM</sup>SMART<sup>TM</sup>cDNA Library Construction Kit (Clontech)

25 mM Natronlauge (NaOH) (Riedel de Haen)

Zur Gewinnung der cDNA wurde das ‚First-Strand cDNA Synthesis Protokoll‘ des ‚Creator<sup>TM</sup>SMART<sup>TM</sup>cDNA Library Construction Kit‘ verwendet. Dabei wurde eine Ausgangsmenge von 1 µg Poly(A)-RNA eingesetzt. Für die First-Strand-cDNA-Synthese wurden in einem sterilen 0,5 µl Reaktionsgefäß X µl Poly(A)<sup>+</sup> RNA (X µl = 1 µg RNA), 1 µl SMART IV Oligonucleotide, 1 µl CDS III/3' PCR Primer pipettiert und mit deionisiertem Wasser auf 5 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Inkubation der Mischung erfolgte bei 72 °C (2 min). Nach 2-minütigem Abkühlen auf Eis wurden 2 µl Puffer (5x First-Strand Buffer), 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl PowerScriptTranscriptase (keine Konzentrationsangabe im Herstellerprotokoll) hinzugegeben. Der Ansatz (10 µl Gesamtvolumen) wurde vorsichtig gemischt und eine Stunde lang bei 42 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation (Amplifikation des ersten cDNA-Stranges) erfolgte die Zugabe von 1 µl NaOH (25 mM). Dann wurde die Mischung nochmals 30 min bei 68 °C inkubiert, um die RNA zu hydrolysieren.

Der cDNA-Synthese-Ansatz kann auf dieser Stufe bei -20 °C bis zu drei Monate lang aufbewahrt werden. Für die Amplifikation des zweiten cDNA-Stranges wurden zu den 11 µl aus den ersten Reaktionen 71 µl deionisiertes Wasser, 10 µl Puffer (10x Advantage 2 PCR Buffer), 2 µl 50x dNTP Mix, 2 µl 5' PCR Primer, 2 µl CDS III/3' PCR Primer und 2 µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix zu einem Endvolumen von 100 µl zusammenpipettiert. Die Lösung wurde gemischt und in einen auf 95 °C erhitzten Thermocycler gestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte entsprechend dem PCR-Programm im Schema 3.



**Schema 3:** Aufbau des PCR-Programms zur Herstellung von cDNA

## 2. AMPLIFIKATION MIT cDNA

Expand High Fidelity PCR System

(Roche)

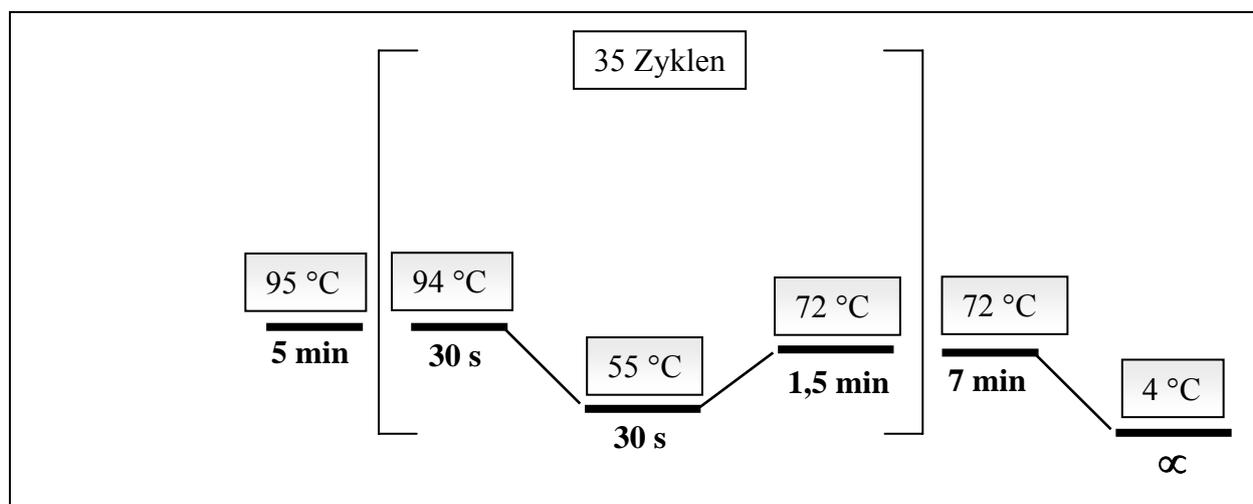
Primer

(vgl. 3.5)

dNTPs (20 mM)

(NEB)

Die hergestellte doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) wurde im Anschluss zur Amplifikation solcher Fragmente verwendet, die sich mit Hilfe der bereits beschriebenen RT-PCR (vgl. 3.9.3.1) nicht synthetisieren ließen. Hierzu wurden 2 µl des ds-cDNA-Ansatzes 1:10 in MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt und 2 µl der Verdünnung in die PCR eingesetzt. Der Aufbau des PCR-Programms für Fragmente >1 kb erwarteter Länge ist in Schema 4 dargestellt.



**Schema 4:** Aufbau des PCR-Programms für Fragmente >1 kb erwarteter Länge

Für die Darstellung von Histon H3 mit degenerierten Primern wurde eine *Touch up*-PCR durchgeführt, bei der die anfängliche *Annealing*-Temperatur von 45 °C schrittweise auf 50 °C erhöht wurde. Im Anschluss wurden noch zusätzliche 25 Zyklen bei 50 °C angefügt, so dass sich eine Gesamtzyklenzahl von 35 ergab.

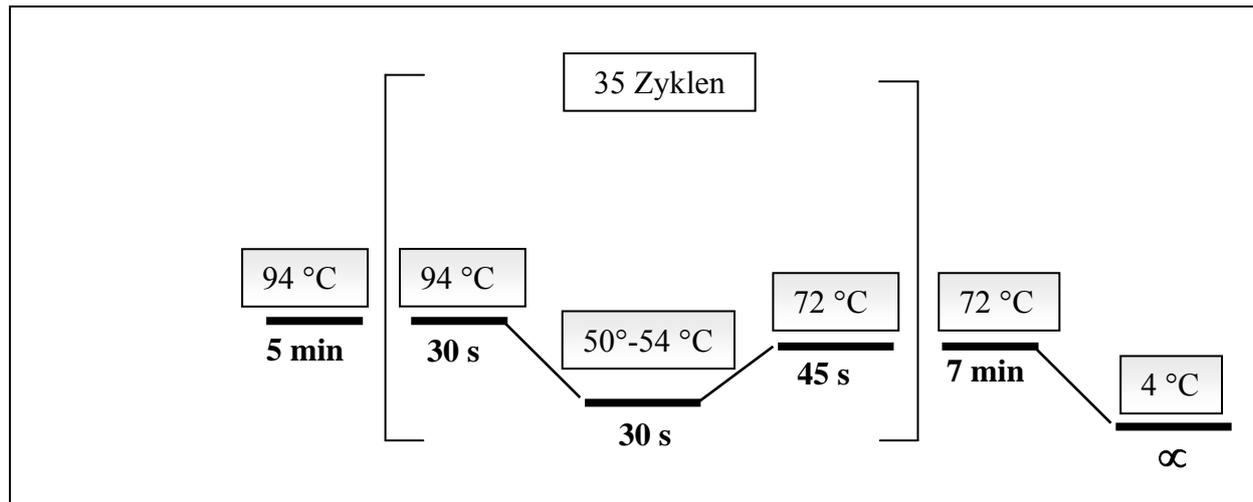
### 3.9.3.3 Kolonien-PCR und Amplifikation mit Plasmid-DNA

Expand High Fidelity PCR System	(Roche)
Primer	(vgl. 3.5)
dNTPs (20 mM)	(NEB)

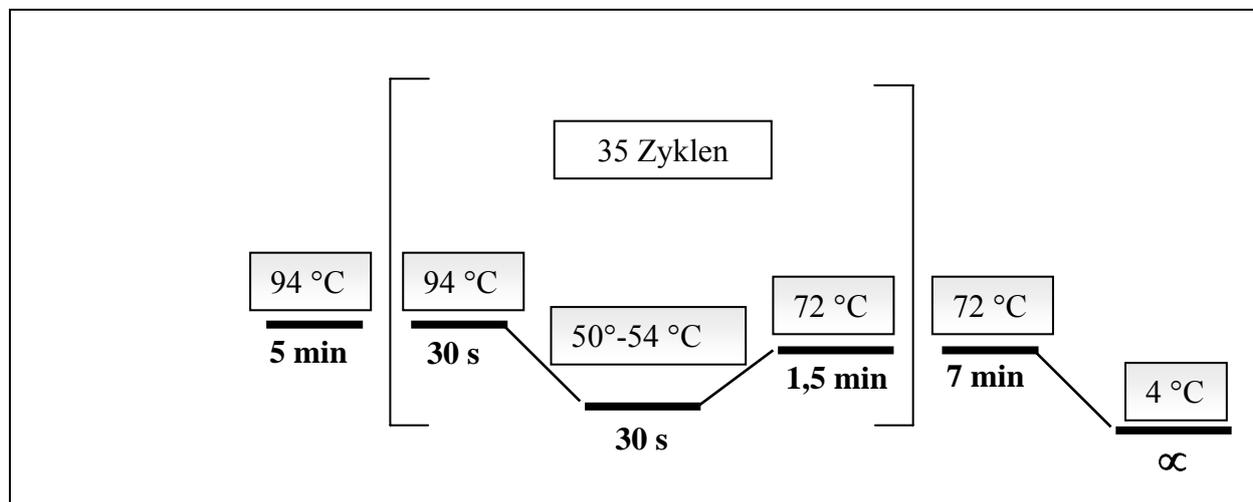
#### KOLONIEN-PCR

Bei Subklonierung von DNA-Fragmenten in entsprechende Plasmidvektoren wurden nach der Transformation (vgl. 3.9.7) mit den erhaltenen Kolonien PCR-Analysen der Plasmid-*Inserts* durchgeführt. Hierbei wurden neben den spezifischen Primern auch der T7 uni-Primer, M13-for- und der M13-rev-Primer verwendet (vgl. 3.5), die den flankierenden Sequenzen der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) der pGEM<sup>®</sup>-T Vektoren komplementär sind. So ist es möglich, das klonierte Fragment zu amplifizieren sowie dessen Anwesenheit und auch dessen Größe über eine Gelelektrophorese zu bestimmen.

Für die Kolonien-PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Der Ansatz der PCR erfolgte mit den hier beschriebenen, geringen Abweichungen entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Bakterienkolonie des jeweiligen Klons wurde mit einem autoklavierten Zahnstocher in 10 µl MQ-H<sub>2</sub>O überführt und resuspendiert. 2 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann dem vorbereiteten PCR-Ansatz zugegeben. Zusätzlich wurde eine weitere Platte mit den gewählten Klonen beimpft. Über diese so genannte Mutterplatte ist eine Zuordnung von Kolonie und PCR-Ansatz leicht möglich. Das PCR Programm wurde aufgrund der unterschiedlichen Größen der erwarteten Fragmente bezüglich der Elongationszeit leicht variiert. Außerdem wurde die *Annealing*-Temperatur je nach verwendeten Primern zwischen 50 °C und 54 °C gewählt. Das Kolonien-PCR-Programm für Fragmente <1 kb erwarteter Länge wurde nach Schema 5 durchgeführt. Das Kolonien-PCR-Programm für Fragmente >1 kb erwarteter Länge erfolgte nach Schema 6.



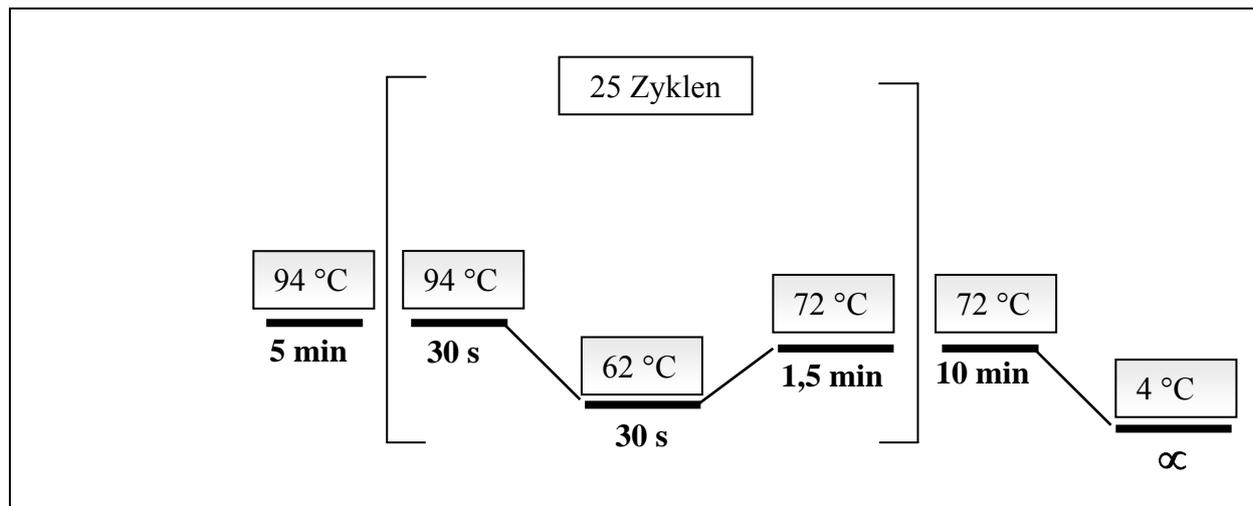
**Schema 5:** Aufbau des Kolonien-PCR-Programms für Fragmente <1 kb Länge



**Schema 6:** Aufbau des Kolonien-PCR-Programms für Fragmente >1 kb Länge

#### AMPLIFIKATION MIT PLASMID-DNA

Das *ace*-5'-Endfragment ließ sich auch nach mehrfachen Versuchen nicht mittels RT-PCR darstellen. Nach Klonierung des *ace*-Gens wurde deshalb eine Amplifikation mit 50 ng Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Hierzu wurde das PCR-Programm in Schema 7 verwendet.



**Schema 7:** Aufbau des PCR-Programms für das *ace-5'*-Endfragment

### 3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

(SAMBROOK und RUSSELL, 2001)

Agarose für Gele	(SERVA)
TAE	(vgl. 3.7)
1 x Tris-Borat-EDTA = TBE	Sigma
Ethidiumbromid	(Fluka)
Gel-Ladepuffer (für DNA und RNA-Gele)	(vgl. 3.7)
DNA-Längenstandard (100 bp - 1,517 kbp / 1 kbp - 10 kbp)	(NEB)
RNA-Längenstandard (500 b - 9 kb)	(NEB)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung längerer DNA- und RNA-Fragmente (>100 bp) wurden Agarosegele eingesetzt. Je nach erwarteter Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 1 bis 2 % eingesetzt. Durch Aufkochen der Agarose in TAE (für DNA) oder in TBE (für RNA) wurde eine klare Agaroselösung hergestellt, zu der nach Abkühlung auf ca. 50 °C 100 ng/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Die Agaroselösung wurde dann in eine entsprechende Flachbettkammer (BioRad) zum Gel ausgegossen. Nach dem Beladen des Gels mit den DNA-/RNA-Proben, die vorher mit maximal 2,5 µl Gel-Ladepuffer (vgl. 3.7) versetzt worden waren, erfolgte die Auftrennung bei 3 - 5 V/cm. Als Längenstandards dienten zwei DNA-Fragmentreihen, die von 100 bp bis 3 kb oder von 500 bp bis 10 kbp reichten sowie ein Standard für RNA (500 b bis 9 kb). Die

Dokumentation der Gele erfolgte im UV<sub>312 nm</sub>-Durchlicht durch eine Epson Digital Kamera, dem dazugehörigem Verarbeitungsprogramm sowie dem Programm PhotoSuite III.

### 3.9.5 Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Geneclean II Kit	(Bio101)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)
Natriumjodid	(Bio101)
Natriumacetat	(Sigma)
Isopropanol	(Riedel de Haen)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)

Die gewünschte Bande wurde mit Hilfe einer sterilen Einmal-Skalpellklinge aus TAE-Agarosegelen ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte über das Geneclean II Kit oder nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. Die Angaben der Hersteller wurden exakt eingehalten.

Nach dem Wiegen des ausgeschnittenen Gelstückes wurde das dreifache Volumen einer chaotropen Salzlösung (Geneclean: 6 M NaI; Qiaquick: QG-Puffer) zugegeben. Die Agarose wurde bei 50 °C in einem Wasserbad oder Thermomixer gelöst. Die Inkubationszeit (5 - 10 min) variierte je nach Größe des ausgeschnittenen Gelstückes. Bei der Extraktion mit Hilfe des Geneclean Kits wurden nach kompletter Lösung der Agarose 6,5 bis 10 µl Glasmilch zugegeben, gut gemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA an die Glaspartikel zu binden. Die Inkubationszeit wurde bei geringer DNA-Menge auf bis zu 15 min verlängert. Durch eine kurze Zentrifugation (5 - 15 s) bei 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 D) wurden die Glaspartikel pelletiert und dreimal mit NEW Wash, einer aus 50 % Ethanol und Salzen bestehenden Waschlösung, gewaschen (1 min, 13.200 rpm). Aus dem luftgetrockneten Pellet wurde die DNA durch Zugabe von 10 - 30 µl MQ-H<sub>2</sub>O eluiert. Hierbei wurde die Glasmilch-Suspension mit der Pipette gut gemischt und kurz zentrifugiert (1 min, 13.200 rpm). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt.

Bei der Extraktion nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protocol wird nach Auflösung der Agarose die Farbe der Mischung kontrolliert, die der des QG-Puffers (gelb) entsprechen soll. Bei Farbumschlägen nach orange bis violett ( $\text{pH} > 7,5$ ) wurden kleine Mengen 3 M Natriumacetat  $\text{pH} 5,0$  ( $\sim 10 \mu\text{l}$ ) zugegeben, bis die Indikatorfärbung wieder den korrekten  $\text{pH}$ -Wert anzeigte ( $\text{pH} 7,5$ ), da die optimale Bindung der DNA an die Membran nur bei  $\text{pH} \leq 7,5$  erfolgen kann. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde der gesamte Ansatz in eine vorbereitete QIAquick Spin-Säule überführt und 1 min bei 13.200 rpm zentrifugiert, um die DNA an die Säulen-Membran zu binden. Es folgten ein Waschschriff mit 0,5 ml QG-Puffer und ein weiterer mit 0,75 ml PE-Puffer. Zur vollständigen Entfernung des Ethanol (aus PE-Puffer) von der Säule wurde die Spin-Säule abschließend noch einmal 1 min zentrifugiert (13.200 rpm) und anschließend in ein neues Röhrchen überführt. Die Elution der PCR-Fragmente von der Säule erfolgte mittels Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm) mit 30 bis 50  $\mu\text{l}$  EB-Puffer (10 mM TrisCl,  $\text{pH} 8,5$ ) oder Wasser.

### 3.9.6 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung zweier Enden von Nukleinsäuremolekülen mit Hilfe von DNA- oder RNA-Ligasen. DNA-Ligasen katalysieren Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer, im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden, freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Erste Ligationen sowie die darauffolgenden Transformationen wurden mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit durchgeführt, wobei streng die Angaben des Herstellers befolgt wurden (vgl. 3.9.6.1). Der Vektor pCR2.1 stellte sich durch das Fehlen des SP6-Promotors für den weiteren Verlauf der Arbeit jedoch als ungünstig heraus. Aus diesem Grund wurde die Arbeit mit diesem Kit eingestellt.

#### 3.9.6.1 Ligation mit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit

TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit

(Invitrogen)

TOPO10-Zellen

(vgl. 3.3)

Für die ersten Klonierungsversuche mit den PCR-Fragmenten des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (3'- und 5'-Endfragment, vgl. 3.5) wurde das Topo TA Cloning<sup>®</sup> Kit eingesetzt. Vorteile dieser neueren DNA-Fragment-Klonierungsmethode sind nach Auskunft des Herstellers sehr kurze Reaktionszeiten (ca. 5 min), geringer Vektor-Religationshintergrund und hohe DNA-Fragmentligationseffizienz. Anstelle einer Ligase wird hierbei ein Topoisomerase-aktivierter Vektor (pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> 3,9 kbp) verwendet: Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCTT, schneidet die DNA und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent gebunden. Weil dieser Vektor zwei benachbarte Schnittstellen enthält und so beide DNA-Enden durch Topoisomerase blockiert sind, wird eine Selbstligation des Vektors verhindert. (KNIPPERS, 2001: 'Beim Topo-Cloning tragen beide Enden des gespaltenen Vektors kovalent gebundene Topoisomerase, was eine Verknüpfung der Enden verhindert, denn dazu sind freie 3'-OH-Enden notwendig.') Ein wesentlicher Faktor für die höhere Geschwindigkeit der Reaktion ist die Tatsache, dass lediglich 2 Reaktanden gleichzeitig zusammentreffen müssen, während bei klassischen Ligationen das mehrfache Treffen von 3 Komponenten erforderlich ist (ATP, Fragment, Ligase; ATP, Vektor, Ligase; AMP-Vektor, AMP-Fragment, Ligase). Die von der Topoisomerase katalysierte Ligation ist nach 5 min beendet und so deutlich schneller als eine übliche T4-Ligase-Reaktion. Für die ersten Klonierungsversuche wurde dieses Kit wegen der Schnelligkeit und der einfachen Handhabung eingesetzt.

Nach der Ligation und Transformation entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls erfolgte die Anzucht, Selektion und Reinigung transformierter Bakterienklone (vgl. 3.9.8). Die auf diese Weise in den Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> 3,9 kb (vgl. 3.2) klonierten PCR-Fragmente des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (3'- und 5'-Endfragment; vgl. 3.5) wurden mittels Quick-Ligation<sup>™</sup> Kit in den pGEM-9z f(-) Vektor umkloniert (vgl. 3.9.7.1).

### **3.9.6.2 Ligation mit pGEM<sup>®</sup>-T Vector System**

pGEM<sup>®</sup>-T Vector System

(Promega)

Für sämtliche weiteren Ligationen kam der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T zum Einsatz. Zur Ligation mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Vektor wurden 5 µl 2xRapid Ligation Buffer, 1 µl pGEM<sup>®</sup>-T, 1 µl T4 DNA

Ligase und 3 µl DNA-Fragment gemischt und mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 3.9.7 Transformation

pGEM <sup>®</sup> -T Vector System	(Promega)
JM109 <i>E.coli</i> -Zellen	(vgl. 3.3)
SOC-Medium	(vgl. 3.6)
LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agar	(vgl. 3.6)

Zur Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde die Methode des Hitzeschocks von chemisch kompetenten Zellen als Standardmethode gewählt und nach Angaben des Herstellerprotokolls (pGEM<sup>®</sup>-T Vector System) durchgeführt. Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch kompetente JM109 *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. 50 µl der *E.coli*-Suspension wurden zur Ligationslösung gegeben und nach vorsichtigem Mischen 20 min auf Eis gestellt. Darauf folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C und 50 Sekunden mit anschließender 2-minütiger Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 950 µl SOC-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C 1 Stunde geschüttelt. Aliquote wurden auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agar plattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die am Folgetag gepickten Klone (vgl. 3.9.7.2) wurden mittels Kolonien-PCR (vgl. 3.9.3.3) auf das Vorhandensein des korrekten Fragments (*Inserts*) kontrolliert.

#### 3.9.7.1 Umklonierung

QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)
GeneClean Kit	(Bio101)
Quick Ligation <sup>™</sup> Kit	(NEB)
Restriktionsendonukleasen: Hind III und Xba I	(vgl. 3.4)
pGEM <sup>®</sup> -9z f(-) Vektor	(vgl. 3.2)
JM109 <i>E.coli</i> -Zellen	(vgl. 3.3)
SOC-Medium	(vgl. 3.6)
LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agar	(vgl. 3.6)

Zur Umklonierung der beiden Fragmente des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (3'- und 5'-Endfragment; vgl. 3.5) wurden je 2 µg Plasmid und je 1 µg pGEM<sup>®</sup>-9z f(-) mit Hind III und Xba I (20 U/µl) bei 37 °C über Nacht im 50 µl-Ansatz verdaut. Die verdauten Ansätze wurden im präparativen 1%igen TAE-Gel aufgetrennt und die geschnittenen Fragmente als auch der Vektor mittels QIAquick Gel Extraktion Kit in 30 µl Wasser eluiert. Nach der Konzentrationsbestimmung der Eluate wurden die Ligationen mit dem Quick Ligation<sup>™</sup>Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden ein Molaritäts-Verhältnis zwischen *Insert* und Vektor von 3:1 gewählt und der Ansatz mit MQ-H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Es folgten die Zugaben von 10 µl 2x Quick Ligation Buffer und 1 µl Quick T4 DNA-Ligase. Nach dem Mischen des Reaktionsansatzes wurde kurz zentrifugiert, und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Ligation durch Abkühlen der Reaktion auf Eis beendet und unmittelbar mit der Transformation begonnen. Hierfür wurden 2 µl der Ligationsreaktion in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis gekühlt und mit 50 µl einer Suspension mit frisch aufgetauten kompetenten Zellen sanft gemischt. Die Transformation in kompetente JM 109-Zellen wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Je 1/20 eines jeden Ansatzes wurde auf Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die am Folgetag gepickten Klone (3.9.7.2) wurden mittels Kolonien-PCR (vgl. 3.9.3.3) auf das Vorhandensein des korrekten *Inserts* kontrolliert.

### 3.9.7.2 Auswahl der Bakterienklone nach Blau-Weiß-Selektion

Alle verwendeten Vektoren (vgl. 3.2) verfügen über ein Selektionssystem, das die Unterscheidung zwischen Plasmiden mit und ohne *Insert* ermöglichte. Das Prinzip der  $\alpha$ -Komplementation und damit die Wiedererlangung der Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase ermöglicht die Selektion der Klone über ihre Färbung (die Spaltung des Substrates X-Gal in ein blaues Produkt). (IBELGAUFTS, 1993: ‚Dieses als  $\alpha$ -Komplementation bezeichnete Phänomen beruht auf der nicht-kovalenten Reassoziaton von Peptidfragmenten, bei der aus zwei enzymatisch nicht aktiven Proteinfragmenten eine biologisch aktive  $\beta$ -Galaktosidase rekonstruiert wird.‘). Blaue Kolonien tragen in der Regel kein *Insert* im Plasmid.

Von den über Nacht auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agar gezogenen Klonen (vgl. 3.9.7 und 3.9.7.1) wurden solche mit weißer Färbung gepickt und das Vorhandensein des jeweiligen *Inserts* mittels Kolonien-PCR (vgl. 3.9.3.3) bestätigt.

### 3.9.8 Anzucht und Selektion plasmidtragender Bakterienklone

#### 3.9.8.1 Anzucht der Bakterien

LB-Flüssigmedium	(vgl. 3.6)
Ampicillin	(vgl. 3.6)
Kanamycin	(vgl. 3.6)

Die verwendeten Plasmidvektoren pGEM<sup>®</sup>-T und pGEM<sup>®</sup>-9z f(-) verfügen über ein Ampicillin-Resistenzgen. pCR<sup>®</sup>2.1-Topo<sup>®</sup> 3.9kb besitzt sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen. Durch Kultivierung in den entsprechenden antibiotikahaltigen Medien wird so das Wachstum plasmidfreier Zellen unterdrückt.

Die Anzucht der plasmidtragenden Klone erfolgte je nach benötigter Menge in 2 - 5 ml (Minipräparation) oder in 150 - 200 ml LB-Medium (Maxipräparation). Nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika wurden die Bakterien entweder nach der Transformation aus einer Kolonie oder aus einer Stammkultur (vgl. 3.9.8.2) in das LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37 °C angezogen.

#### 3.9.8.2 Herstellung von Glycerolkulturen

Glycerol	(Riedel de Haen)
----------	------------------

750 µl einer Bakterien-Übernachtskultur wurden mit 250 µl sterilem 87%igem Glycerol versetzt und sofort bei -70 °C eingefroren.

### 3.9.9 Plasmid-Reinigung

Lösung I und II für Plasmidschnellpräparation (Sol I + II)	(vgl. 3.7)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)
Isopropanol	(Riedel de Haen)

RNase A	(vgl. 3.4)
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II	(Peqlab)
TE-Puffer	(Fluka)
HiSpeed <sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit	(Qiagen)

Die hier angewandten Methoden der Präparation von Plasmid-DNA beruhen auf der alkalischen Lyse mit SDS (SAMBROOK und RUSSELL, 2001): Nach der Zentrifugation der Bakterienkultur werden diese mit EDTA (schwächt die äußere Bakterienmembran durch Entzug von divalenten Kationen) und Lysozym (degradiert das Peptidoglykan der Bakterienzellwand) versetzt. Durch Zugabe von SDS und NaOH werden die Zellen lysiert. SDS bewirkt die Auflösung von Lipidmembranen sowie die Denaturierung der Proteine; NaOH denaturiert doppelsträngige DNA aufgrund des hohen pH-Wertes. Während die komplementären Stränge linearer DNA-Moleküle vollständig voneinander getrennt werden, verbleiben die Einzelstränge zirkulär geschlossener Plasmide ineinander verschränkt. Durch das Absenken des pH-Wertes der Lösung (Zugabe von Acetat) wird eine Reassoziierung der komplementären Einzelstränge ermöglicht. Kurze, zirkulär geschlossene Plasmid-DNA renaturiert schnell und vollständig, während lange, chromosomale Bakterien-DNA-Einzelstränge weitgehend irregulär reassoziieren und ausfallen. Nach Zentrifugation des Gemisches ist die renaturierte Plasmid-DNA im Überstand gelöst, während denaturierte chromosomale DNA, RNA und Protein aggregieren und pelletieren. Die Plasmid-DNA kann dann mit Alkoholen (Ethanol oder Isopropanol) gefällt, gewaschen und anschließend in Puffer aufgenommen werden.

Diese Form der Plasmid-Reinigung wurde im Laufe der Arbeit auf die hier beschriebenen drei Arten angewendet:

- 1) Für die Isolierung kleinerer DNA-Mengen (z.B. für Testverdaus) wurde mit einer 2 ml Übernacht-Kultur eine Schnell-Minipräparation durchgeführt. Dazu wurde die Bakteriensuspension auf 2 ml-Röhrchen verteilt und 10 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge A) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen, die im Röhrchen verblieben, um darin das Pellet zu resuspendieren. Zu dieser Suspension wurden 300 µl Sol I zugegeben und genau 4 Sekunden geschüttelt. Es folgten die Zugabe von 150 µl Sol II und erneutes Vortexen (3 Sekunden). Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge A) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, mit 900 µl 96 - 100%igem Ethanol versetzt und nach 5- bis 10-minütiger Inkubation bei 13.000 rpm (Biofuge A)

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 75%igem Ethanol bei 13.000 rpm (Biofuge A) 2 x gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O. Der Unterschied zu den beiden nachfolgenden Präparationen ist das Fehlen eines RNase-Verdau. Deshalb muss bei nachfolgenden Untersuchungen wie zum Beispiel Restriktionsanalysen RNase A zugesetzt werden.

Für die Reinigung größerer Plasmid-Mengen und für die Präparation von DNA mit hoher Reinheit wurde die Plasmid-Reinigung mit Hilfe zweier kommerzieller Kits durchgeführt. Für 10 ml- bis 15 ml-Kulturen wurde das E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II, für 150 ml- bis 200 ml-Kulturen das HiSpeed<sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit verwendet:

2) Das Protokoll von Peqlab (E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II) gibt keine Auskunft über Pufferzusammensetzungen. Einzige Angaben sind der Zusatz von RNase A zu Lösung I (zusätzlicher Verdau von RNA) und die Zusammensetzung von Lösung II (2 N NaOH, 1 % SDS). Peqlab verwendet Silikamembran-Säulen, um die Plasmid-DNA aus dem Lysat zu isolieren. Die Elution erfolgt mittels TE-Puffer oder Wasser.

Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Vortexen in 500 µl Puffer (Lösung I/RNase A) resuspendiert. Nach der Zugabe von 500 µl Lysepuffer (Lösung II) wurde der Ansatz durch Schwenken kurz gemischt. Es entstand ein klares Lysat, das mit 700 µl Neutralisierungspuffer (Lösung III) versetzt wurde. Diese Suspension wurde solange durch Schwenken durchmischt, bis sich ein weißliches, flockiges Präzipitat bildete. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde eine HiBind<sup>®</sup>-Miniprep-Zentrifugensäule mit dem klaren Überstand beladen und 1 min lang bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten, der erste mit einem Waschpuffer (HB-Puffer), der zweite mit einem DNA-Waschpuffer, erfolgte die Elution mit 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O. Die Plasmid-DNA (40 - 75 µg) wurde bei -20 °C eingefroren.

3) Bei großen DNA-Mengen wurde das HiSpeed Plasmid Maxi Kit eingesetzt. Dieses verwendet im Gegensatz zum E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit keine Silikamembran, sondern ein Anionen-Austausch-Harz, das die Plasmid-DNA unter niedrigen Salz-Konzentrationen und pH-Werten bindet. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch einen Puffer mittleren Salzgehaltes ausgewaschen. Die Plasmid-DNA wird mittels eines Puffers mit hohem Salzgehalt eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

Eine Übernacht-Kultur (150 - 200 ml) wurde auf 50 ml-Stehrandröhrchen verteilt und bei 6.000 x g 15 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 10 ml Resuspensionspuffer (Puffer P1, 50 mM Tris·Cl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Dann wurden 10 ml Lysepuffer (Puffer P2, 200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben, gemischt und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml eines Neutralisierungspuffers (Puffer P3, 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5) wurde erneut gemischt und zur Entfernung des Präzipitats die Suspension in eine QIAfilter Maxi Spritze gefüllt. Mit dem klaren Lysat wurde eine equilibrierte HiSpeed Maxi Tip beschickt (Equilibrationpuffer, 750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol; 0,15 % Triton<sup>®</sup>X-100). Bei diesem Vorgang wurde die Plasmid-DNA an das Harz gebunden. Es folgten ein Waschschriff mit 60 ml Waschpuffer (Puffer QC, 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol) und anschließend die Elution mit 15 ml Elutionspuffer (Puffer QF, 1,25 mM NaCl; 50 mM Tris·Cl pH 8,5; 15 % Isopropanol). Das Eluat wurde in einem 50 ml-Stehrandröhrchen mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde nun mittels einer 30 ml Spritze durch ein QIAprecipitator Maxi Modul gedrückt und anschließend mit 2 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mittels 0,5 ml TE-Puffer (10 mM Tris·Cl pH 8,0; 1 mM EDTA) oder 0,5 ml MQ-H<sub>2</sub>O. Sämtliche Puffer, Lösungen und Gebrauchsgegenstände, wie Filter, Spritzen und Säulen, mit Ausnahme von Isopropanol, 75%igen Ethanol und MQ-H<sub>2</sub>O waren in beiden Kits enthalten.

### 3.9.10 Behandlungen mit Restriktionsendonukleasen

Die Methode des Verdaus mittels Restriktionsendonukleasen wurde zu den hier beschriebenen Arbeitsschritten eingesetzt.

#### 3.9.10.1 Kontrollverdau

Restriktionsendonukleasen	(vgl. 3.4)
RNase A	(vgl. 3.4)
BSA	(NEB)

Nach der Plasmid-Reinigung diente die enzymatische Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen zur Kontrolle der geklonten Gen-Fragmente. Der Ansatz erfolgte mit maximal 500 ng Plasmid. Die geeigneten Puffer wurden dem Herstellerkatalog entnommen. Wurde Plasmid-DNA aus der Schnell-Präparation (vgl. 3.9.9) verwendet, musste RNase A ( $c_{\text{end}} = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) hinzugegeben werden. Inkubiert wurde 1 Stunde lang bei 37 °C. Die Analyse erfolgte über ein TAE-Agarosegel.

### 3.9.10.2 Linearisierung der Plasmide

Restriktionsendonukleasen	(vgl. 3.4)
BSA	(NEB)

Zur Linearisierung der identifizierten Plasmide (vgl. 3.9.11), eine Voraussetzung für den nachfolgenden Schritt der *in vitro*-Transkription (vgl. 3.9.14), wurden diese durch Einfachverdau mit Nco I oder BamH I (ermöglicht die Verwendung des SP6-RNA-Polymerase-Promotors) sowie mit Not I oder Spe I (ermöglicht die Verwendung des T7-RNA-Polymerase-Promotors) geschnitten. Hierzu wurden mindestens 30 - 50  $\mu\text{g}$  Plasmid mit 3 U/ $\mu\text{g}$  DNA des jeweiligen Enzyms im 250  $\mu\text{l}$ -Ansatz bei 37 °C über Nacht verdaut. Die enzymatischen Spaltungen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

### 3.9.10.3 Gewinnung des *ace*-3'-Endfragments

Restriktionsendonukleasen	(vgl. 3.4)
BSA	(NEB)
Klenow	(NEB)
Quick Ligation Kit	(NEB)

Aus dem Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T-*ace*-cDNA (trägt die Information für die komplette *ace*-cDNA) wurde ein 1555 bp-Fragment durch seriellen Verdau mit BamH I und EcoR V entfernt. Anschließend wurde durch eine Behandlung mit Klenow-Polymerase (großes Fragment der DNA-Polymerase I mit 5'-Exonuklease- und DNA-Polymerase-Aktivität) das überhängende Ende der BamH I-Schnittstelle aufgefüllt. Nach Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.9.4, 3.9.5)

und anschließender Religation mit dem Quick-Ligation Kit konnte das 3'-Endfragment der *ace*-cDNA (572 bp) in pGEM<sup>®</sup>-T gewonnen werden. Alle weiteren Schritte (Transformation, Plasmid-Reinigung etc.) erfolgten wie bereits beschrieben (vgl. 3.9.7, 3.9.9).

### 3.9.11 Identifizierung klonierter Gen-Fragmente durch Sequenzierung

Die mittels Kontrollverdau überprüften Plasmide (vgl. 3.9.10.1) wurden zur abschließenden Identifizierung sequenziert (Sequenzierservice der Firma GATC GmbH, Konstanz, Deutschland). Für Histon H3 wurde außerdem eine computergestützte Homologierecherche auf DNA- als auch Protein-Ebene durchgeführt.

### 3.9.12 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8,0)	(Fluka)
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	(Fluka)
Saures Phenol	(Fluka)
TE-Puffer (pH 8,0)	(Fluka)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)

Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine denaturiert werden. Sie sammeln sich, ebenso wie Lipide, in der organischen Phase an der Grenzschicht zwischen oberer und unterer Phase. Die Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen, oberen Phase. Durch eine anschließende Alkohol-Fällung entfernt man verbleibende Phenolreste aus der Lösung und konzentriert die DNA oder RNA.

Vor dem Schritt der *in vitro*-Transkription wurde die linearisierte Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion von unerwünschten Protein- und Lipidverunreinigungen gereinigt. Hierzu wurde zweimal mit je einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, pH 8,0) und einmal mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) 0,5 min extrahiert. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten wurde bei 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 D) 1 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase unter Vermeidung

der Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten eine Ethanol-Fällung (vgl. 3.9.13) und die Aufnahme des Pellets in 50 bis 100 µl TE-Puffer (pH 8,0).

### 3.9.13 Fällung von DNA und RNA

Die Fällung von DNA und RNA mit Alkoholen wurde zur Konzentrierung und Beseitigung von Verunreinigungen, wie Salze oder organische Lösungsmittel, eingesetzt.

#### 3.9.13.1 Ethanol-Fällung

(SAMBROOK und RUSSELL, 2001)

3 M Natriumacetat pH 5,2

(Sigma)

Ethanol, absolut

(Riedel de Haen / Sigma)

Die DNA-/RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2-fachen Volumen Ethanol bei DNA-Fällung oder dem 3-fachen Volumen Ethanol bei RNA-Fällung versetzt, gut gemischt und je nach Menge der DNA/RNA 20 - 60 min bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde dann, ebenfalls abhängig von der Präzipitatsmenge, zwischen 10 und 60 min bei 4 °C und 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 R) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 75%igem Ethanol, der ein bis zweimal wiederholt wurde. Das Präzipitat wurde nach Lufttrocknung in dem jeweiligen Puffer des nachfolgenden Arbeitsschrittes oder in MQ-H<sub>2</sub>O (DNA) oder DEPC-H<sub>2</sub>O (RNA) aufgenommen.

#### 3.9.13.2 Isopropanol-Fällung

(SAMBROOK und RUSSELL, 2001)

Isopropanol

(Riedel de Haen)

Das Verfahren entspricht der Ethanol-Fällung; zur Fällung wurden jedoch anstelle der 2 - 3 Volumen Ethanol 0,7 Volumina Isopropanol zugegeben. Die Inkubation des Gemisches

erfolgte bei Raumtemperatur. Auch hier hingen die Inkubationsdauer, die Anzahl der Waschschriffe sowie die Dauer der Zentrifugation von der Menge des Präzipitats ab.

### 3.9.13.3 Fällung mit Pellet Paint<sup>®</sup> Co-Precipitant

Pellet Paint <sup>®</sup> Co-Precipitant	(Novagen)
3 M Natriumacetat pH 5,2	(Calbiochem)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)

Pellet Paint<sup>®</sup> Co-Precipitant ist eine nicht näher beschriebene Präzipitationshilfe (Carrier), die mit einem Farbstoff gekoppelt ist, wodurch das Pellet deutlich rosa gefärbt wird. Dieser Carrier wurde speziell für Alkohol-Fällungen konzipiert. Pellet Paint<sup>®</sup> Co-Precipitant eignet sich zur Fällung von DNA und RNA.

Bei der Durchführung wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Erst wurden 2 µl des Pellet Paint Co-Precipitants, dann 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 zur DNA/RNA-Lösung gegeben und gut gemischt. Nach Zugabe des 2-fachen Volumens an 96-100%igem Ethanol und der 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Probe bei 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 R) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem kleinen Volumen MQ- oder DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, wobei das Volumen abhängig war von der weiteren Verarbeitungen der Probe.

### 3.9.14 *In vitro*-Transkription

(IBELGAUFTS, 1993)

Riboprobe <sup>®</sup> <i>in vitro</i> Transcription Systems	(Promega)
DNase	(vgl. 3.4)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 4,5)	(Fluka)
TE-Puffer	(Fluka)
Ethanol, absolut	(Riedel de Haen / Sigma)

Die üblichste Methode zur Gewinnung von RNA-Transkripten ist die Klonierung der DNA in einem Vektor, der 5' und 3' der Klonierungsstelle eine SP6- bzw. T7- oder T3-RNA-Polymerase-Bindungsstelle besitzt. Vor der Transkription wird der rekombinante Vektor mittels 5'-Überhang-generierenden Restriktionsenzymen geschnitten und so die Lage des zukünftigen 3'- Endes der RNA bestimmt. Hierdurch wird eine mehrfach zirkulär umlaufende Transkription verhindert und die Produktion von sogenannten *run off*-Transkripten herbeigeführt. Mit Hilfe des Riboprobe<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Systems können 5 bis 10 µg einzelsträngige RNA je 1 µg eingesetzte Plasmid-DNA hergestellt werden. Die Durchführung erfolgte mit geringen Abweichungen, die nachfolgend beschrieben sind, entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls:

20 µl Transcription Optimized 5X Buffer, 10 µl 100 mM DTT und 100 Units Recombinant RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor wurden mit 20 µl Nukleinsäure-Mix (rATP, rGTP, rCTP und rUTP, jeweils 2,5 mM), ca. 3,5 µg linearisierter DNA (in TE-Puffer) sowie 40 Units SP6- oder T7-RNA-Polymerase gemischt. Mit Nuklease-freiem Wasser wurde auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und 2 Stunden lang bei 37 °C bis 40 °C inkubiert. Zur Aufreinigung der Reaktion erfolgte die Zugabe von RQ1 RNase-freier DNase in einer Konzentration von 1 U/µg eingesetzter Plasmid-DNA. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 4,5) 1 min extrahiert. Nach Zentrifugation (2 min, 12.000 x g) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Es folgten eine Ethanol-Fällung und Resuspension der RNA in 50 bis 100 µl TE-Puffer (pH 8,0). Die *in vitro*-Transkripte wurden bei -70 °C gelagert. Sämtliche Puffer und Enzyme zur Reaktion der *in vitro*-Transkription waren im Kit enthalten.

### **3.9.15 Annealing einzelsträngiger RNA-Transkripte zur dsRNA**

Die RNA-Transkripte wurden mit TE-Puffer (pH 8,0) auf eine einheitliche Konzentration von 0,25 µg/µl eingestellt. Je 40 µl der SP6-RNA und T7-RNA (beide c = 0,25 µg/µl) wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und zu gleichen Teilen auf zwei PCR-Tubes verteilt. Im Thermocycler (T-Gradient) wurde das *Annealing* (= die Paarung der komplementären Stränge zu dsRNA) wie folgt durchgeführt:

- Inkubation 85 °C 3 min
- Abkühlen auf 55 °C innerhalb von 20 min
- Inkubation 55 °C 10 min
- Abkühlen auf 40 °C innerhalb von 10 min
- Inkubation 40 °C 20 min
- Abkühlen auf 30 °C innerhalb von 5 min
- Inkubation 30 °C 10 min

Da die Konzentration der doppelsträngigen RNA über das UV-Photometer nicht bestimmt werden konnte, wurde das Ergebnis der *Annealing*-Reaktion in einem 1,2%igen TBE-Gel überprüft.

### 3.9.16 Synthese des RNAi-Kontrollfragments

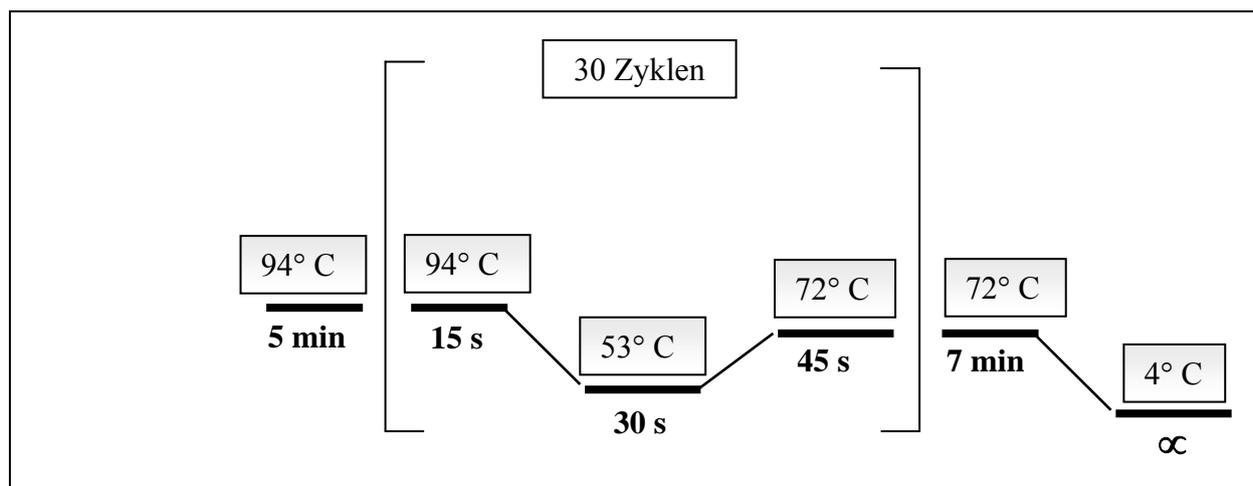
Expand High Fidelity PCR System	(Roche)
Primer	(vgl. 3.5)
pGEM <sup>®</sup> -9z f(-)	(vgl. 3.2)

Die RNA-Interferenz der Genexpression wird durch zelluläre Aufnahme eines doppelsträngigen RNA-Fragments ausgelöst, das einer im Zielorganismus vorkommenden mRNA entspricht. Aus diesem Grund sollten im Organismus nicht vorkommende doppelsträngige RNA-Fragmente keinen Effekt auslösen. Als *Template* für ein doppelsträngiges RNA-Kontrollfragment diente das in *L. cuprina* nicht vorkommende Ampicillin-Resistenzgen. Die Bereitstellung des Gens erfolgte über eine PCR mit dem Expand High Fidelity Kit. Es wurden die Primer *amp*-SP6-for1 sowie *amp*-T7-rev1 und *amp*-T7-rev2 verwendet (vgl. 3.5). Als Matrize diente das Ampicillin-Resistenzgen im Vektor pGEM<sup>®</sup>-9z f(-).

Der Ansatz der Reaktion erfolgte wie hier beschrieben:

0,1 - 0,75 µg DNA	1	µl
10x Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	5	µl
100 µM Primer 1	0,25	µl
100 µM Primer 2	0,25	µl
20 mM dNTPs	0,75	µl
2,6 U Enzym	0,75	µl
H <sub>2</sub> O	42,25	µl
Gesamt-Ansatz	50	µl

Die Herstellung des *amp*-Kontrollfragments erfolgte durch PCR entsprechend dem Programm im Schema 9.



**Schema 9:** Aufbau des PCR-Programms zur Herstellung des *amp*-Kontrollfragments

Die PCR wurde auf 1,5%igem TAE-Agarosegel kontrolliert. Auf diese Weise wurden zwei unterschiedlich große Fragmente mit 354 bp und 557 bp hergestellt. Mit den Kontroll-Fragmenten wurde in gleicher Weise verfahren wie mit den *L. cuprina*-spezifischen Ziel-RNAi-Fragmenten.

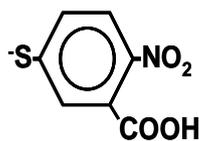
### 3.10 Biochemische Methoden

#### 3.10.1 Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität

5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure („Ellmanns Reagenz“) = DTNB	(Sigma)
Acetylthiocholinjodid	(Sigma)
NaP <sub>i</sub>	(vgl. 3.7)
EDTA	(Fluka)
BSA	(NEB)

In einem Vorversuch wurde erprobt, ob die Aktivität der Acetylcholinesterase in einzelnen Fliegen semiquantitativ bestimmbar ist. Der im Folgenden beschriebene Enzymtest wurde von Prof. Dr. Thomas Ilg (Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim) zur Verfügung gestellt. Das Prinzip des Acetylcholinesterase-Assays beruht auf der Spaltung von Acetylthiocholin durch die Acetylcholinesterase. Das dabei entstehende Thiocholin reagiert mit DTNB, die der Reaktion zugeführt wird. Aus dieser Reaktion geht das gelb gefärbte Produkt 5-Mercapto-2-Nitrobenzoesäure hervor, das dann photometrisch gemessen werden kann und damit zum indirekten Nachweis der Acetylcholinesterase dient.

5-Mercapto-2-Nitrobenzoesäure:



Adulte *L. cuprina* wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt. Hierzu wurde ein Exsikkator wie folgt vorbereitet. Die gelochte Keramikeinlage eines Exsikkators wurde entfernt und der Boden des Gefäßes mit Trockeneis-Granulat bedeckt. Die Keramikeinlage wurde wieder eingesetzt und mit einem 3MM-Papierfilter abgedeckt. Die Fliegen wurden in den Exsikkator gegeben und der Deckel sofort geschlossen. Der aufsteigende CO<sub>2</sub>-Dampf des Trockeneises verursachte eine sofortige Betäubung der Fliegen. Die Fliegen wurden entnommen und die Köpfe unmittelbar mit einem Skalpell abgetrennt. Diese wurden einzeln in 1,5 ml Röhrchen verbracht, auf Eis gestellt und sofort in 100 µl gekühltem Extraktionspuffer (0,1 M NaP<sub>i</sub>/1 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Mit Hilfe eines ins Reaktionsgefäß passenden Pistills (Eppendorf) wurden die Köpfe auf Eis stehend 1 min gemörsert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C

und 13.200 rpm (Tischzentrifuge 5415 R). Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und nochmals in gleicher Weise zentrifugiert. Der erneut gewonnene Überstand (,Kopfextrakt') konnte dann, auf Eis gekühlt, unmittelbar im Enzymtest eingesetzt werden. Hierzu wurden 890 µl frisch angesetzte Stammlösung (0,1 M NaP<sub>i</sub> pH 7,0 / BSA 0,1 mg/ml / DTNB 0,5 mM) in einer 1 ml-Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl Kopfextrakt sowie 100 µl Acetylthiocholin (0,5 mM ACTH in 0,1 M NaP<sub>i</sub>) wurde kurz gemischt und die Extinktionszunahme unmittelbar bei 412 nm gegen einen Referenzwert (0,1 M NaP<sub>i</sub>/1 mM EDTA pH 7,0) gemessen.

### 3.10.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Protein Assay Dye Reagent Concentrate

(Bio-Rad)

BSA

(NEB)

In einem weiteren Vorversuch wurde zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von Fliegenkopfextrakten das Protein Assay Dye Reagent Concentrate verwendet (BRADFORD, 1976). Der Farbwechsel des im Reagenz enthaltenen Coomassie Brilliant Blau G-250 entsteht durch die Bindung des Farbstoffes an positiv geladene bzw. aromatische Aminosäurereste von Proteinen und kann bei 595 nm photometrisch gemessen werden.

Die Standarddeichkurve wurde mit Hilfe einer BSA-Stammlösung von 1 mg/ml erstellt. Abweichend vom Standardprotokoll des Herstellers wurden 1000 µl Bradford-Reagenz in einer 1 ml-Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl Fliegenkopfextrakt und einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 595 nm gegen einen Leerwert.

## 3.11 RNAi-Experiment

Die Injektion von doppelsträngiger RNA in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> stellt den eigentlichen Versuch der RNAi-Genexpressionshemmung dar. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Injektionssystem aufgebaut und ein Standard-Injektionsprotokoll etabliert werden.

### 3.11.1 Aufbau des Injektionssystems

Mikroapplikator PAX 100 (mit Fußschalter) (Burkard Scientific)

Sterile Einmalspritzen, 1 ml (Dispomed)

#### Schlauchsystem:

Tygon LFL, ID: 0,38 mm; Wanddicke: 0,91 mm (Merck)

#### Sterile Einmalkanülen zur Injektion:

30 G x ½, 0,39 x 12 mm (Braun)

#### Adapter:

Kunststoff-Fitting Nr. 731-8224 und Slip-Fitting (BioRad)

Kanüle 23 G x 1, 0,60 x 25 mm (Braun)

Zur Injektion spezifischer, doppelsträngiger RNA in L<sub>3</sub> von *L. cuprina* wurde ein neues Injektionsmodell entwickelt, dessen Aufbau im Nachfolgenden beschrieben wird. Die zentrale Einheit des Systems ist der Mikroapplikator PAX 100, bestehend aus Applikationsmodul und Mikroprozessor/Controller, der die individuelle Einstellung des Injektionsvolumens im Mikroliterbereich ermöglichte. Eine sterile 1-ml-Einmalspritze wurde mit weitgehend herausgezogenem Kolben (Luftpuffer) in das Applikationsmodul des Gerätes eingespannt. Zur Fixierung des Schlauchsystems an der zuvor eingespannten Spritze wurde eine sterile Einmalkanüle (23 G x 1; 0,50 x 25 mm) von einer Seite in das Lumen des Schlauches (Tygon LFL, ID: 0,38 mm, Wanddicke 0,91 mm Color Code orange/green) geschoben, ohne die Wandung desselben zu beschädigen. Der Konus dieser Kanüle ermöglichte so die Verbindung des Schlauches mit der Spritze. Am anderen Ende des Schlauchsystems dienten ein Kunststoff-Fitting und ein Slip-Fitting als Adapter, wobei letzteres die Verbindung zwischen Kunststoff-Fitting und Schlauch herstellte. Am Kunststoff-Fitting wurde nun die Injektions-Kanüle (30 G x ½, 0,39 x 12 mm) eingeschraubt. Das Schraubsystem dieses Adapters war von besonderem Vorteil, da es ein mehrfaches Wechseln der Kanüle im Falle des Verstopfens nach erfolgter Injektion möglich machte.

An der Controller-Einheit des Mikroapplikators erfolgte schließlich die Einstellung des gewünschten Injektionsvolumens. Nach Auslösen der Dispense-Taste oder eines Fußschalters

mit gleicher Funktion übte ein sich vorschiebender Kolben des Applikationsmoduls Druck auf den Spritzenkolben und damit auf den Luftpuffer in der Spritze aus. Mittels dieses Kolbensystems kam es so zur Druckübertragung und damit zum Absatz eines definierten Volumens der jeweiligen Flüssigkeit, die vorher in das System eingebracht wurde. Da die für RNAi-Experimente benötigten Volumina extrem klein waren, bewährte es sich, die spezifische doppelsträngige RNA direkt in den Konus der Injektionskanüle zu pipettieren, ehe diese auf das Kunststoff-Fitting geschraubt wurde.

### 3.11.2 Injektionsprotokoll

Zur Injektion in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> wurde das gewünschte Injektionsvolumen (2 µl = ~500 ng doppelsträngige RNA) an der Kontrolleinheit des Mikroapplikators eingestellt. Die eisgekühlte doppelsträngige RNA des zu injizierenden Gen-Fragments (80 µl) wurde direkt in den Konus einer sterilen Einmalkanüle (30 G x ½, 0,39 x 12 mm) pipettiert, die anschließend vorsichtig auf den Adapter des Schlauchsystems geschraubt wurde. Die *L. cuprina*-L<sub>3</sub> wurde zur Injektion behutsam mit einer anatomischen Pinzette fixiert. Die Injektion der L<sub>3</sub> erfolgte von kaudal, wobei die Kanüle im 45°-Einstich-Winkel ins dorsale 4. bis 5. Abdominalsegment eingestochen und die doppelsträngige RNA durch Auslösen des Fußschalters direkt unter der Epidermis der Larve abgesetzt wurde. Sowohl ein Signalton als auch ein Signallämpchen des Mikroapplikators dienten dabei als Kontrolle der erfolgten Injektion.

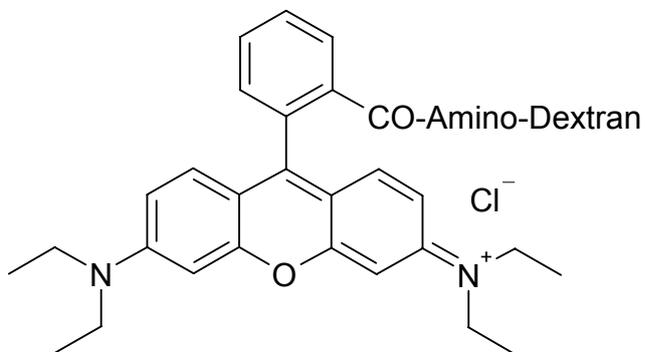
17 L<sub>3</sub> wurden mit dem *adp/atp*-5'-Endfragment injiziert. Bei allen weiteren Gen-Fragmenten wurden jeweils 20 L<sub>3</sub> injiziert. Die Größe der Kontrollgruppen betrug ebenfalls jeweils 20 L<sub>3</sub>. Nach Injektion wurden injizierte und Kontroll-L<sub>3</sub> zur weiteren Entwicklung und Beobachtung möglicher Effekte vorsichtig in ein mit Vermiculit<sup>®</sup> befülltes 20 ml-Probengefäß in einen Klimaraum verbracht (vgl. 3.1: ‚Haltung von L<sub>3</sub> nach Injektion doppelsträngiger RNA‘).

### 3.11.3 Vorversuche zur Injektion von *L. cuprina*-L<sub>3</sub>

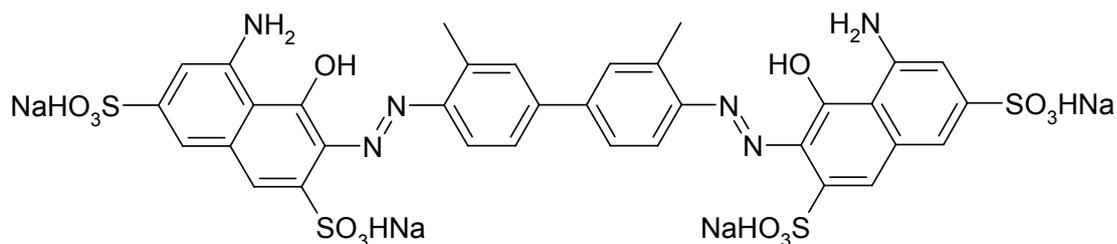
Rhodamine B isothiocyanate-Dextran	(Sigma)
Trypanblue Solution 0,4 %	(Sigma)
Heringssperma-DNA	(Sigma)
Baker's yeast tRNA	(Sigma)
Phosphate Buffered Saline	(Biochrom)
TE-Puffer, pH 8	(Fluka)

Vor den eigentlichen RNAi-Genexpression-Hemmungsversuchen wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Zuerst wurde die Verträglichkeit verschiedener Injektionsvolumina von zwei Lösemitteln getestet. Injiziert wurden MQ-H<sub>2</sub>O und TE-Puffer, pH 8 (10, 5, 2 µl). Des Weiteren wurde die Verteilung von zwei Farbstoffen unmittelbar nach Injektion in L<sub>3</sub> untersucht. Injiziert wurden die Farbstoffe Rhodamin-Dextran (10 µg/µl in MQ-H<sub>2</sub>O; Volumen: 5 und 2 µl) und Trypanblau (1:40 in TE-Puffer; Volumen: 5 und 2 µl).

Rhodamin B - Dextran (MW ~10.000):



Trypanblau (MW 891,8):



Als letzter Vorversuch wurde die Verträglichkeit der Injektion einer unspezifischen RNA- und DNA-Lösung untersucht. Injiziert wurden Heringssperma-DNA (1 µg/µl in TE-Puffer; Volumen: 5 und 2 µl) und Hefe-tRNA (1 µg/µl in TE-Puffer; Volumen: 5 und 2 µl).

Nach der Injektion der Lösemittel, Farb-, unspezifischen RNA- und DNA-Lösungen sowie Inkubation der Larven im Klimaraum (vgl. 3.11.2) wurde jeweils die Schlupfrate der Fliegen bestimmt (vgl. 3.11.4.1).

### **3.11.4 Auswertung nach RNAi-Induktion**

Nach Injektion doppelsträngiger RNA wurden die *L. cuprina*-L<sub>3</sub> hinsichtlich der Weiterentwicklung in Form des Schlupfes von Imagines beurteilt. Des Weiteren wurde anhand der mit *ace*-3'-Endfragment injizierten *L. cuprina* in Einzelfliegen die relative spezifische *ace*-mRNA-Menge semiquantitativ bestimmt.

#### **3.11.4.1 Bestimmung der Schlupfrate**

Die geschlüpften Imagines einer Gruppe wurden innerhalb von 4 Wochen nach Injektion gezählt und der prozentuale Anteil der Schlupfrate bezogen auf die Anzahl der eingesetzten Larven in der jeweiligen Gruppe errechnet (z.B. 15 Imagines entwickelt aus 20 injizierten L<sub>3</sub> = 75 % Schlupfrate). In gleicher Weise wurden die Schlupfraten der Kontrollgruppen und die im Rahmen von Vorversuchen ermittelten Schlupfraten berechnet.

#### **3.11.4.2 Semiquantitative Bestimmung der Acetylcholinesterase-mRNA-Menge nach RNAi-Induktion**

Die geschlüpften Imagines der mit *ace*-3'-Endfragment injizierten Gruppe sowie der unbehandelten Kontrollgruppe wurden täglich gesammelt und in flüssigem Stickstoff getötet. Bis zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den einzelnen Fliegen dieser beiden Gruppen (vgl. 3.9.1.2) wurden diese bei -80 °C gelagert. Es folgte die Durchführung einer RT-PCR mit 2 Primerpaaren (für *ace*-5'-Endfragment und *his3*-Amplifikat; vgl. 3.9.3.1). 5 µl RT-PCR-Produkt jeder Reaktion wurden auf ein 2%iges TAE-Gel aufgetragen (vgl. 3.9.4), um die

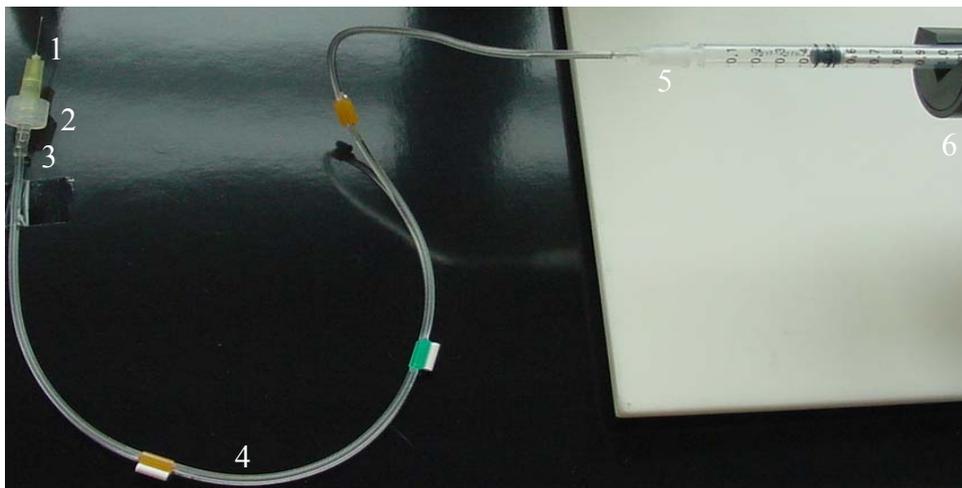
Intensität der Amplifikat-Banden (*ace*-5'-Endfragment gegen *his3*) der mit *ace*-3'-Endfragment injizierten Fliegen mit den der Kontroll-Fliegen zunächst nach Augenschein zu vergleichen.

Die semiquantitative Bestimmung der relativen *ace*-mRNA-Menge jeder Einzelfliege erfolgte mit Programmunterstützung (AIDA, Advanced Image Data Analyzer) durch den Vergleich der Intensität der *ace*-5'-Endfragment-Banden mit den *his3*-Banden aus ein und derselben RT-PCR-Reaktion. Die Quotienten aus *his3*- und *ace*-5'-Endfragment-Intensitäten wurden statistisch nach der Standardmethode zweiseitiger t-Test für zwei unabhängige Stichproben (Satterthwaite-Korrektur für ungleiche Varianzen) ausgewertet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung eines Injektionssystems für *L. cuprina*

Zur Durchführung der RNAi-Genexpression-Hemmungsexperimente in *L. cuprina* war zunächst die Entwicklung eines Injektionssystems für *L. cuprina*-L<sub>3</sub> erforderlich (siehe Abb. 4-1). Als zentrale Einheit des Injektionssystems wurde der Mikroapplikator PAX 100 gewählt, der die Möglichkeit bietet, individuell eingestellte Injektionsvolumina im Mikroliterbereich mittels Auslösens eines Fußschalters abzusetzen. Der Fußschalter erwies sich als besonders günstig, da durch die hohe Mobilität der L<sub>3</sub> die Fixierung der Larve bei gleichzeitiger Injektion nur mit beiden Händen möglich war. Die Wahl des geeigneten Schlauchsystems ermöglichte die Handhabung sehr geringer Volumina (2 µl), wie sie RNAi-Experimente erfordern. Ein Vorteil des Systems und Grundvoraussetzung für die Durchführung der RNAi-Experimente war die minimale Schädigung bei der Injektion der *L. cuprina*-L<sub>3</sub>. Dies wurde durch die Verwendung einer 30G-Kanüle (Braun) erreicht und in einigen Vorversuchen demonstriert (vgl. 4.2, 4.3 und 4.4). Als weiterer Vorteil des Injektionssystems ist der Schraubadapter (Fitting, BioRad) zu nennen, durch den die Injektionskanüle bei Bedarf gewechselt werden konnte.



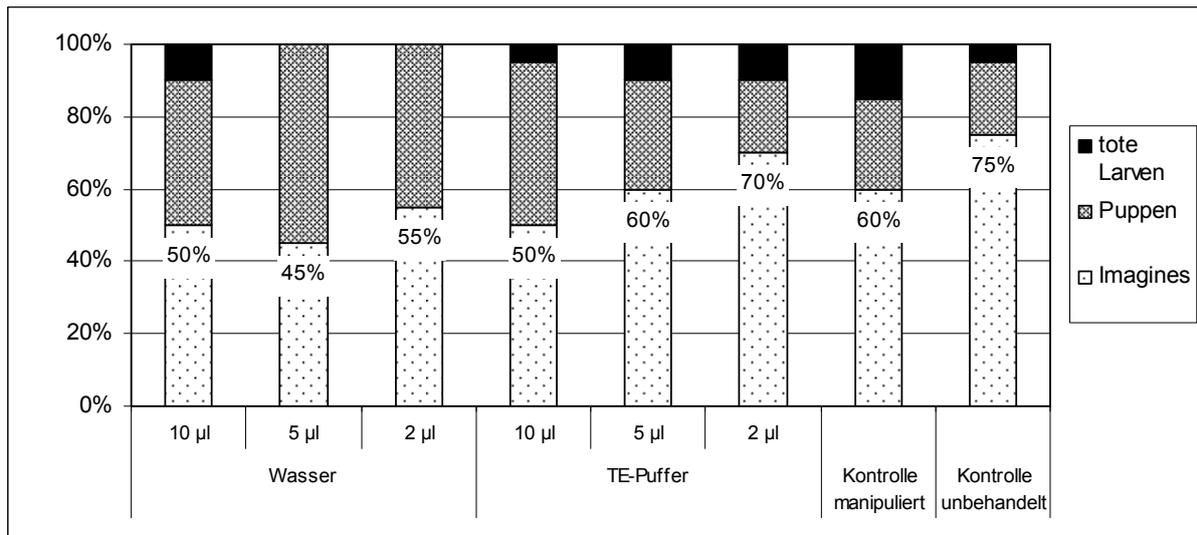
**Abb. 4-1: Aufbau des Injektionssystems**

- 1 Injektionskanüle 30 G x 1/2 , 0,39 x 12 mm (Braun)
- 2 Schraubadapter Kunststoff-Fitting (BioRad)
- 3 Slip-Fitting (BioRad) verbindet Schraubadapter mit Schlauchsystem
- 4 Schlauchsystem Tygon LFL, ID: 0,38 mm (Merck)
- 5 Kanüle 23 G x 1, 0,60 x 25 mm (Braun) verbindet Schlauch mit Spritze
- 6 Applikationsmodul des PAX 100 (Burkard Scientific)

## 4.2 Injektion von Lösemitteln in *L. cuprina*-L<sub>3</sub>

Vor Beginn der eigentlichen RNAi-Experimente wurde die Verträglichkeit von zwei für RNA geeigneten Lösemitteln in verschiedenen Volumina an *L. cuprina*-L<sub>3</sub> getestet. Hierzu wurden jeweils 20 Larven mit RNase freiem Wasser und TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0) injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl, 5 µl und 2 µl. Nach Injektion wurden die Larven zur Weiterentwicklung bei 24 °C bis 29 °C und 60 - 95 % Luftfeuchte inkubiert und die Schlupfrate jeder Versuchsgruppe nach 4 Wochen bestimmt. Parallel zur Injektion der beiden Lösemittel wurden zwei Kontrollgruppen mit entsprechender Larvenzahl mitgeführt. Eine nur mit Injektionskanüle manipulierte Kontrollgruppe diente zur Beurteilung des mechanischen Schadens, der bei der Injektion allein durch die Kanüle gesetzt wurde. Die unbehandelte Kontrollgruppe ließ Rückschluss zu auf die biologische Varianz der Schlupfrate des jeweils verwendeten Larven-Kollektivs.

Die Ergebnisse des Vorversuchs mit Lösemitteln sind in Abb. 4-2 dargestellt. Die Schlupfraten der mit 10 µl (Wasser und TE-Puffer) injizierten *L. cuprina*-L<sub>3</sub> lagen bei jeweils 50 %. Die Injektion von 5 µl Wasser ergab eine Schlupfrate von 45 %; die Schlupfrate bei Injektion von 5 µl TE-Puffer lag mit 60 % leicht höher. Höchste Schlupfraten wurden für die Injektion von 2 µl Lösemittel beobachtet. Hier schlüpften 55 % der mit Wasser injizierten Larven und 70 % der mit TE-Puffer injizierten L<sub>3</sub>. Im Vergleich dazu lag der Schlupf der Kontrollen bei 60 % (manipulierte Kontrolle) und 75 % (unbehandelte Kontrolle). Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,5283$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Die Ergebnisse belegen die gute Verträglichkeit der Injektion von 2 µl TE-Puffer in *L. cuprina*-L<sub>3</sub>. Entsprechend wurde zur Durchführung der RNAi-Experimente ein Injektionsvolumen von 2 µl und TE-Puffer pH 8,0 als geeignetes Lösemittel für doppelsträngige RNA gewählt.



**Abb. 4-2: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion von Lösemitteln in  $L_3$**

Injiziert wurden verschiedene Volumina (10, 5, 2 µl) von RNase freiem Wasser und TE-Puffer (pH 8,0). Zwei Gruppen dienen als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine weitere blieb unbehandelt.

### 4.3 Injektion von Markersubstanzen in *L. cuprina*- $L_3$

#### VERTEILUNG

*L. cuprina*- $L_3$  wurden mit 5 µl Rhodamin-Dextran (10 µg/µl in H<sub>2</sub>O) oder mit 2,5 µl Trypanblau (1:40 in TE-Puffer, pH 8,0) injiziert, um die Verteilung dieser Markersubstanzen in der Larve zu beobachten und zu dokumentieren.

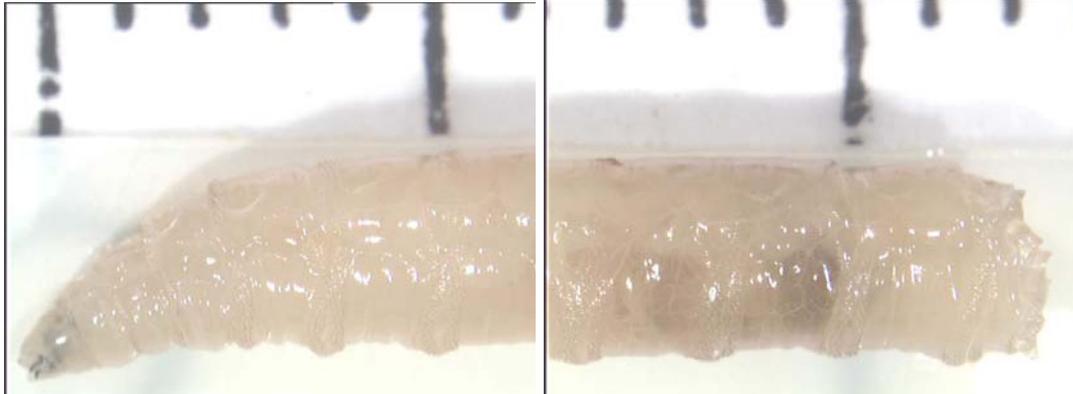
Die beiden Markersubstanzen wurden aus folgenden Gründen gewählt: Das niedermolekulare, amphiphile Trypanblau (MW: 891,8) erschien besonders geeignet, da es aufgrund seiner guten Verträglichkeit für lebende Zellen allgemein als Exklusions-Vitalfarbstoff eingesetzt wird. Rhodamin-Dextran ist eine hochmolekulare, rosa gefärbte Substanz und dank seines Zuckergerüsts wasserlöslich. Die Verteilung von Rhodamin-Dextran (MW: ~10.000) diente vorab als Hinweis auf das Verteilungsverhalten von RNA und DNA. Deren gute Verteilung nach Injektion in die Larve war Voraussetzung für die Durchführbarkeit der späteren RNAi-Experimente an *L. cuprina*- $L_3$ .

Unmittelbar mit Injektion der Markersubstanzen kam es zur sofortigen Verteilung der Farbstoffe in den Larven. Die gesamte *L. cuprina*-L<sub>3</sub> wurde mit der jeweiligen Markersubstanz angefärbt. Die injizierten Larven wurden mittels Mikroskop (STEMI SV8 von Zeiss) und aufgesetzter Kamera (Axiovert 135 von Zeiss) fotografiert. Aufgrund der Größe der Larven musste dies in jeweils zwei Teilbildern (kranialer und kaudaler Abschnitt von L<sub>3</sub>) geschehen. In der Abbildung 4-3 wurde eine unbehandelte *L. cuprina*-L<sub>3</sub> den mit Markersubstanzen injizierten L<sub>3</sub> gegenübergestellt.

***L. cuprina*-L<sub>3</sub>, unbehandelt:**

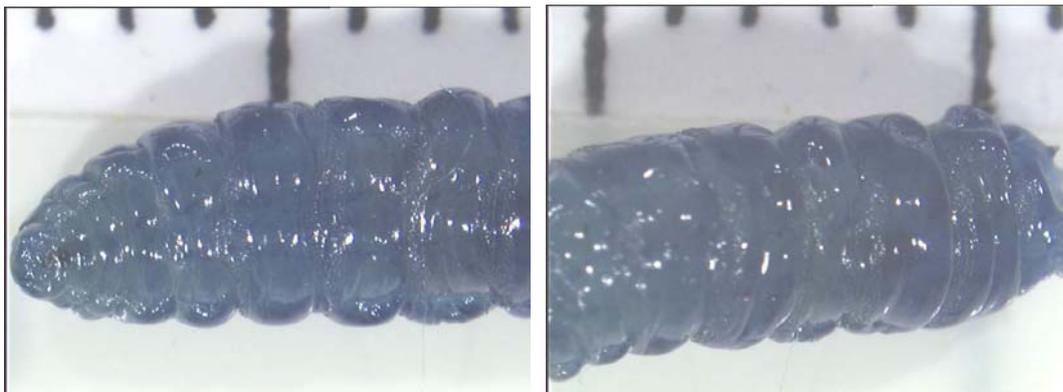
kranialer Abschnitt

kaudaler Abschnitt

***L. cuprina*-L<sub>3</sub>, injiziert mit 2,5 µl Trypanblau:**

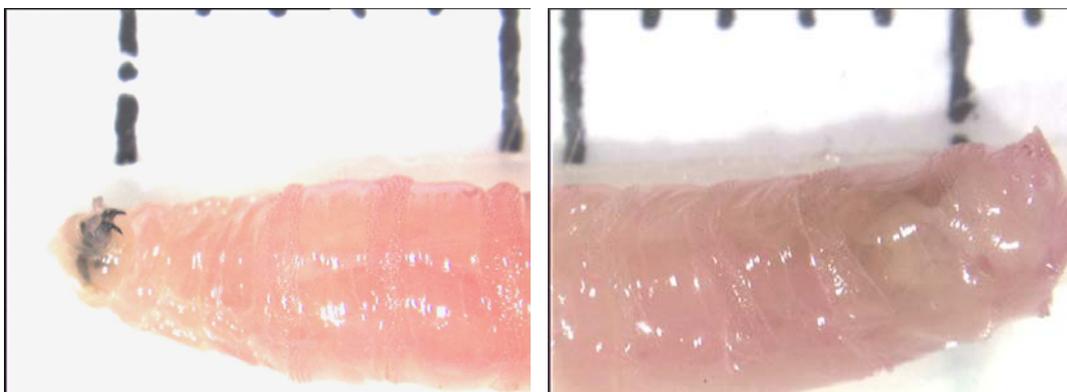
kranialer Abschnitt

kaudaler Abschnitt

***L. cuprina*-L<sub>3</sub>, injiziert mit 5 µl Rhodamin-Dextran:**

kranialer Abschnitt

kaudaler Abschnitt

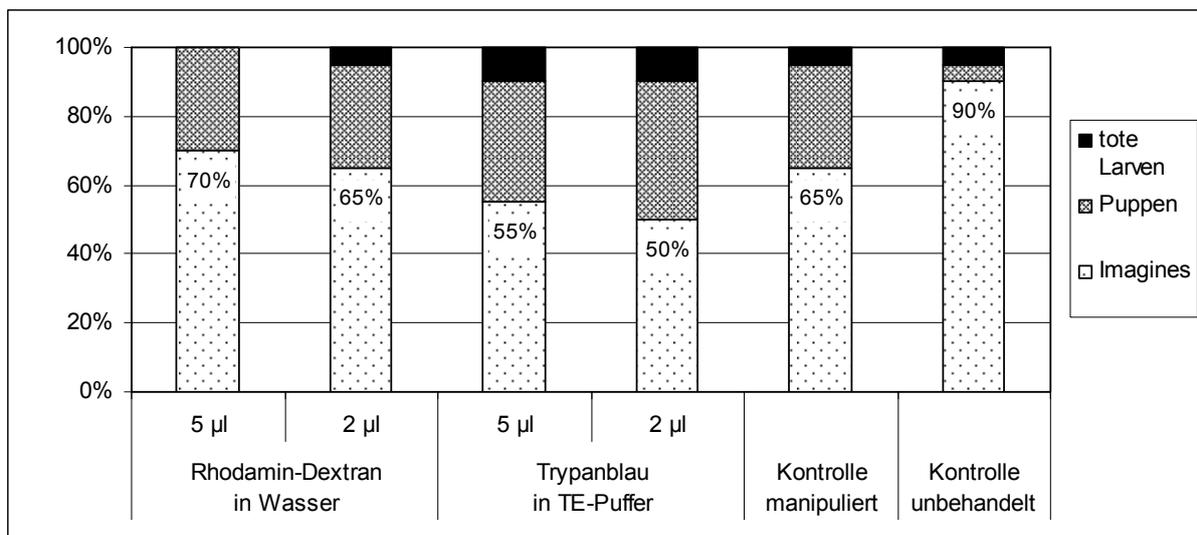
**Abb. 4-3: Verteilung von Markersubstanzen ~1 min nach Injektion in *L. cuprina*-L<sub>3</sub>**

Die Fotodokumentation der unbehandelten und injizierten Larven erfolgte in zwei Aufnahmen (kranialer und kaudaler Abschnitt der Larve). Zur Größendarstellung der Larve ist am jeweils oberen Bildrand die Skalierung eines Lineals sichtbar (1 kleiner Teilstrich entspricht 1 mm).

## VERTRÄGLICHKEIT

Ergänzend zum Injektionsversuch mit zwei verschiedenen Lösemitteln (vgl. 4.2) wurde in einem weiteren Vorversuch die Verträglichkeit der bereits verwendeten Markersubstanzen getestet. Hierzu wurden jeweils 20 *L. cuprina*-L<sub>3</sub> mit 5 µl und 2 µl Rhodamin-Dextran (10 µg/µl in H<sub>2</sub>O) sowie Trypanblau (1:40 in TE-Puffer, pH 8,0) injiziert und die Schlupfraten jeder Gruppe nach einer Inkubation von 4 Wochen (vgl. 4.2) bestimmt. Zum Vergleich dienten wiederum eine manipulierte und eine unbehandelte Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse des Vorversuchs mit Markersubstanzen sind in Abb. 4-4 dargestellt. Nach Injektion von 5 µl Markersubstanz lagen die Schlupfraten bei 70 % (Rhodamin) und 55 % (Trypanblau). Die Injektion von 2 µl Rhodamin ergab eine Schlupfrate von 65 %; nach Injektion von 2 µl Trypanblau wurden 50 % schlüpfende Fliegen beobachtet. Im Vergleich dazu lag der Schlupf der Kontrollgruppen bei 65 % (manipulierte Kontrolle) und 90 % (unbehandelte Kontrolle). Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,1279$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test).



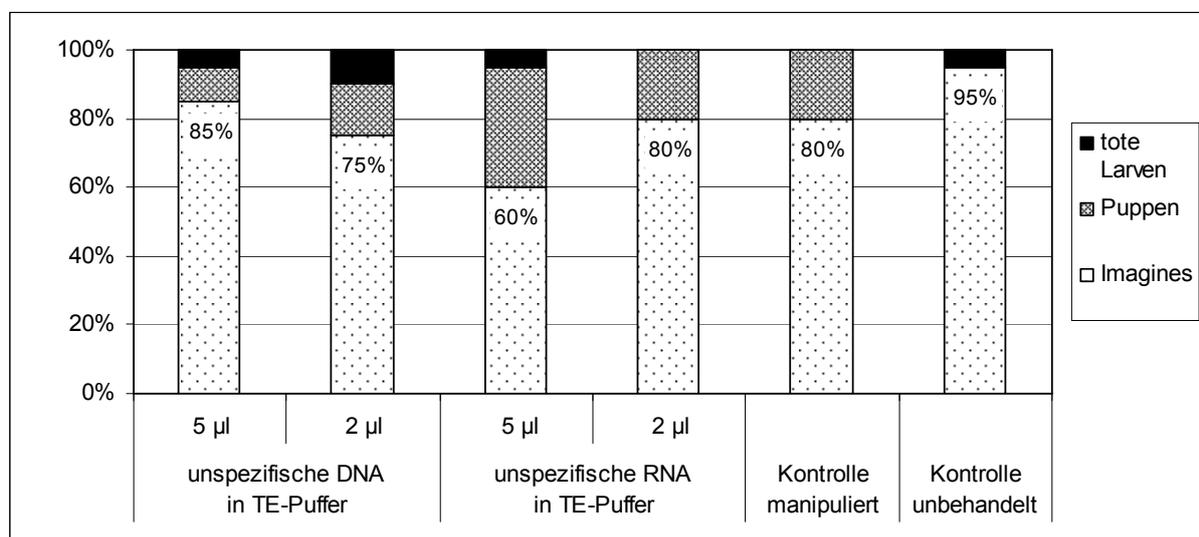
**Abb. 4-4: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion von Rhodamin-Dextran und Trypanblau in L<sub>3</sub>**

Injiziert wurden verschiedene Volumina (5, 2 µl) von Rhodamin-Dextran (10 µg/µl in H<sub>2</sub>O) und Trypanblau (1:40 in TE-Puffer, pH 8,0). Zwei Gruppen dienten als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine weitere blieb unbehandelt.

#### 4.4 Injektion unspezifischer DNA und RNA in *L. cuprina*-L<sub>3</sub>

Im letzten Vorversuch zur Larven-Injektion wurden 5 µl und 2 µl Heringssperma-DNA sowie Bäckerhefe-tRNA in einer Konzentration von 1 µg/µl TE-Puffer, pH 8,0 in je 20 *L. cuprina*-L<sub>3</sub> injiziert, um die Verträglichkeit dieser unspezifischen Nukleinsäuren zu testen. Wie bereits in den vorangegangenen Injektionsversuchen beschrieben (vgl. 4.2 und 4.3) wurden die Schlupfraten jeder Gruppe bestimmt. Als Bezugsgröße dienten die Schlupfraten einer unbehandelten und einer manipulierten Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4-5 dargestellt. Nach Injektion von 5 µl Nukleinsäure lagen die Schlupfraten bei 85 % (DNA) und 60 % (tRNA). Die Injektion von 2 µl Nukleinsäure ergab einen Schlupf von 75 % (DNA) und 80 % (tRNA). Zum Vergleich hierzu konnte in den Kontrollgruppen 80 % (manipulierte Kontrolle) und 95 % (unbehandelte Kontrolle) schlüpfende Imagines beobachtet werden. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,1526$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Die Ergebnisse belegen, dass die Schlupfrate von *L. cuprina* durch die Injektion unspezifischer Nukleinsäuren nicht wesentlich beeinflusst wird.



**Abb. 4-5: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion von unspezifischer DNA aus Heringssperma und tRNA aus Bäckerhefe in L<sub>3</sub>**

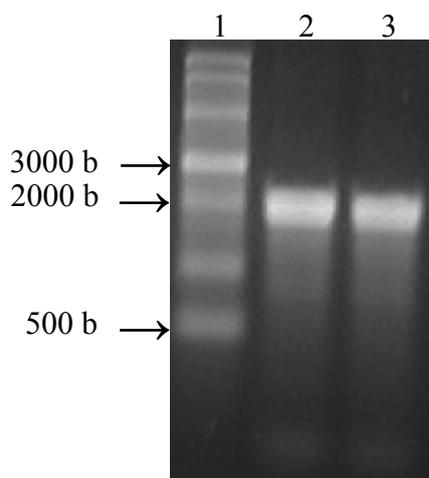
Injiziert wurden verschiedene Volumina (5, 2 µl) von Heringssperma-DNA und Bäckerhefe-tRNA (1 µg/µl in TE-Puffer, pH 8,0). Zwei Gruppen dienten als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine weitere blieb unbehandelt.

## 4.5 Bereitstellung von genspezifischer doppelsträngiger RNA basierend auf *L. cuprina* Gensequenzen (RNAi-Konstrukte)

### 4.5.1 Gewinnung von Gesamt-RNA aus *L. cuprina*

Durch die bereits beschriebene Methode der Gesamt-RNA-Gewinnung mittels TRI-REAGENT™ (Sigma) konnten aus *L. cuprina*-L<sub>3</sub> 4,2 µg Gesamt-RNA/mg Larven gewonnen werden. Die Ausbeute an Gesamt-RNA aus nüchternen *L. cuprina*-Imagines betrug 1,3 µg Gesamt-RNA/mg Fliegen. Das OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnis lag bei 2,19 (L<sub>3</sub>) und 2,14 (Imagines) für 260/280 nm, das heißt die Präparationen waren weitgehend frei von kontaminierender DNA.

In Abbildung 4-6 werden exemplarisch zwei Gesamt-RNA-Präparationen aus adulten *L. cuprina* gelelektrophoretisch (1,5 % TBE-Gel) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die intensive Bande der ribosomalen RNA bei 2000 Basen. Die Schärfe der Bande lässt auf die Unversehrtheit der Gesamt-RNA schließen. Außerdem ist die Abwesenheit hochmolekularen Materials (DNA) ein weiterer Beleg für die Reinheit der RNA-Präparation.



**Abb. 4-6: Gesamt-RNA isoliert aus adulten *L. cuprina* nach Auftrennung in 1,5%igem TBE-Agarosegel**

1: RNA-Längenstandard

2 und 3: *L. cuprina* Gesamt-RNA (bei 2000 b des RNA-Längenstandard)

## 4.5.2 Isolierung von Poly(A)-RNA

Der Anteil von Poly(A)-RNA in der Gesamt-RNA beträgt, abhängig vom jeweiligen Ausgangsmaterial, 1 - 5 % (SAMBROOK und RUSSELL, 2001). Zur Gewinnung von Poly(A)-RNA wurden zwei kommerziell erhältliche Kits verwendet.

Da die Poly(A)-RNA-Ausbeuten mit dem Miltenyi-Kit (Biotec: Isolierung erfolgte mittels *magnetic beads*) anfangs sehr niedrig waren (<0.5 % der Gesamt-RNA), wurde die Isolierung von Poly(A)-RNA aus L<sub>3</sub> mit dem ‚mRNA Spin-Column Protocol‘ (Qiagen) wiederholt. Um die Ausbeute der Poly(A)-RNA zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt abweichend vom Qiagen-Protokoll mit 3 x 50 µl OEB-Puffer (70 °C) durchgeführt (vgl. 3.9.2). Hierdurch konnte die Ausbeute an Poly(A)-RNA aus *L. cuprina*-L<sub>3</sub> auf 1,6 % erhöht werden. Das OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnis lag bei 2,41.

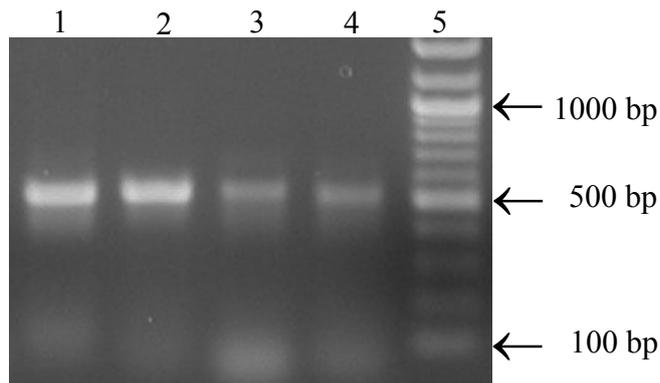
## 4.5.3 Isolierung von Genen und Herstellung von Gen-Fragmenten

Für die Durchführung der RNAi-Genexpression-Hemmungsexperimente wurden Amplifikate der folgenden Gene aus dem *L. cuprina*-Genom komplett oder in Form von zwei Gen-Fragmenten (3'-Endfragment, 5'-Endfragment) hergestellt: Acetylcholinesterase (*ace*), Glutamat-gesteuerter Chloridkanal (*gluch*), ADP/ATP-Translokator (*adp/atp*) und Histon H3 (*his3*).

### 4.5.3.1 Amplifikation von Genen und Gen-Fragmenten mittels RT-PCR

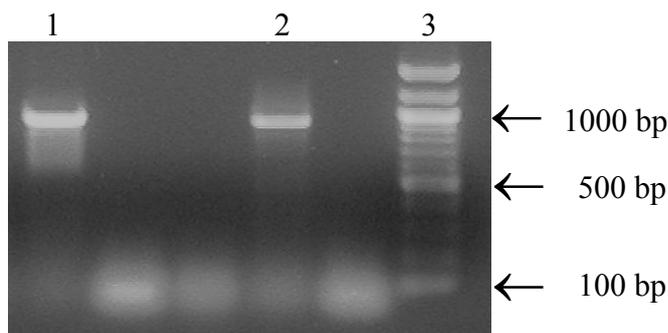
Die vier Gen-Fragmente *adp/atp*-3'-Endfragment, *adp/atp*-5'-Endfragment sowie 3'- und 5'-Endfragmente der *gluch*-cDNA wurden unter Verwendung von Poly(A)-RNA von *L. cuprina*-L<sub>3</sub> mittels RT-PCR amplifiziert (vgl. 3.9.3.1) und in 1,1%igem TAE-Agarosegel dargestellt (siehe Abb. 4-7 und 4-8).

Die Größe der *adp/atp*-Amplifikate betrug 514 bp (5'-Endfragment) und 525 bp (3'-Endfragment). Die Größe der *gluch*-Amplifikate betrug 524 bp (5'-Endfragment) und 517 bp (3'-Endfragment). Die vollständige *adp/atp*-cDNA, welche zusätzlich aus L<sub>3</sub>-Gesamt-RNA amplifiziert wurde, hatte eine Größe von 903 bp.



**Abb. 4-7: Darstellung von *L. cuprina*-DNA-Amplifikaten, amplifiziert mittels RT-PCR, nach Auftrennung in 1,1%igem TAE-Agarosegel**

- 1: *adp/atp*-5'-Endfragment (514 bp)
- 2: *adp/atp*-3'-Endfragment (525 bp)
- 3: *gluch*-5'-Endfragment (524 bp)
- 4: *gluch*-3'-Endfragment (517 bp)
- 5: 100 bp DNA-Längenstandard

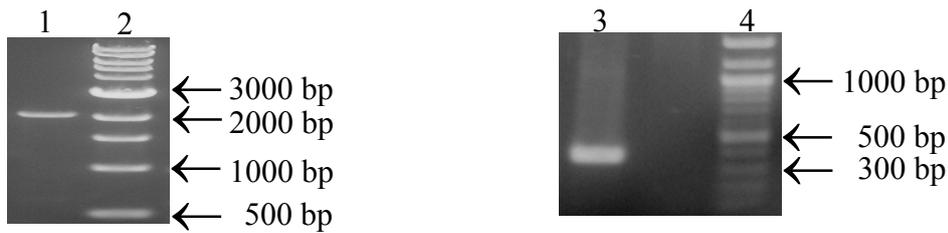


**Abb. 4-8: Darstellung von *L. cuprina*-DNA-Amplifikaten, amplifiziert mittels RT-PCR, nach Auftrennung in 1,1%igem TAE-Agarosegel**

- 1: vollständige *adp/atp*-cDNA (903 bp)
- 2: vollständige *adp/atp*-cDNA (903 bp)
- 3: 100 bp DNA-Längenstandard

#### 4.5.3.2 Amplifikation von Gen-Fragmenten mit cDNA und Plasmid-DNA als Matrize

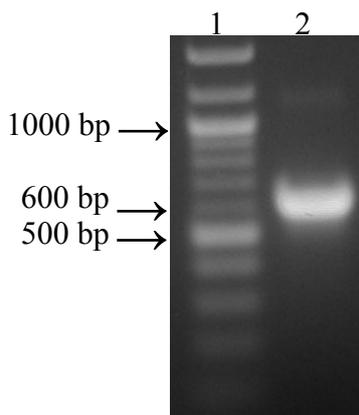
Einige Gen-Fragmente ließen sich erst amplifizieren, nachdem die reverse Transkription in einer gesonderten Reaktion, getrennt von der eigentlichen PCR durchgeführt wurde (vgl. 3.9.3.2). Sowohl *ace* als auch *his3* wurden unter Verwendung von cDNA als *Template* gewonnen. Die vollständige *ace*-cDNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert und hatte eine Größe von 2127 bp. Die mit degenerierten Primern gewonnene *his3*-cDNA hatte eine Größe von 380 bp (siehe Abb. 4-9).



**Abb. 4-9: Darstellung von *L. cuprina*-DNA-Amplifikaten, amplifiziert aus cDNA, nach Auftrennung in 1%igem TAE-Agarosegel**

- 1: vollständige *ace*-cDNA (2127 bp)
- 2: 1 kb DNA-Längenstandard
- 3: vollständige *his3*-cDNA (380 bp)
- 4: 100 bp DNA-Längenstandard

In Abbildung 4-10 ist das 5'-Endfragment der Acetylcholinesterase dargestellt, das unter Verwendung spezifischer Primer und von Plasmid-DNA (pGEM<sup>®</sup>-T-*ace*-cDNA) amplifiziert wurde. Die Größe dieses DNA-Fragments betrug 612 bp.

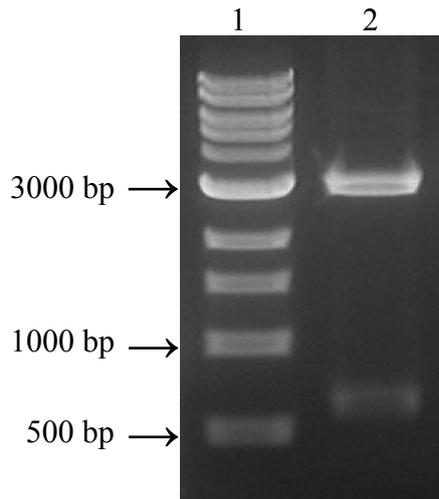


**Abb. 4-10: Darstellung eines *L. cuprina*-DNA-Amplifikats, amplifiziert aus Plasmid-DNA, nach Auftrennung in 1%igem TAE-Agarosegel**

- 1: 1 kb DNA-Längenstandard
- 2: *ace*-5'-Endfragment (612 bp)

#### 4.5.3.3 Gewinnung des *ace*-3'-Endfragments mittels Restriktionsendonukleasen

Das *ace*-3'-Endfragment wurde durch enzymatische Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen BamH I und EcoR V aus der vollständigen *ace*-cDNA geschnitten (vgl. 3.9.10.3). Die Abbildung 4-11 zeigt das *ace*-3'-Endfragment (572 bp) sowie den geschnittenen Vektor nach Kontrollverdau des Plasmids mit Nco I und EcoR V (vgl. 3.9.10.2).



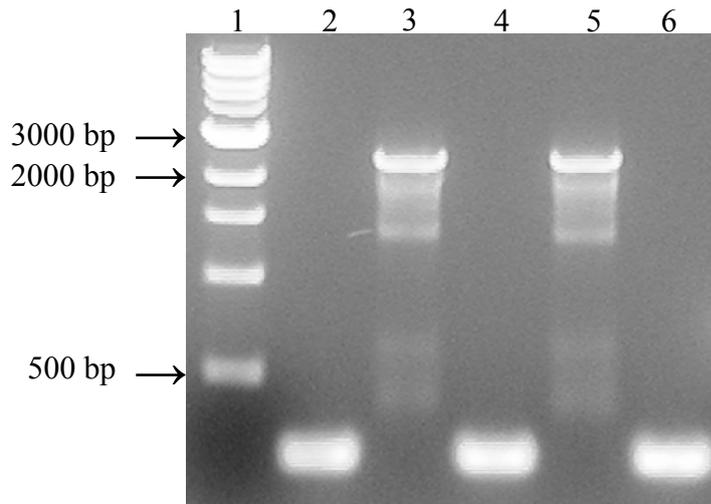
**Abb. 4-11: Darstellung eines *L. cuprina*-DNA-Amplifikats nach enzymatischer Spaltung des Plasmids und Auftrennung in 1%igem TAE-Agarosegel**

1: 1 kb DNA-Längenstandard

2: *ace*-3'-Endfragment (572 bp) nach Verdau des Plasmids mit Nco I und EcoR V; das geschnittene Plasmid liegt auf Höhe der 3000 bp-Markierung des DNA-Längenstandards

#### 4.5.4 Kontrolle der Klonierung mittels Kolonien-PCR

Nach Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (vgl. 3.9.6) und Klonierung (vgl. 3.9.7) wurden die über Nacht gewachsenen Klone mittels Kolonien-PCR (vgl. 3.9.3.3) auf das Vorhandensein des korrekten *Inserts* (= cDNA oder cDNA-Fragments) überprüft. In Abbildung 4-12 ist das Ergebnis einer solchen Kolonien-PCR am Beispiel der vollständigen *ace*-cDNA auf einem 1%igem TAE-Gel dargestellt. Zur PCR wurden die M13-for/-rev-Primer verwendet. Das kodierende Gen hatte eine Größe von 2127 bp. Zusätzliche unspezifische Basenpaare (240 bp), von M13-Primern sowie *ace*BamHI-for-Primer stammend, vergrößerten das Amplifikat auf insgesamt 2367 bp.



**Abb. 4-12: Darstellung verschiedener Klone (a, b, c, d, e), gepickt nach Ligation der Acetylcholinesterase (*ace*) in pGEM<sup>®</sup>-T Vektor und Transformation in *E. coli* JM109, durch Kontroll-PCR mit M13-Primern und Elektrophorese in 1%igem TAE-Agarosegel**

1: 1kb DNA-Längenstandard

2: Klon a ohne Insert

3: Klon b mit vollständiger *ace*-cDNA als Insert (2127 bp *ace* + ~240 bp der M13- Primer)

4: Klon c ohne Insert

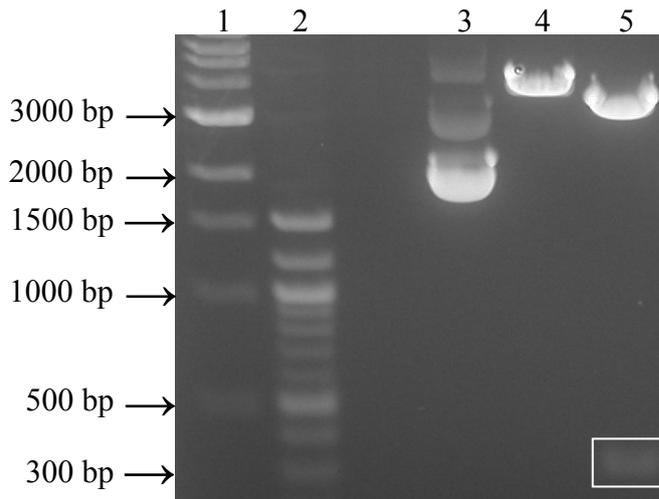
5: Klon d mit vollständiger *ace*-cDNA als Insert (2127 bp *ace* + ~240 bp der M13- Primer)

6: Klon e ohne Insert

#### 4.5.5 Kontrolle der Plasmide mittels Restriktionsenzymverdau

Nach der Plasmid-Reinigung (vgl. 3.9.9) wurden die gewonnenen Plasmide zur nochmaligen Kontrolle des *Inserts* mit Restriktionsenzymen gespalten und so überprüft (vgl. 3.9.10).

In der Abbildung 4-13 sind die Fragmente des *ace*-5'-Endes vor und nach Verdau mit Not I und Spe I mittels Elektrophorese in einem 1%igen TAE-Agarosegel dargestellt. Durch Kontrollverdau mit Not I wurde das Plasmid linearisiert (Abb. 4-13, Bahn 4). Beim anschließenden Verdau mit Spe I wurde ein Fragment mit einer Größe von 344 bp aus dem Plasmid geschnitten (Abb. 4-13, Bahn 5).



**Abb. 4-13: Darstellung des Acetylcholinesterase-5'-Endfragments (*ace*) nach Einfach- und Doppelverdau des Plasmids (pGEM<sup>®</sup>-T Vektor) mit Not I und Spe I und anschließender Auftrennung in 1%igem TAE-Agarosegel**

1: 1 kb DNA-Längenstandard

2: 100 bp DNA-Längenstandard

3: *ace*-5'-Endfragment im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (ungeschnitten)

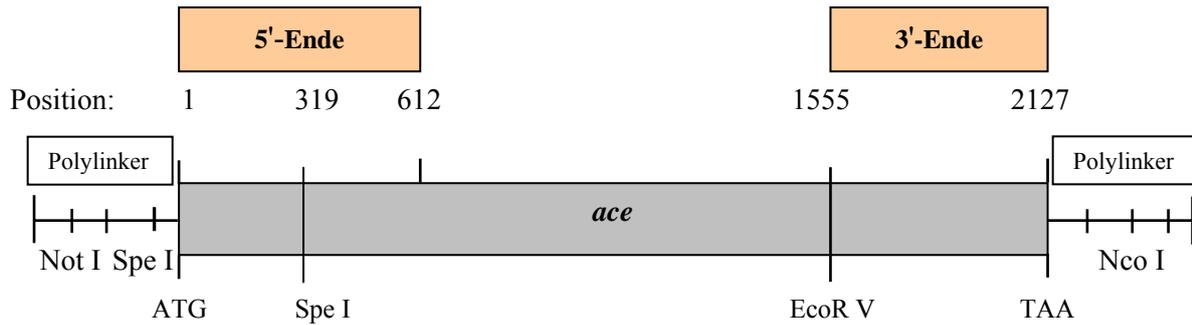
4: *ace*-5'-Endfragment im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor mit Not I geschnitten (linearisiertes Plasmid)

5: *ace*-5'-Endfragment mit Not I und Spe I aus pGEM<sup>®</sup>-T Vektor geschnitten; das ausgeschnittene 5'-Endfragment ist gerahmt (344 bp)

#### 4.5.6 Identifizierung der Gene und Gen-Fragmente durch Sequenzierung

Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden mittels Sequenzierung identifiziert und somit auf ihre Eignung für den Einsatz im RNAi-Experiment überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden anschließend auf DNA-Ebene mit den publizierten *L. cuprina*-Sequenzen verglichen. Einzige Ausnahme bildete die *his3*-cDNA, deren *L. cuprina*-Sequenz bisher nicht beschrieben war. Aus diesem Grund wurde für *his3* zusätzlich ein Sequenzvergleich (*Alignment*) auf DNA-Ebene und Proteinebene zu *D. melanogaster* vorgenommen.

In den nachfolgenden Abbildungen 4-15 bis 4-19 sind die Ergebnisse der Sequenzierungen für *ace*, *gluch* und *adp/atp* dargestellt. Die Sequenz der kompletten *ace*-cDNA wurde durch drei Teilsequenzierungen ermittelt. Abbildung 4-14 zeigt das Acetylcholinesterase-Gen mit Positionsangaben für Polylinker, 3'- und 5'-Ende und Schnittstellen schematisch.



**Abb. 4-14: Karte des Acetylcholinesterase-Gens (*ace*) von *L. cuprina* mit Polylinkern und Schnittstellen**

ATG = Startkodon

TAA = Stopkodon

Not I, Spe I, Nco I, EcoR V = Schnittstellen

#### 4.5.6.1 Sequenzvergleich für *ace*

Abbildung 4-15 (Seite 80 bis 82) zeigt das *Alignment* der isolierten Acetylcholinesterase- (Lucu *ace*) zur publizierten *L. cuprina*-Sequenz (LucuU88631).

1	ATGGCTCGTTTTATAACAACATCATCATCACCAACATTA	LucuU88631
1	ATGGCTCGTTTTATAACAACATCATCATCACCAACATTA	Lucu <i>ace</i>
41	CAACTTCGACCGCAGCAACAGCACCGTCGTCGTCGTGGTC	LucuU88631
41	CAACTTCGACCGCAGCAACAGCA - - TCGTCGTCGTCGTGGTC	Lucu <i>ace</i>
81	ATCAAATGCAACATCCACAGCAACATCGATTTCTTCCCAT	LucuU88631
78	ATCAAATGCAACATCCACAGCAACATCGATTTCTTCCCAT	Lucu <i>ace</i>
121	TCAAGAACATCCAGAAAATCCCGTTATACCTCTAGTAATT	LucuU88631
118	TCAAGAACATCCAGAAA - - - - - TACCTCTAGT C ATT	Lucu <i>ace</i>
161	TATTAACGCGTTCGCGTCTCTAACGTCTCGTTCGTCGTT	LucuU88631
149	TATTAACGCGTTCGCGTCTCTAACGTCTCGTTCGTCGTT	Lucu <i>ace</i>
201	ATCGCTGTCGTCAACATCGTCAAATGACTTATATCGTGTT	LucuU88631
189	AT GCTGTCGTCAACATCGTCAAATGACTTATATCGTGTT	Lucu <i>ace</i>
241	TTTCTCACCACTTGTCTACTCTTTCGCGTATGTCATCGG	LucuU88631
229	TTTCTCACCACTTGTCTACTCTTTCGCGTATGTCATCGG	Lucu <i>ace</i>
281	TGGCGTACGGTATAACGGATCGTTTAATTGTTCAAACAAC	LucuU88631
269	TGGCGTACGGTATAACGGATCGTTTAATTGTTCAAACAAC	Lucu <i>ace</i>
321	TAGTGGTCCCGTACGTGGTCGTGCGGTAACAGTACAGGGT	LucuU88631
309	TAGTGGTCCCGTACGTGGTCGTGCGGTAACAGTACAGGGT	Lucu <i>ace</i>
361	CGTGAAGTGCATGTCTTTCACAGGTATTCCGTATGCAAAAAC	LucuU88631
349	CGTGAAGTGCATGTCTTTCACAGGTATTCCGTATGCAAAAAC	Lucu <i>ace</i>
401	CTCCTGTGGATGATTTACGTTTTTCGCAAGCCAGTACCAGC	LucuU88631
389	CTCCTGTGGATGATTTACGTTTTTCGCAAGCCAGTACCAGC	Lucu <i>ace</i>
441	TGAACCATGGCATGGCGTTTTAGATGCAACACGACTGCCA	LucuU88631
429	TGAACCATGGCATGGCGTTTTAGATGCAACACGACTGCCA	Lucu <i>ace</i>

481	GCAACATGTGTACAAGAGAGATATGAATACTTCCCTGGCT	LucuU88631
469	GCAACATGTGTACAAGAGAGATATGAATACTTCCCTGGCT	Lucu ace
521	TTTCCGGTGAAGAGATATGGAATCCCAATACAAATGTATC	LucuU88631
509	TTTCCGGTGAAGAGATATGGAATCCCAATACAAATGTATC	Lucu ace
561	AGAAGATTGTTTTATATATGAATATATGGGCTCCAGCAAAG	LucuU88631
549	AGAAGATTGTTTTATATATGAATATATGGGCTCCAGCAAAG	Lucua ace
601	GCCCGTCTGCGACATGGTCGTGGTGCCAATGGTGGTGAGC	LucuU88631
589	GCCCGTCTGCGACATGGTCGTGGTGCCAATGGTGGTGAGC	Lucu ace
641	ATTCATCGAAAACCGATCCTGATCATTTAATCCATAGTGC	LucuU88631
629	ATTCATCGAAAACCGATCCTGATCATTTAATCCATAGTGC	Lucu ace
681	AACACCCCAAATAACAACAAATGGTTTACCCATTTTAATA	LucuU88631
669	AACACCCCAAATAACAACAAATGGTTTACCCATTTTAATA	Lucu ace
721	TGGATCTATGGTGGTGGCTTTATGACTGGTTTCGGCCACAC	LucuU88631
709	TGGATCTATGGTGGTGGCTTTATGACTGGTTTCGGCCACAC	Lucu ace
761	TGGACATTTACAATGCCGACATTATGTCAGCGGTGGGTAA	LucuU88631
749	TGGACATTTACAATGCCGACATTATGTCAGCGGTGGGTAA	Lucu ace
801	TGTTATTGTTGCCTCATTTCAGTATCGTGTGGGTGCATTT	LucuU88631
789	TGTTATTGTTGCCTCATTTCAGTATCGTGTGGGTGCATTT	Lucu ace
841	GGTTTTCTACATCTTTCACCGGTTATGCCAGGTTTTGAAG	LucuU88631
829	GGTTTTCTACATCTTTCACCGGTTATGCCAGGTTTTGAAG	Lucu ace
881	AGGAAGCGCCCGTAATGTTGGTCTTTGGGATCAAGCTTT	LucuU88631
869	AGGAAGCGCCCGTAATGTTGGTCTTTGGGATCAAGCAATT	Lucu ace
921	GGCCTTGCGTTGGCTTAAGGAAAACGCTCGTGCCCTTTGGT	LucuU88631
909	GGCCTTGCGTTGGCTTAAGGAAAACGCTCGTGCCCTTTGGT	Lucu ace
961	GGCAATCCCGAATGGATGACTTTGTTTGGTGAATCAGCCG	LucuU88631
949	GGCAATCCCGAATGGATGACTTTGTTTGGTGAATCAGCCG	Lucu ace
1001	GTTTCGAGTTCGGTAAATGCCCAGCTTGTTCGCCGGTTAC	LucuU88631
989	GTTTCGAGTTCGGTAAATGCCCAGCTTGTTCGCCGGTTAC	Lucu ace
1041	AAGAGGTCTTGTGAAGCGCGGCATGATGCAATCGGGTACC	LucuU88631
1029	AAGAGGTCTTGTGAAGCGCGGCATGATGCAATCGGGTACC	Lucu ace
1081	ATGAATGCACCCTGGAGTCATATGACTTCGGAAAAGGCTG	LucuU88631
1069	ATGAATGCACCCTGGAGTCATATGACTTCGGAAAAGGCAG	Lucu ace
1121	TAGAGATTGGTAAAGCTTTAATAAACGATTGTAATTGTAA	LucuU88631
1109	TAGAGATTGGTAAAGCTTTAATAAACGATTGTAATTGTAA	Lucu ace
1161	TGCCTCTTTGTTGCCGGCTAATCCTCAATCAGTAATGGCC	LucuU88631
1149	TGCCTCTTTGTTGCCGGCTAATCCTCAATCAGTAATGGCC	Lucu ace
1201	TGCATGCGTGCGGTCGATGCAAAAACGATTTTCAGTACAAC	LucuU88631
1189	TGCATGCGTGCGGTCGATGCAAAAACGATTTTCAGTACAAC	Lucu ace
1241	AATGGAATTCCCTATTCGGGTATTTTAAGTTTTCCCTCAGC	LucuU88631
1229	AATGGAATTCCCTATTCGGGTATTTTAAGTTTTCCCTCAGC	Lucu ace
1281	TCCCACATAGATGGTGCCTTTTTACCCGCTGATCCCATG	LucuU88631
1269	TCCCACATAGATGGTGCCTTTTTACCCGCTGATCCCATG	Lucu ace
1321	ACACTTATGAAAACAGCTGATATGTCTGGTTATGATATTA	LucuU88631
1309	ACACTTATGAAAACAGCTGATATGTCTGGTTATGATATTA	Lucu ace
1361	TGATTGGAAATGTCAAGGATGAGGGTACATATTTTCTCTT	LucuU88631
1349	TGATTGGAAATGTCAAGGATGAGGGTACATATTTTCTCTT	Lucu ace
1401	ATACGATTTTATTGATTACTTTGATAAAGATGAAGCAACA	LucuU88631
1389	ATACGATTTTATTGATTACTTTGATAAAGATGAAGCAACA	Lucu ace
1441	TCATTGCCACGTGATAAATATTTAGAAATTATGAATAATA	LucuU88631
1429	TCATTGCCACGTGATAAATATTTAGAAATTATGAATAATA	Lucu ace
1481	TATTTAATAAGGCCACACAAGCCGAACGGGAGGCCATTAT	LucuU88631
1469	TATTTAATAAGGCCACACAAGCCGAACGGGAGGCCATTAT	Lucu ace
1521	ATTTTCAGTATACCAGCTGGGAAGGTAATCCAGGATATCAA	LucuU88631
1509	ATTTTCAGTATACCAGCTGGGAAGGTAATCCAGGATATCAA	Lucu ace

1561	AATCAACAGCAAATTGGTAGAGCTGTAGGAGATCACTTCT	LucuU88631
1549	AATCAACAGCAAATTGGTAGAGCTGTAGGAGATCACTTCT	Lucu <i>ace</i>
1601	TTACCTGCCCCACAAATGAGTATGCACAGGCATTAGCTGA	LucuU88631
1589	TTACCTGCCCCACAAATGAGTATGCACAGGCATTAGCTGA	Lucu <i>ace</i>
1641	ACGAGGTGCACAAGTACATTA TACTTTACACATCGC	LucuU88631
1629	ACGAGGTGCACAAGTACATTA TACTTTACACATCGC	Lucu <i>ace</i>
1681	ACAAGTACCTCCTTGTGGGGTGAATGGATGGGCGTTTTAC	LucuU88631
1669	ACAAGTACCTCCTTGTGGGGTGAATGGATGGGCGTTTTAC	Lucu <i>ace</i>
1721	ACGGCGATGAAATCGAGTACTTCTTTGGTCAACCATTAAA	LucuU88631
1709	ACGGCGATGAAATCGAGTACTTCTTTGGTCAACCATTAAA	Lucu <i>ace</i>
1761	CACATCACTGCAGTATAGAGCCGTTGAACGGGAATTGGGA	LucuU88631
1749	CACATCACTGCAGTATAGAGCCGTTGAACGGGA <span style="color: red;">-</span> TTGGGA	Lucu <i>ace</i>
1801	AAACGGATGCTCAATTCAGTTATTGAATTTGCAAAGACGG	LucuU88631
1789	AAACGGATGCTCAATTCAGTTATTGAATTTGCAAAGACGG	Lucu <i>ace</i>
1841	GTAATCCAGCTGTTGATGGTGAAGAATGGCCAAATTTCTC	LucuU88631
1829	GTAATCCAGCTGTTGATGGTGAAGAATGGCCAAATTTCTC	Lucu <i>ace</i>
1881	CAAAGAAGATCCTGTTTATTATGTCTTCAGTACAGATGAA	LucuU88631
1869	CAAAGAAGATCCTGTTTATTATGTCTTCAGTACAGATGAA	Lucu <i>ace</i>
1921	AAAACCTGAAAAACTACAAAGAGGTCCATTGGCCAAACGAT	LucuU88631
1909	AAAACCTGAAAAACTACAAAGAGGTCCATTGGCCAAACGAT	Lucu <i>ace</i>
1961	GCTCATTTTGGAAATGATTATCTGCCGAAAGTACGAAGTTG	LucuU88631
1949	GCTCATTTTGGAAATGATTATCTGCCGAAAGTACGAAGTTG	Lucu <i>ace</i>
2001	GGTTGGTTCCGAATGTGAAAAACAACAGTGCAGAATCTGCG	LucuU88631
1989	GGTTGGTTCCGAATGTGAAAAACAACAGTGCAGAATCTGCG	Lucu <i>ace</i>
2041	GCAGTGTCCATTATATATGAAAAACAGCAAAACTTATTAA	LucuU88631
2029	GCAGTGTCCATTATATATGAAAAACAGCAAAACTTATTAA	Lucu <i>ace</i>
2081	AATGGGTCATCATGCTCACAATAA <span style="background-color: yellow;">TGGTACATGCATTTT</span>	LucuU88631
2069	AATGGGTCATCATGCTCACAATAA TGGTACATGCATTTT	Lucu <i>ace</i>
2121	<span style="background-color: yellow;">TCAATAAAAA</span>	LucuU88631
2109	TCAA <span style="background-color: green;">TAA</span> AAA	Lucu <i>ace</i>

**Abb. 4-15: Nukleotid-Sequenzvergleich der Acetylcholinesterase-cDNA (*ace*) von *L. cuprina***

LucuU88631: Genbanksequenz von *L. cuprina-ace*

Lucu *ace*: *L. cuprina-ace*-Sequenz aus eigener Sequenzierung

Zahlen (1-2121): Position des ersten Nukleotids in der Zeile

Grün: Startkodon (ATG) und Stopkodon (TAA)

Rot: Nukleotid-Austausch oder Nukleotid-Deletion (-)

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer von *ace*

Blau: EcoR V-Schnittstelle; sie diente mit der BamH I-Schnittstelle im LuCu-*ace*BamHI-for1-Primer (vgl. 3.5) zur Gewinnung des *ace*-3'-Endfragments aus der Gesamt-cDNA (vgl. 3.9.10.3)

Im Sequenz-Alignment des Acetylcholinesterase-Gens fällt die Deletion von insgesamt vier Nukleotid-Triplets im Bereich des 5'-Endes der Sequenz auf, davon liegen die letzteren drei unmittelbar nebeneinander. Es folgen zwei Nukleotid-Austausche, die auch eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben. Der Austausch des Adenins durch Cytosin (Position 146 der *ace*-Sequenz) kodiert anstelle eines Asparagins (AAT) ein Histidin (CAT). Der nächste Austausch an Position 191 kodiert statt eines Serins (TCG) ein Leucin (TTG). Die übrigen vier Austausche in der *L. cuprina*-Sequenz sind stumme Mutationen.

#### 4.5.6.2 Sequenzvergleich für *gluch*

Die Sequenzierungen der beiden Fragmente des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals stimmten mit Ausnahme zweier Nukleotid-Austausche im 5'-Endfragment (Abb. 4-16) und einem Austausch im 3'-Endfragment (Abb. 4-17) mit der Ausgangssequenz überein. Das zusätzliche Guanin in der Anfangssequenz des *gluch*-5'-Endfragments ist als Primer-Artefakt zu bewerten. Durch den Austausch des Thymins durch Cytosin im *gluch*-5'-Endfragment, ändert sich auch die kodierte Aminosäure im Vergleich zur Genbanksequenz AF081674 (von TTA → Leucin zu TCA → Serin). Die übrigen Austausche in beiden Gen-Fragmenten des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals sind stumme Mutationen.

G

ATGGGAACC GGCCATTATTTTGGGCGATATTCTATTTTGCCAGTTTATGTAGTGC  
 ATCATTAGCTAATAATGCCAAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTA

T

GATCAAATTTAGGTGCAGGCAAATATGATGCAAGAATACGACCCTCCGGTATTAA  
 TGGAACGGAAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTCCCTACGGTCTATTTT  
 AAAAATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTTTCAGCTGACATTCCGTGAACAGT  
 GGACGGATGAACGTTTGAAATTTGATGACATACAAGGTCGTCTCAAATATTTGACA

A

TTAACAGAAGCCAATCGAGTTTGGATGCCCGATCTGTTCTTTTCCAATGACAAAGA  
 GGGTCATTTCCACAATATCATTATGCCAAATGTTTACATACGTATTTTCCAACGG  
 TTCAGTTCTGTACAGTATTCGTATATCACTGACATTGGCATGTCCCATGAATTTGAA  
 ATTGTATcCATTGGATCGTCAAATTTGTTCACTACG

**Abb. 4-16: Nukleotid-Sequenz des 5'-Endfragments des *L. cuprina*-Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (*gluch*)**

Grün: Startkodon (ATG)

Rot: Nukleotid-Austausch; Angabe der *gluch*-Genbanksequenz AF081674 ist gerahmt

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *gluch*-5'-Endfragments

TGTCACCACTCTCCTAACAATGGC TACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTG  
 G  
 CCACCAAGTCTCATAACAAAGGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTGTTTGACGTTCC  
 GTATTTGGTGCCTGCTCGAGTTCGCCTTGGTGAACATGCGTCCCGCTCAGACATG  
 CACAAGGAGAATATGAAAAGAAACGACGGGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATG  
 CTGCTTCAGATTTATTGGATACAGACAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTG  
 GTACGCCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCA  
 TATGCAGCCACCAAAAACGTCCAAACTGCTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTCCCCA  
 CAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATATCACGAATAACATTCCCG  
 CTGGTCTTCGCCTTATTCAATCTGGTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAG  
 GAGGATGAGTAA

**Abb. 4-17: Nukleotid-Sequenz des 3'-Endfragments des *L. cuprina*-Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (*gluch*)**

Grün: Stopkodon (TAA)

Rot: Nukleotid-Austausch; Angabe der *gluch*-Genbanksequenz AF081674 ist gerahmt

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *gluch*-3'-Endfragments

**4.5.6.3 Sequenzvergleich für *adp/atp***

Bei der Sequenzierung der beiden ADP/ATP-Translokator-Fragmente wurden beim Abgleich zur Genbanksequenz AF218587 zwei Nukleotid-Austausche im 5'-Endfragment (Abb. 4-18) und 3 Austausch im 3'-Endfragment (Abb. 4-19) gefunden. Im 5'-Endfragment wird durch den Austausch eines Cytosins durch Thymin anstelle der Aminosäure Prolin (CCC) ein Leucin (CTC) kodiert. Der zweite Austausch im 5'-Endfragment ist eine stumme Mutation.

GCAAAATGGGTAAGGAAGCTGCTGATCCCCTTGGATTCGTAAAGGATTTGCCCGCC  
 GGTGGTATCTCCGCCGCTGTCTCAAAGACTGCCGTCGCCCCATCGAGCGTGTCAA  
 GTTGCTCTTGCAAGTACAACACATCTCCAAACAAATCAGCCCCGATAAGCAATACA  
 AGGGTATGATCGATTGTTTTGTCCGCATTCCAAAAGAACAAGGTTTTGCTTCATACT  
 GGCCTGGTAACATGGCTAACGTTATCAGATATTTCCCAACCCAGGCTTTGAACTTT  
 GCCTTCAAGGATAAGTACAAGCAAGTTTTCTTGGGTGGTGTGACAAGAACACTCA  
 ATTCTGGCGTTACTTCTTGGGTAAGTTAGCTTCCGGTGGTGTGCTGCTGGTGCCACTTC  
 C  
 TCTCTGCTTCGTCTATCCCTTGGACTTTGCCCGTACTCGTTTGGCTGCTGATACCGGT  
 G  
 AAGGGTAGTCAACGTGAATTCAGTGGCTTGGGCAACTGCTTGGCCAAGATCTTCAA  
 ATCTGACGGTT

**Abb. 4-18: Nukleotid-Sequenz des 5'-Endfragments des *L. cuprina*-ADP/ATP-Translokators (*adp/atp*)**

Grün: Startkodon (ATG)

Rot: Nukleotid-Austausch; Angabe der *adp/atp*-Genbanksequenz AF218587 ist gerahmt

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *adp/atp*-5'-Endfragments

Alle Nukleotid-Austausche im 3'-Endfragment des ADP/ATP-Translokators ändern auch die Aminosäuresequenz (Abb. 4-19). Durch den ersten Austausch wird Isoleucin (ATC) durch Threonin (ACC) ersetzt. Der zweite Nukleotid-Austausch kodiert anstelle eines Alanins (GCG) ein Valin (GTG). Beim dritten Austausch wird für Threonin (ACA) ein Isoleucin (ATA) kodiert.

```

GGTGCCACTTCCCTCTGCTTCGTCTTACCCCTTGGACTTTGCCCGTACTCGTTTGGCTG
CTGATACCGGTAAGGGTGGTCAACGTGAATTCCTGGCTTGGGCAACTGCTTGGC

CAAGATCTTCAAATCTGACGGTTTGGTTGGTTTGTACCGCTGGTTTCGGTGTATCCGT
ACAAGGTATCATTATCTACCGTGCTGCCTACTTCGGCTTCTACGATACCGCTCGCGG
TATGTTGCCCGATCCTAAGAACACCCCCATCTACATCAGCTGGGCTATCGCTCAAG
TTGTTACAACCTGTTGCTGGTATTGTCTCCTATCCCTTCGATACTGTCCGTCGTCGTAT

GATGATGCAGTCTGGTCGCAAGGCTACCGAAATCATCTACAAGAACACATTGCACT
GCTGGGCCACCATCGCCAAACAAGAAGGTAAGTGGTGCCTTCTTCAAGGGTGCCTTC
TCCAACGTTCTCAGAGGTACCGGTGGTGTCTTCGTAAGTGTATTGTACCGATGAAATC
AAGAAGTTCTGTAA

```

**Abb. 4-19: Nukleotid-Sequenz des 3'-Endfragments des *L. cuprina*-ADP/ATP-Translokators (*adp/atp*)**

Grün: Stopkodon (TAA)

Rot: Nukleotid-Austausch; Angabe der *adp/atp*-Genbanksequenz AF218587 ist gerahmt

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *adp/atp*-3'-Endfragments

#### 4.5.6.4 Sequenzvergleiche für *his3* / HIS 3

Das Histon H3 wurde unter Verwendung degenerierter Primer (vgl. 3.5) amplifiziert. Der Vergleich der Sequenzen auf Nukleotid- und Protein-Ebene zu *D. melanogaster* ist in den Abbildungen 4-20 und 4-21 dargestellt.

Die Nukleinsäure-Sequenz von *L. cuprina* (Abb. 4-20, *Lucu his3*) unterscheidet sich in 71 Nukleotiden. Damit zeigt sie im zu beurteilenden Bereich eine 81%ige Übereinstimmung mit der Sequenz von *D. melanogaster* (Abb. 4.20, *Dm his3*). Von der so identifizierten *L. cuprina*-Sequenz wurden die spezifischen *his3*-Primer abgeleitet (vgl. 3.5), die bei der semiquantitativen Bestimmung der Acetylcholinesterase-mRNA-Menge (vgl. 4.8) Verwendung fanden. Die Aminosäure-Sequenz (Abb. 4-21) zeigt eine 100%ige Übereinstimmung zwischen *L. cuprina* (*Lucu Histon H3*) und *D. melanogaster* (*Dm Histon H3*). Das zeigt, dass sämtliche Austausche in der Nukleinsäure-Sequenz (Abb. 4-20) stumme Mutationen sind.

1	ATGGCCAGAACAAAGCAAACCTGC	TCGTAAATCCACCGGTG	Lucu <i>his3</i>
1	ATGGCTCGTACTAAGCAGACTGCCCGTAAGTCGACCGGAG		Dm <i>his3</i>
41	GTAAGCCCGCGTAAACAATGGCTACCAAAGCTGCAAG		Lucu <i>his3</i>
41	GAAAGGCTCCTCGTAAGCAGCTAGCCACCAAGGCTGCCCG		Dm <i>his3</i>
81	TAAATCAGCACCTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCCCAT		Lucu <i>his3</i>
81	TAAATCGGCGCCATCCACCGGCGGAGTGAAGAAGCCCCAT		Dm <i>his3</i>
121	CGTTACCGTCCCGGTACCGTIGCTCTTCGTGAATCCGTC		Lucu <i>his3</i>
121	CGTTATCGTCCCGGAACTGTGGCTCTTCGTGAGATCCGTC		Dm <i>his3</i>
161	GTTATCAGAAATCCACAGAATTGCTTATCCGCAAATGCC		Lucu <i>his3</i>
161	GTTACCAGAAAGTCGACCGAGTTGCTCATCCGCAAGCTGCC		Dm <i>his3</i>
201	TTTCCAACGTTTAGTCCGTGAAATIGCCAGGATTTCAAG		Lucu <i>his3</i>
201	CTTCCAGCGTCTGTTTCGTGAAATCGCTCAGGATTTCAAG		Dm <i>his3</i>
241	ACCGATTTACGTTTCCAATCIGCTGCTATCGGTGCTTTGC		Lucu <i>his3</i>
241	ACCGATCTGCGTTTCCAGTCGGCTGCCATCGGTGCCTTGC		Dm <i>his3</i>
281	AGAAGCATCTGAAGCCTACTTGGTGGGATTGTTTGAAGA		Lucu <i>his3</i>
281	AGGAAGCATCTGAGGCGTACCTGGTGGGTCTCTTCGAGGA		Dm <i>his3</i>
321	CACIAACTTGTGCGCTATCACGCCAAGCGTGTACATT		Lucu <i>his3</i>
321	CACCAACTTGTGCGCTATCCACGCCAAGCGCGTGACAATC		Dm <i>his3</i>
361	ATGCCAAAAGACATACAGTT		Lucu <i>his3</i>
361	ATGCCTAAGGACATCCAGTT		Dm <i>his3</i>

**Abb. 4-20: Nukleotid-Sequenzvergleich des Histon H3 (*his3*) von *L. cuprina* mit *D. melanogaster***

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *his3*

Lucu *his3*: *L. cuprina*-Sequenz von *his3*

Dm *his3*: *D. melanogaster*-Sequenz von *his3*

Zahlen (1-361): Position des ersten Nukleotids in der Zeile

Grün: Startkodon (ATG)

Rot: Nukleotid-Austausch

Gelb: Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer des *his3*-Gens

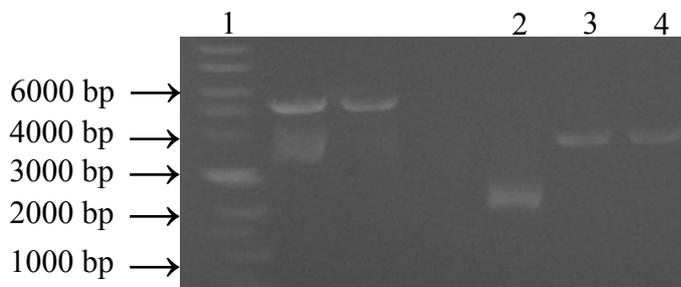
1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPH	Lucu Histon H3
1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPH	Dm Histon H3
41	RYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFK	Lucu Histon H3
41	RYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFK	Dm Histon H3
81	TDLRFQSAAIGALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI	Lucu Histon H3
81	TDLRFQSAAIGALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI	Dm Histon H3
121	MPKDIQ	Lucu Histon H3
121	MPKDIQ	Dm Histon H3

**Abb. 4-21: Protein-Sequenzvergleich des Histon H3 (HIS 3) von *L. cuprina* (Lucu Histon H3) mit *D. melanogaster* (Dm Histon H3)**

Grau: 100%ige Übereinstimmung der beiden Histon H3-Protein-Sequenzen

#### 4.5.7 Linearisierung der Plasmide als Vorbereitung der *in vitro*-Transkription

Die identifizierten Plasmide wurden durch Einfachverdau mit Nco I oder Not I (*adp/atp*- und *gluch*-Fragmente, *ace*-5'-Endfragment, *ace*-3'-Endfragment), mit Nco I oder Spe I (*his3*) sowie mit BamH I oder Not I (vollständige *ace*-cDNA) geschnitten, um sie für die *in vitro*-Transkription in geeigneter Weise zu linearisieren (vgl. 3.9.10.2). Auf diese Weise wurde jedes Plasmid jeweils einmal an beiden Seiten des *Inserts* geschnitten. Die Linearisierung mit Nco I oder BamH I ermöglichte so die Verwendung der SP6-RNA-Polymerase, während die Spaltung mit Not I oder Spe I die Verwendung der T7-RNA-Polymerase erlaubte. In der Abbildung 4-22 ist die Linearisierung des *ace*-3'-Endfragments nach Verdau mit Nco I und Not I auf einem 1,5%igen TAE-Agarosegel dargestellt.



**Abb. 4-22: Darstellung des Acetylcholinesterase-3'-Endfragments (*ace*) nach Einfachverdau des Plasmids (pGEM<sup>®</sup>-T Vektor) mit Nco I oder Not I und anschließender Auftrennung in 1,5%igem TAE-Agarosegel**

1: 1 kb DNA-Längenstandard

2: *ace*-3'-Endfragment im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (ungeschnitten)

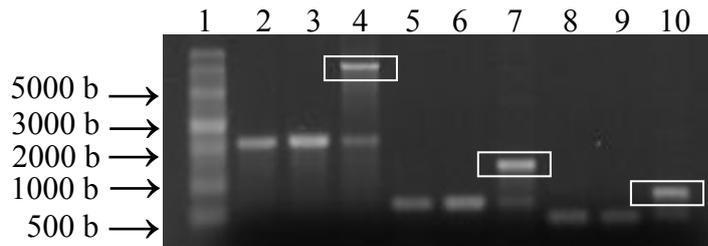
3: *ace*-3'-Endfragment im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor mit Nco I geschnitten (linearisiertes Plasmid für die Gewinnung eines SP6-RNA-Polymerase-Transkriptes)

4: *ace*-3'-Endfragment im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor mit Not I geschnitten (linearisiertes Plasmid für die Gewinnung eines T7-RNA-Polymerase-Transkriptes)

#### 4.5.8 *In vitro*-Transkripte und Herstellung doppelsträngiger RNA

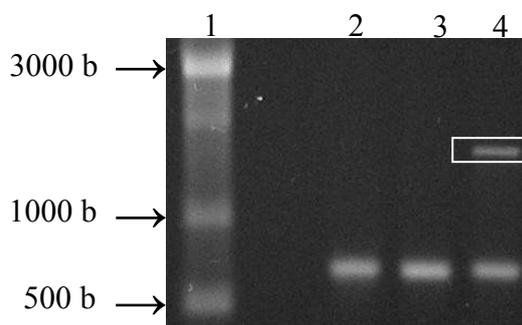
Die linearisierten Plasmide wurden gereinigt, gefällt (vgl. 3.9.12 und 3.9.13) und transkribiert (vgl. 3.9.14). Zur Herstellung doppelsträngiger RNA wurden die so gewonnenen einzelsträngigen SP6- und T7-RNA-Polymerase-*in vitro*-Transkripte eines Gen-Fragments in einer *Annealing*-Reaktion (vgl. 3.9.15) gepaart.

Die Abbildungen 4-23 bis 4-27 zeigen die SP6- und T7-RNA-Polymerase-Transkripte der jeweiligen cDNA oder des cDNA-Fragments (3'- und 5'-Endfragment) neben den durch *Annealing* gepaarten doppelsträngigen RNA-Transkripten (= dsRNA, in den Abbildungen markiert durch einen weißen Rahmen). Die nach erfolgtem *Annealing* verbliebenen Einzelstränge spiegeln die begrenzte Genauigkeit der Quantifizierung der beiden RNA-Einzelstränge wieder (z.B. in Abb. 4-23, Bahn 4, 7 und 10 die jeweils ungerahmte Bande).



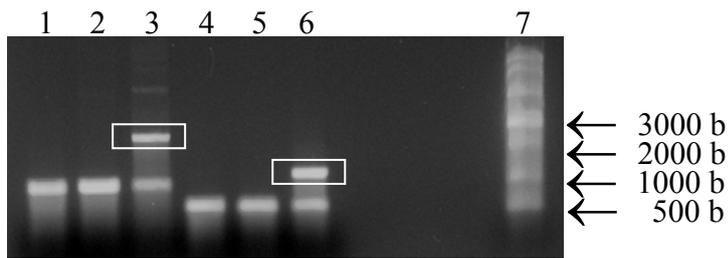
**Abb. 4-23: Darstellung verschiedener SP6-RNA-Polymerase-, T7-RNA-Polymerase-Transkripte und der dsRNA-Konstrukte von *L. cuprina* nach Auftrennung in 1,2%igem TBE-Agarosegel**

- 1: RNA-Längenstandard
- 2: SP6-RNA-Polymerase-Transkript der vollständigen *ace*-cDNA
- 3: T7-RNA-Polymerase-Transkript der vollständigen *ace*-cDNA
- 4: gepaartes dsRNA-Konstrukt der vollständigen *ace*-cDNA (gerahmt)
- 5: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *ace*-3'-Endfragments
- 6: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *ace*-3'-Endfragments
- 7: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *ace*-3'-Endfragments (gerahmt)
- 8: SP6-RNA-Polymerase-Transkript der *his3*-cDNA
- 9: T7-RNA-Polymerase-Transkript der *his3*-cDNA
- 10: gepaartes dsRNA-Konstrukt der *his3*-cDNA (gerahmt)



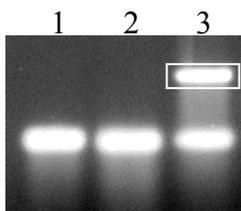
**Abb. 4-24: Darstellung von SP6-RNA-Polymerase-, T7-RNA-Polymerase-Transkript und dsRNA-Konstrukt des *ace*-5'-Endfragments von *L. cuprina* nach Auftrennung in 1,2%igem TBE-Agarosegel**

- 1: RNA-Längenstandard
- 2: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *ace*-5'-Endfragments
- 3: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *ace*-5'-Endfragments
- 4: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *ace*-5'-Endfragments (gerahmt)



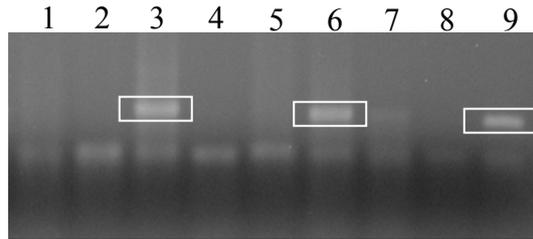
**Abb. 4-25: Darstellung von SP6-RNA-Polymerase-, T7-RNA-Polymerase-Transkript und dsRNA-Konstrukt der vollständigen *adp/atp*-cDNA und des *adp/atp*-5'-Endfragments von *L. cuprina* nach Auftrennung in 1,2%igem TBE-Agarosegel**

- 1: SP6-RNA-Polymerase-Transkript der vollständigen *adp/atp*-cDNA
- 2: T7-RNA-Polymerase-Transkript der vollständigen *adp/atp*-cDNA
- 3: gepaartes dsRNA-Konstrukt der vollständigen *adp/atp*-cDNA (gerahmt)
- 4: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *adp/atp*-5'-Endfragments
- 5: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *adp/atp*-5'-Endfragments
- 6: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *adp/atp*-5'-Endfragments (gerahmt)
- 7: RNA-Längenstandard



**Abb. 4-26: Darstellung von SP6-RNA-Polymerase-, T7-RNA-Polymerase-Transkript und dsRNA-Konstrukt des *adp/atp*-3'-Endfragments von *L. cuprina* nach Auftrennung in 1,2%igem TBE-Agarosegel**

- 1: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *adp/atp*-3'-Endfragments
- 2: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *adp/atp*-3'-Endfragments
- 3: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *adp/atp*-3'-Endfragments (gerahmt)



**Abb. 4-27: Darstellung von SP6-RNA-Polymerase-, T7-RNA-Polymerase-Trankripten und dsRNA-Konstrukten des *gluch-5'*-Endfragments und *gluch-3'*-Endfragments von *L. cuprina* sowie einer unspezifischen Kontroll-cDNA (*amp*) nach Auftrennung in 1,2%igem TBE-Agarosegel**

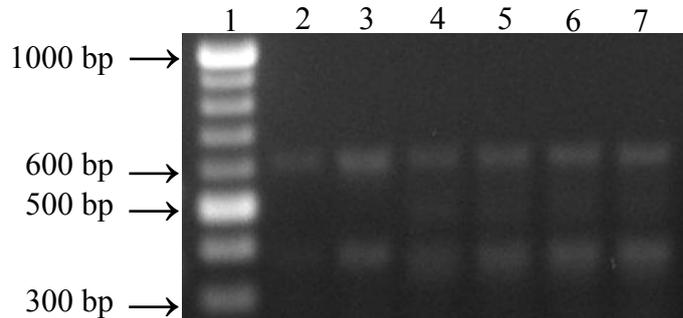
- 1: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *gluch-5'*-Endfragments
- 2: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *gluch-5'*-Endfragments
- 3: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *gluch-5'*-Endfragments (gerahmt)
- 4: SP6-RNA-Polymerase-Transkript des *gluch-3'*-Endfragments
- 5: T7-RNA-Polymerase-Transkript des *gluch-3'*-Endfragments
- 6: gepaartes dsRNA-Konstrukt des *gluch-3'*-Endfragments (gerahmt)
- 7: SP6-RNA-Polymerase-Transkript der *amp*-cDNA (*amp* = Ampicillin-Resistenzgen)
- 8: T7-RNA-Polymerase-Transkript der *amp*-cDNA
- 9: gepaartes dsRNA-Konstrukt der *amp*-cDNA (gerahmt = unspezifisches dsRNA-*amp*-Kontroll-Konstrukt)

#### 4.5.9 RT-PCR mit 2 Primerpaaren

Vorab wurde die Möglichkeit getestet, in einer RT-PCR 2 Gen-Fragmente (*ace-5'*-Endfragment und *his3*) gleichzeitig zu amplifizieren (vgl. 3.9.3.1). Des Weiteren musste für die semiquantitative Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge nach RNAi-Induktion die Zyklenzahl ermittelt werden, bei der die Reaktion im linearen Bereich verläuft. Hierzu wurden dem Reaktionsansatz jeweils 2,5 µl-Aliquote nach 24, 26, 28, 30, 32 und 34 Zyklen entnommen und sofort auf Eis gekühlt, um sie sodann gelelektrophoretisch aufzutrennen.

Abbildung 4-28 zeigt die *his3*-Amplifikate und *ace-3'*-Endfragment-Amplifikate zum Zeitpunkt der jeweiligen Zyklenzahl. Ab Zyklenzahl 32 ist keine Zunahme der Bandenintensität mehr zu erkennen (Abb. 4-28, Vergleich Bahn 6 und 7). Folglich ist hier eine Sättigung der Reaktion erreicht, das heißt, die für die Reaktion notwendigen Komponenten wurden verbraucht (Primer, dNTPs, Enzym, etc.). Dem Rechnung tragend wurde für die nachfolgende Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge in einzelnen adulten *L. cuprina* (vgl. 4.8) eine Zyklenzahl zwischen 28 und 30 gewählt (Abb. 4-28, Bahn 4 und 5). Die ausreichende Signalstärke für eine semiquantitative Bestimmung ist bei dieser Zyklenzahl

gewährleistet. Die höhere Signalstärke bei Zyklenzahl 26 (Bahn 3) ist durch eine fehlerhafte Entnahme von  $>2,5 \mu\text{l}$  Reaktionsansatz zu erklären.



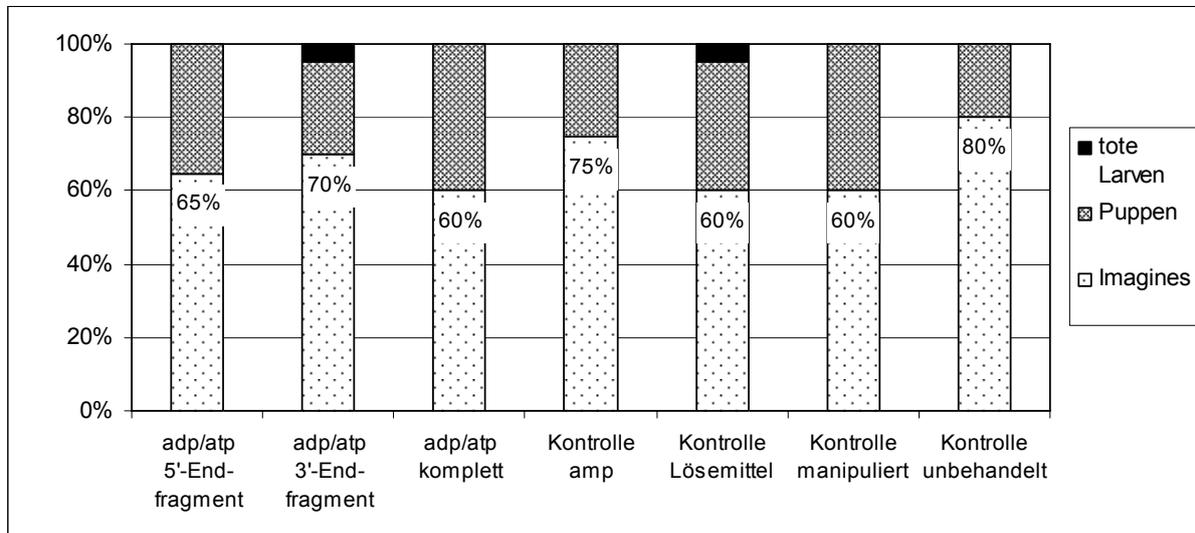
**Abb. 4-28:** Darstellung einer sequenziellen RT-PCR mit zwei Primerpaaren zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl nach Auftrennung in 1%igem TAE-Agarosegel  
1: 100 bp DNA-Längenstandard  
2-7: *ace-5'*-Endfragment-Amplifikat (616 bp) und *his3*-Amplifikat (380 bp) nach 24 (2), 26 (3), 28 (4), 30 (5), 32 (6) und 34 Zyklen (7)

#### 4.6 Versuch des RNAi-Genexpressionsknockdown an *L. cuprina*-L<sub>3</sub>

Es wurde eine Reihe von Experimenten der RNAi-Genexpressionshemmung durch Injektion spezifischer, doppelsträngiger RNA in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> durchgeführt.

Im ersten Versuch wurde den Larven dsRNA-Konstrukte des 5'-Endfragments, 3'-Endfragments und der kompletten cDNA des ADP/ATP-Translokators injiziert. Die Schlupfraten der mit *adp/atp*-5'-Endfragment injizierten L<sub>3</sub> lag bei 65 % und die der *adp/atp*-3'-Endfragment injizierten L<sub>3</sub> bei 70 %. Nach Injektion des von vollständiger *adp/atp*-cDNA abgeleiteten dsRNA-Konstrukts schlüpften 60 % der injizierten Fliegen. In der Ampicillin-Resistenzgen-Kontrolle (*amp*) entwickelten sich 75 % der L<sub>3</sub> zu Imagines. In der Lösemittel- (TE-Puffer, pH 8,0) und der manipulierten Kontrollgruppe zeigte sich ein Schlupfrate von 60 %. In der unbehandelten Kontrollgruppe schlüpften 80 % der *L. cuprina*. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,7386$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Folglich konnte bei keinem der Experimente mit ADP/ATP-Translokator-Konstrukten eine signifikante Abnahme der Schlupfrate nachgewiesen werden.

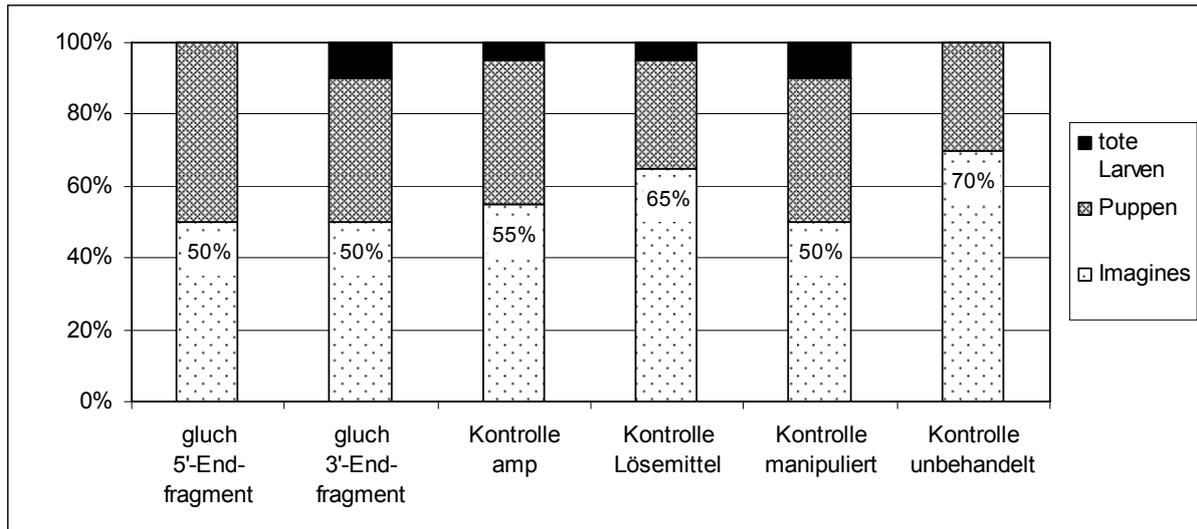
In Abbildung 4-29 werden die nach Injektion spezifischer, doppelsträngiger RNA erzielten Schlupfraten neben den der Kontrollgruppen (unspezifisches Ampicillin-Resistenzgen, Lösemittel, manipuliert und unbehandelt) gezeigt.



**Abb. 4-29: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion spezifischer dsRNA-Konstrukte des ADP/ATP-Translokators (*adp/atp*) in  $L_3$**

Injiziert wurden je 2  $\mu$ l dsRNA-Konstrukt des 3'-, 5'-Endfragments und der kompletten *adp/atp*-cDNA sowie wie der unspezifischen Ampicillin-Resistenzgen (*amp*) -Kontrolle ( $\sim 250$  ng dsRNA/ $\mu$ l in TE-Puffer, pH 8,0). Drei weitere Gruppen dienten zusätzlich als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde mit 2  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8,0 injiziert (Lösemittelkontrolle); eine zweite Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine dritte blieb unbehandelt.

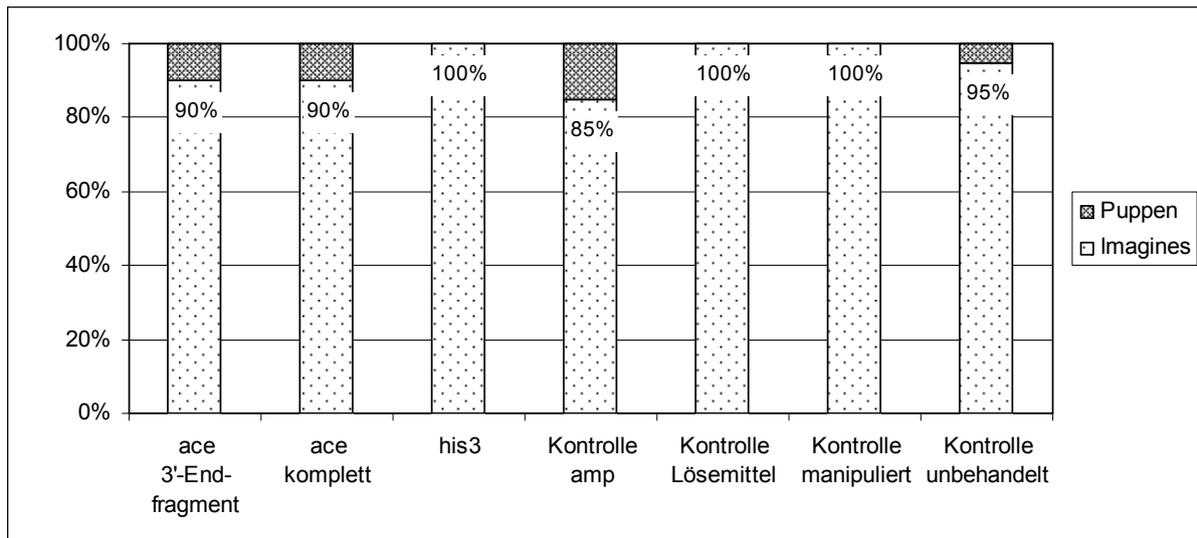
Das nächste RNAi-Experiment wurde mit den 3'- und 5'-Endfragmenten des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (*gluch*) durchgeführt. 50 % Imagines schlüpften nach Inkubation aus den Larven der *gluch*-5'-Endfragment und der *gluch*-3'-Endfragment injizierten Gruppen. Die Schlupfraten der Ampicillin-Resistenzgen-Kontrolle und der manipulierten Kontrolle lagen mit 55 % (*amp*) und 50 % (manipuliert) in vergleichbarer Höhe. Es fällt auf, dass auch in der unbehandelten Kontrolle nur 70 % der Imagines zum Schlupf kamen. Eine Lösemittel-Kontrolle (TE-Puffer) zeigte 65 % Schlupf adulter Fliegen. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,6852$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Auch bei Verwendung von spezifischen *gluch*-RNAi-Konstrukten war nach Injektion in *L. cuprina*- $L_3$  keine Beeinträchtigung der Schlupfraten festzustellen. Die Ergebnisse dieses RNAi-Experimentes sind in Abbildung 4-30 neben den Schlupfraten der Kontrollgruppen dargestellt.



**Abb. 4-30: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion spezifischer dsRNA-Konstrukte des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (*gluch*) in  $L_3$**

Injiziert wurden je 2  $\mu$ l dsRNA-Konstrukt des *gluch*-3'- und *gluch*-5'-Endfragments sowie der unspezifischen Ampicillin-Resistenzgen (*amp*) -Kontrolle (~250 ng dsRNA/ $\mu$ l in TE-Puffer, pH 8,0). Drei weitere Gruppen dienten zusätzlich als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde mit 2  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8,0 injiziert (Lösemittelkontrolle); eine zweite Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine dritte blieb unbehandelt.

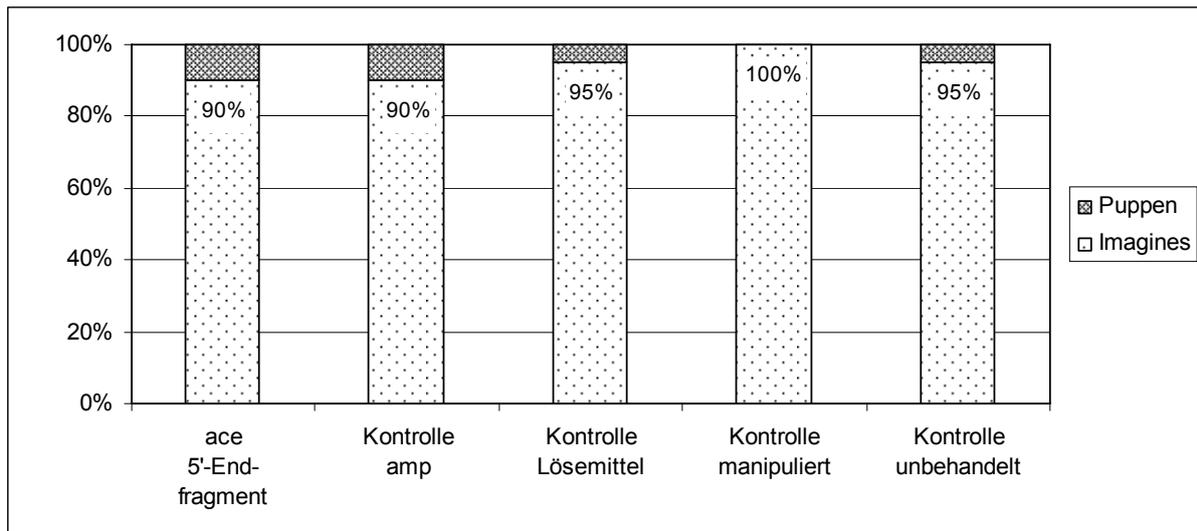
Im nachfolgenden RNAi-Experiment wurde neben zwei dsRNA-Konstrukten der Acetylcholinesterase (*ace*-3'-Endfragment und komplette *ace*-cDNA) auch das von Histon H3-abgeleitete dsRNA-Konstrukt (*his3*) in *L. cuprina*- $L_3$  injiziert. Beide *ace*-dsRNA-injizierten Gruppen zeigten eine Schlupfrate von 90 % (*ace*-3'-Endfragment und komplette *ace*-cDNA). In der Gruppe der *his3*-injizierten  $L_3$  schlüpften 100 % adulte Fliegen. In der *amp*-Kontrolle schlüpften 85 % der Imagines. In der Lösemittel- und manipulierten Kontrollgruppe entwickelten sich 100 % des Versuchskollektivs zu adulten Fliegen und in der unbehandelten Kontrollgruppe schlüpften 95 % der *L. cuprina*. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,2265$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Wie schon in den vorhergehenden Experimenten mit *adp/atp*- und *gluch*-dsRNA-Konstrukten, beeinflusste die Injektion von *ace*- oder *his3*-cDNA-abgeleiteter dsRNA die Schlupfrate von *L. cuprina* nicht in signifikanter Weise. Die Ergebnisse dieses RNAi-Experimentes sind in Abbildung 4-31 neben den Schlupfraten der Kontrollgruppen dargestellt.



**Abb. 4-31: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion spezifischer dsRNA-Konstrukte der Acetylcholinesterase (*ace*) und des Histon H3 (*his3*) in  $L_3$**

Injiziert wurden je 2  $\mu$ l dsRNA-Konstrukt des *ace*-3'-Endfragments, der kompletten *ace*-cDNA und des *his3* sowie der unspezifischen Ampicillin-Resistenzgen (*amp*) -Kontrolle ( $\sim$ 250 ng dsRNA/ $\mu$ l in TE-Puffer, pH 8,0). Drei weitere Gruppen dienten zusätzlich als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde mit 2  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8,0 injiziert (Lösemittelkontrolle); eine zweite Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine dritte blieb unbehandelt.

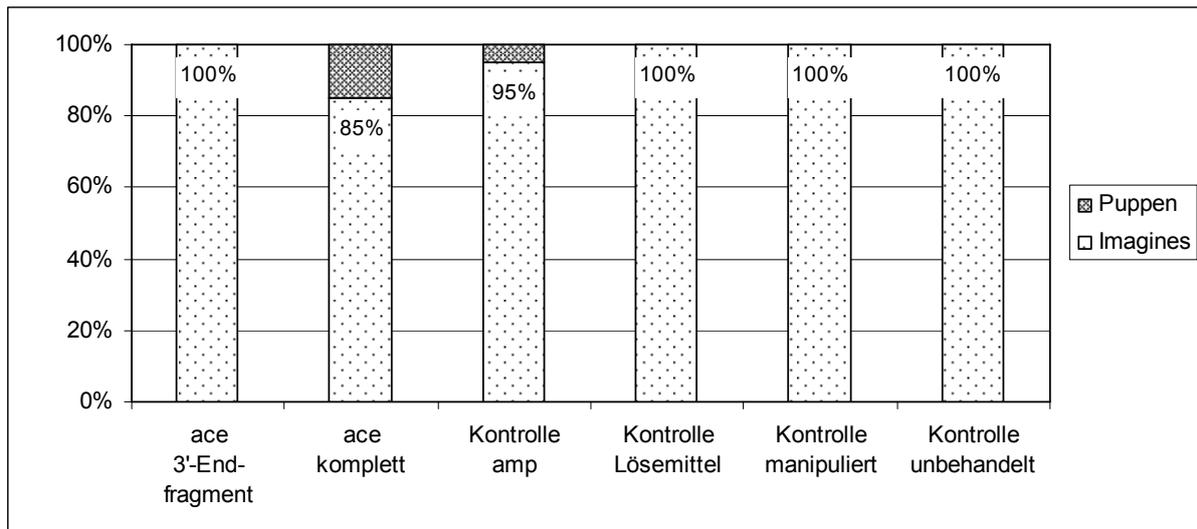
Die Injektion des Acetylcholinesterase-5'-Endfragments resultierte in einer Schlupfrate von 90 %. In den Kontrollgruppen entwickelten sich 90 % (*amp*-Kontrolle), 95 % (Lösemittel- und unbehandelte Kontrolle) und 100 % (manipulierte Kontrolle) der Larven zu Imagines. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,6523$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Die Ergebnisse dieses RNAi-Experimentes sind in Abbildung 4-32 neben den Schlupfraten der Kontrollgruppen dargestellt.



**Abb. 4-32: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach Injektion des spezifischen dsRNA-Konstrukts des *ace*-5'-Endfragments in  $L_3$**

Injiziert wurden je 2  $\mu$ l dsRNA-Konstrukt des *ace*-5'-Endfragments sowie der unspezifischen Ampicillin-Resistenzgen (*amp*) -Kontrolle ( $\sim$ 250 ng dsRNA/ $\mu$ l in TE-Puffer, pH 8,0). Drei weitere Gruppen dienten zusätzlich als Kontrollen: Eine Kontrollgruppe wurde mit 2  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8,0 injiziert (Lösemittelkontrolle); eine zweite Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine dritte blieb unbehandelt.

Um die Ergebnisse für die *ace*-Gen-abgeleiteten Konstrukte zu bestätigen, wurde in einem letzten RNAi-Genexpression-Hemmungsversuch nochmals sowohl das *ace*-3'-Endfragment als auch das von der kompletten *ace*-cDNA abgeleitete dsRNA-Konstrukt injiziert. Die Anzahl der sich entwickelnden Imagines entsprach mit 100 % Schlupfrate (*ace*-3'-Endfragment) und 85 % Schlupfrate (komplette *ace*-cDNA) den Ergebnissen der ersten Injektion mit diesen RNAi-Konstrukten. Im Vergleich dazu lagen die Schlupfraten der Kontrollgruppen bei 95 % (*amp*-Kontrolle) und 100 % (Lösemittel-Kontrolle, manipulierte und unbehandelte Kontrolle). Aufgrund der hohen Schlupfraten in den Kontrollgruppen (95 - 100 %) ergab der statistische Vergleich einen geringen Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,0460$ ; Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Beim Vergleich der gepoolten Testgruppen (*ace*-Gruppen versus Kontrollen) war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,0722$ ; Chi-Quadrat-Test). Beim paarweisen Vergleich (komplette *ace*-cDNA versus unbehandelte Kontrolle) war der Unterschied ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,0717$ ; Chi-Quadrat-Test). Die Ergebnisse dieses RNAi-Experiments werden in der Abbildung 4-33 im direkten Vergleich zu den Schlupfraten der Kontrollgruppen dargestellt.



**Abb. 4-33: Schlupfraten bei *L. cuprina* nach wiederholter Injektion spezifischer dsRNA-Konstrukte der Acetylcholinesterase (*ace*) in  $L_3$**

Injiziert wurden je 2  $\mu$ l dsRNA-Konstrukt des 3'-Endfragments und der kompletten *ace*-cDNA sowie der unspezifischen Ampicillin-Resistenzgen (*amp*) -Kontrolle ( $\sim$ 250 ng dsRNA/ $\mu$ l in TE-Puffer, pH 8,0). Drei weitere Gruppen dienten zusätzlich als Kontrollen. Eine Kontrollgruppe wurde mit 2  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8,0 injiziert (Lösemittelkontrolle); eine zweite Kontrollgruppe wurde zur Bewertung des mechanischen Injektionsschadens mit der Injektionskanüle manipuliert, eine dritte blieb unbehandelt.

Die Ergebnisse der durchgeführten RNAi-Experimente zeigen, dass durch Injektion spezifischer, doppelsträngiger RNA der hier betrachteten Gene (*adp/atp*, *gluch*, *ace*, *his3*) in *L. cuprina*- $L_3$ , unabhängig von Größe und Art des jeweiligen verwendeten dsRNA-Konstruktes, keine signifikante Verringerung der Schlupfrate (Anzahl schlüpfender Imagines) oder andere phänotypische Effekte wie Tod der  $L_3$  nach Injektion oder Ausbleiben der Verpuppung verursacht wurden.

#### 4.7 Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität in adulten *L. cuprina*

In einem Vorversuch wurden aus jeweils 10 Imagines Kopfextrakte gewonnen, um sowohl deren Proteingehalt (vgl. 3.10.2) als auch deren Acetylcholinesterase-Aktivität (vgl. 3.10.1) mittels photometrischer Messung des Pseudosubstrat-Reaktionsproduktes Thiocholin ( $\Delta$  OD<sub>412</sub>) zu bestimmen.

Die gewonnene Enzymaktivität (Extinktionswerte) eines Fliegenkopfes wurde sodann auf den jeweiligen Proteingehalt sowie auf das jeweilige Kopfgewicht derselben Imago bezogen und somit ins Verhältnis gesetzt. Die zehn unbehandelten Fliegen zeigten eine Schwankungsbreite der spezifischen Enzymaktivitäten von 0,0019 bis 0,0061  $\Delta$  OD<sub>412</sub>/min/mg Protein. Bezogen auf das jeweilige Kopfgewicht variierten die Acetylcholinesterase-Aktivitäten von 0,0065 bis 0,0227  $\Delta$  OD<sub>412</sub>/min/mg Gewebe. In Tabelle 4-1 sind die Quotienten aus Enzymaktivität und Proteingehalt sowie die Quotienten von Enzymaktivität und Kopfgewicht der zehn gemessenen Fliegen dargestellt.

**Tab. 4-1: Acetylcholinesterase-Aktivität im Verhältnis zu Proteingehalt und Gewicht gemessen in zehn einzelnen Köpfen adulter *L. cuprina***

ACHE = Enzymaktivität der Acetylcholinesterase

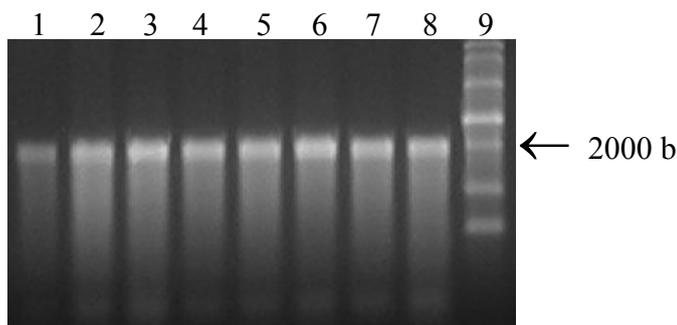
Fliege Nr.	ACHE-Aktivität / Proteingehalt in mg	ACHE-Aktivität / Kopfgewicht in mg
1	0,0046	0,0065
2	0,0061	0,0137
3	0,0061	0,0109
4	0,0046	0,0095
5	0,0051	0,0075
6	0,0029	0,0227
7	0,0031	0,0121
8	0,0049	0,0135
9	0,0042	0,0136
10	0,0019	0,0093

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits bei unbehandelten Fliegen eine erhebliche Varianz der Enzymaktivitäten um den Faktor 3 (bezogen auf Proteingehalt und Gewicht jedes Fliegenkopfes) besteht. Aufgrund dieser Schwankungsbreite erscheint eine Aussage über die Beeinflussung der Acetylcholinesterase-Aktivität nach RNAi-Induktion nicht möglich.

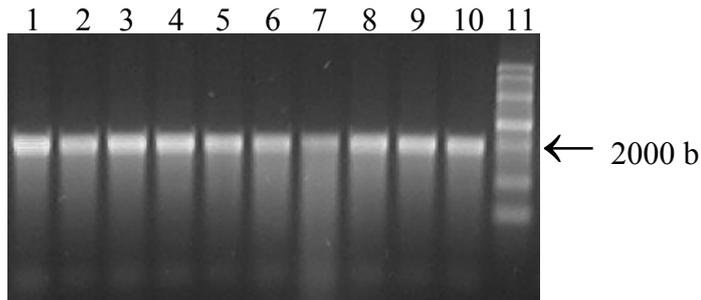
#### 4.8 Semiquantitative Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge in einzelnen adulten *L. cuprina* nach RNAi-Induktion

Zur semiquantitativen Bestimmung der Acetylcholinesterase-mRNA-Menge in jeder einzelnen Fliege wurde exemplarisch die *ace*-3'-Endfragment-injizierte Gruppe ausgewählt. Neben diesen dsRNA-behandelten Imagines wurden auch die adulten Fliegen einer unbehandelten Kontrollgruppe unmittelbar nach Schlupf in flüssigem Stickstoff getötet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Aus jeder einzelnen Imago wurde die Gesamt-RNA isoliert (vgl. 3.9.1.2), um sodann deren Qualität auf TBE-Agarosegelen zu überprüfen.

Abbildung 4-34 und 4-35 zeigen exemplarisch aus einzelnen Fliegen der *ace*-3'-Endfragment-injizierten-Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe isolierte Gesamt-RNA (500 ng) auf einem 1,5%igem TBE-Gel. Die Gesamt-RNA von einer Fliege jeder Gruppe wurde aufgrund ihrer nicht zufriedenstellenden Qualität verworfen (Abb. 4-34: Bahn 1; Abb. 4-35: Bahn 7) und damit nicht für die semiquantitative Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge eingesetzt.



**Abb. 4-34: Darstellung der aus *L. cuprina*-Einzelfliegen isolierten Gesamt-RNA der *ace*-3'-Endfragment injizierten Gruppe nach Auftrennung in 1,5%igem TBE-Agarosegel**  
1: Gesamt-RNA mangelhafter Qualität.  
2-8: Im Vergleich dazu stellt sich die Gesamt-RNA aus sieben weiteren Einzelfliegen mit intensiver Bande (ribosomaler RNA) bei 2000 b dar.  
9: RNA-Längenstandard



**Abb. 4-35: Darstellung der aus *L. cuprina*-Einzelfliegen isolierten Gesamt-RNA der unbehandelten Kontrollgruppe nach Auftrennung in 1,5%igem TBE-Agarosegel**

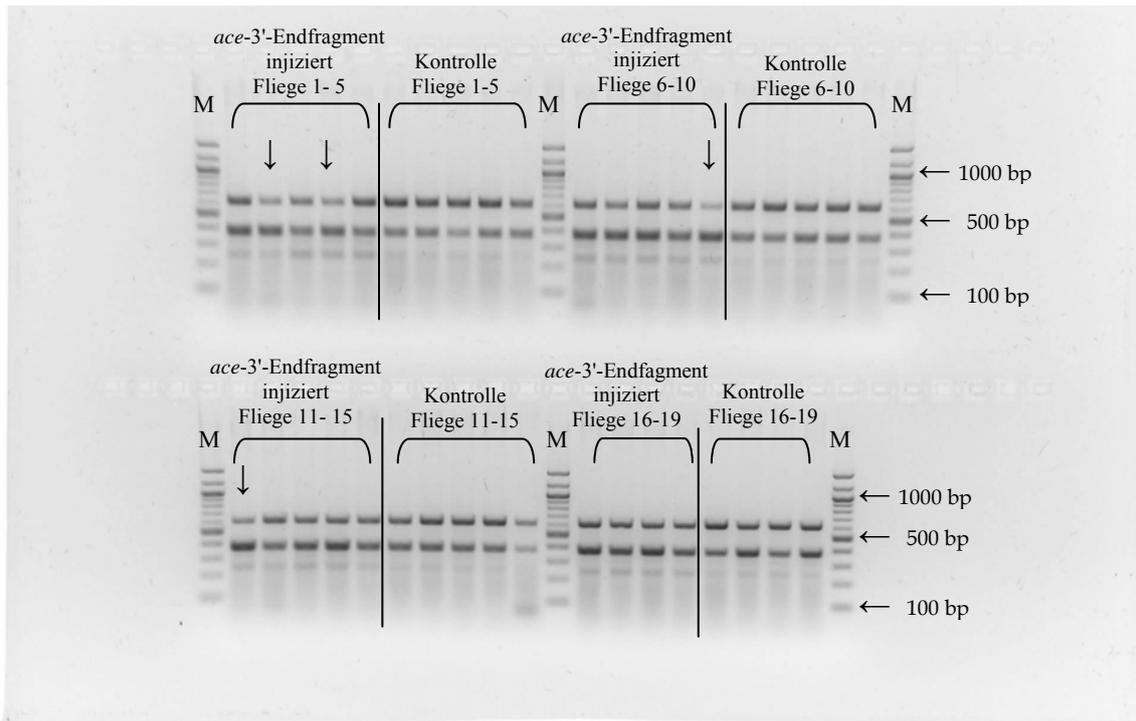
7: Gesamt-RNA mangelhafter Qualität.

1-6 und 8-10: Im Vergleich dazu stellt sich die Gesamt-RNA aus neun weiteren Einzelfliegen mit intensiver Bande (ribosomaler RNA) bei 2000 b dar.

11: RNA-Längenstandard

Mit der Gesamt-RNA aus den 19 verbliebenen Einzelfliegen jeder Gruppe (*ace*-3'-Endfragment-injizierte Gruppe, unbehandelte Kontrolle) wurde eine RT-PCR mit 2 Primerpaaren (vgl. 3.9.3.1) durchgeführt, bei der 500 ng der isolierten Gesamt-RNA jeder Fliege als Matrize dienten. So wurden aus der Gesamt-RNA jeder Imago in einer Reaktion sowohl das *ace*-5'-Endfragment (612 bp) sowie das *his3* (380 bp) amplifiziert.

In Abbildung 4-36 wurden 5  $\mu$ l jedes Ansatzes (25  $\mu$ l) auf einem 2%igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Amplifikate der *ace*-3'-Endfragment-injizierten-Fliegen denen der Kontrollfliegen zum direkten Vergleich gegenübergestellt wurden. Die Intensität einiger *ace*-5'-Endfragment-Banden der RNAi-induzierten Gruppe erscheinen im Vergleich zur jeweiligen *his3*-Bande schwächer als bei der Kontrollgruppe (siehe Markierung  $\downarrow$  in Abb. 4-36).



**Abb. 4-36: Darstellung der *ace-5'*-Endfragment- und *his3*-Amplifikate, gewonnen nach RT-PCR mit zwei Primerpaaren und Auftrennung in 2%igem TAE-Agarosegel**

Die *ace-5'*-Endfragment- (612 bp) und *his3*-Amplifikate (380 bp) wurden unter identischen Bedingungen in einem Reaktionsansatz gewonnen. Als Matrize diente die Gesamt-RNA aus jeweils 19 Einzelfliegen der mit *ace-3'*-Endfragment-injizierten Gruppe und der unbehandelte Kontrolle.

Mengenmäßig im Vergleich zur *his3*-Bande besonders geringe *ace-5'*-Endfragment-Amplifikate wurden mit ↓ markiert.

M: 100 bp DNA-Längenstandard

Die Intensitäten der *ace-5'*-Endfragment-Banden und *his3*-Banden wurden mit Hilfe des Programms AIDA (Advanced Image Data Analyzer; vgl. 3.11.4.2) bestimmt. Die dann ermittelten *his3/ace-5'*-Endfragment-Quotienten jeder einzelnen Imago der RNAi-induzierten Gruppe (nach Injektion des *ace-3'*-Endfragments) sowie der Kontrollgruppe werden in Tabelle 4-2 gezeigt. Ebenfalls wiedergegeben werden der Mittelwert und die Standardabweichung in jeder Versuchsgruppe. Die *his3/ace-5'*-Endfragment-Quotienten lagen im Bereich von 0,903 bis 1,819 in der RNAi-induzierten Gruppe und im Bereich von 0,716 bis 1,119 in der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen RNAi-induzierten (*ace-5'*-Endfragment) und Kontroll-Fliegen sind mit  $p < 0,0001$  (t-Test) hochsignifikant (vgl. 3.11.4.2).

**Tab. 4-2: Verhältnis der Amplifikat-Intensitäten *his3/ace-5'*-Endfragment nach RT-PCR mit Gesamt-RNA einzelner, adulter *L. cuprina* als Matrize**

Hohe Werte bei den Intensitätsverhältnissen sind auf besonders schwache Intensitäten der *ace-5'*-Endfragment-Banden zurückzuführen (vgl. Abb.4-36). Die vier höchsten Werte in Fliegen der RNAi-induzierten Gruppe wurden fett gedruckt.

x = Mittelwert

s = Standardabweichung

Fliege Nr.	Fliegen nach RNAi-Induktion		Fliegen der Kontrollgruppe	
1	1,109		0,799	
2	<b>1,506</b>		0,842	
3	1,087		0,716	
4	<b>1,419</b>		0,836	
5	0,903		0,964	
6	1,231		0,994	
7	1,336		0,822	
8	1,198		1,004	
9	1,173		0,916	
10	<b>1,819</b>	x = 1,242	0,861	x = 0,914
11	<b>1,744</b>	s = ±0,235	1,025	s = ±0,097
12	1,007		0,955	
13	1,194		0,941	
14	1,229		0,922	
15	1,083		0,874	
15	1,150		0,853	
17	1,133		1,119	
18	1,213		0,879	
19	1,063		1,034	

## 5 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Machbarkeit von RNAi-induzierter Genexpressionsunterdrückung in nicht-embryonalen Stadien der Goldfliege *L. cuprina*.

Zur Schaffung der Voraussetzungen für diese Art von RNAi-Experimenten waren

- 1) die Bereitstellung von Gesamt- und Poly(A)-RNA aus *L. cuprina*-Larven und -Imagines, die RT-PCR-Amplifikation von geeigneten Genen bzw. Genfragmenten (3'- und 5'-Endfragmenten) als Matrizen (*Templates*) für die *in vitro*-Transkription und die Generierung von injizierbarer doppelsträngiger RNA, sowie
- 2) die Etablierung von tolerierten und reproduzierbaren L<sub>3</sub>-Larven-Injektionstechniken erforderlich.

Als Ausgangsmaterial standen *L. cuprina*-L<sub>3</sub> und Adulte aus der Intervet-eigenen Stammhaltung und Zucht zur Verfügung. Für die Durchführung der RNAi-Experimente wurden als *L. cuprina*-Zielsequenzen die cDNAs von Acetylcholinesterase (*ace*), ADP/ATP-Translokator (*adp/atp*) und Glutamat-gesteuerten Chloridkanal (*gluch*) sowie das Histon H3 (*his3*) ausgewählt. Die Auswahl aus den allgemein zugänglichen *L. cuprina*-cDNAs (GenBank) wurde zum einen von der in *D. melanogaster* erwiesenen (*ace*; HALL und KANKEL 1976, FOURNIER et al., 1993) oder vermuteten (*gluch*, *adp/atp*) Letalität der jeweiligen Gen-*Knockouts* bestimmt. Zum anderen sollten die Gene als Einzelkopie-Gene vorliegen. Dies wurde nach Untersuchungen bei *D. melanogaster* (vgl. CELNIKER et al., 2002) vermutet (das Genom von *L. cuprina* ist nicht sequenziert) für Gene, die für den ADP/ATP-Translokator und Glutamat-gesteuerten Chloridkanal kodieren. Für das Acetylcholinesterase-Gen wurde das Vorliegen als Einzelkopie in *L. cuprina* in Untersuchungen von CHEN et al. (2001) bestätigt.

Die DNA-Sequenzen der verschiedenen klonierten RT-PCR-Fragmente ergab weitgehende Übereinstimmung mit den Datenbanksequenzen. Die wenigen Unterschiede sind vermutlich auf PCR-Artefakte, Einzelnukleotidpolymorphismen sowie Splice-Varianten zurückzuführen und wurden für die weitere Durchführung der Experimente ignoriert. Zusätzlich zu den Datenbank-bekanntem Genen wurde das *his3* als aller Wahrscheinlichkeit nach für *L. cuprina* ebenfalls essenziellem Gen in RNAi-Versuche sowie als Kontrollgen für die semiquantitative RT-PCR-Bestimmung von mRNA-Spiegeln einbezogen. Hierbei stand keine publizierte

DNA-Sequenz zur Verfügung. Daher wurde die *L. cuprina-his3*-cDNA mit Hilfe degenerierter Primer aus Gesamt-RNA isoliert. Bemerkenswerterweise unterschied sich die *L. cuprina-his3*-cDNA-Sequenz in 73 von 378 Nukleotiden (81%ige Identität) vom *D. melanogaster-his3*, obschon die Übersetzung in die Aminosäuresequenz eine 100%ige Übereinstimmung ergab. Die meisten Nukleotid-Austausche waren in der dritten Base der Triplets festzustellen, in wenigen Fällen waren auch die ersten Basen von Leucin- und Arginin-Codons betroffen. In Übereinstimmung mit dem auffälligen generellen A/T-Reichtum von *L. cuprina*-cDNAs (eigene Codon-usage-Untersuchungen, vgl. als Beispiel *ace-D. melanogaster* 41,4 % A/T versus *ace-L. cuprina* 59,6 % A/T) führten die beobachteten Austausche im *L. cuprina-his3* zu einer Verschiebung in Richtung höherem A/T-Gehalt (52,5 %) verglichen mit der *Drosophila*-Sequenz (37 %).

Von diesen vier untersuchten Genen wurden eine Reihe von *sense*- und *antisense*-Transkripten hergestellt. Diese Transkripte wurden erfolgreich zu Doppelstrang-RNA hybridisiert und anschließend in Larven-Injektionsversuchen eingesetzt.

Vor Beginn der RNAi-Experimente musste zunächst ein für *L. cuprina* geeignetes Injektionssystem entwickelt werden. Die zwei wichtigsten Faktoren waren hierbei sowohl ein hohes Maß an Verträglichkeit für *L. cuprina* als auch die Möglichkeit des Umgangs mit sehr kleinen Volumina, wie sie für dsRNA-Injektionen üblich sind (DZITOYEVA et al., 2001; GOTO, 2003; ZHU et al., 2003). Die ursprüngliche Überlegung, dem *Drosophila*-Vorbild zu folgen (vgl. KENNERDELL und CARTHEW, 1998) und entsprechend *Lucilia*-Eier zu injizieren, wurde aufgrund der im Vergleich zu *Drosophila* viel höheren Fragilität und Empfindlichkeit der *L. cuprina*-Eier gegen mechanische Manipulation verworfen. Stattdessen fiel die Wahl auf die *L. cuprina*-L<sub>3</sub>, da dieses Larvenstadium für die Durchführung der RNAi-Experimente mehrere Vorteile bietet. Die Verwendung von *L. cuprina*-L<sub>3</sub> ermöglicht die Gewinnung homogener Versuchskollektive auf sehr einfache Weise. Außerdem erscheint dieses Stadium aufgrund der unmittelbar anstehenden massiven Umbauvorgänge während der nachfolgenden Verpuppung (Puparium) als besonders geeignet, um nach Injektion von dsRNA mögliche RNAi-Effekte makro-phänotypisch auszubilden. Die Entscheidung, *L. cuprina*-L<sub>3</sub> zu verwenden, wurde zusätzlich bestärkt durch die Arbeit von DZITOYEVA et al. (2001), die erstmals Genexpressionshemmung nach Injektion adulter *Drosophila* mit *lacZ*-dsRNA und damit die erfolgreiche Anwendung von RNAi in einem nicht-embryonalen Stadium beschreibt.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Injektion verschiedener Volumina des für dsRNA geeigneten Lösemittels TE-Puffer (pH 8.0) in L<sub>3</sub>-Larven prinzipiell möglich ist, ohne deren Vitalität und Weiterentwicklung während der Verpuppung maßgeblich zu stören. Des Weiteren belegte die Injektion verschiedener Farbstoff-Marker nicht nur die gleichmäßige Verteilung des injizierten Mediums in der gesamten Leibeshöhle der Larve, sondern zeigte auch die Verträglichkeit sowohl hochmolekularer als auch niedermolekularer Substanzen wie Rhodamin-Dextran und Trypanblau. Abschließend konnte in einem weiteren Vorversuch gezeigt werden, dass auch die Injektion unspezifischer RNA (Bäckerhefe-tRNA) und DNA (Heringssperma-DNA) keine wesentlichen Effekte auf die Entwicklung der Larve sowie auf den anschließenden Schlupf der Imagines (Ecdysis) hatte. Während der Vorversuche stellte sich das Verstopfen der sehr feinen Injektionskanüle bereits nach wenigen Injektionen als das vorrangige technische Problem bei der Durchführung der RNAi-Experimente dar. Der Umgang mit den sehr kleinen, nur limitiert verfügbaren Volumina an dsRNA während der eigentlichen RNAi-Experimente machte es notwendig, das Injektionssystem an diese Bedürfnisse anzupassen. Hierzu wurde das ursprünglich fest miteinander verschweißte Kanülen-Schlauch-System durch ein flexibles ersetzt. Durch den nun am Schlauchende vorhandenen Schraubadapter konnten nach Injektion verstopfte Kanülen ersetzt werden, was die serienmäßige Injektion kleiner Volumina (dsRNA) erst möglich machte. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein an *L. cuprina*-L<sub>3</sub> adaptiertes Injektionssystem etabliert werden konnte, bei dem insbesondere die Vitalität der Larven sowie Puparium und Ecdysis durch die Injektion weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Somit waren die Voraussetzungen für dsRNA-Injektionsexperimente geschaffen.

Für die eigentlichen RNAi-Genexpression-Hemmungsversuche wurde die dsRNA vier verschiedener Gene in Form von 3'-Endfragment, 5'-Endfragment (*ace*, *gluch*, *adp/atp*) und/oder das von vollständiger cDNA abgeleitete dsRNA-Konstrukt (*ace*, *adp/atp*, *his3*) in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> injiziert. Nach der Injektion waren bei keiner der verwendeten RNAi-Konstrukte mögliche, durch RNA-Interferenz ausgelöste makro-phänotypischen Effekte, wie zum Beispiel Tod der L<sub>3</sub>, das Ausbleiben der Verpuppung oder die Verringerung der Schlupfrate vitaler Imagines festzustellen. Unabhängig von Typ und Länge der dsRNA entwickelten sich im Vergleich zur mechanisch manipulierten, unbehandelten Kontrolle mindestens 85 % und zum Teil sogar bis zu 100 % der mit spezifischer dsRNA injizierten Larven zu adulten, vitalen Fliegen.

Für das Ausbleiben von Phänotypen bei dem beschriebenen experimentellen Ansatz kann eine Reihe von Faktoren verantwortlich sein:

- 1) Die Annahme, der *Knockout* der vier Gene wirke sich letal aus, trifft nicht zu.
- 2) Es gibt eine Verringerung der endogenen mRNA-Konzentrationen, aber die Penetranz des RNAi-Effektes und damit das Wirkungsausmaß reicht nicht aus, um Entwicklungsstillstand oder Letalität auszulösen.
- 3) Die injizierte dsRNA führte zu keiner Verringerung der mRNA-Konzentrationen.

Um zwischen den Möglichkeiten 1) und 2) einerseits und 3) andererseits unterscheiden zu können, sollten exemplarisch die Experimentreihen mit *ace*-dsRNA auf mögliche, makrophänotypisch nicht wirksame, RNAi-Effekte auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. Der Versuch, einen Acetylcholinesterase-RNAi-Effekt durch quantitative Bestimmung der Enzym-Aktivität zu identifizieren, scheiterte jedoch an der schon im unbehandelten Fliegenkollektiv festgestellten großen Schwankungsbreite der Enzymaktivität (Faktor >3), sowohl bezogen auf den Proteingehalt als auch bezogen auf das Frischgewicht der untersuchten Einzelfliegen (vgl. 4.7). Bei dieser hohen Variabilität schien es nicht wahrscheinlich, dass subtile RNAi-Effekte auf diese Weise nachweisbar waren. Um vorhandene RNAi-Effekte zumindest auf RNA-Ebene nachweisen zu können, wurde versucht, die mRNA-Mengen exemplarisch bei frisch geschlüpften Fliegen der mit *ace*-3'-Endfragment injizierten Gruppe (des zuletzt durchgeführten RNAi-Experiments, vgl. mit Abb. 4-33) sowie der unbehandelten Kontrollgruppe mittels RT-PCR zu quantifizieren. Hierzu wurde aus jeder Fliege die Gesamt-RNA gewonnen, deren gute Qualität bei jeweils 19 der 20 präparierten Fliegen mittels TBE-Agarosegel-Elektrophorese bestätigt werden konnte (vgl. 4.8). Die semiquantitative Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge jeder einzelnen Fliege erfolgte mit zwei Primerpaaren, in die jeweils gleiche Mengen an Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt wurden (500 ng). Die RT-PCR wurde mit allen RNA-*Templates* (der RNAi-behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrolle) gleichzeitig und unter identischen Bedingungen bei 28 Zyklen durchgeführt. Diese Zyklenzahl war zuvor als diejenige ermittelt worden, bei der die Amplifikation als lineare Reaktion verläuft und alle notwendigen Reagenzien in ausreichendem Maße vorhanden sind (vgl. 4.5.9). Essenziell für die Bestimmung der *ace*-mRNA-Menge mittels RT-PCR in den RNAi-induzierten Fliegen war der Einsatz der *ace*-5'-terminalen Primer. Diese verhinderten die Amplifikation von möglichen dsRNA-Resten des *ace*-3'-Endfragments, die ursprünglich beim RNAi-Experiment

injiziert worden waren. Um den Nachweis einer auf RNA-Ebene vorhandenen Genexpressionshemmung nach Injektion doppelsträngiger RNA zu ermöglichen, wurden in einem RT-PCR-Ansatz sowohl das *ace*-5'-Endfragment (612 bp) als auch das *his3* (380 bp) amplifiziert, wobei das letztere Amplifikat als interne Kontrolle diente. Nach der Analyse der Banden-Intensitäten wurden die Quotienten aus *his3/ace*-5'-Endfragment bestimmt. Hierbei zeigte sich im Verhältnis der Amplifikatmengen ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der *ace*-RNAi-induzierten Gruppe und der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,0001$ ; t-Test). Damit konnte belegt werden, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (*ace*-3'-Endfragment) in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> eine Verringerung der *ace*-mRNA-Menge in den Imagines zur Folge hatte. Der Nachweis einer Genexpressionshemmung nach RNA-Interferenz im parasitischen Insekt *L. cuprina* wurde somit erbracht.

Zu Beginn dieser Arbeit (Frühjahr 2002) gab es neben *Drosophila* für Arthropoden wenige Berichte über embryonale RNAi-Effekte. Sie betrafen den Käfer *T. castaneum* (BROWN et al., 1999), die Fliege *M. abdita* (STAUBER et al., 2000), die Wanze *O. fasciatus* (HUGHES und KAUFMANN, 2000) sowie die Spinne *Cupiennius salei* (SCHOPPMEIER und DAMEN, 2001; STOLLEWERK et al., 2001), nicht jedoch Parasiten von veterinärmedizinischem Interesse. Ein einzelner Bericht über phänotypische Effekte nach Injektion von dsRNA in Larven von *S. peregrina* (NISHIKAWA und NATORI, 2001) ließ darauf schließen, dass eine nach-embryonale Genexpressionshemmung durch RNAi auch bei anderen parasitischen Arthropoden möglich sein könnte. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigen diese Annahme für die parasitische Fliege *L. cuprina*. Obschon eine makro-phänotypische Penetranz in den hier beschriebenen Versuchen nicht gegeben war, zeigen die *ace*-RNA-Quantifizierungen in dsRNA-behandelten Fliegen, dass *L. cuprina* zu der Liste der RNAi-Technologie zugänglichen Organismen hinzugefügt werden kann.

Die Arbeit von GOTO et al. (2003) zeigt, dass die Effizienz des RNAi-Effektes stark vom Alter der behandelten Organismen abhängen kann, während embryonale RNAi-Effekte zeitlich stark begrenzt sein können. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten beide Einflüsse, wie zum Beispiel das Alter der injizierten Larven oder der untersuchten Imagines sowie die Zeitdauer von der dsRNA-Injektion bis zur Analyse der mRNA-Expression, nicht untersucht werden. Eine Konzentrationserhöhung der zu injizierenden dsRNA ( $>250$  ng/ $\mu$ l) wäre bei der Durchführung von Folgestudien ebenfalls denkbar. Es ist zu vermuten, dass auf diese Weise optimierte Versuchsansätze, möglicherweise auch mit weiteren Genen wie zum

Beispiel Kutikulabildungs-Enzymen (Chitinsynthase) zu stärkeren, auch makro-phänotypisch sichtbaren Effekten führen. Dies könnte das Thema von auf dieser Arbeit aufbauenden Studien sein.

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden auf dem Gebiet der Arthropoden-RNAi-Experimente auch bei parasitischen Vertretern über große Fortschritte berichtet: Beim Malaria-Überträger *A. gambiae* wurde durch Injektion von dsRNA in Adulttiere (BLANDIN et al., 2002; OSTA et al., 2004) sowie durch Einführung von dsRNA-Haarnadel-bildenden Plasmiden in Embryos (BROWN et al., 2003) RNAi-Genexpressionshemmung erreicht. Die Expression einer Reihe von Genen konnte beim Gelbfieber-Vektor *Aedes aegypti* durch thorakale Injektion von dsRNA eines nukleären Rezeptors unterdrückt werden (ZHU et al., 2003). In dieser Moskitospezies wurde auch ein Sindbisvirus-Expressionssystem zur Einführung vererbbarer RNAi-Konstrukte erprobt (ATTARDO et al., 2003). Besonders bemerkenswert waren außerdem eine Reihe von Berichten über RNA-Interferenz angewendet in Zecken der Spezies *Amblyomma americanum* (ALJAMALI et al., 2003; KARIM und RAMAKRISHNAN et al., 2004) und *Ixodes scapularis* (NARASIMHAN et al., 2004). So gelang es ALJAMALI et al. (2003) erstmals mittels RNAi, die Expression eines Histamin-bindenden, in den Speicheldrüsen von *A. americanum* lokalisierten Proteins (HBP) zu inhibieren. Dabei bewirkte die Injektion in nüchterne, weibliche *A. americanum* die Inhibition von HBP nicht nur auf RNA-Ebene (Nachweis mittels RT-PCR mit Gesamt-RNA extrahiert aus Zeckenspeicheldrüsen), sondern auch auf Proteinebene (Nachweis durch Bestimmung der Histaminbindungs-Aktivität). Bemerkenswert war außerdem ALJAMALIs Beobachtung, dass RNAi-behandelte Zecken, die 24 Stunden nach Mikroinjektion am Wirt infestiert wurden, deutlich länger benötigten, um ihren Saugakt zu vollenden. Während sich KARIM und RAMAKRISHNAN et al. (2004) auf die *in vitro*-Anwendung von RNAi an isolierten *Amblyomma*-Speicheldrüsen beschränkten, zeigten NARASIMHAN et al. (2004) die erfolgreiche Genexpressionshemmung nach dsRNA-Injektion in adulte *I. scapularis* (Salp14, ein Antikoagulant der Speicheldrüse) sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von ALJAMALI et al. (2003), wurde gezeigt, dass bei dsRNA-injizierten (Actin) Zecken die Blutaufnahme beeinträchtigt ist.

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation wurde unlängst auch eine Publikation zum Thema RNAi in Fliegen der Gattung *Lucilia* veröffentlicht. In der Arbeitsgruppe von MELLENTHIN et al. (2006) wurden, der Methode von KENNERDELL

und CARTHEW (1998) folgend, Embryonen der Gattung *Lucilia sericata* erfolgreich mit dsRNA (*wingless*) injiziert, was zur Ausbildung eines embryonalen Phänotyps führte (Ausbildung eines Haarborsten-Rasens). MELLENTHN et al. berichten dabei von einer besonderen Fragilität der *L. sericata*-Eier verglichen zu denen von *D. melanogaster* und bestätigen damit eine Beobachtung, die während der hier vorliegenden Arbeit für *L. cuprina* gemacht wurde. Erklärt wird dies mit dem differierenden Längen-Breitenverhältnis, welches in einer verstärkten Empfindlichkeit der *L. sericata*-Eier gegenüber mechanischen Manipulationen resultiert. Es ist zu vermuten, dass dies auch für die Eier von *L. cuprina* gelten dürfte. Abweichend von der Methode KENNERDELL und CARTHEWs wurde die Konzentration der zu injizierenden dsRNA auf 5 µg/µl erhöht, um so das größere Volumen der *L. sericata*-Eier verglichen mit *D. melanogaster* zu kompensieren. Interessanterweise blieben trotz dieser Konzentrationserhöhung die ausgebildeten Effekte in *L. sericata* auf den Bereich der Injektionsstelle lokalisiert, was für die begrenzte Verteilung der injizierten dsRNA im Embryo spricht. Analog zu der hier vorliegenden Arbeit dienten mit dsRNA-freiem Puffer injizierte *L. sericata* als Kontrolle zur Erkennung möglicher Injektionsartefakte.

Trotz der hier genannten, vielversprechenden Anwendungen von RNAi in nicht-embryonalen Arthropodenstadien sowie auch in Ektoparasiten bleibt zu untersuchen wie robust und penetrant die bisher beobachteten Phänotypen in den verschiedenen Parasitenspezies bei einer größeren Anzahl von Genen und Versuchen sind. Weiterhin sind neben den oft unvollkommen entwickelten Genetikwerkzeugen vorerst auch die begrenzte Anzahl der bekannten und verfügbaren Ektoparasiten-Gene limitierend für einen breiten Einsatz der RNAi-Technologie. Letzteres könnte sich aber bei weiterem Fortschreiten bestehender oder geplanter Genomprojekte (zum Beispiel *Anopheles gambiae*: HOLT et al., 2002; *Ctenocephalides felis*, GAINES et al., 2002; *Ixodes scapularis*: HILL und WIKEL, 2005) schnell und fundamental zum Positiven verändern. Es bleibt festzuhalten, dass die RNAi-Technologie bei Ektoparasiten zum jetzigen Zeitpunkt noch keine verlässliche, robuste Methode darstellt. So wurden bei den hier durchgeführten RNAi-Untersuchungen an *L. cuprina* keine makroskopischen Phänotypen beobachtet, obwohl die deutliche Verringerung des *ace*-mRNA-Spiegels den erfolgreichen Abbau der endogenen mRNA durch RNA-Interferenz belegt. Dass eine vollständige Unterdrückung des Acetylcholinesterase-Gens ohne Effekt bleiben könnte, erscheint unwahrscheinlich, da Insektizide wie Carbamate und Organophosphate (WESLEY, 2002) auf einer Hemmung dieses Enzyms beruhen und letal wirksam sind. Die Ausbildung eines makroskopischen Phänotyps ist vermutlich von

einem stärkeren oder sogar vollständigen Abbau endogener mRNA abhängig, da die in *L. cuprina* nach RNAi-Induktion verfügbaren Acetylcholinesterase-Spiegel offensichtlich für die Weiterentwicklung zur Imago ausreichen.

Trotz der Abwesenheit von makroskopischen Phänotypen wurde mit dieser Arbeit die Genexpressionshemmung mittels RNAi in *L. cuprina* erfolgreich demonstriert, wie die reduzierten *ace*-mRNA-Spiegel belegen. Die Anwendung der RNAi-Methode wurde damit auf eine neue Spezies erweitert und erfolgte erstmalig am dritten Larvenstadium einer Fliege (L<sub>3</sub>). Abschließend ist festzustellen, dass die Anzahl der RNAi-Beispiele in nicht-embryonalen Arthropodenstadien generell noch überschaubar sind. Der enorme Fortschritt der letzten Jahre, zu dem diese Arbeit einen Teil beitragen konnte, lässt allerdings hoffen, dass diese vielversprechenden Anfänge in naher Zukunft zu einem nutzbaren Werkzeug der *Target*-Identifizierung führen können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Methodik der RNA-Interferenz (RNAi) auf ein nicht-embryonales Stadium der Goldfliege *Lucilia cuprina* zu übertragen und damit die Möglichkeit von RNAi als ein molekulares Werkzeug der *Target*-Identifizierung im Ektoparasiten zu untersuchen. Die Arbeit beinhaltet einen Versuch der Genexpressionshemmung mittels RNAi durch Injektion doppelsträngiger, spezifischer RNA (dsRNA) in L<sub>3</sub>-Larven von *L. cuprina*.

Als Zielsequenzen wurden cDNAs von Genen ausgewählt, die für Acetylcholinesterase (*ace*), Glutamat-gesteuerten Chloridkanal (*gluch*), ADP/ATP-Translokator (*adp/atp*) und Histon H3 (*his3*) kodieren. Mit dieser Auswahl, die auf Literaturbefunden bei *D. melanogaster* basierten, sollten Gene herangezogen werden, bei denen die Hemmung der Genexpression letale Folgen für den Organismus hat und die als Einzelkopie-Gene vorliegen. Das zu Beginn dieser Arbeit für *L. cuprina* noch nicht beschriebene *his3* wurde isoliert und diente neben der Verwendung im RNAi-Experiment insbesondere bei der semiquantitativen RT-PCR-Bestimmung der mRNA-Menge als Kontrollgen in RNAi-induzierten *L. cuprina*.

Als Voraussetzung für Genexpression-Hemmungsversuche wurden Gesamt- und Poly(A)-RNA aus *L. cuprina*-Larven und -Imagines gewonnen, die ihrerseits als Matrize zur Herstellung der vollständigen cDNA (*ace*, *adp/atp*, *his3*) oder cDNA-Fragmente (3'- und 5'-Endfragment von *ace*, *adp/atp*, *gluch*) in (RT-)PCR-Amplifikationen diente. Die generierten Amplifikate von *ace*, *gluch* und *adp/atp* wurden vor der *in vitro*-Transkription zur Herstellung doppelsträngiger RNA sequenziert und die ermittelten Sequenzen mit den publizierten *L. cuprina*-Sequenzen verglichen. Die wenigen gefundenen Abweichungen von der Datenbanksequenz, vermutlich PCR-Artefakte, Einzelnukleotid-Polymorphismen oder Splice-Varianten, konnten für die weitere Durchführung der RNAi-Experimente ignoriert werden. Für die *his3*-cDNA wurde ein Sequenzvergleich mit *D. melanogaster* vorgenommen, der eine 81%ige Übereinstimmung auf Nukleotid-Ebene und eine 100%ige Übereinstimmung auf Protein-Ebene ergab. Generell auffällig war zudem der höhere A/T-Gehalt der hier betrachteten *L. cuprina*-Gene verglichen mit *D. melanogaster*.

Weitere Voraussetzung für die RNAi-Experimente war die Schaffung und Etablierung eines für *L. cuprina*-L<sub>3</sub> geeigneten Injektionssystems, das die serienmäßige Injektion kleiner Volumina dsRNA (2 µl) ermöglichte. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Injektion von

für dsRNA geeignetem Puffer (TE-Puffer, pH 8.0) sowie unspezifischer DNA (Heringssperma-DNA) und RNA (Bäckerhefe-tRNA) in *L. cuprina*-L<sub>3</sub>, die Vitalität und Weiterentwicklung der Larven weitestgehend unbeeinflusst ließ.

Es folgten die eigentlichen RNAi-Experimente mit der spezifischen dsRNA der genannten cDNAs in Form von 3'-Endfragment, 5'-Endfragment (*ace*, *gluch*, *adp/atp*) oder vollständiger cDNA (*ace*, *adp/atp*, *his3*). Nach Injektion in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> waren bei keinem der verwendeten RNAi-Konstrukte durch Genexpressionshemmung ausgelöste, makrophänotypische Effekte (zum Beispiel Tod der L<sub>3</sub>, Ausbleiben der Verpuppung oder Abnahme des Schlupfes vitaler Imagines) zu beobachten. Die ursprüngliche Überlegung, einen RNAi-Effekt auf Protein-Ebene durch quantitative Bestimmung der Acetylcholinesterase-Enzymaktivität in einzelnen *ace*-dsRNA-induzierten Fliegen nachzuweisen, wurde aufgrund der bereits überraschend hohen Variabilität (Faktor >3) der Enzymaktivität in einem zuvor untersuchten, unbehandelten Fliegenkollektiv verworfen. Die Möglichkeit, eine vorhandene Genexpressionshemmung auf mRNA-Ebene zu zeigen, beruht auf der Abnahme spezifischer mRNA in dsRNA-injizierten Fliegen. Dieser Nachweis der mRNA-Abnahme erfolgte durch die semiquantitative Bestimmung der mRNA-Menge von *ace*-5'-Endfragment und *his3* (Kontroll-Gen) in RNAi-induzierten (*ace*-3'-Endfragment) adulten *L. cuprina* verglichen mit den jeweiligen mRNA-Mengen beider Gene (*ace*, *his3*) in adulten Fliegen einer unbehandelten Kontrollgruppe. Hierbei wurden sowohl das *ace*-5'-Endfragment sowie das *his3* gleichzeitig in einer RT-PCR-Reaktion amplifiziert und die Intensitäten der Amplifikat-Banden beider Gene nach gelelektrophoretischer Auftrennung verglichen. Die statistische Auswertung der ermittelten *his3/ace* mRNA-Verhältnisse (*ace*-5'-Endfragment) mittels t-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zwischen RNAi-induzierten und unbehandelten *L. cuprina*. Der Nachweis einer mRNA-Abnahme (*ace*) und damit der Genexpressionshemmung durch die Injektion spezifischer, doppelsträngiger RNA in L<sub>3</sub> konnte somit erbracht werden.

Die Anwendung von RNAi an einer parasitischen Fliege sowie an einem nicht-embryonalen Stadium (L<sub>3</sub>) wurde an *L. cuprina* erfolgreich auf mRNA-Ebene demonstriert und die Goldfliege kann als weitere Spezies in die Liste der mittels RNAi-zugänglichen Arthropoden aufgenommen werden.

## 7 SUMMARY

The objective of this thesis was to investigate RNA-interference (RNAi) as a possible molecular tool of target identification in a non-embryonic stage of an ectoparasite, the Australian blowfly *Lucilia cuprina*. The thesis describes the RNA-interference induced gene silencing by injection of specific double stranded RNA (dsRNA) into L<sub>3</sub>-larvae of *L. cuprina*.

The target genes were selected because lethal effects after gene knockout were known to take place for the gene acetylcholinesterase (*ace*) and these effects were anticipated for the genes glutamate-gated chloride channel (*gluch*), ADP/ATP-translocator (*adp/atp*) and histon H3 (*his3*). Furthermore, *ace*, *gluch* and *adp/atp* are single copy genes in *D. melanogaster* and *ace* is also described as a single copy gene in *L. cuprina*. The *L. cuprina his3* gene was isolated and used in the RNAi-experiments and also as the control gene for the semi-quantitative determinations of mRNA-amounts in RNAi-induced *L. cuprina* using RT-PCR technique.

The first step was to extract total and poly(A)-RNA from the larvae-L<sub>3</sub> and adult *L. cuprina* which were used for the amplification of a full length gene and gene fragments (3'- and 5'-end-fragment) through the (RT-)PCR technique. Next the resulting full length gene (*ace*, *adp/atp*, *his3*) and gene fragments (*ace*, *adp/atp*, *gluch*) were sequenced and compared to the published *L. cuprina* sequences. The sequences showed only minor differences to the published sequences, which most likely are PCR-artifacts, single nucleotide polymorphisms or splice variations. The *L. cuprina his3* sequence was aligned with the *D. melanogaster* and showed 81 % identity at the nucleotide level and 100 % identity at the protein level. In general, the investigated *L. cuprina* genes had a markedly higher A/T-content than the *D. melanogaster* genes, predominantly due to a pronounced third base A/T bias. For the RNAi-experiments, double stranded RNA of the full length genes and gene fragments were generated by *in vitro*-transcription.

A prerequisite for the RNAi-experiments was the development of an injection system for *L. cuprina*-L<sub>3</sub> that enabled routine injections of small volumes (2 µl) into the larvae. Prior to starting the RNAi-experiments with *L. cuprina* specific dsRNA several investigations were conducted to validate the injection system. In these injection method validation studies the tolerance of larvae for dsRNA buffers (TE-buffer, pH 8.0; H<sub>2</sub>O) and unspecific DNA and

RNA (herring sperm DNA, baker's yeast tRNA) was demonstrated by the vitality and further development of the injected larvae.

Following the validation studies, the *L. cuprina* specific gene fragments (3'- and 5'-end-fragment) of *ace*, *gluch*, *adp/atp* and the full length genes (*ace*, *adp/atp*, *his3*) were injected into L<sub>3</sub>-larvae. None of the injections resulted in phenotype effects, such as death of L<sub>3</sub>-larvae after injection or disruption of larvae development (decrease of pupation rate or decrease in hatch of adults). When analyzing untreated flies, a wide range of acetylcholinesterase-enzyme levels was found (factor >3); therefore using these enzyme levels as a readout system for gene silencing was considered impractical and it was not pursued further. The other potential manifestation of gene silencing is the decrease in mRNA levels in dsRNA injected flies. This decrease was investigated by semi-quantitative measurement of the mRNA levels of *ace* and *his3* (control gene) in adult flies hatched from *ace* 3'-end-fragment injected *L. cuprina*-L<sub>3</sub> compared to the mRNA levels of both genes (*ace*, *his3*) in untreated flies of the control group using RT-PCR technique. The intensity of the *ace* and *his3* bands in the gel was measured and the *his3/ace* mRNA-ratios were statistically evaluated (t-test) and showed a significant difference between the *ace* 3'-end-fragment injected *L. cuprina* and the untreated control group ( $p < 0.0001$ ). This difference in *ace*-mRNA levels in *ace*-dsRNA treated larvae compared to controls strongly suggests that successful gene silencing in *L. cuprina*-L<sub>3</sub> has been achieved.

In summary, it was demonstrated in this study that RNAi leads to a specific decrease of mRNA-levels in the non-embryonic L<sub>3</sub>-stage of the ectoparasitic fly *L. cuprina*. Therefore, the Australian sheep blowfly is now on the list of arthropods accessible to gene expression knockdown by RNAi.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

AMG (1976): Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln

In der Fassung vom 26.07.1999 zuletzt geändert durch Zwölftes Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 30.07.2004, Deutschland.

Aljamali MN., Bior AD., Sauer JR., Essenberg RC. (2003): RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*.

*Insect Mol. Biol.* **12**, 299-305.

Attardo GM., Higgs S., Klingler KA., Vanlandingham DL., Raikhel AS. (2003): RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito *Aedes aegypti*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13374-13379.

Bettencourt R., Terenius O., Faye I. (2002): Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia pupae* is lethal to next generation embryos.

*Insect Mol. Biol.* **11**, 267-271.

Billuart P., Winter CG., Maresh A., Zhao X., Luo L. (2001): Regulation axon branch stability: The role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signalling pathway.

*Cell* **107**, 195-207.

Bishop BF., Bruce CI., Evans NA., Goudie AC., Gratton KA., Gibson SP., Pacey MS., Perry DA., Walshe ND., Witty MJ. (2000): Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats.

*Vet. Parasitol.* **91**, 163-176.

Blandin S., Moita LF., Köcher T., Wilm M., Kafatos CF., Levashina EA. (2002): Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene.

*EMBO Rep.* **3**, 852-856.

Brand AH., Perrimon N. (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.

*Development* **118**, 401-415.

Brent LJ., Drapeau P. (2002): Targeted “knockdown” of channel expression *in vivo* with an antisense morpholino oligonucleotide.

*Neuroscience* **114**, 275-278.

Brown AE., Crisanti A., Catteruccia F. (2003): Comparative analysis of DNA vectors at mediating RNAi in *Anopheles mosquito* cells and larvae.

*J. Exp. Biol.* **206**, 1817-1823.

Brown JS., Mahaffey PJ., Lorenzen DM., Denell ER., Mahaffey WJ. (1999): Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects.

*Evol. Dev.* **1**, 11-15.

Bucher G., Scholten J., Klingler M. (2002): Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera).

*Curr. Biol.* **12**, R85-R86.

Caplen NJ., Fleenor J., Fire A., Morgan RA. (2000): dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference.

*Gene* **11**, 95-105.

Caplen NJ., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan RA. (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9742-9747.

Carthew RW. (2001): Gene silencing by double-stranded RNA.

*Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 244-248.

Celniker SE., Wheeler DA., Kronmiller B., Carlson JW., Halpern A., Patel S., Adams M., Champe M., Dugan SP., Frise E., Hodgson A., George RA., Hoskins RA., Lavery T., Muzny DM., Nelson CR., Pacleb JM., Park S., Pfeiffer BD., Richards S., Sodergren EJ., Svirskas R., Tabor PE., Wan K., Stapelton M., Sutton GG., Venter C., Weinstock G., Scherer SE., Myers EW., Gibbs RA., Rubin GM. (2002): Finishing a whole-genome shotgun: Release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatid genome sequence. *Genome Biol.* **3**, 0079.1-0079.14.

Chen Z., Newcomb R., Forbes E., McKenzie J., Batterham P. (2001): The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 805-816.

Chromczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Coates JR. (1982): Insecticide mode of action. *Academic Press*, New York.

Cogoni C., Macino G. (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166-169.

Cogoni C., Macino G. (2000): Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 638-643.

Colebrook E., Wall R. (2004): Ectoparasites of livestock in Europe and the Mediterranean region. *Vet. Parasitol.* **120**, 251-274.

Cully DF., Paress PS., Liu KK., Schaeffer JM., Arena JP (1996): Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin.

*J. Biol. Chem.* **271**, 20187-20191.

Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe DC. (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus.

*Cell* **101**, 543-553.

Dzitoyeva S., Dimitrijevic N., Manev H. (2001): Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system.

*Mol. Psychiatry* **6**, 665-670.

Dzitoyeva S., Dimitrijevic N., Manev H. (2003): Identification of a novel *Drosophila* gene, beltless, using injectable embryonic and adult RNA interference (RNAi).

*BMC Genomics* **4**, 33.

Dzitoyeva S., Dimitrijevic N., Manev H. (2003):  $\gamma$ -Aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: Adult RNA interference and pharmacological evidence.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5485-5490.

Elbashir SM., Lendeckel W., Tuschl T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.

*Gene Dev.* **15**, 188-200.

Elbashir SM., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001):

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.

*Nature* **411**, 494-498.

Elbashir SM., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. (2001): Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877-6888.

Fiala A., Müller U., Menzel R. (1999): Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Neurobiol.* **19**, 10125-10134.

Fire A., Xu S., Montgomery MK., Kostas SA., Driver SE., Mello CC. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

Fire A. (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15**, 358-363.

Fournier D., Mutero A., Pralavorio M., Bride JM. (1993): *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interact.* **87**, 233-238.

Gaines PJ., Brandt KS., Eisele AM., Wagner WP., Bozic CM., Wisnewski N. (2002): Analysis of expressed sequence tags from subtracted and unsubtracted *Ctenocephalides felis* hindgut and Malpighian tubule cDNA libraries. *Insect Mol. Biol.* **11**, 299-306.

George JE., Pound JM., Davey RB. (2004): Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* **129**, 353-366.

Giordano E., Rendina R., Peluso I., Furia M. (2002): RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 637-648.

Goto A., Blandin S., Royet J., Reichhart JM., Levashina EA. (2003): Silencing of Toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila* adult flies. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6619-6623.

Graf J-F., Gogolewski R., Leach-Bing N., Sabatini GA., Molento MB., Bordin EL., Arantes GJ. (2004): Tick control: an industry point of view. *Parasitology* **129**, 427-442.

Greenspan RJ. (1997): Fly pushing: The theory and practice of *Drosophila* genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, U.S.A.

Grishok A., Tabara H., Mello CC. (2000): Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* **287**, 2494-2497.

Hall JC., Kankel DR. (1976): Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **83**, 517-535.

Hammond SM., Bernstein E., Beach D., Hannon GJ. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.

Hannon GJ. (2002): RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.

Hennig (1998): Genetik. *Springer-Verlag*, Heidelberg, Deutschland.

Hill CA., Wikel SK. (2005): The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research. *Trends Parasitol.* **21**, 151-153.

Holt RA., Subramanian GM., Halpern A., Sutton GG., Charlab R., Nusskern DR., Wincker P., Clark AG., Ribeiro JM., Wides R., Salzberg SL., Loftus B., Yandell M., Majoros WH., Rusch DB., Lai Z., Kraft CL., Abril JF., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson PW., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides GK., Chrystal MA., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans CA., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer ME., Hladun SL., Hogan JR., Hong YS., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin JJ., Lobo NF., Lopez JR., Malek JA., McIntosh TC., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy SD., O'Brochta DA., Pfannkoch C., Qi R., Regier MA., Remington K., Shao H., Sharakhova MV., Sitter CD., Shetty J., Smith TJ., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton LQ., Topalis P., Tu Z., Unger MF., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford KJ., Wortman JR., Wu M., Yao A., Zdobnov EM., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu SC., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth CW., Louis C., Kalush F., Mural RJ., Myers EW., Adams MD., Smith HO., Broder S., Gardner MJ., Fraser CM., Birney E., Bork P., Brey PT., Venter JC., Weissenbach J., Kafatos FC., Collins FH., Hoffman SL. (2002): The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.

*Science* **298**, 129-149.

Hughes LC., Kaufmann CT. (2000): RNAi analysis of deformed, proboscipedia and sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head.

*Development* **127**, 3683-3694.

Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli AE., Bálint E., Tuschl T., Zamore PD. (2001): A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.

*Science* **293**, 834-838.

Ibelgaufts H. (1993): Gentechnologie von A bis Z, Studienausgabe.

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.

IFAH (2002): Annual Report 2002

*International Federation of Animal Health*, Brüssel, Belgien.

IFAH (2003): Annual Report 2003

*International Federation of Animal Health*, Brüssel, Belgien.

Ishaaya I. (2001): Biochemical sites of insecticide action and resistance.

*Springer-Verlag*, Berlin, Germany.

Ishaaya I., Degheele D. (1998): Insecticides with novel mode of action: mechanism and application.

*Springer-Verlag*, Berlin, Germany.

Kalidas S., Smith DP. (2002): Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*.

*Neuron* **33**, 177-184.

Kane NS., Hirschberg B., Qian S., Hunt D., Thomas B., Brochu R., Ludmerer SW., Zheng Y., Smith M., Arena JP., Cohen CJ., Schmatz D., Warmke J., Cully DF (2000): Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulosporic acid and ivermectin.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13949-13954.

Karim S., Ramakrishnan VG., Tucker JS., Essenberg RC., Sauer JR., (2004): *Amblyomma americanum* salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE2 stimulated protein secretion.

*Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 407-413.

Kennerdell JR., Carthew RW. (1998): Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway.

*Cell* **95**, 1017-1026.

Kennerdell JR., Carthew RW. (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA.

*Nat. Biotechnol.* **18**, 896-898.

Knippers R. (2001): Molekulare Genetik.

*Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, Deutschland.

Krämer F., Mencke N. (2001): Flea biology and control: the biology of the cat flea, control and prevention with imidacloprid in small animals.

*Springer-Verlag*, Berlin, Germany.

Lam G., Thummel CS. (2000): Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*.

*Curr. Biol.* **10**, 957-963.

Levot GW. (1995): Resistance and the control of sheep ectoparasites.

*Int. J. Parasitol.* **25**, 1355-1362.

Lipardi C., Wei Q., Paterson BM. (2001): RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs.

*Cell* **107**, 297-307.

Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M., Sugimoto A. (2001): Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi.

*Curr. Biol.* **11**, 171-176.

Mehlhorn H., Düwel D., Raether W. (1993): Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren.

*Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, Deutschland.

Meinke PT. (2001): Perspective in animal health: old targets and new opportunities.

*J. Med. Chem.* **44**, 641-659.

Mellenthin K., Fahmy K., Ali RA., Hunding A., Da Rocha S., Baumgartner S. (2006): Wingless signaling in a large insect, the blowfly *Lucilia sericata*: A beautiful example of evolutionary developmental biology.

*Dev. Dyn.* **235**, 347-360.

Mendes MC., Veríssimo CJ., Kaneto CN., Pereira JR. (2001): Bioassays for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in São Paulo state, Brazil.

*Arq. Inst. Biol.* São Paulo, **68**, 23-27.

Misquitta L., Paterson MB. (1999): Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for Nautilus in embryonic somatic muscle formation.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1451-1456.

Mourrain P., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel JB., Jouette D., Lacombe AM., Nikic S., Picault N., Rémoúé K., Sanial M., Vo TA., Vaucheret H. (2000): *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance.

*Cell* **101**, 533-542.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen RA. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*.

*Plant Cell.* **2**, 279-289.

Ngo H., Tchudi C., Gull K., Ullu E. (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14687-14692.

Narasimhan S., Montgomery RR., DePonte K., Tschudi C., Marcantonio N., Anderson JF., Sauer JR., Cappello M., Kantor FS., Fikrig E. (2004): Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1141-1146.

- Nishikawa T., Natori S. (2001): Targeted disruption of a pupal hemocyte protein of sarcophagi by RNA interference.  
*Eur. J. Biochem.* **268**, 5295-5299.
- Ogawa S., Pfaff DW. (1998): Current status of antisense DNA methods in behavioral studies.  
*Chem. Senses* **23**, 249-255.
- Osta MA., Christophides GK., Kafatos FC. (2004): Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development.  
*Science* **303**, 2030-2032.
- Piccin A., Salameh A., Benna C., Sandrelli F., Mazzotta G., Zordan M., Rosato E., Kyriacou CP., Costa R. (2001): Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer.  
*Nucleic Acids Res.*, **29**, E55.
- Plasterk RH. (2002): RNA silencing: the genom's immune system.  
*Science* **296**, 1263-1265.
- Roberts DB. (1998): *Drosophila: A practical approach*.  
*IRL Press*, Oxford, UK.
- Roignant J., Carre C., Mugat B., Szymczak D., Lepesant J., Antoniewski C. (2003): Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*.  
*RNA* **9**, 299-308.
- Romano N., Macino G. (1992): Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences.  
*Mol. Microbiol.* **6**, 3343-3353.

Rommel M., Eckert J., Kutzer E., Körting W., Schnieder T., begründet von Supperer J. und Boch R. (2000): Veterinärmedizinische Parasitologie.

*Parey Buchverlag* im Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, Deutschland.

Rubin GM., Kidwell MG. Bingham PM. (1982): The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations.

*Cell* **29**, 987-994.

Sambrook J., Russell D.W. (2001): Molecular Cloning, A Laboratory Manual.

*Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

Schoppmeier M., Damen WG. (2001): Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of Distal-less is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation.

*Dev. Genes Evol.* **211**, 76-82.

Schmid A., Schindelholz B., Zinn K. (2002): Combinatorial RNAi: a method for evaluating the functions of gene families in *Drosophila*.

*Trends Neurosci.* **25**, 71-74.

Shanks DJ., Gautier P., McTier TL., Evans NA., Pengo G., Rowan TG. (2003): Efficacy of selamectin against biting lice on dogs and cats.

*Vet. Rec.* **152**, 234-237.

Smardon A., Spoerke JM., Stacey SC., Klein ME., Mackin N., Maine EM. (2000): EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*.

*Curr. Biol.* **10**, 169-178.

Spradling AC., Rubin GM. (1982): Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes.

*Science* **218**, 341-347.

Spradling AC., Stern D., Beaton A., Rhem EJ., Lavery T., Mozden N., Misra S., Rubin GM. (1999): The Berkeley *Drosophila* genome project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25 % of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-177.

Stauber M., Taubert H., Schmidt-Ott U. (2000): Function of bicoid and hunchback homologs in the basal cyclorrhaphan fly *Megaselia* (Phoridae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10844-10849.

St. Johnston D. (2002): The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **3**, 176-188.

Stollewerk A., Weller M., Tautz D. (2001): Neurogenesis in the spider *Cupiennius salei*. *Development* **128**, 2673-2688.

Tabara H., Grishok A., Mello CC. (1998): RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-431.

Tavernarakis N., Wang SL., Dorovkov M., Ryzanov A., Driscoll M. (2000): Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* **24**, 180-183.

Taylor M.A. (2001): Recent developments in ectoparasiticides. *Vet. J.* **161**, 253-268.

Tellam RL., Bowles VM. (1997): Control of blowfly strike in sheep: Current strategies and future prospects. *Int. J. Parasitol.* **27**, 261-273.

Timmons L., Fire A. (1998): Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.

Tsuda M., Kamimura K., Nakato H., Archer M., Staatz W., Fox B., Humphrey M., Olson S., Futch T., Kaluza V., Siegfried E., Stam L., Selleck SB. (1999): The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*.

*Nature* **400**, 276-280.

Tuschl T., Zamore PD., Lehmann R., Bartel DP., Sharp PA. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*.

*Genes Dev.* **13**, 3191-3197.

Van Roessel P., Hayward NM., Barros CS., Brand AH. (2002): Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*.

*Genesis* **34**, 170-173.

Wall R., Shearer D. (1997): Veterinary Entomology.

*Chapman & Hall*, 2-6 Boundary Row, London, UK

Wargelius A., Ellingsen S., Fjose A. (1999): Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 156-161.

Wesley T. (2002): Animal Pharm Reports, Antiparasitics.

*PJB Publications Ltd*, UK.

Wianny F., Zernicka-Goetz M. (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development.

*Nat. Cell Biol.* **2**, 70-75.

Winston MW., Molodowitch C., Hunter CP. (2002): Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1.

*Science* **295**, 2456-2459.

Willadsen P. (1997): Novel vaccines for ectoparasites.

*Vet. Parasitol.* **71**, 209-222.

Wyniger R. (1978): Insektenzucht.

*Eugen Ulmer Verlag*, Stuttgart, Deutschland.

Zhang YQ., Roote J., Brogna S., Davis AW., Barbash DA., Nash D., Ashburner M. (1999):

Stress sensitive B encodes an adenine nucleotide translocase in *Drosophila melanogaster*.

*Genetics* **153**, 901-903.

Zamore PD., Tuschl T., Sharp PA., Bartel DP. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals.

*Cell* **101**, 25-33.

Zhu J., Chen L., Raikhel AS (2003): Posttranscriptional control of the competence factor  $\beta$ FTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13338-13343.

---

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Zahner, Leiter des Institutes für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit und für die sorgfältige Durchsicht und seine wertvollen Ratschläge zur Erstellung des Manuskriptes danken.

Die praktischen Arbeiten der Dissertation fanden in der Firma Intervet Innovation GmbH statt. Hier gilt mein besonderer Dank Dr. Christina Mertens, ehemalige Leiterin der Abteilung Profiling, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und darüber hinaus stets geduldige und wohlwollende Mentorin war.

Herrn Prof. Dr. Thomas Ilg, Leiter des Technology Core Teams, danke ich sehr für die Stellung des Themas sowie seine umfassende und fachlich fundierte Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten und die geduldige Beratung bei der Erstellung des Manuskriptes. Er legte den roten Faden durch das Dickicht der Forschung und trug so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für ihre Hilfsbereitschaft und praktische Unterstützung bedanke ich mich herzlichst bei Susanne Schmalz und Boris Rothacker, die den Beginn dieser Arbeit sehr erleichterten. Margaret Werr gilt mein ganz besonderer Dank, denn ihre Hilfe bei den experimentellen Arbeiten und ihr Überblick beim Sichten der Ergebnisse waren unersetzlich. Danke an dieser Stelle ebenfalls für so manches nicht-wissenschaftliche Gespräch und dass es auch an arbeitsreichen Tagen möglich war, mit Euch zu lachen.

Ein Dankeschön gilt zahlreichen Mitarbeitern der Intervet Innovation GmbH, insbesondere der Abteilungen Profiling & Product Development und Drug Discovery, für ihre vielfältige Unterstützung. Namentlich bedanke ich mich bei Edith Jeschek für die Bereitstellung der *L. cuprina*, bei Manfred Uphoff für seine Hilfe beim Fotografieren derselben und sein stets offenes Ohr, bei Dr. Andreas Rohwer für die Unterstützung beim Sequenzvergleich, bei Dipl.-Stat. Eva Zschiesche für ihre Hilfe bei den statistischen Auswertungen, bei Dr. Anja Heckerroth für ihre hartnäckige Unterstützung zum Ende hin und nicht zuletzt bei Hartmut Zoller, der vor vielen Jahren den Keim zu dieser Arbeit legte.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Phil sage ich von ganzem Herzen Danke für Eure stetigen Ermutigungen und die wunderbare Gewissheit, auf Euren Rückhalt vertrauen zu können.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5292-7



9 783583 51952928