

4 Ergebnisse

4.1 Der Sarcoptes-Milben-Ganzkörperextrakt

4.1.1 Isolierung von *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* und Herstellung des Milbenextraktes

Für die vorliegende Arbeit wurden von insgesamt 5 toten Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*), die eine generalisierte Räude aufwiesen, *Sarcoptes*-Milben aller Entwicklungsstadien in Form kontaminierter Hautgeschabsel entnommen und durch ein Auswanderungsverfahren isoliert. Nach dem Einsammeln der ausgewanderten Milben mittels Pinzette und Objektträger wurden diese sowohl manuell mit einem Teflon-Homogenisator als auch durch wechselnde Ultraschallbehandlung und Zentrifugation zerkleinert und gesäubert (s. Material und Methoden 3.1.1 und 3.1.2).

4.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Anhand des DC Protein-Assays (BioRad) wurde nach der Herstellung des Milben-Ganzkörperextraktes ein Proteingehalt von 400 µg/ml ermittelt.

Die Proteingehalte der Proben, die aufgrund der Inkompatibilität des Carbonatpuffers mit der 2-D Gelelektrophorese und mit der Sequenzierung mittels PD-10 Säule umgepuffert und anschließend aufkonzentriert wurden, lagen im Bereich zwischen 350-450 µg/ml.

Insgesamt standen nach der Aufbereitung und Herstellung der Extrakte rund 30 ml Milben-Ag für die Arbeiten zur Verfügung, was in etwa einem Gesamtproteingehalt von 12 g entspricht.

4.1.3 Proteinfractionierung in der eindimensionalen SDS-PAGE

Die qualitative Überprüfung der Proteinzusammensetzung des Milben-Ganzkörperextraktes erfolgte in einem 8-16%igen Polyacrylamid-Gradientengel.

Zur Ermittlung der optimalen Proteinmenge für den folgenden Immunoblot und die 2-D Gelelektrophorese, wurden pro Gel jeweils eine niedrige, eine mittlere und eine hohe Proteinmenge aufgetragen. Um zu überprüfen, welche Rolle bestehende oder zerstörte Disulfidbrücken bei der Auftrennung spielen, wurden die Proben sowohl mit reduzierendem (PP red), als auch mit nicht reduzierendem Probenpuffer (PP non red) versetzt.

Bei dem in Abbildung 5 gezeigten Gradientengel wurden 0,4 µg, 1,2 µg und 4µg Milbenprotein eingesetzt.

Um die Proteinbanden nach der eindimensionalen Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurde die modifizierte Silberfärbung nach Blum et al. gewählt (s. Tabelle 3).

Mit der SDS-PAGE konnten für *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* unter Verwendung von PP red insgesamt 33 diskrete Banden nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Proteinkomponenten liegt in dem vom Markerprotein umfassten Molekularbereich von 15-225 kDa.

Ein wesentlicher Unterschied bei der Verwendung der unterschiedlichen Probenpuffer konnte nicht festgestellt werden. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, stellen sich lediglich die Banden mit dem Molekulargewicht 225 und 140 kDa nur unter Verwendung von PP red deutlich dar.

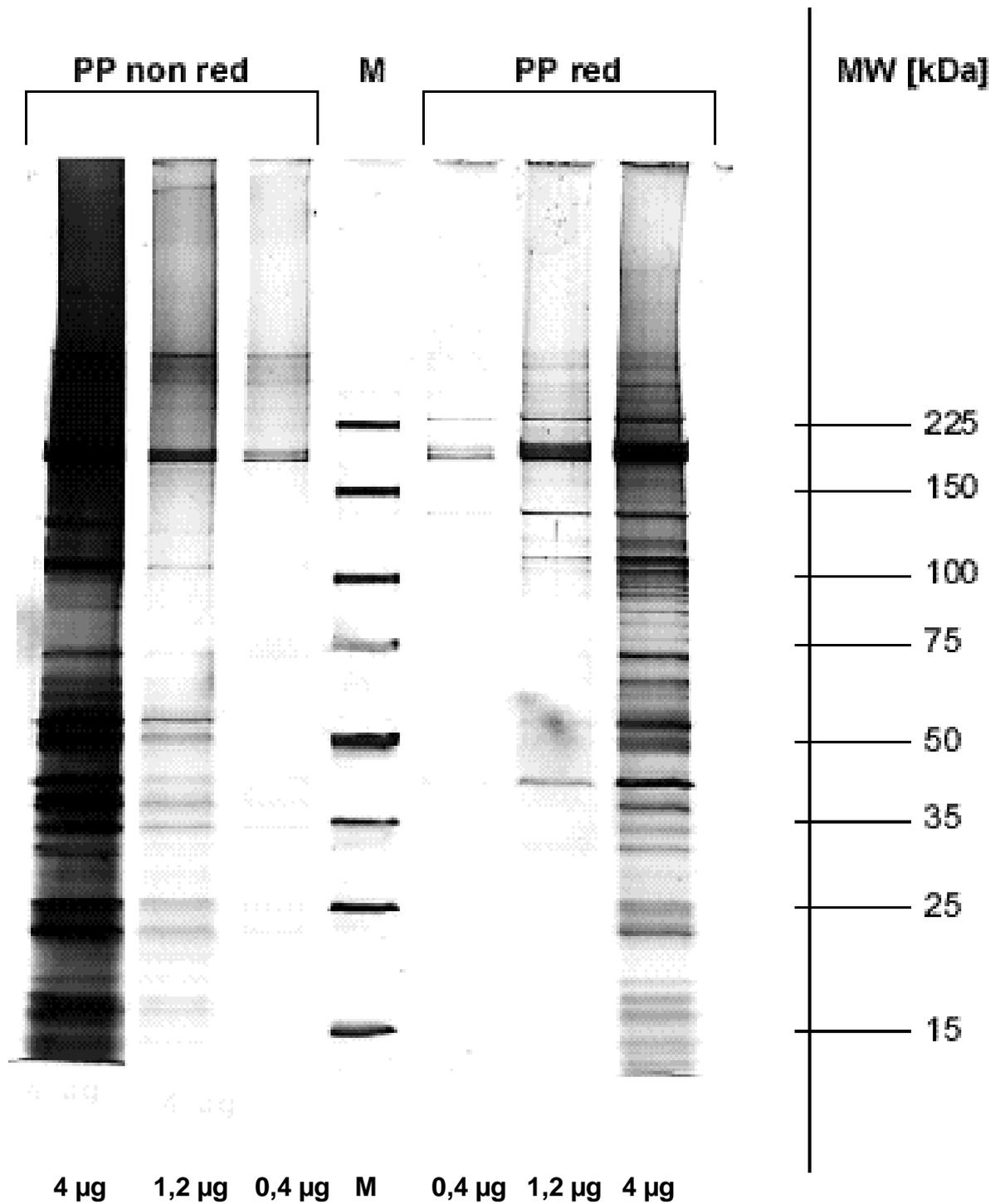


Abb.5: Proteinfractionen des *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes*-Extraktes nach eindimensionaler SDS-PAGE, Silberfärbung

M: Proteinmarker

4.1.3 Immunoblot

Zur Prüfung der antikörperbindenden Eigenschaften wurden die Proteinbanden im Immunoblot getestet.

Entsprechend dem Ergebnis aus der SDS-PAGE wurde die mittlere Proteinmenge, je nach Proteingehalt der Probe ca. 1,5 µg pro Gelspur, ausgewählt.

Nach Festlegung der Ag-Menge, sollte durch den Blot nach der geeigneten Ak-Verdünnung gesucht werden. Dafür wurde der 1. Ak in den Verdünnungen 1:1000, 1:3000 und 1:10.000 eingesetzt.

Das Mitführen des Serums eines gesunden Kaninchens aus der Laborzucht des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin als Negativkontrolle (NK), diente dazu, die Spezifität der Bindungen des 1. Aks zu überprüfen.

Der 2. Ak wurde in einer Verdünnung von 1:40.000 eingesetzt.

Wie zuvor bei der eindimensionalen SDS-PAGE sollte auch beim Immunoblot untersucht werden, ob sich bedeutende Unterschiede in der Ergebnisdarstellung durch Verwendung der unterschiedlichen Probenpuffer PP red und PP non red ergeben.

Von den 33 elektrophoretisch deutlich aufgetrennten Proteinbanden wurden im Immunoblot 18 vom spezifischen Ak erkannt (Abbildung 6). Die Intensität der Bandenbildung erschien ungleichmäßig und war besonders deutlich in den Bereichen 42-45 kDa, 70 kDa, 110 kDa und 183-190 kDa.

Auch hier ließen sich keine gravierenden Unterschiede bei der Verwendung der unterschiedlichen Probenpuffer feststellen.

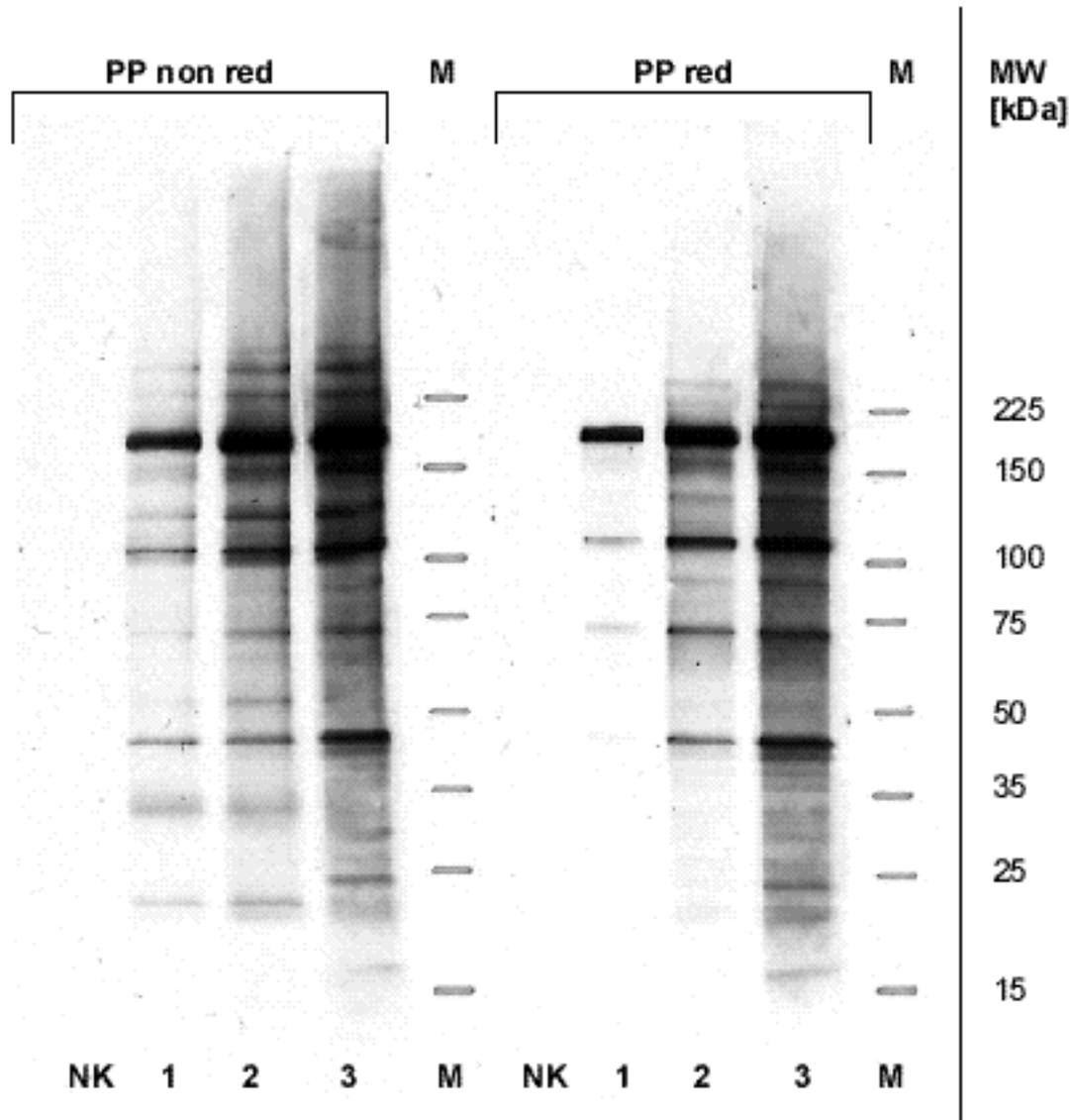


Abb.6: Proteinbanden im Immunoblot

M: Proteinmarker

1: Ak-Verdünnung 1:10.000

2: Ak-Verdünnung 1:3000

3: Ak-Verdünnung 1:1000

NK: Negativkontrolle, Verdünnung 1:3000

4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

4.2.1 2-D Mini-Gradientengele

Aus Kosten- und Zeitgründen wurde der Milbenextrakt zunächst auf 2-D Minigele (8-16% Gradientengele) aufgetragen. So konnte ein erster Überblick über die Eignung des Extraktes für die 2-D Gelelektrophorese und die Qualität der Probenaufbereitung gewonnen werden.

Um den isoelektrischen Punkt möglichst vieler Proteine des komplexen Extraktes zu ermitteln, wurden sowohl Gele mit pH 3-10, als auch mit pH 4-7 verwendet.

Insgesamt wurden je 165 µl Probenvolumen auf die IPG-Streifen geladen. Dieses setzte sich zusammen aus 10 µl Milbenextrakt (ca. 4 µg Milbenprotein), 9,5 µl Aqua bidest., 137,5 µl Rehydratationspuffer (1,2fach konz.) sowie 5 µl Digoxygenin-markierter (DIG) Trypsininhibitor (1:3) und 3 µl DIG-Carbonicanhydrase (1:20). Bei beiden Produkten handelt es sich um Markerproteine (Boehringer Mannheim).

Die Sichtbarmachung der Proteinspots nach der Elektrophorese erfolgte durch die modifizierte Silberfärbung nach Blum et al.

Wie aus den Abbildungen 7 und 8 hervorgeht, befindet sich der Großteil der Proteinspots im pH-Bereich 5-7. Somit erfolgte im Gel mit pH 4-7 eine gute und deutliche Proteinauftrennung. Die Spots wurden sichtbar gestreckt und somit größtenteils voneinander separiert.

Bei beiden Gelen sind jedoch horizontale Streifen und teilweise unvollständig fokussierten Spots zu sehen. Verursacher sind nicht-proteinhaltige Verunreinigungen in der Probe (meist liegen die Salzkonzentrationen zu hoch), die mit der IEF interferieren und das 2-D Ergebnis negativ beeinflussen.

Im vorliegenden Falle wurde der Carbonatpuffer, in dem das Milben-Ag gelöst wurde, als Störquelle angesehen.

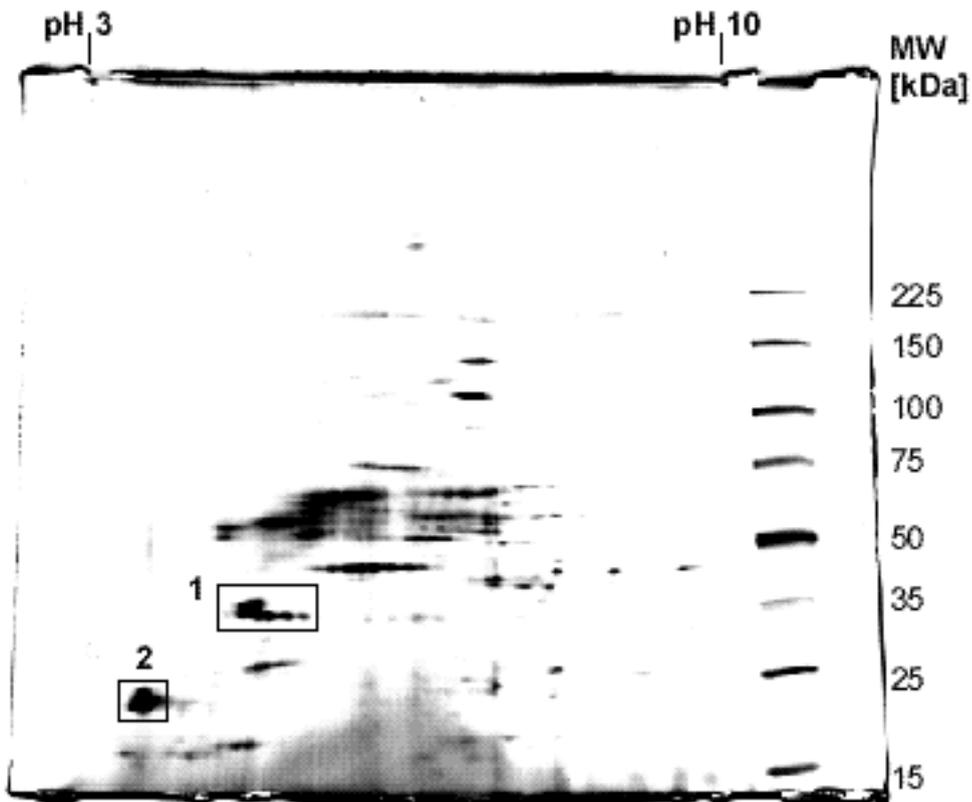


Abb. 7: 2-D Minigel, 8-16%, pH 3-10, Silberfärbung

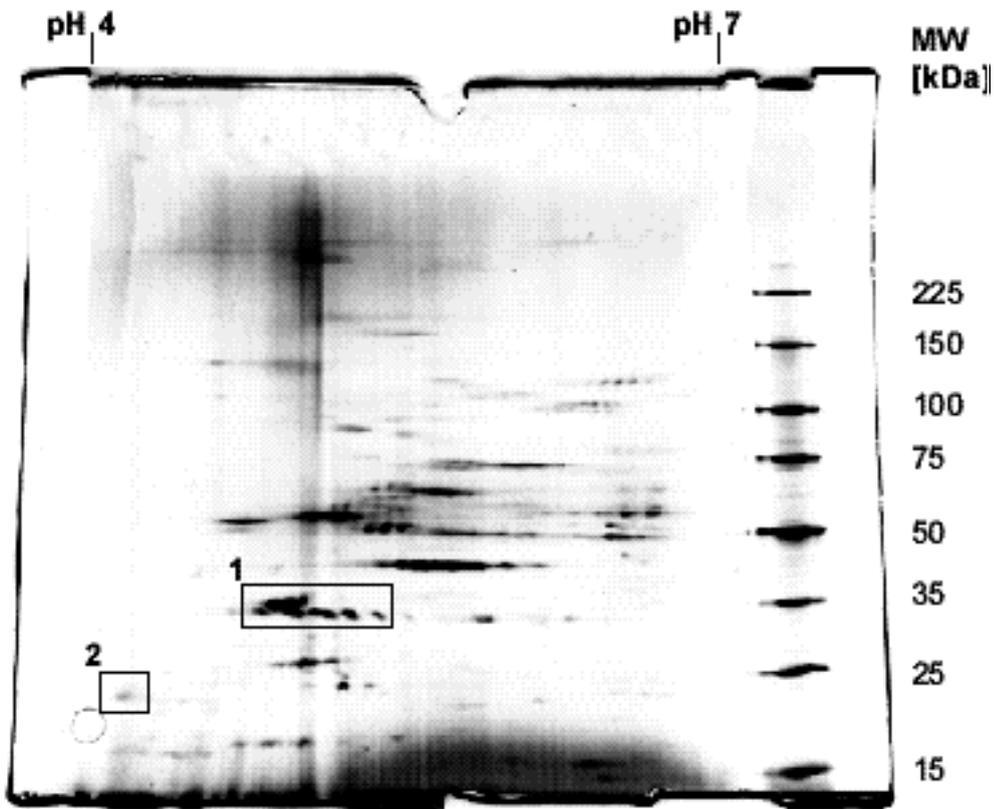


Abb. 8: 2-D Minigel, 8-16%; pH 4-7; Silberfärbung

1: DIG-Carbonicanhydrase, 2: DIG-Trypsininhibitor

4.2.2 2-D Maxi-Gradientengele

Nachdem sich bei den Mini-Gradientengele gezeigt hat, dass die Probenqualität durch den enthaltenen Carbonatpuffer für die 2-D Gelelektrophorese mangelhaft ist, wurde der Milbenextrakt vor dem Auftrag auf die 2-D Maxigele mittels PD-10 Säule umgepuffert und durch anschließende Zentrifugenfilter konzentriert.

Insgesamt wurden bei den 2-D Maxigelen 360 µl Probenvolumen pro 18 cm Streifen aufgetragen. Dieses setzte sich zusammen aus: 80 µl Milbenextrakt (ca. 30 µg Milbenprotein), 14 µl Aqua bidest. und 266 µl Rehydratationspuffer (1,2fach).

Vom Proteinmarker (Pro Sieve[®] FMC) wurden 3 µl aufgetragen.

Die Maxigele wurden ebenfalls in den pH-Bereichen 3-10 und 4-7 angefertigt.

Zur Sichtbarmachung der Protein-Spots wurde die modifizierte Silberfärbung nach Blum et al. gewählt.

Jeder pH-Bereich wurde zweifach angefertigt, so dass ein Gel der Silberfärbung und eines dem Immunoblot unterzogen werden konnte, um sie anschließend zu vergleichen.

Auch hier bestätigte sich das Ergebnis der 2-D Minigele, dass die Spots im pH-Bereich 4-7 ausreichend gestreckt und somit gut voneinander getrennt dargestellt werden konnten.

Die vertikale Streifung am rechten Rand der Gele in Abbildung 9 und 10 ergab sich durch das vorzeitige Stoppen der IEF. Es handelt sich dabei um die Proteine, die einen höheren isoelektrischen Punkt haben und durch das Stoppen nicht aufgetrennt wurden.



Abb. 9: 2-D Gel, 10-20%, pH 3-10, Silberfärbung

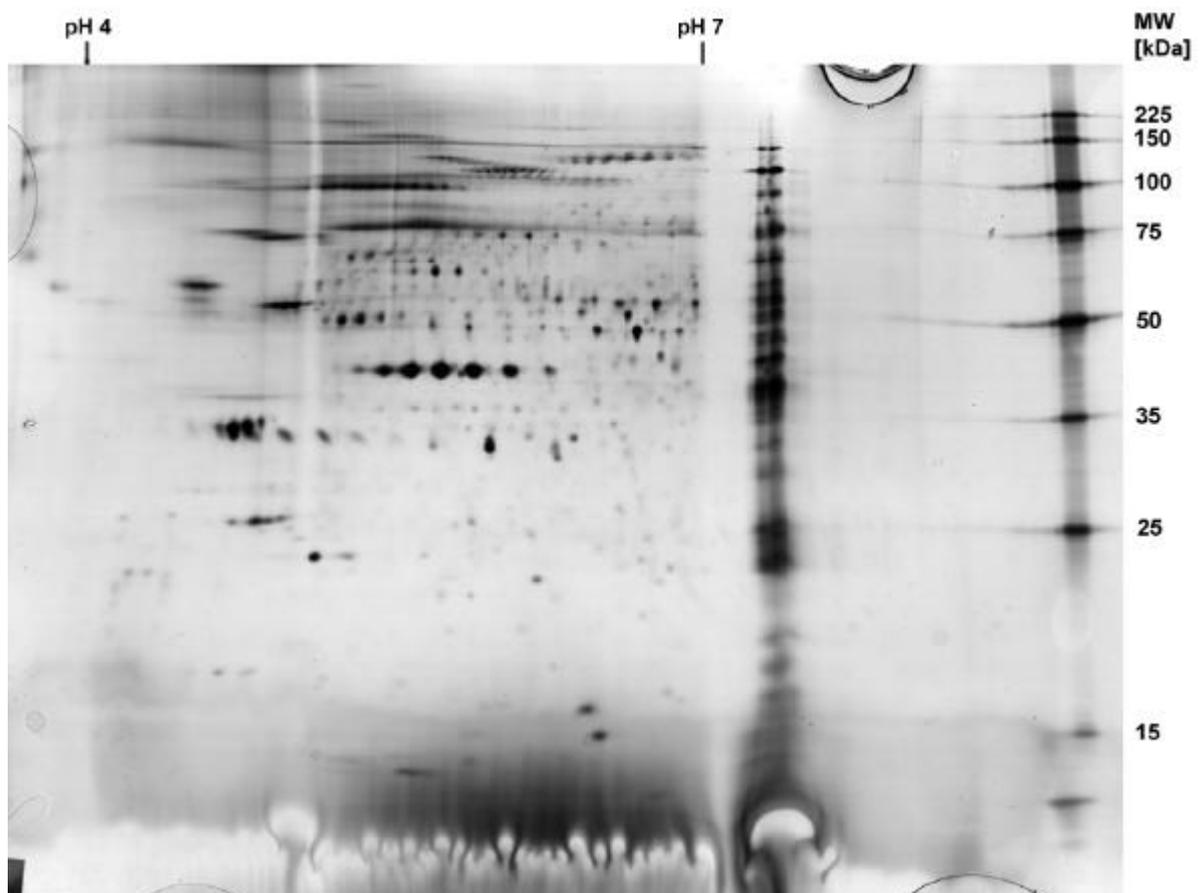


Abb. 10: 2-D Gel, 10-20%, pH 4-7, Silberfärbung

4.2.3 Immunoblot der 2-D Gele

Für den Immunoblot der 2-D Gele wurde der 1. Ak in einer Verdünnung von 1:3000 und der 2. Ak in einer Verdünnung von 1:40.000 eingesetzt.

Vom Proteinmarker (Pro Sieve[®] FMC) wurden 20 µl aufgetragen.

Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, zeigen viele der Spots eine deutliche Immunreaktivität, welche sich besonders auf den pH-Bereich 5-7 und den Molekulargewichtsbereich von etwa 80-25 kDa konzentriert.

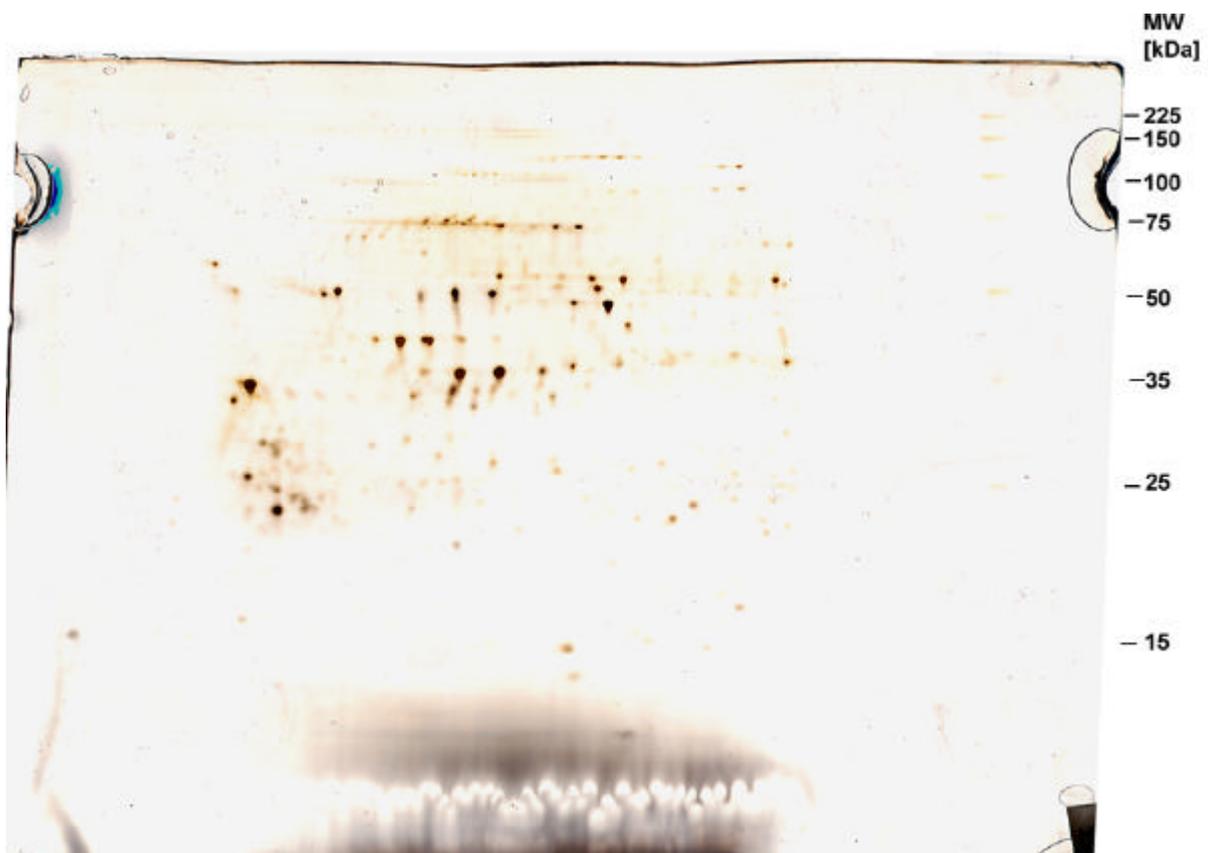


Abb. 11: Immunoblot 2-D Gel, 10-20%, pH 4-7

1. Ak 1:3000

2. Ak 1:40.000

4.2.4 Blot auf eine PVDF-Membran

Um einen möglichst hohen Proteingehalt der einzelnen Spots für die Sequenzierung zu erreichen ohne das Gesamtvolumen der Probe zu verändern, wurde der Milbenextrakt mittels Zentrifugenfilter (Ultrafree[®], Millipore) aufkonzentriert (siehe auch 3.4.1). Wie zuvor auch, lag das aufgetragene Volumen des Milbenextraktes bei 80 µl, der Proteingehalt konnte jedoch auf die 3-fache Menge (ca. 1 mg/ml) gesteigert werden.

Um den Bereich zwischen 150-35 kDa zu strecken und damit eine weitere Separierung der Spots zu erreichen, wurde ein 10%iges Gel angefertigt.

Nach Durchführung des Blots wurde die Gesamtheit der Proteinspots auf der PVDF-Membran durch eine Coomassie R-250-Färbung sichtbar gemacht.

Durch zahlreich durchgeführte Immunoblots in beiden pH Bereichen ließ sich ein immer wiederkehrendes Muster der immunogenen Spots erkennen. Nach Rücksprache mit Dr. Kannicht und Dr. Löster aus dem Biochemischen Institut für Humanmedizin der FU Berlin wurden die Spots, die ansequenziert werden sollten, bereits vor Anfertigung der Coomassie-Membran ausgewählt.

Im Anschluss an die Coomassie-Färbung konnten die immunogenen Spots von Interesse durch Orientierung an pH-Wert und Molekulargewicht sowie das charakteristische Bild gut identifiziert und auf einer Kopie der Membran markiert werden.

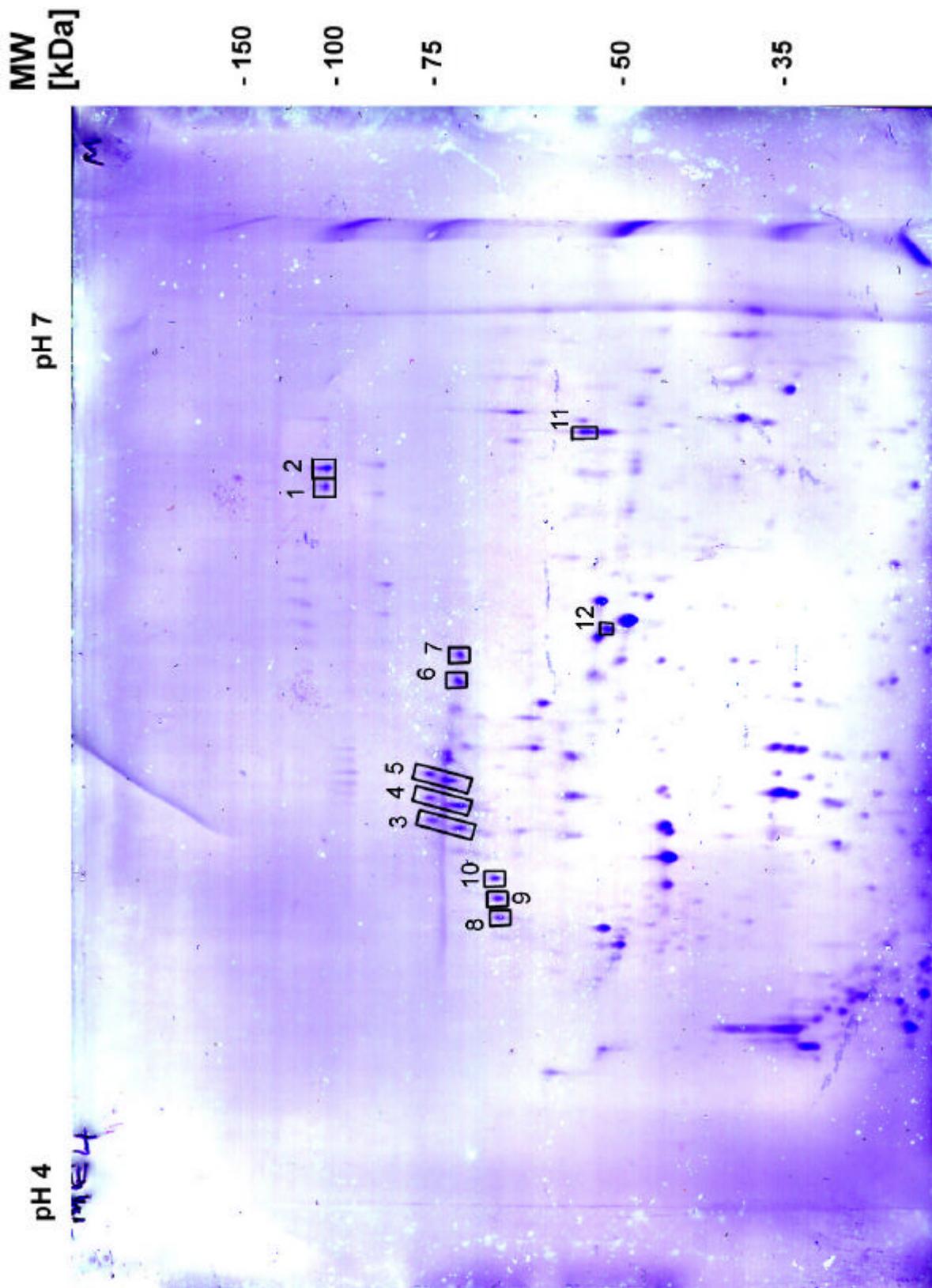


Abb. 12: Blot des 10%igen, zweidimensionalen Gels auf PVDF-Membran, pH 4-7, Coomassie-Färbung

4.3 Sequenzanalyse

Von den 12 markierten Spots auf der PVDF-Membran wurden 8 der Sequenzierung zugeführt.

Die Sequenzierung im Procise ABI 494 cLC von Spot 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 und 12 ergab folgende Ergebnisse:

Spot 12: (MQ) (KSG) N (KS) AVLLGVYEN-D, Proteingehalt: 450 fMol

Spot 11: (AS) PNHDKAFD (VE) L-V, Proteingehalt: 170 fMol

Diese wurden im Buchstaben-Code angegeben.

Die Klammern geben an, dass an dieser Position entweder die eine oder die andere AS stehen kann.

Der Strich an Position 14 bei Spot 12 und an Position 12 bei Spot 11 zeigt an, dass die an dieser Position stehende AS nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

Daraus ergibt sich für die beiden Spots folgende Sequenz:

Spot 12: (Met/Gln) (Lys/Ser/Gly) Asn (Lys/Ser) Ala Val Leu Leu Gly Val Tyr Glu Asn
? Asp, 450 fMol

Spot 11: (Ala/Ser) Pro Asn His Asp Lys Ala Phe Asp (Val/Glu) Leu ? Val, 170 fMol

Die Fentomol-Angabe gibt den Proteingehalt an, der vom entsprechenden Spot sequenzierbar war. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese sogenannte Anfangsausbeute je nach Protein maximal 50% des Proteingehaltes auf der Coomassie gefärbten PVDF-Membran entspricht.

Die eindeutig identifizierten AS von Spot 12 in Pos 5-13 haben, abgesehen von Glu, unpolare, hydrophobe Seitenketten. Dagegen haben die AS in Position 2-9 bei Spot 11 sowohl hydrophile, negativ geladene (Asp) als auch hydrophile, positiv geladene (His, Lys), sowie polare, hydrophobe (Asn) und unpolare, hydrophobe Seitenketten (Pro, Ala, Phe).

Spot 2, 5, 7, 3, 4, und 9 konnten nicht gelesen werden. Die Gründe dafür liegen höchstwahrscheinlich in einer Blockierung des N-terminalen Endes oder an einem zu geringen Proteingehalt.