

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Abkürzungen	7
1.1 Viren	7
1.2 Sonstige Abkürzungen	7
2 Einleitung	9
2.1 Xenotransplantation	10
2.1.1 Xenotransplantation und Abstoßungsreaktion.....	10
2.1.2 Risikopotenzial.....	11
2.2 Circoviren	13
2.2.1 Verwandte Viren.....	14
2.2.2 Virusaufbau.....	14
2.2.3 Genomstruktur PCV.....	15
2.2.4 Die Replikation.....	16
2.2.5 Das Replikase-Gen.....	17
2.2.6 Das Capsid-Gen.....	17
2.2.7 Pathogenese.....	18
2.3 Aufgabenstellung	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Materialien	22
3.1.1 Zellen.....	22
3.1.2 Chemikalien.....	22
3.1.3 Enzyme, Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker.....	24
3.1.4 Klonierungsvektoren und Bakterienstämme.....	24
3.1.5 Reagenziensets (Kits).....	24
3.1.6 Filter, Membranen, Säulen.....	25
3.1.7 Kunststoffartikel.....	25
3.1.8 Geräte und Hilfsmittel.....	26
3.1.9 Puffer, Lösungen.....	27
3.1.10 Seren und Antikörper.....	30
3.1.11 Software.....	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Zellkultur.....	31
3.2.2 Transfektion.....	32
3.2.3 Infektion.....	32
3.2.4 RNA.....	33
3.2.5 cDNA Synthese.....	34
3.2.6 Differential Display.....	35
3.2.7 Northern Blot.....	38
3.2.8 DNA.....	42
3.2.8.1 Extraktion aus Zellkulturzellen und Konzentrationsmessung.....	42
3.2.8.2 DNA-Modifikationen.....	42
3.2.8.3 Transformation und Klonierung mit dem TOPO TA® Vektor.....	44
3.2.8.4 Vektoraufreinigung.....	45
3.2.8.5 Virus-DNA.....	46
3.2.9 PCR.....	46
3.2.9.1 Methode.....	46
3.2.9.2 Nested-PCR.....	47
3.2.9.3 Seminested-PCR.....	47
3.2.9.4 RT-PCR.....	48
3.2.9.5 RACE-PCR.....	48
3.2.9.6 DNA-Sondenherstellung.....	52
3.2.10 Agarosegelelektrophorese.....	53

3.2.11	Real-time PCR	53
3.2.11.1	TaqMan® PCR	53
3.2.11.2	SYBR Green PCR	55
3.2.11.3	Kopiezahlberechnung und Auswertung der Daten	56
3.2.12	Durchflusszytometrische Analyse	58
3.2.13	Immunfluoreszenz	59
3.2.14	Sequenzierung	59
3.2.15	Sequenzdatenaufbereitung	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Untersuchte Proben und eingesetzte Methoden	61
4.2	Differential Display	62
4.3	Northern Blot	69
4.4	Real-time PCR und SYBR Green	70
4.4.1	Durchgeführte Untersuchungen	71
4.4.2	Analyse der Regulation einzelner Gene in PCV-infizierten porcinen Zelllinien	71
4.4.2.1	L23-Zellen: porcine B-Lymphozyten	72
4.4.2.2	L52-Zellen: porcine B-Lymphozyten	74
4.4.2.3	L35-Zellen: porcine T-Lymphozyten	74
4.4.2.4	Porcine Nierenzellen	75
4.4.2.4.1	PS-Zellen	75
4.4.2.4.2	PK15-Zellen	76
4.4.3	Zusammenfassung	77
4.5	RACE-PCR	78
4.6	Durchflusszytometrie	78
4.7	Darstellung differentieller Transkription einzelner DD-Klone	78
4.8	Klon 6B: Interleukin18 – IL18	78
4.8.1	Differential Display und BLAST	78
4.8.2	Northern Blot	79
4.8.3	SYBR Green	80
4.8.4	Zusammenfassung	81
4.9	Klone 10 und 13: Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I - MHC I	81
4.9.1	Differential Display und BLAST	81
4.9.2	Northern Blot	82
4.9.3	SYBR Green	83
4.9.4	Kinetik MHC I	84
4.9.5	Durchflusszytometrische Analysen	85
4.9.6	Analyse zur Transkription und Expression des MHC I	90
4.10	Klon 14G: Death associated protein5 - DAP5	91
4.10.1	Differential Display und BLAST	91
4.10.2	Northern Blot	92
4.10.3	SYBR Green	94
4.10.4	RACE Analyse	94
4.10.5	Zusammenfassung	96
4.11	Klon 16A: NS1-assoziertes Protein - NSAP1	97
4.11.1	Differential Display und BLAST	97
4.11.2	Northern Blot	98
4.11.3	Zusammenfassung	99
4.12	Klone 18 bis 21: EHD3	100
4.12.1	Differential Display und BLAST	100
4.12.2	Northern Blot	101
4.12.3	SYBR Green	102
4.12.4	Zusammenfassung	102

4.13	Klone 23 bis 26: Lyncein	103
4.13.1	Differential Display und BLAST	103
4.13.2	Northern Blot	104
4.13.3	SYBR Green	104
4.13.4	Zusammenfassung	105
4.14	Klon 36E: STAT3 interagierendes Protein1 - StIP1.....	105
4.14.1	Differential Display und BLAST	105
4.14.2	Northern Blot	106
4.14.3	SYBR Green	107
4.14.4	Zusammenfassung	107
4.15	Klon 40J: unbekanntes Transkript.....	108
4.15.1	Differential Display und BLAST	108
4.15.2	Northern Blot	109
4.15.3	SYBR Green	110
4.15.4	Zusammenfassung	111
4.16	Caspase3	111
4.16.1	Northern Blot	111
4.16.2	SYBR Green	112
4.16.3	Zusammenfassung	113
5	Diskussion	114
5.1	Transkriptionsregulation in Abhängigkeit von der Zielzelle.....	115
5.2	Interleukin18 - IL18	116
5.3	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I - MHC I	120
5.4	Death associated Protein5 - DAP5 / Elongations initiations Faktor 4gamma2 - eIF4γ2	124
5.5	Nichtstruktur-Protein1 assoziiertes Protein - NSAP1	126
5.6	EHD3.....	128
5.7	Lyncein	129
5.8	STAT3 interacting protein1 - StIP1	129
5.9	Klon 40J.....	132
5.10	Caspase3	132
5.11	Schlussfolgerung	135
6	Zusammenfassung.....	141
7	Summary	143
8	Anhang	145
9	Literatur.....	149
10	Danksagung.....	162
11	Lebenslauf.....	163
12	Selbständigkeitserklärung.....	165