

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	3
2.1 Die Ödemkrankheit der Schweine	3
2.2 Edema Disease <i>E. coli</i> (EDEC)	5
2.3 Der Virulenzfaktor „Shigatoxin 2e“	7
2.4 Ödemkrankheitsmodelle	13
2.5 Aktive Immunisierung gegen die Ödemkrankheit	19
2.5.1 Impfstoffe auf Basis von chemisch-inaktiviertem Shigatoxin 2e	20
2.5.2 Impfstoffe auf Basis von gentechnisch-inaktivierten Shigatoxinen	23
3 MATERIAL UND METHODEN	34
3.1 Bakterienstämme.....	34
3.2 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs)	34
3.3 Plasmide.....	35
3.4 Antikörper	37
3.5 Serumproben	37
3.6 Tiere	37
3.7 Bakteriologische Methoden	39
3.7.1 Anzucht von Bakterien.....	39
3.7.2 Keimzahlbestimmung	39
3.7.3 Sterilitätskontrolle	39
3.7.4 Dekontamination.....	40
3.8 Molekulargenetische Methoden	40
3.8.1 Präparation von DNS.....	40
3.8.2 Bestimmung von DNS-Konzentrationen.....	40
3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.8.4 Agarosegelektrophorese	44
3.8.5 DNS-Restriktion.....	44
3.8.6 DNS-Klonierung in pET-24b(+).....	45
3.8.7 Ortspezifische Mutagenese	45
3.8.8 DNS-Sequenzierung	45

3.9	Proteinpräparative und -analytische Methoden	46
3.9.1	Übersicht über die hergestellten Stx2e- und rStx2e-Präparate.....	46
3.9.2	Präparation von Shigatoxin 2e aus Bakterienzelllysat	46
3.9.3	Präparation von Shigatoxin 2e aus dem Periplasma (Polymyxin-B-Methode) ...	47
3.9.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.9.5	Tricine-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricine-SDS-PAGE)	48
3.9.6	rStx2e-haltiges und rStx2e-freies-Challengematerial	48
3.9.7	Impfantigene.....	49
3.10	Serologische Methoden	49
3.10.1	Immunoblot.....	49
3.10.2	Enzyme-linked immunosorbent Assay für Antikörper gegen Stx2e (ELISA _{rStx2e})	50
3.10.3	RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.....	51
3.10.4	SIFIN-Stx2e-ELISA.....	53
3.11	Zellkulturmethoden	54
3.11.1	Kultivierung von Verozellen	54
3.11.2	Verozell-Zytotoxizitätstest	54
3.11.3	Stx2e-Neutralisationstest (Stx2e-NT-Test)	56
3.12	Tierexperimentelle Methoden	57
3.12.1	Prinzip des etablierten Ödemkrankheitsmodells.....	57
3.12.2	Tierhaltung.....	58
3.12.3	Impfungen.....	58
3.12.4	Intravenöse Inokulation von rStx2e.....	58
3.12.5	Parameter bei der Versuchsauswertung	58
3.12.6	Übersicht über die durchgeführten Tierversuche	58
3.13	Statistische Auswertung	61
3.14	Bilddokumentation	61
4	ERGEBNISSE	62
4.1	Rekombinante Herstellung von Shigatoxin 2e	62
4.1.1	Klonierung des stx2e-Gens in den Expressionsvektor pET-24b(+)	62
4.1.2	Genetische Identitätsprüfung der Transformanten	62
4.2	Herstellung von gentechnisch mutiertem rStx2e	62
4.2.1	Einführung von ortspezifischen Mutationen in das stx2e-Gen	62
4.2.2	Genetische Identitätsprüfung der Transformanten	64
4.3	Charakterisierung von rStx2e und gentechnisch mutiertem rStx2e	71
4.3.1	Qualitativer Nachweis der Bildung von rStx2e und rStx2e _{MUT} durch transformierte <i>E. coli</i> -Stämme	71
4.3.2	Subzelluläre Lokalisation und zytotoxische Aktivität von rStx2e und mutiertem rStx2e	74
4.3.3	Einfluss der Kulturbedingungen auf die rStx2e-Expression	76

4.4	Herstellung und Charakterisierung von rStx2e- und rStx2e_{MUT}-Impfantigen-Chargen	79
4.4.1	Impfantigen aus chemisch inaktiviertem rStx2e	79
4.4.2	Impfantigen aus gentechnisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e _{MUT})	80
4.5	Etablierung und Validierung des Ödemkrankheitsmodells	80
4.5.1	Mortalität in Abhängigkeit von der rStx2e-Dosis.....	83
4.5.2	Humorale Immunantwort auf die intravenöse rStx2e-Applikation	83
4.6	Immunisierungsversuche an Ferkeln	85
4.6.1	Wirkung von rStx2e-Impfstoffen auf die Mortalität im Ödemkrankheitsmodell....	86
4.6.2	Humorale Immunantwort auf die Impfung mit rStx2e-Impfstoffen.....	90
4.6.2.1	Induktion von Antikörpern gegen <i>E. coli</i> -Antigene.....	90
4.6.2.2	Induktion von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern	92
4.6.2.3	Zusammenhang zwischen dem Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern und der Mortalität.....	96
4.6.2.4	Korrelation zwischen den Messdaten aus dem ELISA _{rStx2e} und dem Stx2e- Neutralisationstest	97
5	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	98
6	ZUSAMMENFASSUNG	117
	SUMMARY.....	119
7	LITERATUR	121
	ANHANG.....	132
	DANKSAGUNG	165