

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

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur</b>	<b>2</b>
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
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
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
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
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

<b>5. Diskussion</b>	<b>78</b>
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
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>7. Summary</b>	<b>101</b>

# 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 <sub>2</sub> -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, $\alpha$ -, $\beta$ -, oder $\gamma$ -Interferon
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -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 <sub>c</sub> -Zelle	cytotoxische T-Zelle
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',n',-Triethylmethylethylendiamin
T <sub>h</sub> -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