

Aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene
sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim
Prof. Dr. R. Böhm

Institut für Molekulare Parasitologie
der Humboldt Universität
Prof. Dr. R. Lucius

vorgelegt über das Institut
für Geflügelkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Prof. Dr. H. M. Hafez

**Herstellung und immunologische Prüfung eines rekombinanten
Vakzine-Stammes von *Salmonella enterica enterica*,
Serovar Typhimurium, für die Expression von Antigenen
aus *Eimeria tenella***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nicole Noppinger
aus Heerlen (Niederlande)
Berlin 2002

Journal-Nr. 2640

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Hafez Mohammed Hafez
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Böhm
Dritter Prüfer:	Univ.-Prof. Dr. Richard Lucius

Tag der Promotion: 17.10.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Kokzidiose beim Huhn	2
2.1.1. <i>Eimeria tenella</i>	3
2.1.2. Prophylaxe und Bekämpfung der Kokzidiose beim Huhn	3
2.2. Immunologie	4
2.2.1. Immunsystem des Huhnes	4
2.2.2. Immunologie bei Kokzidiose	8
2.2.3. Molekularbiologische Charakterisierung von ausgewählten <i>Eimeria tenella</i> Antigenen	12
2.2.4. Vakzinierung gegen Kokzidiose	16
2.3. <i>Salmonella</i> live carrier vaccine	17
2.4. Ziele der Arbeit	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Isolierung der Gesamt-RNS aus sporulierten <i>Eimeria tenella</i> Oozysten	25
3.1.1. Messung der Nukleinsäurelösungen	27
3.2. Polymerase-Kettenreaktion	27
3.2.1. Reverse Transkription	27
3.2.2. PCR mit Einzelstrang-DNA als Template	28
3.2.3. PCR mit aufgereinigten PCR-Fragmenten als Template	29
3.3. Analyse und enzymatische Veränderungen von Nukleinsäuren	29
3.3.1. Vektoren	29
3.3.2. Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten (Ligation)	30
3.3.3. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden von DNA	30
3.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
3.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	32
3.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen	33
3.5. Bakterienstämme	34
3.6. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	34
3.7. Identifizierung rekombinanter Bakterienklone	35
3.8. Langzeitlagerung von Bakterien-Zellen	36
3.8.1. Lagerung bei -80 °C	36

3.8.2. Lagerung bei -70 °C	36
3.9. Konjugation von <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Escherichia coli</i>	36
3.10. Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	37
3.10.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung mittels BCA-Reagenzien	39
3.10.2. Konzentrierung der Proteinlösungen	39
3.11. Tierversuch Stuttgart	40
3.11.1. Haltung der Tiere	40
3.11.2. Versuchsplan	40
3.11.3. Herstellung und Applikation der Versuchsdosen	41
3.11.4. Probenentnahme	43
3.12. Tierversuch Budapest	44
3.12.1. Haltung der Tiere	44
3.12.2. Versuchsplan	44
3.12.3. Herstellung und Applikation der Versuchsdosen	45
3.12.4. Probenentnahme	45
3.12.5. Reisolierung der rekombinanten <i>Salmonella</i> aus Kotproben	45
3.13. Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	46
3.13.1. Antigenherstellung und Beschichtung der Mikrotiterplatten	46
3.13.2. Durchführung des ELISAs	47
3.13.3. Statistische Methoden	48
4. Ergebnisse	52
4.1. Ergebnisse der Gesamt-RNA Isolierung aus <i>Eimeria tenella</i> Oozysten	52
4.1.1. Ergebnis der Photometrischen Messung der Gesamt-RNA	52
4.2. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion	52
4.2.1. Ergebnisse der Reversen Transkription	52
4.2.2. Ergebnisse der PCR mit DNA als Template	53
4.3. Ergebnisse der Klonierungen in <i>Escherichia coli</i> und <i>Salmonella typhimurium</i>	54
4.3.1. Ergebnisse der Transformationen in <i>Escherichia coli</i>	54
4.3.2. Ergebnisse der Konjugation von <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Escherichia coli</i>	57
4.3.3. Ergebnisse der Überprüfung von Transformationen bzw. Konjugationen mittels PCR	58
4.4. Ergebnisse der Expression von rekombinanten Proteinen in <i>Escherichia coli</i> und <i>Salmonella typhimurium</i>	59
4.5. Ergebnisse der Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>Escherichia coli</i>	62
4.6. Tierversuch Stuttgart und Budapest	63
4.7. Immunologische Charakterisierung der Eimerien-Antigene	63
4.7.1. Ergebnisse des Immunoblot	63
4.7.2. Ergebnisse des ELISA	63

5. Diskussion	78
5.1. Molekularbiologische Charakterisierung von den <i>Eimeria tenella</i> Antigenen TA4, 3Etmic und SO7	78
5.1.1. Amplifikation	78
5.1.2. Klonierung	79
5.1.3. Expression	80
5.2. Tierversuch	84
5.2.1. Immunantwort auf Salmonellen	85
5.2.2. Immunantwort auf die relevanten <i>Eimeria tenella</i> Antigene	89
5.2.3. ELISA	95
5.3. Ausblick	98
6. Zusammenfassung	99
7. Summary	101

Abkürzungen

Liste der wichtigsten Abkürzungen:

A	Adenin
AMV	”Avian myeloblastosis virus”
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	Breite
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzg	bezüglich
C	Cytosin
CD	”cluster of differentiation”, Gruppenbezeichnung für humane Leukozytenantigene
CFA	Complett Freund' Adjuvants
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
CTAB	Cetytrimethylammoniumbromid
cDNA	”complementary DNA”
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat-Na ₂ -Salz
ELISA	”Enzym-linked-immunosorbent-assay”
FA	Freund' Adjuvants
G	Guanin
H	Höhe
Hind III	Restriktionsendonuklease von <i>Haemophilus influenzae</i>
iCFA	inkomplettes Freund' Adjuvants
IFN	Interferon, α -, β -, oder γ -Interferon
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-Galactopyranosid
KBE	Koloniebildende Einheiten
kD(a)	Kilodalton
konj.	konjugiert
LB	"Luria broth"
LMW	"Low Molecular Weight"
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarität
MHC	"Major histocompatibility complex", Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNS	"messenger Ribonukleinsäure"
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	"Polymerase Chain Reaktion", Polymerase Kettenreaktion
RBS	"Ribosome binding site", Ribosom-Bindungsstelle
rek.	rekombinant
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Stichproben-Standardabweichung
s.c.	subcutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Std.	Standard
T	Thymin
TBS	TRIS buffered saline
T _c -Zelle	cytotoxische T-Zelle
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',n',-Triethylmethylethylendiamin
T _h -Zelle	T-Helfer-Zelle
TRAP	"Thrombospondin-related adhesive protein" von <i>Plasmodium falciparum</i>
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
U	"unit", Einheit
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
X-gal	Xylencyanol FF
XLD	Xylose - Lysin - Desoxycholat
\bar{x}	Mittelwert