

8 ZUSAMMENFASSUNG

Bestimmung der Wirtstierarten in Blutmahlzeiten von Tsetsefliegen (Diptera: Glossinidae) mittels der Polymerasekettenreaktion und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (PCR-RFLP).

Tsetsefliegen sind obligat blutsaugende Arthropoden, die ausschließlich an Wirbeltieren Blut saugen. Sie sind für die Übertragung der Schlafkrankheit beim Menschen und der afrikanischen Trypanosomosen bei Haustieren in weiten Teilen Afrikas südlich der Sahara (Tsetsegürtel) verantwortlich. Kenntnisse über das Verhalten von Tsetsefliegen bei der Nahrungsaufnahme sind erforderlich, um die Beziehung zwischen Wirt und Vektor und ihre jeweilige Rolle im Übertragungszyklus der Krankheit zu verstehen. Die Herkunft der Blutmahlzeiten der Tsetsefliegen liefert dabei wichtige Informationen über die natürlichen Ernährungsgewohnheiten der verschiedenen Fliegenarten aus der Gattung *Glossina*. Ziel der Arbeit war es daher, ein DNA-analytisches Untersuchungsverfahren zur Tierartidentifikation des von Tsetsefliegen aufgenommenen Blutes zu entwickeln.

Es wurde eine DNA-Bank von Haus- und Wildtierarten eingerichtet, die 33 potenzielle Wirbeltierwirte von Tsetsefliegen erfasst. Die DNA wurde aus natürlichen Proben, wie Blut, Haaren und Haut extrahiert und mittels PCR unter Verwendung universeller *Cytochrom b*-Primer (*cytb* 1 und *cytb* 2) amplifiziert. Die verwendeten Primer waren komplementär zu konservierten Regionen des *Cytochrom b* - Gens der Wirbeltiere und führten bei allen untersuchten Arten der Familie Bovidae zu übereinstimmenden aber variablen 359 bp PCR-Produkten. Die Auswahl geeigneter Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen basierte auf dem Vergleich von mtDNA Sequenzdaten von Boviden, die vom "National Centre for Biotechnology Information" (USA) bezogen wurden. Die potenziellen Schnittstellen innerhalb der verschiedenen 359 bp Amplifikate, wurden mit dem von der „New England Biolab Incorporation“ entwickelten frei verfügbaren Programms „*NEB cutter V1.0*“

identifiziert. Für die Unterscheidung der verschiedenen Arten der Familie Bovidae wurde unter Nutzung der unterschiedlichen Restriktionsenzyme *TaqI*, *AluI*, *HindII* die PCR-RFLP Analyse verwendet. Die erhaltenen artspezifischen Restriktionsprofile waren für die Identifikation von allen 10 untersuchten Bovidenarten geeignet. Die Interpretation der Restriktionsprofile erfolgte visuell, durch Vergleich mit Referenzproben und unter Verwendung eines 50 bp DNA-Markers. Eine Computeranalyse war nicht notwendig.

Die Ergebnisse zeigen, dass es unter Verwendung universeller *cytb* Primer möglich ist, die in der Blutmahlzeit von Tsetsefliegen vorhandene Wirtstier-DNA zu amplifizieren. Die Nachweisrate in Blutmahlzeiten von Tsetsefliegen mittels PCR-RFLP betrug 24 h nach der Blutaufnahme 100%, nach 48 h 80%, nach 72 h 60% und nach 96 h 40%. Außerdem war die Technik auch für die Amplifikation der DNA von Blutausstrichen auf Filterpapier geeignet. Bei Verwendung antiseptischer Lösungen wurde die Wirtstier- DNA nicht zerstört.

Nach der Verdauung der PCR Amplifikate mit Restriktionsendonukleasen entstanden durch co-Amplifikation nukleärer *cytb* Pseudogene einige unspezifische DNA Fragmente. Außerdem wurde bei einigen Tierarten eine unvollständige Restriktionsverdauung beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die *cytb* PCR-RFLP-Analyse eine vielversprechende Methode für die Identifikation der Blutmahlzeiten von Tsetsefliegen ist.