

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
und dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin

Freie Universität Berlin

**Untersuchung der antigenen Proteinfractionen
eines Sarcoptes-Milben-Extraktes
durch SDS-PAGE, Immunoblot, Zweidimensionale Gelelektrophorese
und Sequenzanalyse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SIGRUN LERCH
Tierärztin aus Berlin
Berlin 2001

Journal Nr. 2502

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
und dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin

Freie Universität Berlin

**Untersuchung der antigenen Proteinfractionen
eines Sarcoptes-Milben-Extraktes
durch SDS-PAGE, Immunoblot, Zweidimensionale Gelelektrophorese
und Sequenzanalyse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SIGRUN LERCH
Tierärztin aus Berlin
Berlin 2001

Journal Nr. 2502

Fordere viel von Dir selbst
Und erwarte wenig von den anderen
Konfuzius

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Tag der Promotion: 16.07.2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Biologie der Sarcoptes-Milbe	3
2.1.1	Taxonomie	3
2.1.2	Ontogenese und Morphologie	4
2.2	Epidemiologie	7
2.3	Pathogenese und Klinik der Sarcoptes-Räude	10
2.4	Immunologie der Sarcoptes-Räude	14
2.5	Diagnose und Differentialdiagnose	18
2.5.1	Konventionelle Diagnostik	18
2.5.2	Intrakutantest	19
2.5.3	Serodiagnostik	20
2.6	Therapie	21
2.7	Antigengewinnung aus Sarcoptes-Milben	23
2.7.1	Herstellung eines Milben-Ganzkörperextraktes	24
2.7.2	Untersuchung auf qualitative Eigenschaften	25
2.7.2.1	Proteinfraktionierung in der SDS-PAGE	25
2.7.2.2	Immunoblot	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Herstellung des Sarcoptes-Milben-Antigens	27
3.1.1	Isolierung der Sarcoptes-Milben	27
3.1.2	Herstellung des Milben-Ganzkörperextraktes	28
3.1.3	Bestimmung des Proteingehaltes	28
3.2	Antikörper	29
3.3	Proteinfraktionen des Sarcoptes-Milben-Extraktes	29

3.3.1	Proteinfraktionierung in der eindimensionalen SDS-PAGE und Färbung	29
3.3.2	Transfer der Proteinfraktionen auf Nitrozellulose und Färbung	32
3.3.3	Proteinfraktionen im Immunoblot	33
3.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	33
3.4.1	Probenvorbereitung	34
3.4.2	Isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen, 1. Dimension	35
3.4.3	SDS-PAGE, 2.Dimension	36
3.4.3.1	Herstellung der SDS-Gele	37
3.4.3.2	Equilibrierung der IPG-Streifen	39
3.4.3.3	Auftrag der IPG-Streifen	39
3.4.3.4	Elektrophorese der zweiten Dimension	40
3.4.4	Transfer der Proteinspots auf Nitrozellulose	40
3.4.5	Transfer der Proteinspots auf eine PVDF-Membran	41
3.4.6	Coomassiefärbung der PVDF-Membran	42
3.5	Sequenzierung	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Der Sarcoptes-Milben-Ganzkörperextrakt	43
4.1.1	Bestimmung des Proteingehaltes	43
4.1.2	Proteinfraktionierung in der eindimensionalen SDS-PAGE	44
4.1.3	Proteinfraktionen im Immunoblot	46
4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	48
4.2.1	2-D Minigele	48
4.2.2	Große 2-D Gele	50
4.2.3	Immunoblot der 2-D Gele	52
4.2.4	Blot auf eine PVDF-Membran	53
4.3	Sequenzanalyse	55
5	Diskussion	56
7	Zusammenfassung	63

8	Summary	64
9	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumen-Prozent
%(w/v)	Gewicht-Prozent
A	Alanin
Ag	Antigen(e)
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CIE	engl.: crossed immune electrophoresis
D	Asparaginsäure
DF	Dermatophagoides farinae
DIG	Digoxygenin-markiert
DP	Dermatophagoides pteronyssinus
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
g	Erdbeschleunigung $g=9,81 \text{ m/s}^2$
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H	Histidin
His	Histidin
HPLC	engl.: high performance liquid chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IKT	Intrakutantest
IPG	Immobilisierter pH Gradient
K	Lysin
kDa	Kilodalton
kg KGW	Kilogramm Körpergewicht
L	Leucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Mol
M	Methionin
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht
mM	Millimol
MW	engl: molecular weight
N	Asparagin
P	Prolin
PBS	engl: phosphat buffered saline
Phe	Phenylalanin
p. inf.	lat.: post infectionem
Pro	Prolin
Q	Glutamin
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
TBS	engl.: tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
V	Valin
Val	Valin
var.	lat.: variatio
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Entwicklungsstadien der Sarcoptes-Milbe 5

Abbildung 2:

Sarcoptes scabiei; Dorsalansicht der weiblichen Adultmilbe
Ventralansicht der männlichen Adultmilbe 6

Abbildung 3:

Klinisches Bild der Sarcoptes-Räude beim Hund
Generalisierter Befall mit deutlich sichtbaren Prädilektionsstellen 11

Abbildung 4:

Skabies beim Menschen
Sekundärinfizierte Herde im Bereich des Handrückens 13

Abbildung 5:

Proteinfraktionen des Sarcoptes scabiei var. vulpis Extraktes nach
eindimensionaler SDS-PAGE, Silberfärbung 45

Abbildung 6:

Proteinfraktionen im Immunoblot 47

Abbildung 7:

2-D Minigel, 8-16%, pH 3-10, Silberfärbung 49

Abbildung 8:

2-D Minigel, 8-16%, pH 4-7; Silberfärbung 49

Abbildung 9:

2-D Gel, 10-20%, pH 3-10, Silberfärbung 51

Abbildung 10:

2-D Gel, 10-20%, pH 4-7, Silberfärbung 51

Abbildung 11:

Immunoblot 2-D Gel, 10-20%, pH 4-7

52

Abbildung 12:

2-D Blot auf PVDF-Membran, pH 4-7, Coomassie-Färbung

54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Einfluss von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit auf die
Überlebensdauer der Sarcoptes-Milbe 9

Tabelle 2:

Behandlung der Sarcoptes-Räude beim Hund 23

Tabelle 3:

Silberfärbung nach Blum et al., modifiziert 31

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Schein für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. F. G. Schmidt danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit im Institut für Immunologie und Molekularbiologie in Berlin-Mitte.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Unterstützung und die Geduld bei den Einweisungen in die Arbeitstechniken und Beantwortung unzähliger Fragen.

Frau C. Palissa danke ich im besonderen für ihre Hilfe und Zusammenarbeit.

Dem Team Dr. C. Kannicht, Dr. C. Löster und Frau C. Fisseau aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie (Bereich Humanmedizin) danke ich sehr herzlich für ihre große und besonders maßgebende Unterstützung.

Herrn Dr. Sauber von der Aventis Pharma danke ich für die Durchführung der Sequenzanalyse.

Meiner Mutter und meinem Vater danke ich für ihre Geduld und die moralische und finanzielle Unterstützung sowie meinem Mann und meinem Sohn für ihre Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sigrun Lerch
Geburtsdatum	18.11.1969
Geburtsort	Wiesbaden
Eltern	Christl Lerch, geb. Vogelgesang Dr. rer. nat. Ulrich Lerch
Familienstand	verheiratet, einen Sohn

Schulbildung

1976-1980	Grundschule Blieskastel
1980-1985	Von der Leyen-Gymnasium Blieskastel
1985-1989	Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken
18.05.1989	Abitur

Ausbildung

1991-1997	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
16.09.1997	3. Staatsexamen
08.10.1997	Tag der Approbation
seit 25.11.1997	Anfertigung einer Dissertation im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin und im Institut für Immunologie und Molekularbiologie der Freien Universität Berlin

Selbständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter
Zuhilfenahme der angegebenen Literatur erstellt habe.

Berlin, den 16.07.2001

Unterschrift _____

