

The diagnosis of infections with *Sarcocystis* spp. in sheep requires refinement. Because there are no defined diagnostic antigens available, the current serological tests lack standardisation. Therefore, a recombinant antigen was developed that can be used in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Sarcocystis*-infections in sheep.

A cDNA library was constructed in  $\lambda$ gt11 from cystozoite-derived poly(A)<sup>+</sup> RNA of *S. tenella*. Immunological screening of the library with homologous polyclonal serum from an experimentally infected sheep identified 23 recombinant clones that expressed antigenic polypeptides.

The PCR conditions for amplification of the *Sarcocystis* gene fragments using primers corresponding to the  $\lambda$ gt11 sequence next to the *Eco* RI cloning site were optimised and PCR was performed on ten of the positive clones. To exclude identical gene fragments from further studies eight single-stranded PCR products generated by asymmetric PCR were sequenced and compared by homology analysis. Five different gene fragments were defined from the nucleotide sequences.

A 475 bp PCR product, termed *STC-29*, was subcloned into pGEX-3X to express the encoded antigen in fusion with glutathione *S*-transferase (GST). The recombinant *STC-29*/GST fusion polypeptide had a size of 45.9 kDa which is consistent with the size of the *S. tenella* polypeptide predicted from the amino acid sequence (18.1 kDa). The *STC-29*/GST fusion polypeptide reacted in Western blots with polyclonal anti-*S. tenella* sera from experimentally infected sheep.

Western blots and ELISAs with immunsera from mice directed against *STC-29*/GST or against total cystozoite proteins of *S. tenella*, *S. arieticanis* or *S. gigantea* revealed that the recombinant antigen corresponds to a native antigen of 25.1 kDa that appears to be present in all three *Sarcocystis* species.

Using *Sarcocystis* positive and negative sera from an experimentally infected sheep an ELISA based on *STC-29*/GST was established by optimising the ELISA parameters for best discrimination between *Sarcocystis* positive and negative reactions. Background reactions caused by the fusion partner GST did not pose a problem for discrimination between *Sarcocystis*-specific and negative reactions in ELISA.

Christina Mertens : Klonierung, Expression und Charakterisierung von antigenkodierenden *Sarcocystis tenella* Genfragmenten

### Problemstellung

Für die Serodiagnose von *Sarcocystis tenella*-Infektionen bei Schafen stehen gegenwärtig nur traditionelle Antigenpräparationen zur Verfügung. Die aus Zystozoiten gewonnenen Antigene variieren von Präparation zu Präparation und sind, bedingt durch die obligat intrazelluläre Lage des Parasiten, in der Regel mit Zellbestandteilen des Wirtes kontaminiert. Zudem wird eine akzeptable Antigenausbeute nur durch die experimentelle Infektion von Versuchstieren erreicht, die infolge der langsamen Zystozoitenentwicklung relativ zeitaufwendig ist. Eine Standardisierung der serologischen Untersuchungsmethoden ist daher dringend erforderlich.

### Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte ein rekombinantes *S. tenella*-Antigen in einem *Escherichia coli*-Expressionssystem hergestellt werden, um die ökonomische Produktion eines definierten Antigens in großer Menge und gleichbleibender Qualität zu ermöglichen. Das rekombinante Antigen sollte weiterhin charakterisiert werden und auf seine Eignung als diagnostisches Antigen im ELISA zur Diagnose von *Sarcocystis* Infektionen beim Schaf untersucht werden.

### Klonierung, Expression und Charakterisierung von *S. tenella*-Genfragmenten

Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von *S. tenella* Zystozoiten wurde zur Herstellung einer cDNA-Bank in  $\lambda$ gt11 kloniert. Durch Screening mit polyklonalen Referenzseren von experimentell mit *S. tenella* infizierten Schafen wurden 23 Klone isoliert, die antigene Polypeptide exprimierten.

Die Amplifikation der *S. tenella* Genfragmente durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Primern, die mit einer  $\lambda$ gt11-Sequenz beiderseits der *Eco* RI-Klonierungsstelle hybridisieren, wurde an einem der rekombinanten Klone optimiert. Die Amplifikation erfolgte entweder direkt von rekombinanten Bakteriophagen oder von der extrahierten, rekombinanten Bakteriophagen-DNA. Die DNA-Isolierung aus Bakteriophagen, die zuvor im Dichtegradienten gereinigt wurde schließt eine Kontamination der PCR mit *E. coli*-DNA oder Inhibitoren aus dem Kulturmedium aus. Die Genfragmente von 10 rekombinanten Klonen wurden amplifiziert. Die PCR-Produkte waren 177 - 725 bp lang.

Um identische *S. tenella*-Genfragmente von weiteren Untersuchungen auszuschließen, wurden acht PCR-Produkte mit Hilfe asymmetrischer PCR als Einzelstrang-DNA der Sequenzierung zugänglich gemacht. Ein 177 bp-Fragment und ein 475 bp-Fragment wurden vollständig sequenziert. Jeweils drei 700 bp-lange PCR-Produkte und 725 bp-lange PCR-Produkte wurden partiell sequenziert. Anhand der DNA-Homologie ließen sich die Nukleotidsequenzen in 5 Gruppen einordnen.

#### Analyse des rekombinanten Antigens STC-29

Ein 475 bp langes *S. tenella* Genfragment, genannt *STC-29*, wurde näher charakterisiert. Die Nukleotidsequenz kodiert bis zu einem Stop-Codon am Ende des *Sarcocystis*-Genfragmentes ein Polypeptid mit einer errechneten Größe von 18,1 kDa. Um das rekombinante Antigen als Fusionspolypeptid mit Glutathione-S-Transferase (GST) zu exprimieren, wurde das PCR-Produkt *STC-29* in den Expressionsvector pGEX-3X subkloniert. Durch Begradigung und Phosphorylierung des PCR-Produktes und Ligation in die *Sma* I-Schnittstelle des desphosphorylierten Plasmids konnte das *Sarcocystis*-Leseraster erfolgreich beibehalten werden. Nach Expression und Affinitätsreinigung an Glutathion konnte ein 45,9 kDa GST-Fusionspolypeptid isoliert werden. Unter Berücksichtigung des GST-Trägerproteins, das mit einer Größe von 27,6 kDa aufgetrennt wurde, entsprach das *STC-29*-kodierte Polypeptid der erwarteten Größe. Das rekombinante Antigen *STC-29*/GST wurde in Western Blots mit dem *S. tenella*-positiven Serum eines experimentell infiziertes Schafes erkannt.

Zystozoitenproteine von *S. tenella*, *S. arieticanis* und *S. gigantea* sowie das rekombinante Antigen STC-29/GST wurden zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Der Western Blot von *S. tenella*-Zystozoitenproteinen mit dem anti-STC-29/GST Serum zeigte, daß das rekombinante Antigen einem nativen Antigen von 25,1 kDa entsprach. Da alle Immunseren im ELISA mit dem rekombinanten STC-29/GST-Antigen reagierten, scheinen STC-29-Epitope bei *S. tenella*, *S. arieticanis* und *S. gigantea* vorhanden zu sein.

Im ELISA mit polyklonalem Referenzserum eines experimentell infizierten Schafes erwies sich das rekombinante Antigen als geeignet, *Sarcocystis*-positive Seren von *Sarcocystis*-negativen Seren zu unterscheiden. Das hier entwickelte rekombinante Antigen bietet gegenüber traditionellen Antigenen den Vorteil reproduzierbar zu sein und damit die Möglichkeit, einen standardisierten ELISA zur Diagnose der *Sarcocystis*-Infektionen bei Schafen zu entwickeln.