

1. Einleitung	10
1.1 Pestiviren	10
1.1.1 Taxonomie, Morphologie, Genomorganisation und Biotypen	10
1.1.2 Antigenetische und genetische Heterogenität von Pestiviren	14
1.1.3 Wirtsspektrum und Wachstum in Zellkultur	15
1.1.4 Klinik und Pathogenese der durch BVDV induzierten Krankheiten	16
1.2. Nichttranslatierte Regionen	17
1.2.1 NTRs bei zellulären Messenger-RNAs	17
1.2.2 Einteilung der 3' NTRs von Plusstrang-RNA Viren	18
1.2.3. Eigenschaften und Funktionen viraler 3' NTRs	19
1.2.4 3' NTRs bei Pestiviren	20
1.2.5 RNA-Sekundärstrukturen	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1. 1 Zellen	27
2.1.1.1 Eukaryotische Zellen	27
2.1.1.2 Prokaryotische Zellen	27
2.1.2 Virusstämme	27
2.1.3 Plasmide und cDNA-Gesamtklone	27
2.1.4 Antiseren und Antikörper	28
2.1.4.1 Antiseren	28
2.1.4.2 Antikörper	28
Primärantikörper	28
Sekundärantikörper	29
2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide	29
2.1.6 Nährmedien	33
2.1.6.1 Zellkulturmedien	33
2.1.6.2 Bakterienkulturmedien	34
2.1.7 Lösungen und Puffer	34
2.1.8 Radioaktiv markierte Substanz	38
2.1.9 Enzyme	38
2.1.10 Chemikalien	39
2.1.11 Vorgefertigte Systeme („Kits“)	40
2.1.12 Verbrauchsmaterialien	41
2.1.13 Geräte	41
2.1.13.1 Zentrifugen	43
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zellkulturarbeiten	43
2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten	43
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	44
2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen	44
2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA	44
2.2.1.5 Plaquereinigung	45
2.2.1.6 Virustitration	46
2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen	46
2.2.1.8 Indirekte Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von viralem Antigen	47
2.2.1.9 Wachstumskurve	48
2.2.1.10 Bestimmung der spezifischen Infektiosität von synthetischen RNA Transkripten	49
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	49

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien.....	49
2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	50
2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	50
2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp).....	51
2.2.2.5 Mittlere Plasmidpräparation (Midi-Präp).....	52
2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken.....	53
2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanolfällung.....	53
2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	54
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	54
2.2.4 RNA-Techniken.....	55
2.2.4.1 <i>In vitro</i> Transkription.....	55
2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen.....	56
2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“.....	56
2.2.4.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“).....	57
2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung.....	57
2.2.4.6 Reverse Transkription (RT).....	58
2.2.5 DNA-Techniken.....	58
2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	58
2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „Quick Change“(QC)-PCR.....	59
2.2.5.3 Radioaktive Markierung durch „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde.....	60
2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	61
2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA.....	61
2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription.....	61
2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau.....	62
2.2.5.5.3 <i>Dpn</i> I-Verdau von QC-PCR-Produkten.....	62
2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	62
2.2.5.7 Sequenzierung von DNA.....	63
2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen.....	64
2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone.....	65
2.2.5.9.1 M3, M5, M9, M10, M11, Del SL I und Del SL II.....	65
2.2.5.9.2 M1, M2, M4, M6, M7, M8, M12, M13, M14, M15, M3R2, M3R5.....	66
2.2.5.9.3 Del SL III, Del SL II-III.....	66
2.2.5.9.4 Del SL II R1, Del SL II R3, Del SL II R6.....	67
2.2.6 Proteinanalytische Methoden.....	67
2.2.6.1 Zelllyse.....	67
2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	68
2.2.6.3 Immunoblot-Analyse.....	68
2.2.7 Analyse von Sequenzdaten.....	69
2.2.7.1 Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur.....	69
2.2.8 Computergestützte Quantifizierung von Northern Blots.....	70
3. Ergebnisse.....	71
3.1 4-Basen-Deletionen in der 3' NTR von CP7-388.....	71
3.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten M6-M15.....	73
3.2.1 Wachstumseigenschaften.....	73
3.2.2. Virale RNA-Synthese.....	75
3.2.2 Expression der viralen Nichtstrukturproteine NS3 und NS2-3.....	76
3.3 Sequenzanalyse von sekundären Mutationen für M6-M15.....	77
3.4 Sequenzanalyse der Pseudorevertanten von M3.....	78
3.5 Deletion kompletter Stemloops.....	82
4. Diskussion.....	89

5. Literaturverzeichnis.....	95
6. Zusammenfassung.....	101
7. Summary	103
8 Abbildungsverzeichnis.....	105
8.1 Abbildungen.....	105
8.2 Tabellen	105
9. Abkürzungsverzeichnis.....	106
10. Publikationen, Vorträge und Poster.....	108
10.1 Publikationen.....	108
10.2 Kongressbeiträge.....	108
11. Danksagung.....	110