

## 4.5. Ergebnisse der Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *Escherichia coli*

Für die Auswertung des ELISAs wurden Positivkontrollen benötigt. Dazu wurde einem Teil der Tiere subcutan aufgereinigtes rekombinantes Eimerien-Antigen verabreicht. Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die pQE-30 Konstrukte in *Escherichia coli* verwendet. Die Aufreinigung wurde unter denaturierende Bedingungen durchgeführt. Die Elutionsfraktionen der Aufreinigungen wurden anhand Coomassie Blau gefärbten SDS-PAGE beurteilt (siehe Abbildungen 4.11 und 4.12), und nur Fraktionen mit einer deutlichen Bande wurden dialysiert. Die aufgereinigten Proteine 3Etmic, TA4-2 und SO7 zeigen außer den spezifischen Banden bei 55, 28 bzw. 25 kDa zusätzliche Banden im Coomassie Blau angefärbten SDS-PAGE.

Nach der Dialyse erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration über einen BCA-Test. Die Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) der rekombinanten Proteine wurden anhand einer BSA-Standardkurve berechnet.

Bei den rekombinanten Proteinen 3Etmic und TA4-2 waren die Endkonzentrationen mit  $330 \mu\text{g}/\text{ml}$  und  $150\text{-}180 \mu\text{g}/\text{ml}$  für die im Tierversuch benötigten Dosen ausreichend. Die Endkonzentration von dem rekombinanten Protein SO7 betrug  $60$  und  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ , somit mußte vor dem Tierversuch eine Konzentrierung der Proteinlösung durchgeführt werden.

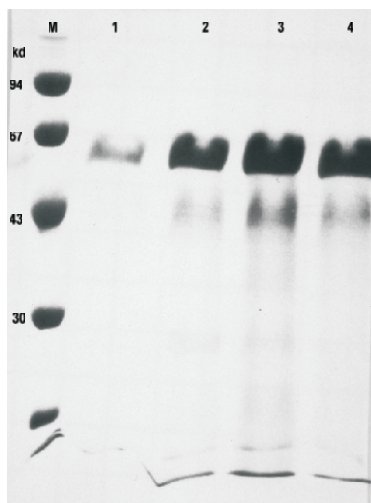


Abbildung 4.11.: Elutionsfraktionen einer Aufreinigung vom rekombinanten Antigen 3Etmic (55 kD). Analyse durch ein 12 % SDS-PAGE. Bahn 1-4: Elutionsfraktionen 1-4.

## 4.6. Tierversuch Stuttgart und Budapest

Je nach Impfschema wurde den Tieren entweder oral die rekombinanten *Salmonellen*-Impfstoff-Kandidaten oder subcutan die aufgereinigten rekombinanten Eimerien-Antigene verabreicht. Eine Kombination der beiden Applikationsformen wurde auch getestet. Beim Tierversuch Stuttgart verstarb vermutlich Stress bedingt kurz nach der subcutanen Applikation ein Tier aus der Versuchsgruppe 6.

Der Tierversuch "Budapest" wurde von Herr Professor István Varga und seine Mitarbeitern an der Veterinärmedizinischen Fakultät in Budapest betreut. Die Inokulation der *Salmonellen* am 1. Lebenstag wurde von Herrn Dr. Wolfgang Beyer und mir durchgeführt. Die Tötung und Probenentnahme am Versuchsende erfolgt durch Herrn Dr. Thomas Pogonka und Herrn Dr. Rainer Wölk, aus dem Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt Universität zu Berlin.

Die Tiere der Stallkontrolle von den Tierversuchen Stuttgart und Budapest waren während der Versuchsdauer unauffällig.

## 4.7. Immunologische Charakterisierung der Eimerien-Antigene

### 4.7.1. Ergebnisse des Immunoblot

Die rekombinanten *Escherichia coli* und *Salmonella* Stämme wurden in einem Western Blot bezüglich der Expression der rekombinanten Proteine 3Etmic, TA4-2 und SO7 getestet. Die Hintergrundreaktionen sind gering, jedoch sind teilweise zusätzliche Banden zu sehen. Die Ergebnisse der Expressionsüberprüfung vom Antigen SO7 sind in den Abbildungen 4.10 dargestellt.

Auf den Abbildungen 4.13 und 4.14 ist die Expression der drei *Eimeria tenella* Antigene, sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Salmonella typhimurium*, mit dem Vektor pMMB207.1 dargestellt. Bei dem Antigen SO7 waren die Signale auf der Membran teilweise so schwach, dass sie auf den Ablichtungen der Membranen nicht mehr sichtbar sind.

### 4.7.2. Ergebnisse des ELISA

Die Untersuchung der Versuchsproben auf Immunglobulin A und G erfolgte über einen ELISA.

#### *Tierversuch Stuttgart*

Die Versuchsgruppe mit der zweifachen subcutan Applikation von CFA (Gruppe 9) und die Gruppe mit der einmaligen oralen Gabe von Zlux207.1 (Gruppe 8) dienten, bei der Untersuchung von gegen spezifischen Eimerien-Antigene gerichtetem IgG, als Kontrollgruppen.

Die Untersuchung der Seren auf Immunglobulin G gerichtet gegen die spezifischen Eimerien-Antigene ergab für die zweimalig subcutan injizierten Tiere (Gruppe 6, 7 und 10) höhere OD-Werte als für die Kontrollgruppen 8 und 9. Die OD-Werte der gemischt behandelten Gruppen (4 und 5), also bei den Tieren die sowohl eine orale als auch eine subcutane Applikationen bekommen haben, sind auch höher als die der Kontrollgruppen. Bei den Gruppen 1, 2 und 3, welche nur oral behandelt wurden, liegen die OD-Werte im Bereich der Kontrollgruppen. Die Ergebnisse sind in den Grafiken 4.15 bis 4.22 und in den Tabellen 4.5 und 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.5.: Statistik zu den Ergebnissen vom ELISA zur Untersuchung von IgG in Seren gerichtet gegen das rekombinante Antigen SO7. Inkubation des ABTS Substratpuffers 10 min.

Gruppe	$\sigma_{n-1}$	$\sigma_n$	$\bar{x}$	n
1	0,0870	0,0826	0,2497	10
6	0,2889	0,2724	1,5955	9
9	0,0719	0,0682	0,2758	10
8	0,1033	0,0980	0,1978	10
2	0,05633	0,0534	0,2078	10
6	0,3091	0,2914	1,86	9
9	0,1014	0,0962	0,3055	10
8	0,1030	0,0977	0,1989	10
4	0,8262	0,7838	1,4382	10
6	0,3218	0,3034	1,523	9
9	0,0904	0,0857	0,2636	10
8	0,1134	0,1076	0,1923	10

Eine Untersuchung von gegen LPS gerichteten Immunglobulin G im Serum erfolgte bei den Tieren, die mit einem Salmonellenstamm oral behandelt wurden. Der kommerzielle *Salmonella typhimurium* Antibody ELISA verfügte über eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um Serum von spezifisch-pathogen-frei gehaltenen Tieren, während die Positivkontrolle ein Serum mit standardisiertem *Salmonella typhimurium* Antikörpertiter war. Die Untersuchung der Seren auf Immunglobulin G gerichtet gegen LPS führte bei keiner der Versuchsproben zu einem positiven Ergebnis. Sämtliche Tiere aus allen Gruppen besaßen einen als negativ definierten OD-Wert. Die Definitionen negativ und positiv für eine Probe leitete sich von den OD-Werten der mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen ab.

Bei der Untersuchung auf Immunglobulin A gerichtet gegen LPS oder gegen die spezifischen Eimerien-Antigene wurden sowohl die Seren als auch die Gallenflüssigkeit der Tiere getestet. Die zweimalig subcutan mit CFA behandelte Gruppe (Gruppe 9) diente sowohl bei IgA gerichtet gegen LPS, als auch gerichtet gegen ein spezifisches Eimerien-Antigen, als Kontrollgruppe. Während die einmalig oral applizierte Zlux207.1 Gruppe

Tabelle 4.6.: Statistik zu den Ergebnissen vom ELISA zur Untersuchung von IgG in Seren gerichtet gegen das rekombinante Antigen TA4-2 bzw. 3Etmic. Inkubation des ABTS Substratpuffers 10 min.

Gruppe	$\sigma_{n-1}$	$\sigma_n$	$\bar{x}$	n
5	0,469	0,445	1,03	10
7	0,142	0,135	1,35	10
9	0,069	0,065	0,258	10
8	0,028	0,027	0,132	10
3	0,074	0,070	0,194	10
7	0,163	0,155	1,297	10
9	0,076	0,072	0,315	10
8	0,042	0,040	0,154	10
10	0,259	0,245	1,56	10
9	0,309	0,293	0,259	10
8	0,042	0,040	0,090	10

(Gruppe 8) nur bei den Testungen auf IgA gerichtet gegen die Eimerien-Antigene als Kontrolle eingesetzt wurde. Bei der Untersuchung von IgA unabhängig von der Ausrichtung des Immunglobulines, und ob es sich bei dem Probenmaterial um Serum oder Gallenflüssigkeit handelte, ergaben sich für die untersuchten Versuchsgruppen keine von den Kontrollgruppen 8 und 9 abweichende Ergebnisse.

Der Verdacht das es sich bei den Extremwerten 0,235 ; 0,239 ; 0,358 aus Gruppe 4 und dem Extremwert 0,123 aus Gruppe 5 um Ausreißer handelt, wird auf dem 5 %-Niveau als unbegründet zurückgewiesen. Der berechnete Testquotient für Gruppe 4 und Gruppe 5 mit  $n=10$  war  $< 0,477$  (Sachs, 1968).

Die anhand dem Nullklassentest berechnete Anzahl der Nullklassen der Versuchsgruppen 1, 2, 3, 4, 5, 9 und 10 ist  $\leq 5$ . Bei  $n = 10$  ist die Anzahl der zulässige Nullklassen (nk) = 6 (Zoefel, 1988). Somit kann bei fünf auftretenden Nullklassen und sechs zulässigen die These der Normalverteilung beibehalten werden.

Der U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney prüft die Nullhypothese: Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Beobachtung der ersten Grundgesamtheit größer ist als eine beliebig gezogene Beobachtung der zweiten Grundgesamtheit, ist gleich 0,5. Die entsprechende einseitige Fragestellung ist ebenfalls möglich. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der berechnete U-Wert kleiner oder gleich dem kritischen Wert  $U(m, n; \alpha)$  ist. Der kritische Wert von U für den Test von Wilcoxon, Mann und Whitney für den einseitigen Test mit  $\alpha=0,01$  und  $m=n= 0$  ist =19. Da bei den Versuchsgruppen 4, 5, 6, 7, und 10 die Prüfgröße  $< 19$  wird die Nullhypothese auf einem 1 %-Niveau abgelehnt, d. h. die Alternativhypothese wird akzeptiert. Bei den Gruppen 1, 2 und 3 ist die Prüfgröße  $> 19$ . Die Nullhypothese ist auf dem 1 %-Niveau nicht abzulehnen.

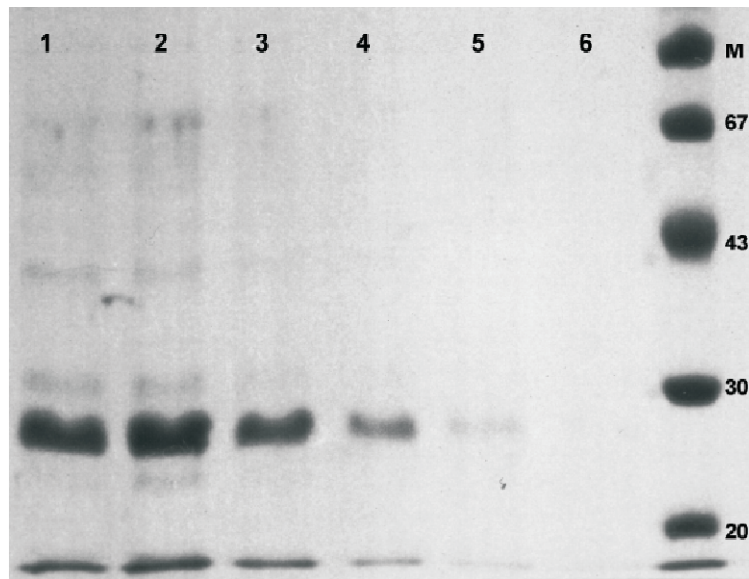


Abbildung 4.12.: Elutionsfraktionen einer Aufreinigung vom rekombinanten Antigen SO7 (25 kD). Analyse durch ein 12 % SDS-PAGE. Bahn 1-6:Elutionsfraktionen 1-6.

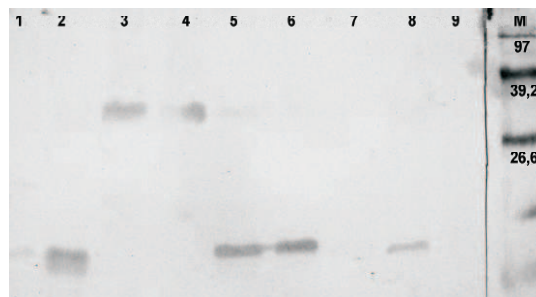


Abbildung 4.13.: Western Blot eines 12 % SDS-PAGE mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen. Bahn 1+2: SO7 (25 kD); Bahn 3+4: 3Etmic (55 kD); Bahn 5+6: TA4-2 (28 kD) in Top10F' bzw. JM109; Bahn 7: Negativkontrolle = pMMB207.1 in JM 109; Bahn 8: ZluxSO7; Bahn 9 ohne Probe



Abbildung 4.14.: Western Blot eines 12 % SDS-PAGE mit rekombinanten Salmonellen Stämmen. Bahn 1: ZluxTA4 (28 kD); Bahn 2: Zlux3Etmic (55 kD); Bahn 3: ZluxSO7 (25 kD); Bahn 4: ohne Probe; Bahn 5: Negativkontrolle Zlux207.1 in JM 109; Bahn 6-8: ohne Probe; Bahn 9: SO7 in Top 10F'.

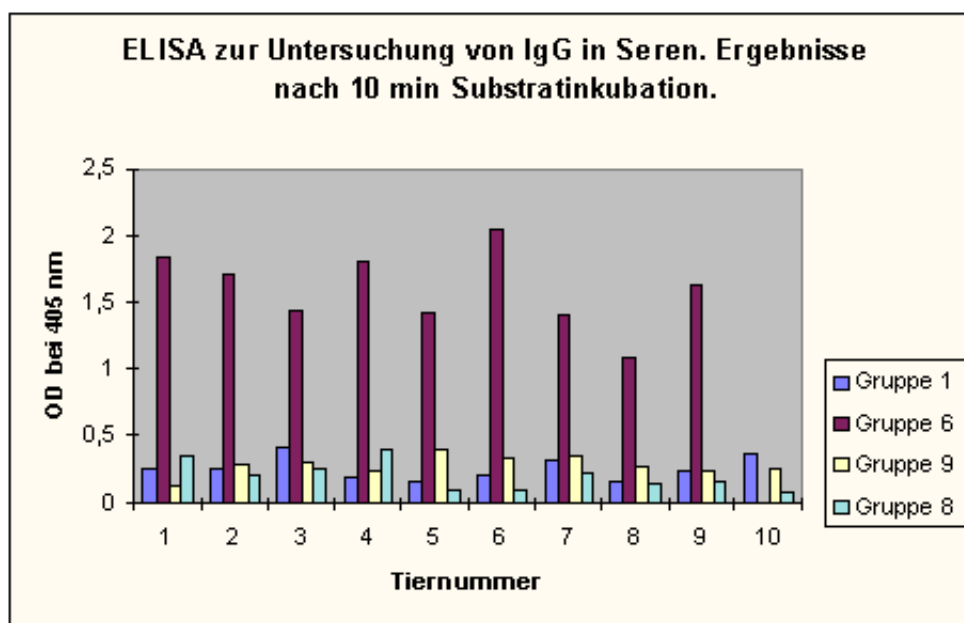


Abbildung 4.15.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen SO7. Gruppe 1: dreimalige orale Applikation von ZluxSO7; Gruppe 6: subcutan rekombinantes Antigen SO7; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.

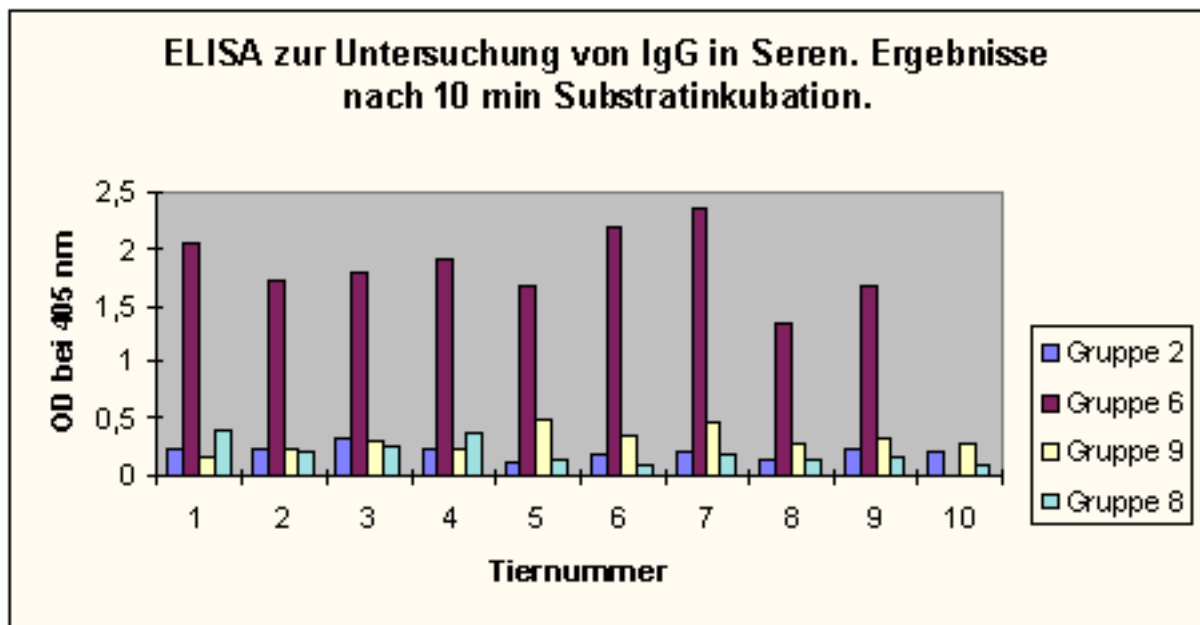


Abbildung 4.16.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen SO7. Gruppe 2: einmalige orale Applikation von ZluxSO7; Gruppe 6: subcutan rekombinantes Antigen SO7; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.

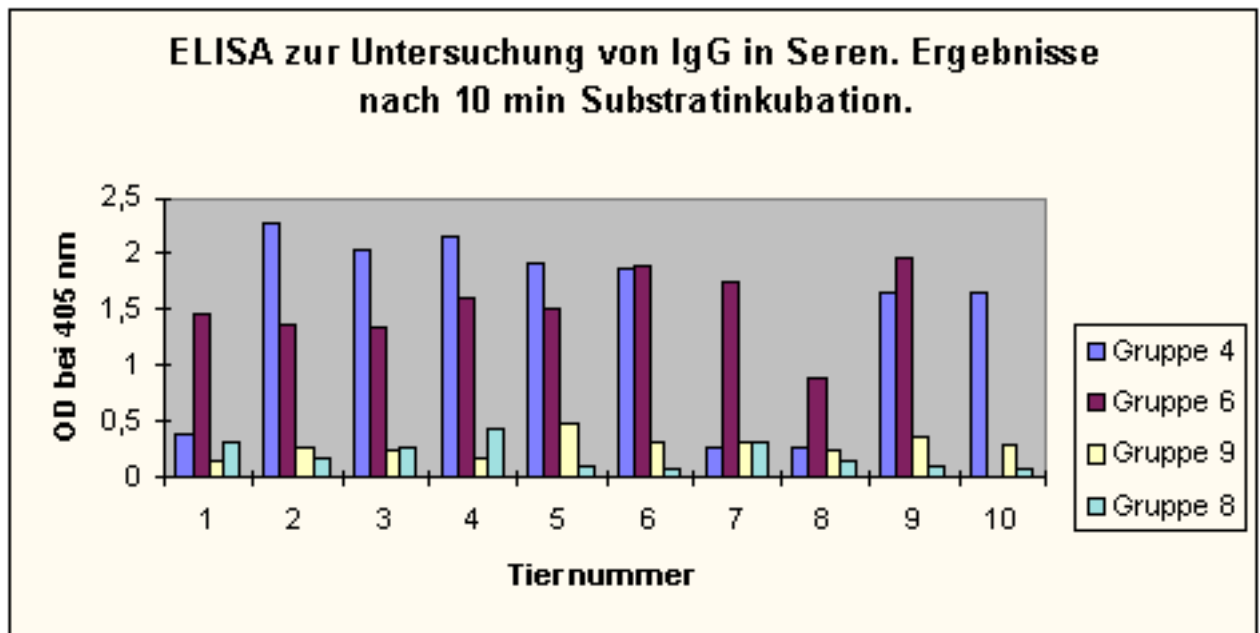


Abbildung 4.17.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen SO7. Gruppe 4: orale Applikation von Zlux-SO7 und subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen SO7; Gruppe 6: subcutan rekombinantes Antigen SO7; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.



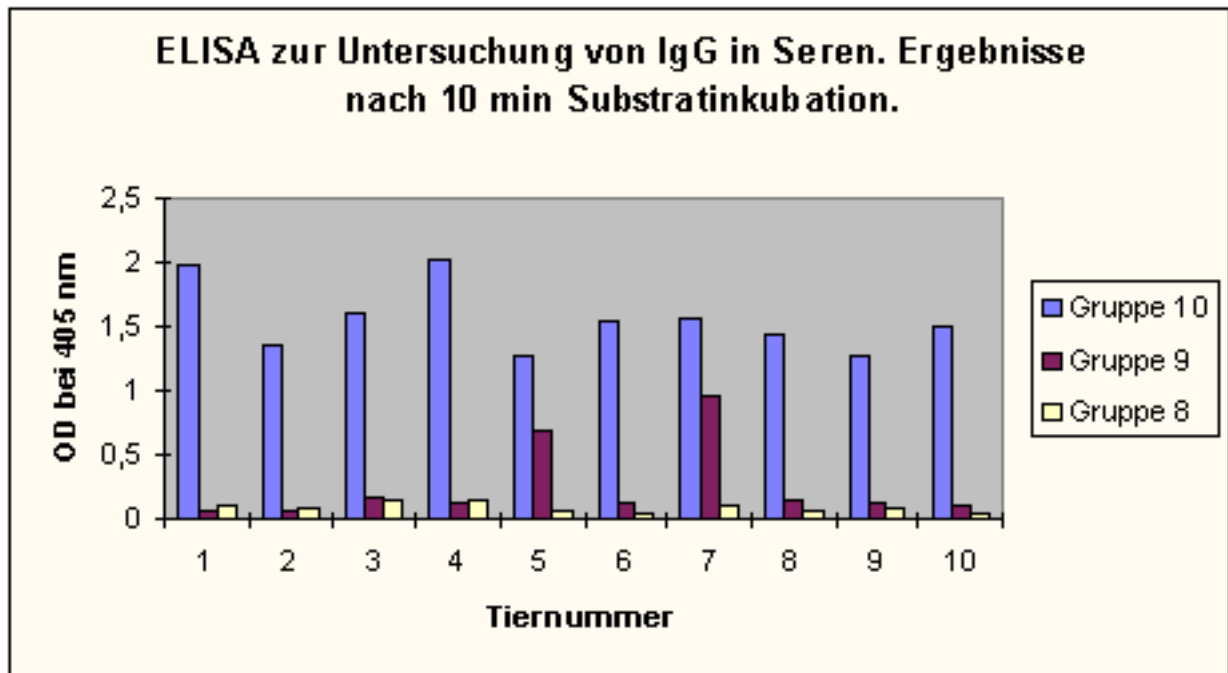


Abbildung 4.18.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen 3Etmic. Gruppe 10: subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen 3Etmic; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.

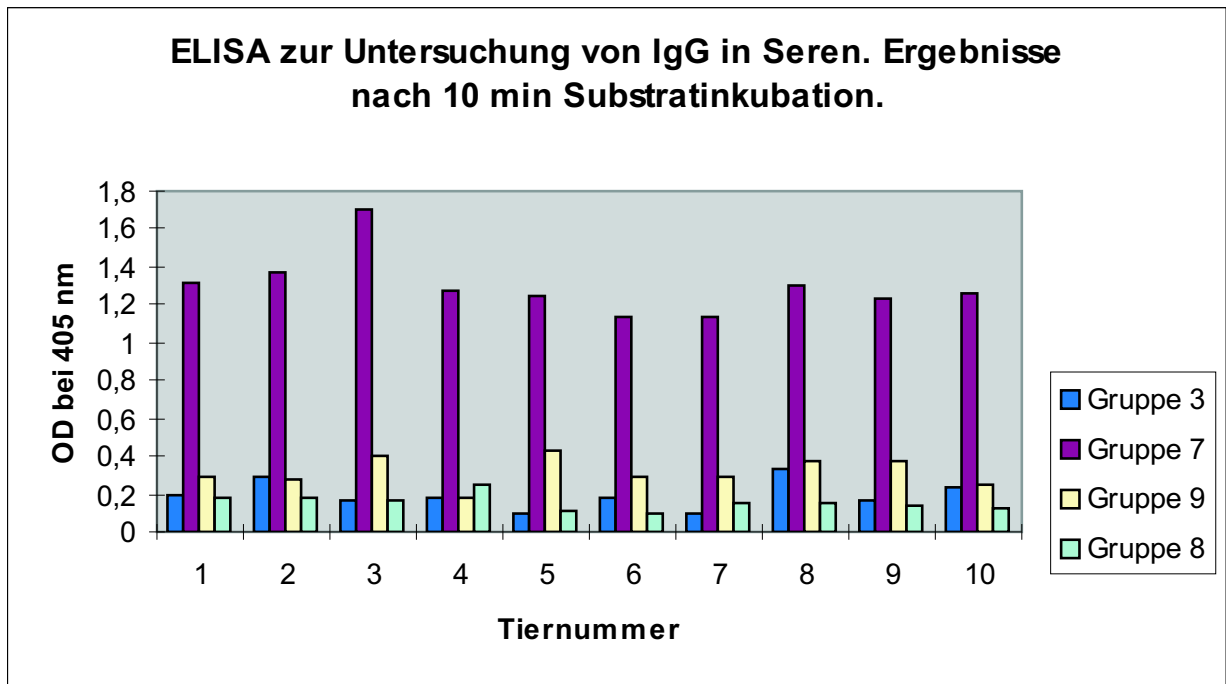


Abbildung 4.19.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen TA4. Gruppe 3: einmalige orale Applikation von ZluxTA4; Gruppe 7: subcutan rekombinantes Antigen TA4-2; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.

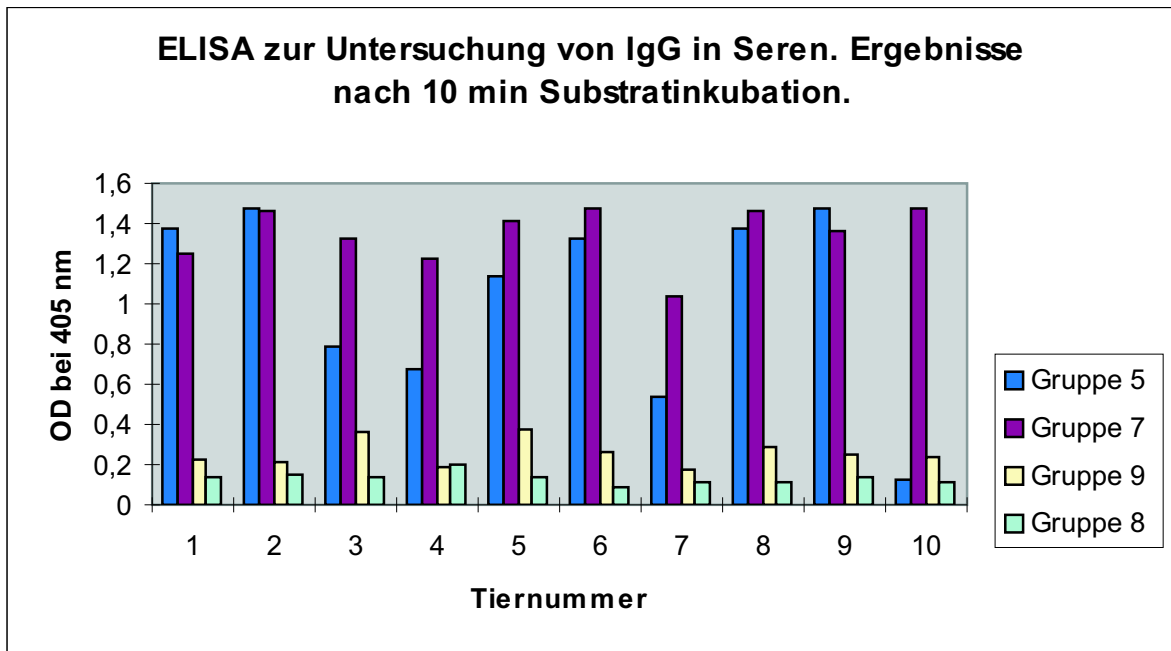


Abbildung 4.20.: Grafische Auswertung der ELISA Ergebnisse von IgG gerichtet gegen das rekombinante Antigen TA4. Gruppe 5: orale Applikation von ZluxTA4 und subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen TA4-2; Gruppe 7: subcutan rekombinantes Antigen TA4-2; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1.

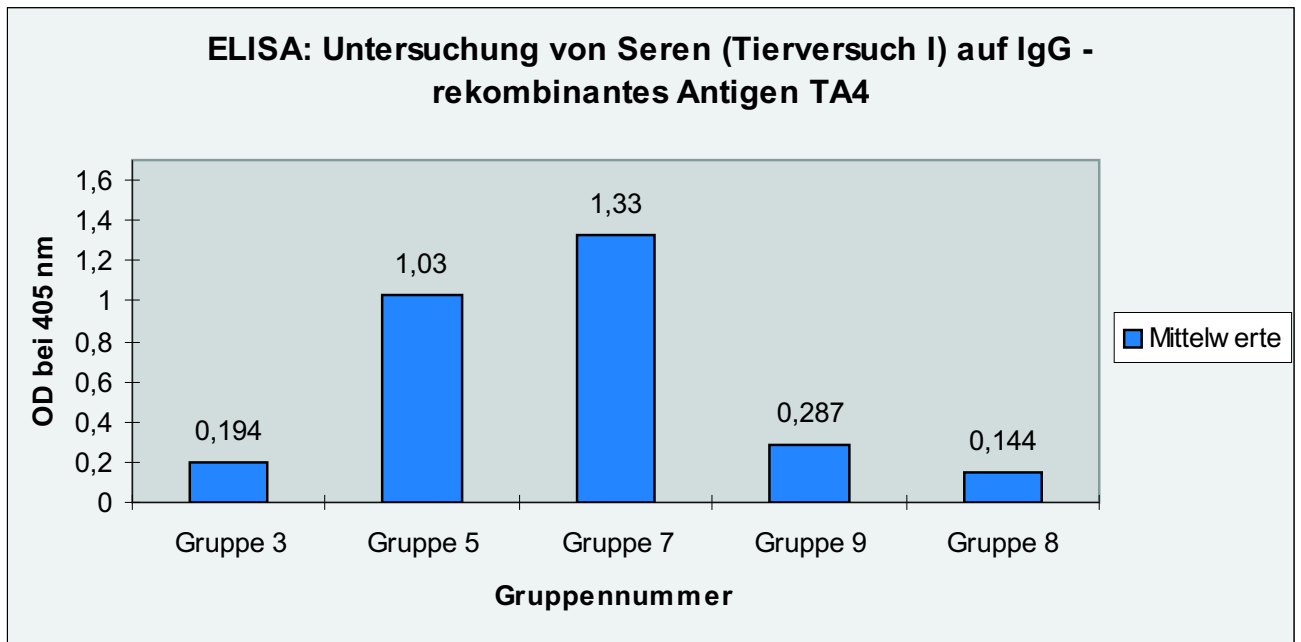


Abbildung 4.21.: Grafische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes von TA4-Versuchsgruppen. Gruppe 3: einmalige orale Applikation von Zlux TA4; Gruppe 5: einmalige orale Applikation von ZluxTA4 und einmalige subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen TA4-2; Gruppe 7: zweimalige subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen TA4-2; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1. Bei Gruppe 7, 8 und 9 wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Messungen zusammengefaßt.(Tierversuch I entspricht Tierversuch Stuttgart)

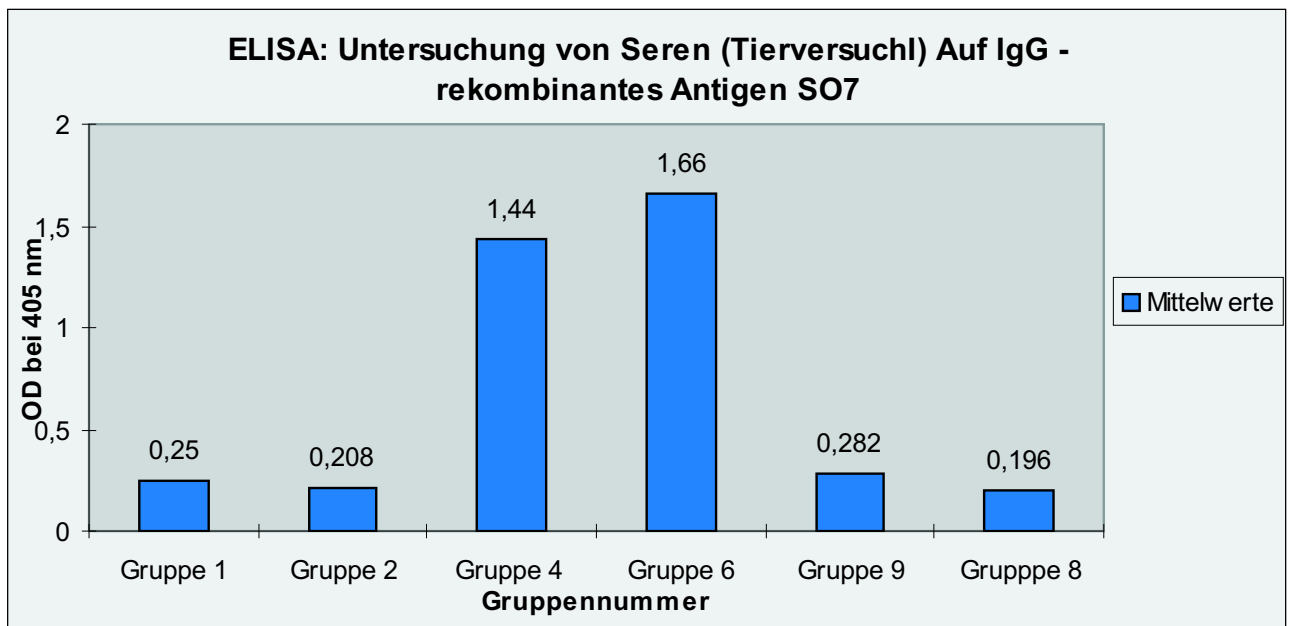


Abbildung 4.22.: Grafische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes von SO7-Versuchsgruppen. Gruppe 1: dreimalige orale Applikation von Zlux-SO7; Gruppe 2: einmalige orale Applikation von Zlux SO7; Gruppe 4: einmalige orale Applikation von ZluxSO7 und einmalige subcutane Applikation von dem rekombinanten Antigen SO7; Gruppe 6: zweimalige subcutan Applikation von dem rekombinanten Antigen SO7; Gruppe 9: Placebogruppe; Gruppe 8: Zlux207.1. Bei Gruppe 6, 8 und 9 wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Messungen zusammengefaßt.

### *Tierversuch Budapest*

Die Auswertung der Proben aus dem Tierversuch Budapest wurden von Herrn Dr. Pogonka, Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt Universität zu Berlin durchgeführt.

Tabelle 4.7.: Statistik zu den Ergebnissen vom ELISA zur Untersuchung von IgA in Gallenflüssigkeit gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS. Inkubation des AP-Substratpuffers 60 min.

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung
1	1,097	0,181
2	1,039	0,301
3	0,429	0,137
4	0,664	0,305
5	0,493	0,119
6	1,142	0,407

Tabelle 4.8.: Statistik zu den Ergebnissen vom ELISA zur Untersuchung von IgG in Seren gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS. Inkubation des AP-Substratpuffers 60 min.

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung
1	1,528	0,515
2	0,977	0,377
3	0,194	0,036
4	0,149	0,028
5	0,176	0,026
6	1,292	0,157

Die Untersuchung der Seren und der Gallenflüssigkeit auf die Antikörper IgG und IgA gerichtet gegen die rekombinante Antigene TA4 und 3Etmic erbrachte kein positives Ergebnis. Positive Ergebnisse fanden sich bei der Untersuchung von Seren und Gallenflüssigkeit auf IgG und IgA gerichtet gegen LPS.

Die Abbildungen 4.23, 4.24 und 4.25 und die Tabellen 4.7, 4.8 und 4.9 zeigen die Ergebnisse zur Untersuchung von Antikörpern gerichtet gegen das Antigen LPS.

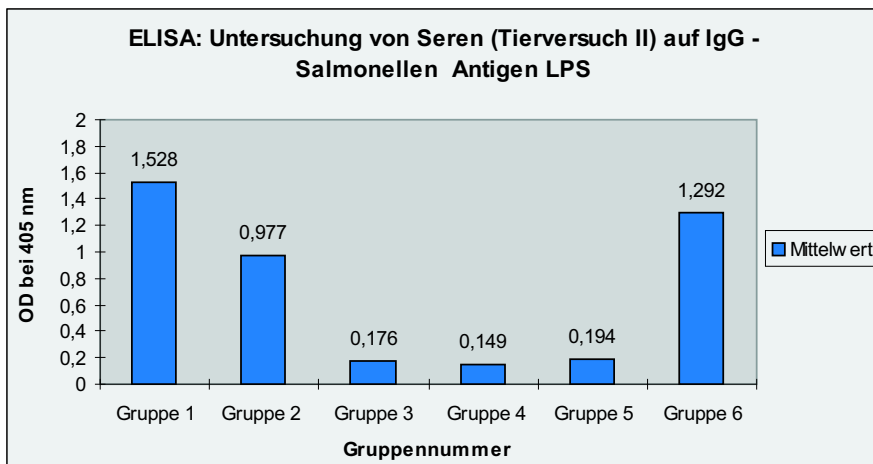


Abbildung 4.23.: Grafische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes von IgG gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS im Serum. Gruppe 1: dreimalige orale Applikation ZluxTA4; Gruppe 2: dreimalige orale Applikation Zlux3Etmic; Gruppe 3: Stallkontrolle; Gruppe 4: Placebogruppe; Gruppe 5: oral Antikokzidium; Gruppe 6: dreimalige orale Applikation Zlux207.1.

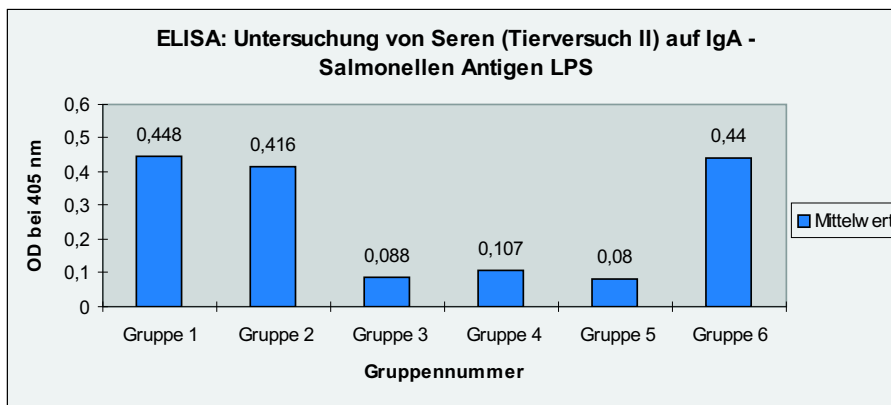


Abbildung 4.24.: Grafische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes von IgA gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS im Serum. Gruppe 1: dreimalig orale Applikation ZluxTA4; Gruppe 2: dreimalig orale Applikation Zlux3Etmic; Gruppe 3: Stallkontrolle; Gruppe 4: Placebogruppe; Gruppe 5: oral Antikokkzida; Gruppe 6: dreimalig orale Applikation Zlux207.1.

Tabelle 4.9.: Statistik zu den Ergebnissen vom ELISA zur Untersuchung von IgA in Seren gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS. Inkubation des AP-Substratpuffers 60 min.

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung
1	0,448	0,126
2	0,416	0,165
3	0,080	0,009
4	0,107	0,024
5	0,088	0,013
6	0,440	0,192

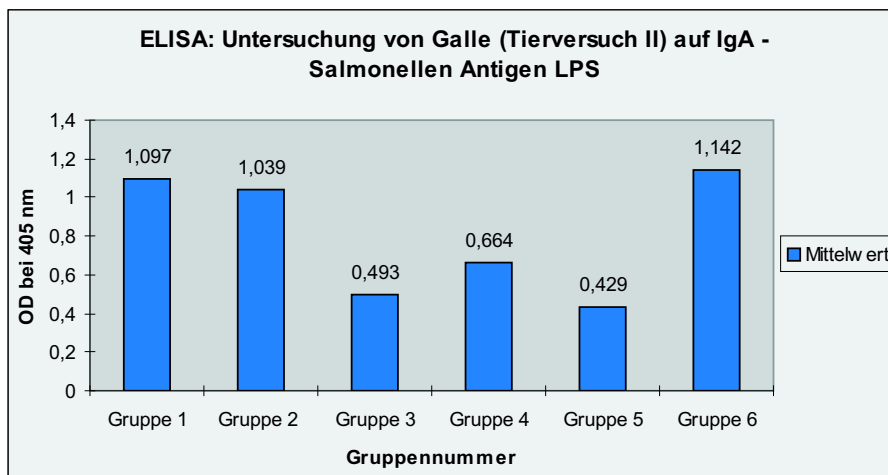


Abbildung 4.25.: Grafische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes von IgA gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS in Gallenflüssigkeit. Gruppe 1: dreimalig orale Applikation ZluxTA4; Gruppe 2: dreimalig orale Applikation Zlux3Etmic; Gruppe 3: Stallkontrolle; Gruppe 4: Placebogruppe; Gruppe 5: oral Antikozidium; Gruppe 6: dreimalig orale Applikation Zlux207.1.