

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG	11
1.1 RNA-Rekombination	11
1.1.1 Definition und biologische Bedeutung der RNA-Rekombination	11
1.1.2 Putative Mechanismen der RNA-Rekombination	12
1.1.3 RNA-Rekombination beeinflussende Faktoren	17
1.2 Pestiviren	20
1.2.1 Taxonomie, Morphologie, Genomaufbau und Biotypen	20
1.2.2 Wirtsspektrum von Pestiviren und Pathogenese von Pestivirus-induzierten Krankheiten	21
1.2.3 RNA-Rekombination bei Pestiviren	26
1.3 Zielsetzung der Arbeit	31
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Material	32
2.1.1 Zellen	32
2.1.1.1 Eukaryotische Zellen	32
2.1.1.2 Prokaryotische Zellen	32
2.1.2 Virusstämme	32
2.1.3 Plasmide und Gesamtklone	32
2.1.4 Antisera und Antikörper	34
2.1.4.1 Antisera	34
2.1.4.2 Antikörper	34
2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide	35
2.1.5.1 Oligonukleotide für RT, PCR, gerichtete Mutation und Klonierung	35
2.1.5.2 Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung	40
2.1.6 Nährmedien	41
2.1.6.1 Zellkulturmedien	41
2.1.6.2 Bakterienkulturmedien	41
2.1.7 Lösungen und Puffer	42
2.1.8 Chemikalien	46
2.1.9 Radioaktiv markierte Substanz	48
2.1.10 Enzyme	48
2.1.11 Vorgefertigte Systeme ("Kits")	48
2.1.12 Verbrauchsmaterialien	49
2.1.13 Geräte	50
2.2 Methoden	52
2.2.1 Zellkulturarbeiten	52
2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten	52
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	52
2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen	53
2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA	53
2.2.1.5 Plaquereinigung	54
2.2.1.6 Virustitration und Titerbestimmung	54
2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen	55
2.2.1.8 Serumneutralisationstest	55
2.2.1.9 Wachstumskurve	56
2.2.1.10 Kristallviolett färbung von Zellen	57

Inhaltsverzeichnis

2.2.2 Mikrobiologische Methoden	57
2.2.2.1 Anzucht von Bakterien	57
2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	57
2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	58
2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp)	59
2.2.2.5 Große Plasmidpräparation (Midi-Präp)	60
2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken	61
2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung	61
2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	61
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	62
2.2.4 RNA-Techniken	62
2.2.4.1 Synthetische Transkription	62
2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen	63
2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“	63
2.2.4.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“)	64
2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung	64
2.2.4.6 Reverse Transkription (RT)	65
2.2.5 DNA-Techniken	65
2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	65
2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „Quick Change“(QC)-PCR	66
2.2.5.3 Radioaktive Markierung durch „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gen-sonde	67
2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	67
2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA	68
2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription	68
2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau	68
2.2.5.5.3 <i>DpnI</i> -Verdau von QC-PCR-Produkten	68
2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	68
2.2.5.7 Sequenzierung von DNA	69
2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	70
2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone	71
2.2.5.9.1 p+ubi SGT	71
2.2.5.9.2 p-ubi SGT	71
2.2.5.9.3 p-CP7-5A	72
2.2.5.9.4 pNCP7-M1	72
2.2.5.9.5 p+ubi SGT-M1M2	72
2.2.5.9.6 p+ubi SGT-M2M3	73
2.2.5.9.7 pNCP7- <i>HindIII</i> / <i>HindIII</i>	73
2.2.5.9.8 pNCP7-GAA	73
2.2.5.9.9 pNCP7- <i>ΔNaeI</i> / <i>SmaI</i>	74
2.2.5.9.10 pNCP7- <i>ΔClaI</i> / <i>ClaI</i>	74
2.2.5.9.11 pCP7-11449	74
2.2.5.9.12 pCP7-11284	74
2.2.5.9.13 p+SGT-CP7-11201	75
2.2.5.9.14 p+SGT-CP7-11450	75
2.2.5.9.15 p+ubi-Alfort	76
2.2.6 Proteinanalytische Methoden	77
2.2.6.1 Zellyse	77
2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
2.2.6.3 Immunoblotanalyse nach Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	78
2.2.7 Analyse von Sequenzdaten	78

Inhaltsverzeichnis

3. ERGEBNISSE	80
3.1 Entwicklung und Charakterisierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für BVDV	80
3.1.1 Etablierung eines RNA-Rekombinationssystems für BVDV	80
3.1.2 Einfluss der in den synthetischen Transkriptionsansätzen enthaltenen cDNA auf die Entstehung eines zytopathischen Effekts in Zellkultur	82
3.1.3 Korrelation zwischen den Mengen an transfizierter +ubi SGT-RNA und der Anzahl voneinander unabhängig entstandener ZPEs in Zellkultur	84
3.1.4 Charakterisierung von zp BVDV-Rekombinanten	85
3.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination	91
3.2.1 Einfluss der Polarität des synthetischen Transkripts +ubi SGT	91
3.2.2 Untersuchungen zur Replikationsinitiation des Minusstrangs von zp BVDV CP7-5A	92
3.2.3 Stabilität von +ubi SGT nach Transfektion	94
3.2.4 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei synthetischen RNAs in nicht infizierte Zellen	95
3.2.5 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei replikationsinkompetenten RNAs	96
3.2.6 Charakterisierung von nzp BVDV-Rekombinanten	97
3.2.7 Ursprung der viralen 3' NTR in rekombinanten BVDV-Genomen	100
3.2.8 Kotransfektionen von +ubi SGT mit RdRp-Mutanten von NCP7-5A	101
3.2.9 RNA-Rekombination <i>in vivo</i> in Abwesenheit einer funktionellen pestiviralen RdRp	104
3.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:	
Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV	111
3.3.1 Etablierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für KSPV	111
3.3.2 Biologische Klonierung und Genomanalyse des rekombinanten zp KSPV CP G1	113
3.3.3 Eigenschaften von CP G1 auf verschiedenen Zelllinien	116
3.3.4 Wachstumskinetik von CP G1	118
3.3.5 NS3-Expression von CP G1	118
3.3.6 Eignung von CP G1 für Serumneutralisationstests	120
3.3.7 Genetische Stabilität von CP G1	122
4. DISKUSSION	128
4.1 Entwicklung und Charakterisierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für BVDV	128
4.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination <i>in vivo</i>	132
4.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:	
Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV	142
5. ZUSAMMENFASSUNG	148
6. SUMMARY	151
7. LITERATURVERZEICHNIS	153
8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	168
9. PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER	170
10. DANKSAGUNG	171