

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Molekulargenetischer Ansatz für Krankheitsresistenz und Verbesserung der Immunantwort beim Schwein	3
2.2 Bedeutung von <i>cis</i> -regulierenden Strukturen	7
2.3 Das Immunsystem.....	8
2.3.1 Das angeborene Immunsystem	9
2.3.2 Das adaptive Immunsystem	10
2.4 Das Komplementsystem	12
2.4.1 Der klassische Weg.....	13
2.4.2 Der alternative Weg.....	13
2.4.3 Der Lektin-Weg	14
2.4.4 Der terminale Weg	15
2.4.5 Regulation des Komplementsystems	15
2.5 Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene	16
2.5.1 Die Komplementkomponente C6	16
2.5.2 Die Komplementkomponente C8G.....	17
2.5.3 Die Komplementkomponente C9	18
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Versuchsübersicht.....	20
3.2 Material.....	21
3.2.1 Tiermaterial	21
3.2.2 Chemikalien, biologisches Material, Enzyme und Kits	21
3.2.3 Verbrauchsmaterial	22
3.2.4 Puffer, Lösungen und Medien	23
3.2.4.1 Lösungen und Medium für Plasmid- und BAC-Kultur	23
3.2.4.2 Puffer und Lösungen für die Bandshift-Analyse	23
3.2.5 Laborgeräte.....	24
3.3 Methoden	25
3.3.1 DNA-Isolierung.....	25
3.3.2 RNA-Isolierung.....	25
3.3.3 cDNA (complementary DNA) Synthese.....	26
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.5 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	27
3.3.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	28
3.3.7 Sequenzierung mit dem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	29
3.3.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	29
3.3.9 BAC (Bacterial Artificial Chromosome).....	29
3.3.9.1 BAC-Kultur.....	30
3.3.9.2 BAC-Sequenzierung	31
3.3.10 Klonierung.....	32

3.3.11	SNP-Genotypisierung (single nucleotide polymorphism)	33
3.3.11.1	Identifizierung von SNPs	33
3.3.11.2	PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	33
3.3.12	<i>in silico</i> -Sequenzanalyse	34
3.3.13	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	34
3.3.13.1	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden	35
3.3.13.2	Herstellung von Kompetitor-Sonden	35
3.3.13.3	Aufreinigung der Sonden mit dem illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns, Radiolabeled Probe Purification Kit (GE Healthcare)	36
3.3.13.4	Bindereaktion (Bandshift-Analyse).....	36
3.3.13.5	Radiographischer Nachweis des Bandshiftes.....	36
3.3.14	Assoziationsstudien.....	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Molekulare Charakterisierung der Promotoren der ausgewählten Kandidatengene	38
4.1.1	Die sechste Komponente des porcinen Komplementsystems (C6).....	38
4.1.1.1	Sequenzierung der Promotorregion	38
4.1.1.2	Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes	38
4.1.1.3	Identifizierung von Polymorphismen	40
4.1.1.4	<i>in silico</i> -Sequenzanalyse des C6-Promotors	41
4.1.1.5	Nachweis eines sequenzspezifisch bindenden Proteinkomplexes durch EMSA-Analyse.....	44
4.1.2	Die Komponente C8G des porcinen Komplementsystems.....	46
4.1.2.1	Sequenzierung der Promotorregion	46
4.1.2.2	Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes.....	47
4.1.2.3	Identifizierung von Polymorphismen.....	47
4.1.2.4	<i>in silico</i> -Sequenzanalyse des C8G-Promotors.....	48
4.1.3	Die neunte Komponente des porcinen Komplementsystem (C9)	50
4.1.3.1	Sequenzierung der Promotorregion	50
4.1.3.2	Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes.....	51
4.1.3.3	Identifizierung von Polymorphismen	51
4.1.3.4	<i>in silico</i> -Sequenzanalyse des C9-Promotors	52
4.1.3.5	Nachweis eines sequenzspezifisch bindenden Proteinkomplexes durch EMSA-Analyse.....	55
4.2	Assoziationsstudien.....	56
4.2.1	Ergebnisse der Assoziationsstudien für den SNP C1R c.726C>T	57
4.2.1.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C1R c.726C>T.....	57
4.2.1.2	Effekte des SNP C1R c.726C>T auf den Phänotyp „mRNA- Expression“	58
4.2.2	Ergebnisse der Assoziationsstudie für den SNP C1S c.2054A>G	58
4.2.2.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C1S c.2054A>G.....	58
4.2.2.2	Effekte des SNP C1S c.2054A>G auf den Phänotyp „mRNA- Expression“	59
4.2.3	Ergebnisse der Assoziationsstudie für den SNP C6 -80C>T	60
4.2.3.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C6 -80C>T.....	60

4.2.3.2	Effekte des SNP C6 -80C>T auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	61
4.2.4	Ergebnisse der Assoziationsstudie für den SNP C6 c.862A>G.....	63
4.2.4.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C6 c.862A>G	63
4.2.4.2	Effekte des SNP C6 c.862A>G auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	63
4.2.5	Ergebnisse der Assoziationsstudien für den SNP C7 c.154A>G.....	65
4.2.5.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C7 c.154A>G	65
4.2.5.2	Effekte des SNP C7 c.154A>G auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	65
4.2.6	Ergebnisse der Assoziationsstudien für den SNP C8A c.1544C>T.....	67
4.2.6.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C8A c.1544C>T	67
4.2.6.2	Effekte des SNP C8A c.1544C>T auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	67
4.2.7	Ergebnisse der Assoziationsstudien für den SNP C9 -737C>T.....	68
4.2.7.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C9 -737C>T	68
4.2.7.2	Effekte des SNP C9 -737C>T auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	69
4.2.8	Ergebnisse der Assoziationsstudien für den SNP C9 c.350A>G.....	70
4.2.8.1	Ergebnisse der Genotypisierung von SNP C9 c.350A>G	70
4.2.8.2	Effekte des SNP C9 c.350A>G auf den Phänotyp „mRNA-Expression“	70
4.2.9	Zusammenhang zwischen den Lungenbefunden und dem Phänotyp „mRNA-Expression“	71
4.2.10	Genotypverteilung in Abhängigkeit vom erhobenen Lungenbefund	74
5	Diskussion	76
5.1	Molekulare Struktur der Promotoren der Kandidatengene C6, C8G und C9.....	76
5.1.1	Charakterisierung des Promotors des porcinen C6-Gens.....	76
5.1.2	Charakterisierung des Promotors des porcinen C8G-Gens	83
5.1.3	Charakterisierung des Promotors des porcinen C9-Gens	84
5.2	Assoziationsanalysen	89
5.2.1	Interaktion zwischen den Komplementkomponenten	89
5.2.2	Polymorphismen und Genotypisierung.....	90
5.2.3	Assoziation der frühen Komplementkomponenten	91
5.2.4	Assoziation der terminalen Komplementkomponenten	92
5.2.5	Eignung des Lungenbefundes als Merkmal für Tiergesundheit.....	95
5.3	Fazit und Perspektiven für weitere Untersuchungen	98
6	Zusammenfassung	100
7	Summary.....	102
8	Literaturverzeichnis	104
9	Anhang	119
10	Erklärung	126
11	Danksagung	127