

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Gesamt-RNA Isolierung aus *Eimeria tenella* Oozysten

Die widerstandsfähige Schale der *Eimeria tenella* Oozysten musste vor Beginn des Kits zur Isolierung der Gesamt RNA zerstört werden. Dazu wurden die Oozysten unterschiedlichen mechanischen Kräften (Ultraschall und Reibung) ausgesetzt. Diese zusätzlichen Arbeitsschritte waren notwendig, da das normalerweise verwendete Ausgangsmaterial des Kites (tierischen Zellen, Hefen, Bakterien) eine empfindsamere Außenwand als die *Eimeria* Oozysten besitzt. Im Lichtmikroskop konnte der Aufschluß der sporulierten *Eimeria tenella* Oozysten beobachtet werden. Sowohl die Oozystenhülle als auch die Sporozystenhülle waren nicht mehr intakt, und so lagen die Sporozoiten frei vor.

4.1.1. Ergebnis der Photometrischen Messung der Gesamt-RNA

Die photometrische Messung der isolierten Gesamt-RNA ergab eine Konzentration von 300,4 $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion

4.2.1. Ergebnisse der Reversen Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA wurde durch eine reverse Transkription in Einzelstrang-DNA umgeschrieben. Durch sequenzspezifische Primer wurden Fragmente der relevanten *Eimeria tenella* Gene amplifiziert. Eine Überprüfung der PCR-Fragmente erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Wenn die PCR-Produkte in ihrer Größe mit der der gewünschten *Eimeria tenella* Fragmente übereinstimmten, wurde zur weiteren Abklärung, ob es sich tatsächlich um die relevanten *Eimeria tenella* Gene handelt, eine Analyse der PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen und Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt.

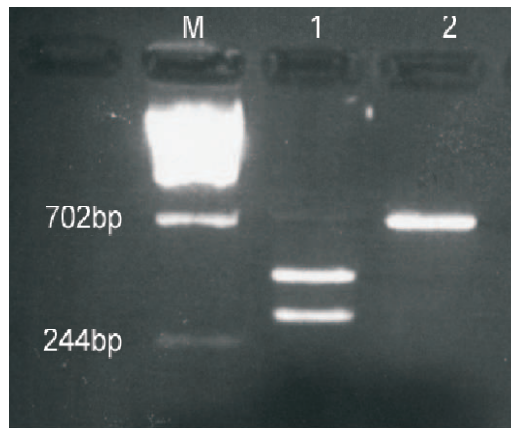


Abbildung 4.1.: 1,0 % Agarose-Gelelektrophorese einer Restriktionsanalyse des DNA Fragments TA4. Das Restriktionsenzym Sca I spaltet TA4 (Spur 2) in ein 303 bp und ein 429 bp großes Fragment (Spur 1).

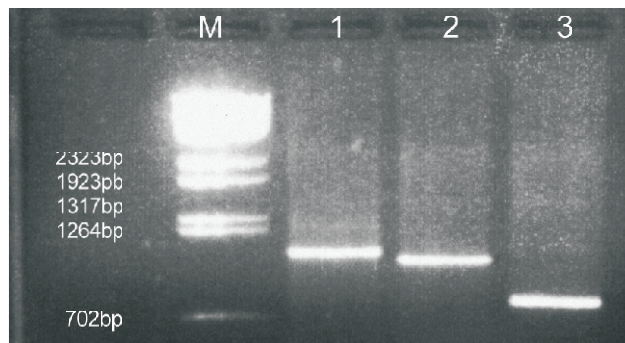


Abbildung 4.2.: 1,2 % Agarose-Gelelektrophorese einer Restriktionsanalyse des DNA Fragments Etmic mit den Restriktionsenzymen BamHI (Spur 1 = 1057 bp), SalI (Spur 2 = 1002 bp) und SmaI (Spur 3 = 767 bp und 754 bp). Die zweiten, kleineren Fragmente der BamHI- bzw. SalI-Spaltung sind nicht abgebildet.

4.2.2. Ergebnisse der PCR mit DNA als Template

Die PCRs mit DNA als Template und unter Verwendung unterschiedlicher Primerpaare führte zur Synthese der ausgewählten *Eimerien tenella* Fragmente. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.1 und in der Abbildung 4.3 dargestellt.

Bei der Amplifikation von Etmic1, 3Etmic und 5Etmic wurde das PCR-Fragment Etmic-2 als Template verwendet, bei TA4-2 diente das PCR-Fragment TA4 als Vorlage. Bei Etmic1 wurde mit den Fragmenten 3Etmic und 5Etmic, das sind die 3'- bzw. 5'-Enden des Etmic1-Fragmentes, weitergearbeitet.

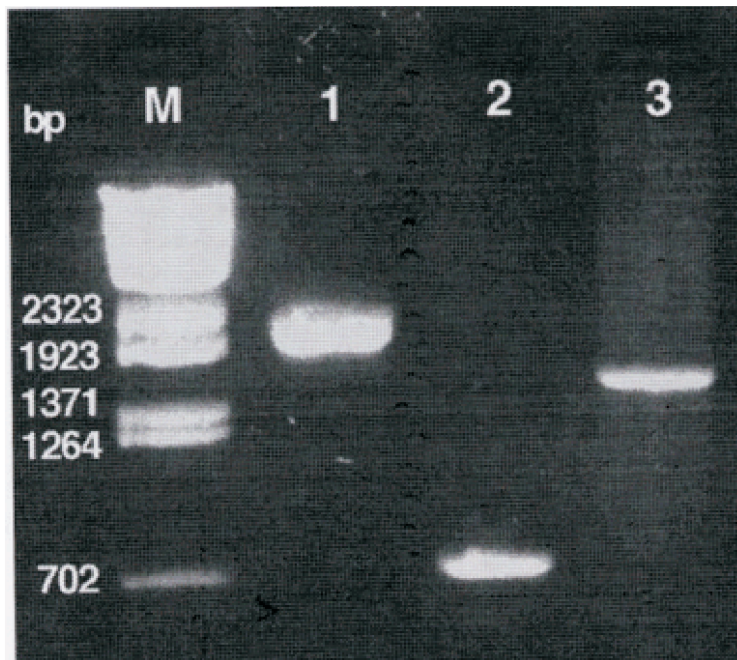


Abbildung 4.3.: Ergebnisse von PCRs mit Einzelstrang DNA als Template und unterschiedlichen Primerpaaren. Analyse durch eine 1 % Agarose-Gelelektrophorese. PCR-Fragment Etmic1 (Spur 1), TA4 (Spur 2) und Ettub (Spur 3).

Das spezifische DNA-Fragment beta-tubulin wurde nicht in die folgenden Transformation miteinbezogen. Beta-tubulin wurde bei den PCRs als Kontrollfragment mitgeführt, d. h. mit diesem spezifischen Fragment wurde abgeklärt, ob es sich bei der isolierten RNA bzw. bei der amplifizierten DNA um *Eimeria tenella* Produkte handelte.

4.3. Ergebnisse der Klonierungen in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*

4.3.1. Ergebnisse der Transformationen in *Escherichia coli*

Die Klonierung der relevanten Gene 3Etmic, 5Etmic, TA4-2 und SO7 wurde mit dem Vektor pBluescript II SK(+/-) und dem Bakterienstamm XL1-Blue durchgeführt. Die Restriktionsstelle entsprach der Spaltstelle des Restriktionsenzymes EcoRV. Die α -Komplementation, die im Laborjargon als "Blau-Weiß-Selektion" bezeichnet wird, wurde als Selektionsmerkmal verwendet. Mit den positiven Kolonien wurden eine CTAB-Schnellisolierung durchgeführt, und anschließend erfolgte eine Restriktionsanalyse mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese.

Zur Erhöhung des Klonierungsertrages wurde der Vektor durch eine alkalische Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert, und die PCR-Fragmente durch eine Kinase

Tabelle 4.1.: Ergebnisse der PCR mit DNA als Template

spezif. DNA-Fragmente	Kurzbezeichnung	Größe	Primerpaar
beta tubulin	Ettub	1522 bp	Ettub-f/-r
Mikronem 2	Etmic2	2063 bp	Etmic-f2/-r2
Mikronem 1	Etmic1	2035 bp	Etmic-f/-r
3Mikronem	3Etmic	1081 bp	Etmic-f4/-r
5Mikronem	5Etmic	993 bp	Etmic-f/-r4
TA4	TA4	732 bp	TA4-f/-r
TA4-2	TA4-2	750 bp	TA4-f2/-r2
SO7	SO7	635 bp	SO7-F6/-R6

phosphoryliert. Die Ligation wurde mit "glatten Enden" durchgeführt. Mit den oben aufgeführten Schritten konnte für die DNA-Fragmente 5Etmic, 3Etmic, TA4-2 und SO7 positive Klone in dem Vektor pBluescript und dem Wirt XL1-Blue kloniert werden, siehe Abbildung 4.4.

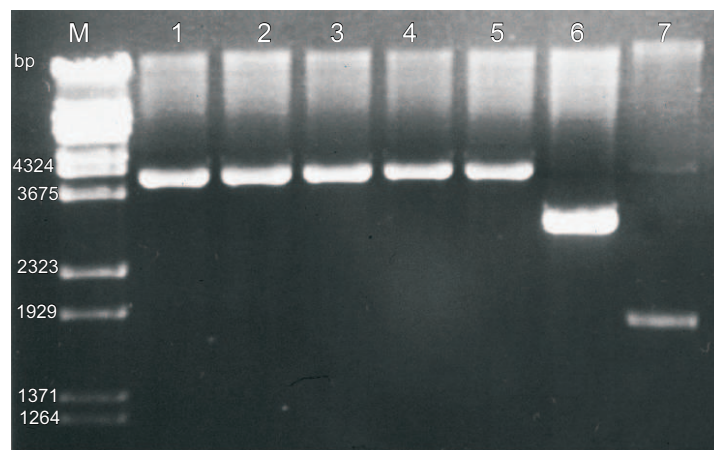


Abbildung 4.4.: Ergebnis der Transformation vom PCR-Fragment 3Etmic und pBluescript-EcoRV in XL1-Blue. 0,8 % Agarose-Gelelektrophorese einer Restriktionsanalyse mit Hind III. Der Vektor (Spur 6) besitzt 2961 bp, und ist mit 3Etmic (1081 bp) als Insert 4042 bp groß (Spur 1-5). Spur 7 zeigt unverdauten Vektor.

In einem Drittlabor wurde eine automatisch Sequenzierung der positiven Klone durchgeführt (Daten nicht aufgeführt). Die Sequenz der Klone wies einzelne Basenaustausche auf, die aber auf die Aminosäuresequenz der relevanten *Eimeria tenella* Antigene keine Auswirkung hatten.

Um die Expression der rekombinanten *Eimeria tenella* Antigene in *Escherichia coli* spezifischer überprüfen zu können, wurde der Vektor pBluescript II SK(+/-) durch den

Tabelle 4.2.: Vektoren mit Insert in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* Stämmen

Vektor	Merkmal-Vektor	Vektorgröße	Insert	Merkmal-Insert	Insertgröße	Wirt
pBluescript II SK	EcoRV; CIP	2961 bp	5Etmic	Kinas.	993 bp	XL1-Blue
pBluescript II SK	EcoRV; CIP	2961 bp	3Etmic	Kinas.	1081 bp	XL1-Blue
pBluescript II SK	EcoRV; CIP	2961 bp	TA4-2	Kinas.	750 bp	XL1-Blue
pBluescript II SK	EcoRV; CIP	2961 bp	SO7	Kinas.	635 bp	XL1-Blue
pQE-30	BamHI; SalI	3462 bp	5Etmic	BamHI; SalI	1038 bp	XL1-Blue
pQE-30	BamHI; SalI	3462 bp	3Etmic	BamHI; SalI	1126 bp	SCS-110
pQE-30	BamHI; SalI	3462 bp	TA4-2	BamHI; SalI	795 bp	XL1-Blue
pQE-30	BamHI; SalI	3462 bp	SO7	BamHI; SalI	680 bp	XL1-Blue
pMMB207.1	EcoRI; SalI	8,5 kbp	5Etmic	MunI; SalI	1124 bp	JM 109; Zlux
pMMB207.1	EcoRI; SalI	8,5 kbp	3Etmic	EcoRI; SalI	1183 bp	JM 109; Zlux
pMMB207.1	EcoRI; SalI	8,5 kbp	TA4-2	EcoRI; SalI	852 bp	JM 109; Zlux
pMMB 207.1	EcoRI; HindIII	8,5 kbp	SO7	EcoRI; HindIII	694 bp	Top 10F'; Zlux

Vektor pQE-30 ausgewechselt. Dazu wurden die isolierten Plasmide der positiven Klone mit BamHI und SalI verdaut. Anschließend wurde eine Ligation mit dem Vektor pQE-30, der ebenfalls BamHI und SalI gespalten war, durchgeführt, siehe Abbildung 4.5. Als Wirt wurde weiterhin XL1-Blue oder der Bakterienstamm SCS 110 verwendet.

Die Transformation wurde über eine Isolierung der Plasmid-DNA und Agarose-Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente überprüft.

Um eine erhöhte Stabilität des Plasmides im Salmonellen Stamm zu erlangen, wurde ein Vektorwechsel durchgeführt. Das zu exprimierende Fragment wurde dazu in einen Vektor kloniert, der durch interspezifische Konjugation von *Escherichia coli* zu Salmonellen übertragbar war. Das ausgewählte Plasmid pMMB207.1 kann von vielen verschiedenen gramnegativen Bakterienarten u. a. auch Salmonellen repliziert werden.

Beim Wechsel von Vektor pQE-30 in Vektor pMMB207.1 wurde die *Eimeria tenella* Antigen-Sequenz zusammen mit der flankierenden ribosomalen Bindungsstelle des Expressionsplasmides pQE-30 verwendet. Dadurch wurde eine optimale Entfernung zwischen dem Startmethionin der exprimierenden DNA-Sequenz und der RBS erreicht. Die pQE-30-Konstrukte wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI bzw. im Falle von SO7 mit HindIII statt SalI geschnitten. Die Ausnahme bei dem Antigen SO7 wurde notwendig, da sich in der Sequenz des Antigens eine Schnittstelle für SalI befindet. Das Fragment 5Etmic wird durch das Restriktionsenzym EcoRI gespalten, darum mußte bei diesem Fragment bei der Klonierung von pQE-30 in pMMB207.1 auf das Enzym MunI ausgewichen werden. In der Tabelle 4.2 sind die einzelnen Vektoren und Inserts in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* aufgelistet. Als Wirt für den pMMB207.1 Vektor wurden die *Escherichia coli* Stämme JM 109 und Top10F' verwendet. Die nachfolgenden Arbeiten wurden mit den Fragmenten 3Etmic, SO7 und TA4-2 durchgeführt.

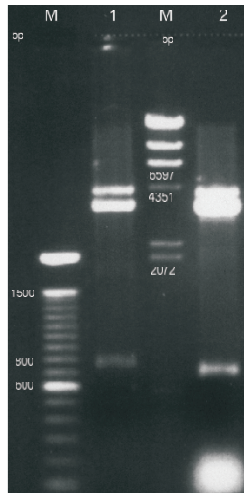


Abbildung 4.5.: pQE-30-TA4-2 und -SO7 Verdau mit BamHI und Sall. Analyse durch eine 1,0 % Agarose-Gelelektrophorese. Das TA4-2-Fragment (Spur 1) ist 795 bp und das SO7-Fragment (Spur 2) 680 bp groß. Die restlichen Banden in der Spur 1 und 2 sind ungespaltener pQE-30 Vektor.

4.3.2. Ergebnisse der Konjugation von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*

In der Konjugation wurden die TA4-2, 3Etmic und SO7 exprimierenden *Escherichia coli* Klone verwendet. Das pMMB207.1-Plasmid ist zwar mobilisierbar aber nicht auto-transferabel, somit wurde für seine Übertragung durch Konjugation ein Helferplasmid der Inkompatibilitätsgruppe P (z. B. pRK2013) benötigt, das die Transferfunktion bereitstellt. Die Übertragung der Plasmide von *Escherichia coli* auf *Salmonella typhimurium* erfolgte in einem als "Triparentales Mating" bezeichneten Konjugationsansatz. Der Konjugationsansatz setzte sich aus den Bakterienstämmen Zlux, HB101 mit dem Vektor pRK2013 und dem jeweiligem positiven *Escherichia coli* Klon zusammen.

Die Kolonien der Konjugationsplatten wurden auf ihre Zugehörigkeit zu *Salmonella typhimurium* überprüft. Es wurden nur die Kolonien auf das Vorhandensein der Eimerien-Gene bzw. auf deren Expression überprüft, die folgenden Kriterien entsprachen:

- Objektträgeragglutination mit polyvalenten und monovalenten *Salmonella*-Testseren positiv
- Farbumschlag des XLD-Agar-Indikators von rot nach pink
- Schwarzfärbung der Einzelkolonie auf XLD-Agar
- runde, glänzende Einzelkolonie mit einem Durchmesser von 2 - 4 mm
- Lumineszens der Einzelkolonie

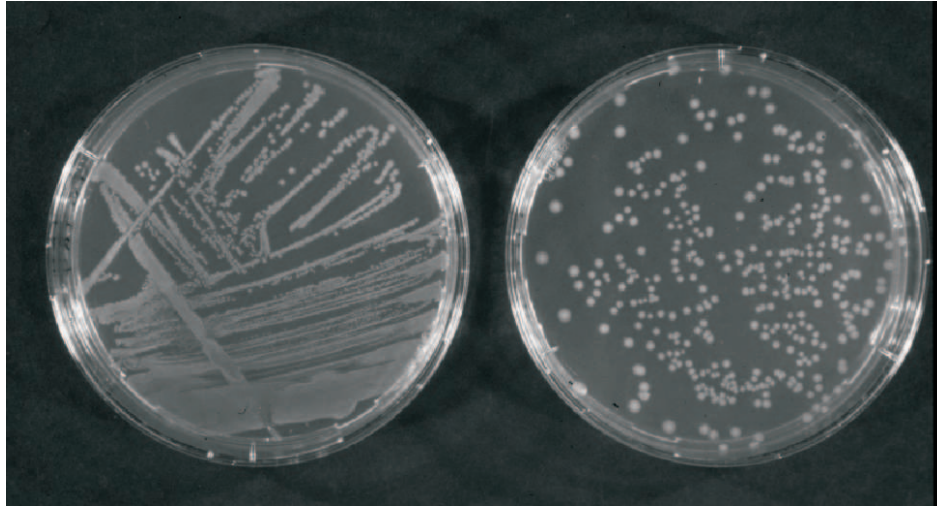


Abbildung 4.6.: Kolonien des rekombinanten Salmonellen-Impfstoffkandidaten TA4 bei Tageslicht fotografiert. Eine ÜN-Kultur wurde auf Std.-Agar ausgestrichen bzw. verdünnt ausplattiert, und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Zur genetischen Markierung der rekombinanten Salmonellen wurde das Lux-Operon (=lux) von *Vibrio fischeri* eingesetzt. Die Fähigkeit der rekombinanten Salmonellen im Dunklen zu Leuchten ist auf den Abbildungen 4.6 und 4.7 dargestellt. Dafür wurden die gleichen Platten bei Tageslicht und bei Dunkelheit aufgenommen. Tabelle 4.3 zeigt eine Aufschlüsselung der verwendeten Bezeichnungen für die rekombinanten Salmonellen-Impfstoffkandidaten.

Tabelle 4.3.: Eigenschaften der *Salmonella typhimurium* Stämme

Bezeichnung	Wirt	Plasmid	rek. Antigen	Bemerkung
Zlux	<i>Zoosaloral H</i>	pMMB207.1lux	—	Kanamycin
ZluxSO7	<i>Zoosaloral H</i>	pMMB207.1lux	SO7	Chloramphenikol
ZluxTA4	<i>Zoosaloral H</i>	pMMB207.1lux	TA4	Chloramphenikol
Zlux3Etmic	<i>Zoosaloral H</i>	pMMB207.1lux	3Etmic	Chloramphenikol

Legende: lux = ZpUTKm

4.3.3. Ergebnisse der Überprüfung von Transformationen bzw. Konjugationen mittels PCR

Bei dem kleinstem Fragment der *Eimeria tenella* Gene, dem SO7, wurde zusätzlich zur Restriktionsanalyse eine Überprüfung der Klone mittels PCR durchgeführt, siehe Abbildung 4.8. Dies wurde notwendig, da eine Überprüfung mittels Restriktionsanalyse bedingt durch die Fragmentgröße von SO7 nicht eindeutig zu interpretieren war.

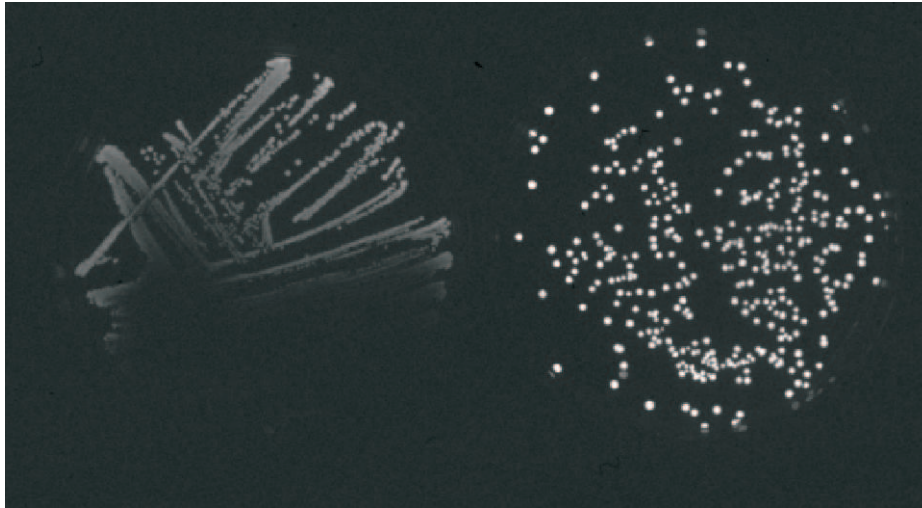


Abbildung 4.7.: Kolonien des rekombinanten Salmonellen-Impfstoffkandidaten TA4 bei Dunkelheit fotografiert. Eine ÜN-Kultur wurde auf Std.-Agar ausgestrichen bzw. verdünnt ausplattiert, und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

4.4. Ergebnisse der Expression von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*

Tabelle 4.4.: Expression der relevanten *Eimeria tenella* Genen

Name	Größe in kD
3Etmic	50-55
TA4-2	26-28
SO7	25-27

Bei den pQE30-Konstrukten in *Escherichia coli* erfolgte die Expression von 3Etmic, TA4-2 und SO7 nach einer Induktion mit IPTG. Beim Einsatz der rekombinanten Salmonellen im Tierversuch ist die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG nicht möglich. Der Vektor pMMB207.1 benötigt keine Induktion durch IPTG, da eine Deletion seines *lacI^q*-Gens eine kontinuierliche Expression der rekombinanten Eimerien-Antigene erlaubt. In der Abbildung 4.9 ist die Expression von pMMB207.1-TA4-2 in dem *Escherichia coli* Stamm JM 109 und in dem Salmonellen Stamm Zlux dargestellt.

Die Größen der rekombinanten Proteine sind in der Tabelle 4.4 aufgeführt. Die Expression des rekombinanten SO7 konnte in mit Coomassie Blau angefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durch seine Größe nicht eindeutig identifiziert werden, daher mußte ein Nachweis des Expressionsproduktes im Immunoblot erfolgen.

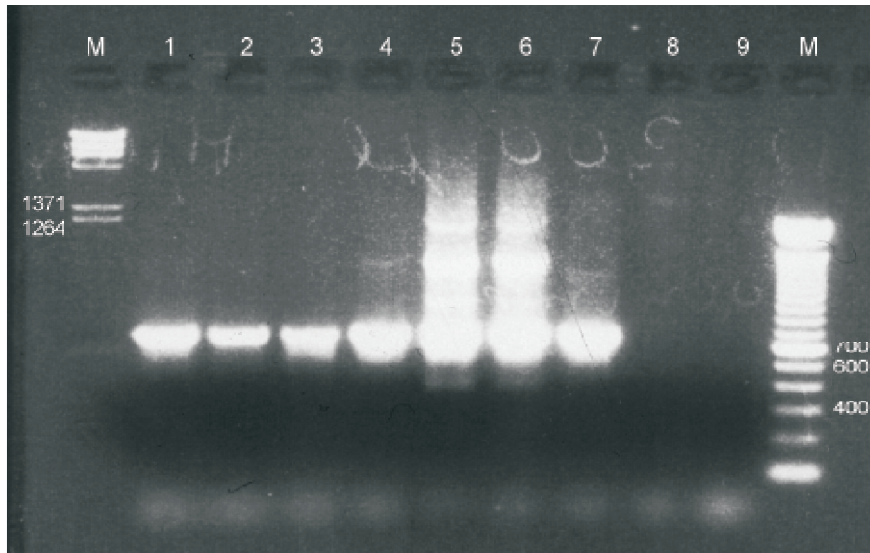


Abbildung 4.8.: Ergebnisse der Überprüfung einer Transformation bzw. Konjugation des SO7 Fragmentes in dem Vektor pMMB207.1 mittels PCR. Spur 1-4: amplifiziertes Insert SO7 in Top 10F' bzw. Spur 5 und 6: in Zlux mit den Primern SO7-F6 und -R6; Spur 7 = Positivkontrolle SO7 in pQE-30 und XL1-Blue als Wirt; Spur 8:Negativkontrolle pMMB207.1 ohne Insert in JM 109; Spur 9: PCR-Prämix. Analyse durch eine 1,5 % Agarose-Gelelektrophorese.

Die Abbildung 4.10 zeigt die Expression von einem aus Kotproben reisolierten, rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4. Bei der Kotprobe handelt es sich um eine Probe aus dem Tierversuch Budapest, die sechs Tage nach der ersten oralen Applikation gezogen wurde.

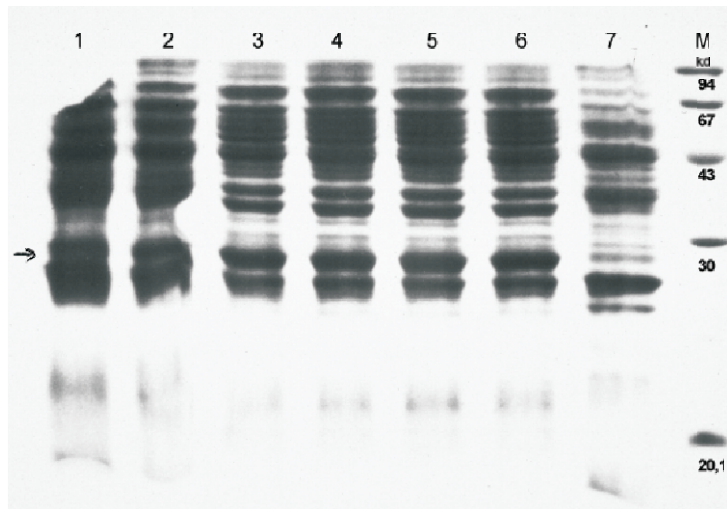


Abbildung 4.9.: Ergebnisse der Expression von pMBB207.1-TA4-2-EcoRI-SalI (28 kD) in JM109 (Bahn 3-6) bzw. Zlux (Bahn 1 und 2), dargestellt in einem 12 % SDS-PAGE. Bahn 7:Negativkontrolle = Zlux207.1.

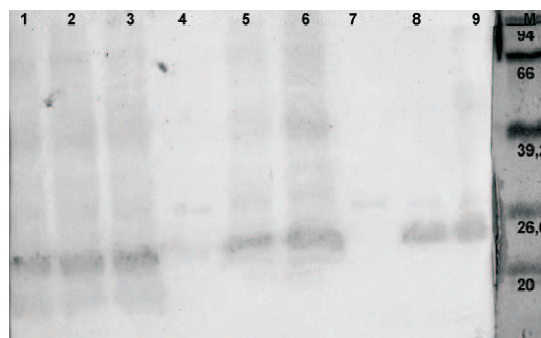


Abbildung 4.10.: Western Blot eines 10 % SDS-PAGE. Bahn 1-6: pMBB207.1-EcoRI-HindIII-SO7 (25 kD) in Top 10F'; Der Top 10F' Klon auf Bahn 4 besitzt keine Expression; Bahn 7: Negativkontrolle pMMB207.1;Bahn 8: Expression von TA4 (28 kD) eines aus Kotproben reisolierten Salmonellen-Impfstoffkandidaten TA4, und Bahn 9: Expression von ZluxTA4.