

Genomische Charakterisierung boviner β -Defensin-Gene

Dissertation Susanne Roosen

Berichterstatter Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. Kalm

β -Defensin-Gene codieren multifunktionelle Peptide, die sowohl eine direkte antimikrobielle Wirksamkeit gegen Bakterien, Pilze und Viren aufweisen als auch als Signalmoleküle im Immunsystem fungieren. Aus diesem Grund wird angenommen, dass β -Defensine Kandidatengene für Mastitisresistenz sind. Anhand der Methoden der strukturellen und funktionellen Genomanalyse soll geklärt werden, ob β -Defensin-Gene einen Faktor der angeborenen Resistenz gegenüber Mastitis darstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die genomische Charakterisierung boviner β -Defensin-Gene.

Um die Defensin-Gene isolieren zu können, wurden die genomischen bovinen BAC-Banken No. 750 und No. 754 des RZPD mit Defensin-Consensus-Primern gescreent. Es wurden 20 BACs, die Defensin-Gene enthalten, identifiziert. Durch die Erstellung eines Contigs sollte die Abfolge der Gene auf dem Chromosom dargestellt werden. Es konnten zwei Contigs konstruiert werden, die einen Bereich von ca. 310 kb und ca. 387 kb abdecken.

Die Identifizierung von Defensin-Genen erfolgte durch Sequenzierung von adapter-ligierten Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten und durch Subklonierung von PCR-Produkten. Anhand dieser Methoden konnten insgesamt 20 Gene identifiziert werden. 7 Gene waren unbekannt und wurden mit *DEFB401–DEFB405*, *LAP-like* und *EBDP* bezeichnet. 3 Gene sind ortholog zum *hBD-3* und wurden als *DEFB300*, *DEFB302P* und *DEFB303P* benannt. Mit den Sequenzen der 5'-flankierenden Bereiche der *hBD-2*- und *hBD-3*-orthologen Gene wurde eine Promotoranalyse durchgeführt, bei der die am häufigsten vorkommenden regulativen Motive TATA-, CCAAT- und GC-Boxen sowie zum Teil NF- κ B-Bindungsstellen und die hypothetischen Transkriptionsstartpunkte identifiziert wurden.

Durch eine Expressions-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass im Epithelgewebe verschiedener Bereiche des Eutergewebes *DEFB300* exprimiert wird. Die cDNA wurde mittels 5'-3'-RACE amplifiziert und subkloniert. Der hypothetische Transkriptionsstart von *DEFB300* konnte durch die Analyse der vollständigen cDNA bestätigt werden. Eine Analyse der phylogentischen Beziehungen der bovinen β -Defensin-Gene lieferte einen Hinweis, dass *hBD-2* und die *hBD-2*-orthologen Gene sowie *hBD-3* und die *hBD-3*-orthologen Gene jeweils von einem gemeinsamen Ursprungsgen abstammen könnten. Die Gruppierung der bisher unveröffentlichten Gene lässt darauf schließen, dass es sich bei *DEFB401*, *DEFB404* und *DEFB405* um neutrophile Defensine und bei *DEFB402*, *DEFB403* und *LAP-like* um epitheliale Defensine handeln könnte.