

5 Diskussion

Wenn der direkte Erregernachweis – wie bei der *Sarcoptes*-Räude nicht oder nur schwer möglich ist, werden häufig immunologische Methoden herangezogen, um eine sichere Diagnosestellung zu erreichen. Jedoch ist die Immuno-Diagnose parasitärer Infektionen trotz der großen Fortschritte der vergangenen Jahre immer noch in einem formativen Stadium (Cohen et al., 1976).

Die Literaturrecherche ergab, dass die *Sarcoptes*-Räude in ihrer Präsenz in der Praxis häufig unterschätzt wird. Die Befallsintensität liegt deutlich höher als angenommen und muss auch wegen ihres zoonotischen Potentials als ernstes Problem betrachtet werden (Bornstein, 1995; Dahl, 1983). Diese Tatsache verdeutlicht die Notwendigkeit eines sicheren diagnostischen Nachweisverfahrens. Nur dadurch lässt sich eine gezielte Behandlung einleiten und eine Heilung erreichen.

Zum Nachweis spezifischer *Sarcoptes*-Milben-Antikörper ist der indirekte ELISA als Alternative zur konventionellen Diagnostik geeignet und hat bereits praktische Bedeutung erlangt (Sobek, 1998; VetMedLab, 1998). Für routinemäßige Untersuchungen wäre es jedoch notwendig, den Immuntest zu standardisieren. Die rekombinante Herstellung der Antigen würde die Spezifität dieses serologischen Testverfahrens steigern, denn kein serologischer Test kann spezifischer als das verwendete Antigen sein.

Jedoch hat sich gezeigt, dass die Suche nach diesen spezifischen Antigenen sehr schwierig und langwierig ist. Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Entwicklung zuverlässiger serodiagnostischer Tests bei parasitären Infektionen liegt in der komplexen Natur der verwendeten Antigene. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Antigene von Parasitenextrakten auch bei phylogenetisch verwandten Spezies oder gelegentlich auch nicht verwandten Parasiten vorhanden sind und somit vom immunodiagnostischen Gesichtspunkt keinen praktischen Wert haben (Cohen et al., 1976).

Die Suche nach den Antigenen ist aber nicht nur bezüglich einer verbesserten Diagnostik so bedeutend. Ein weiterer Gesichtspunkt der intensiven Erforschung der spezifischen *Sarcoptes*-Antigene und der immunologischen Abwehrprozesse des Wirtes gegenüber dem Parasiten ist, dass dadurch Anhaltspunkte für die Entwicklung

einer induzierten Immunisierung als effektive Immunprophylaxe gegeben wären (Ilchmann, 1983). Nisafi (1986) sieht in der Entwicklung neuer Arzneimittelgenerationen und Vakzinen gegen Parasitosen unter Ausschaltung möglicher Resistenzen eine Schwerpunktaufgabe der Erforschung parasitärer Antigene. Eine Impfung gegen die *Sarcoptes*-Räude in Gebieten, wo diese vermehrt auftritt, würde eine effektive Bekämpfung darstellen.

Die Antigene und die durch sie induzierten Antikörper sind außerdem für die Analyse immunpathogener Prozesse sowie für die Bewertung der verschiedenen Komponenten der Immunantwort von Bedeutung (Ilchmann, 1983).

In dieser Arbeit wurde versucht, den komplexen Milben-Ganzkörperextrakt so weit wie möglich in einzelne Proteinbanden aufzutrennen und mittels Immunoblot die spezifischen *Sarcoptes*-Antigene sichtbar zu machen.

Nach der Herstellung des Milben-Ganzkörperextraktes und Bestimmung des Proteingehaltes wurde das komplexe Proteingemisch mittels eindimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und die Molekulargewichte der einzelnen Banden bestimmt.

Durch Verwendung der unterschiedlichen Probenpuffer sollte festgestellt werden, ob sich bei der SDS-PAGE und beim Immunoblot ein bedeutender Unterschied feststellen lässt in Abhängigkeit davon, ob Disulfidbrücken erhalten (PP non red) bzw. gespalten (PP red) sind.

In der SDS-PAGE konnten für *Sarcoptes scabiei* var. *vulpis* 33 Eiweißkomponenten im Bereich von etwa 10-300 kDa differenziert werden. Proteine außerhalb des vom Markerprotein umfassten Molekularbereiches, sowie Proteine mit sehr geringem Proteingehalt oder solche, die sich stark überlappen konnten mit dieser Technik nicht deutlich dargestellt werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Literaturquellen in etwa überein. Bornstein (1995) wies im Bereich von 14-164 kDa 20 Banden von *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* nach. Die elektrophoretische Auftrennung von Sobek (1998) ergab 25 Proteinbanden. Bei der Strukturanalyse eines *Sarcoptes scabiei* var. *canis*-Extraktes fanden Arlian et al. (1988d) 30 Protein- bzw. Peptidbanden im Bereich von 6-200 kDa.

Grundsätzlich sind jedoch die Ergebnisse der SDS-PAGE einer kritischen Interpretation zu unterwerfen, da sowohl bei der Gewinnung als auch bei der Herstellung des Ganzkörperextraktes auch bei exakter Durchführung bakterielle Kontaminationen sowie Verunreinigungen allgemeiner Art und solche durch Fremdproteine nicht ausgeschlossen werden können.

Der Einsatz unterschiedlicher Mengen an Protein bei der SDS-PAGE diente der Festsetzung der optimalen Proteinmenge für weitere Gelelektrophoresen und den folgenden Immunoblot.

Die Sensitivität des Blottes ist abhängig vom Titer der Primär- und Sekundärantikörper sowie vom Verstärkereffekt und der Empfindlichkeit des Detektionssystems. Wegen des in dieser Arbeit verwendeten hochempfindlichen Detektionssystems musste die Menge an Protein so gering wie möglich gehalten werden.

Außerdem war zu berücksichtigen, dass es sich bei dem verwendeten Kaninchenserum um ein polyklonales Antiserum handelte. Polyklonale Antiseren enthalten neben maximal 25-30% an spezifischen Antikörpern überwiegend unspezifische Immunglobuline bezogen auf das Immunogen. Dadurch besteht eine gewisse Gefahr, dass es zu unspezifischen Reaktionen mit anderen Proteinen kommt. Zudem können zufällige Kreuzreaktionen der spezifischen Antikörper mit Epitopen auf anderen Proteinen auftreten. Es wurde versucht, diese ungewollten Signale durch entsprechende Verdünnung des Antiserums, durch sorgfältiges Blocken und stringente Waschbedingungen zu minimieren. Als zusätzliche Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde das Serum eines gesunden Kaninchens in einer Verdünnung von 1: 3000 mitgeführt.

Nach Festlegung der geeigneten Proteinmenge anhand des Ergebnisses aus der SDS-PAGE erfolgte die Beurteilung der angemessenen Verdünnung des 1. Antikörpers. Es wurde davon ausgegangen, dass die verwendeten Ak denaturierungsresistente oder konformationsunabhängige (sequenzielle) Epitope erkennen.

Durch Verwendung der unterschiedlichen Probenpuffer wurde überprüft, ob spezifische Epitope der verwendeten Ak in Abhängigkeit der Disulfidbrücken zerstört wurden. In diesem Fall stellte sich bei reduzierendem und nicht reduzierendem Probenpuffer in etwa das gleiche Bild dar. Im Immunoblot wurden 18 der 33

elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden vom spezifischen Ak erkannt. Bei Arlian et al. (1988a) reagierten insgesamt 15 von 30 Proteinfractionen des *Sarcoptes canis*-Extraktes. Bei Sobek (1998) reagierten 8-11 Banden zwischen 14 und 200 kDa im Immunoblot.

Ein Vergleich dieser Untersuchungsergebnisse scheint jedoch schwer möglich, da sich sowohl die verwendeten Extrakte und Techniken als auch die Nachweismethoden teilweise erheblich unterscheiden.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass der Extrakt von *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* sehr komplex ist und dass die Milbe eine Quelle multipler Antigene ist. Die unregelmässige Bandendarstellung zeigt, dass die Antigene variable Quantität und Potenz besitzen.

Das limitierte Auflösungsvermögen der eindimensionalen Elektrophorese in Bezug auf das hochkomplexe Proteingemisch, sollte durch Einsatz der 2-D Elektrophorese um mindestens eine Größenordnung verbessert werden. Durch die 2-D Minigele in unterschiedlichen pH-Bereichen wurde erkannt, dass der Carbonatpuffer, der im Milbenextrakt enthalten war, sich nicht für diese Technik eignet. Die Probenaufbereitung muss für die 2-D Elektrophorese stets empirisch ermittelt werden. Ist sie nicht optimal, können Trennverfahren unvollständig sein und Informationen verloren gehen. Kontaminationen unterschiedlichster Art interferieren außerdem bereits in kleinen Mengen mit den chemischen Reaktionen des Edman-Abbaus oder verhindern die notwendigen effizienten Extraktionsschritte. Aus diesem Grund wurden die Proben für die folgenden Anwendungen mittels PD-10 Säule umgepuffert.

Bei den Ergebnissen der Immunoblots der ein- und zweidimensionalen Elektrophoresen ist zu bedenken, dass Wirtssubstanzen als Kontaminationen im üblichen Sinne auftauchen, mit der Testspezifität interferieren und somit zu Fehlinterpretationen führen können.

Die *Sarcoptes*-Milbe ernährt sich von Gewebsflüssigkeit und Hornzellen ihres Wirtes. In Bezug zur Gesamtgröße stellt ihr Verdauungstrakt einen erheblichen Anteil dar. Bei der Herstellung des Extraktes wird der gesamte Milbenkörper zerkleinert, so dass Hauteiweiße aus dem Verdauungskanal der Milben oder Schuppenantigene der Wirte in das Testpräparat gelangen. Eine kutane Autosensibilisierung, die evtl. sekundär im Verlauf der Räude entsteht, würde dann durch den Test miterfasst

werden. In welchem Maß die Ergebnisse der Elektrophoresen und des Immunoblots in den durchgeführten Untersuchungen beeinflusst und somit die Suche nach den spezifischen *Sarcoptes*-Ag erschwert wurden, ist noch unklar.

Die Sequenzanalyse stellte den nächsten Schritt bei der Charakterisierung der aufgetrennten Proteinspots dar.

Von den insgesamt 8 Spots, die der Sequenzierung zugeführt wurden, konnten nur von Spot 11 und 12 Sequenzen ermittelt werden. Die eindeutig identifizierten AS von Spot 12 in Pos 5-13 haben überwiegend unpolare, hydrophobe Seitenketten. D.h., sie stoßen Wasser ab und neigen dazu, sich zusammenzulagern. Der Zusammenhalt hydrophober Seitenketten wirkt stabilisierend auf die dreidimensionale Struktur wasserlöslicher Proteine. Die unterschiedlichen Größen und Formen dieser Kohlenwasserstoffseitenketten erlauben es ihnen, zu kompakten Strukturen mit wenig Zwischenräumen zusammenzurücken. Demgegenüber haben die AS von Spot 11 sehr unterschiedliche chemische Eigenschaften.

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

Unter dem Aspekt, dass etwa nur 50% der gesamten eingebrachten Proteinmenge sequenziert werden kann, ist diese folglich bei zukünftigen Sequenzanalysen deutlich zu erhöhen.

Die bestehende Blockade der Spots kann in vivo entstanden oder bei der Proteinreinigung und Probenvorbereitung unbeabsichtigt eingeführt worden sein. Da eine Blockierung nur in den seltensten Fällen chemisch oder enzymatisch vor der Sequenzanalyse entfernt werden kann, sind Sequenzinformationen von blockierten Proteinen normalerweise nur von „internen“ Sequenzen möglich. Um diese zu erhalten, muss eine chemische oder enzymatische Fragmentierung des Proteins und eine nachfolgende Auftrennung und Sequenzanalyse der entstandene Fragmente durchgeführt werden.

Aus diesen Gründen empfiehlt es sich, vor einer erneuten Sequenzierung einen selektiven Proteasenverdau durchzuführen. Entweder man spaltet das Protein dabei vollständig in gegen die Protease resistente Peptide auf und trennt die Peptide durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography). Führt man den Verdau nur kurze Zeit durch, erhält man größere

Spaltprodukte. Der unvollständige Proteasenverdau spart Zeit und verringert Verluste. Dabei wird das zu sequenzierende Protein in der Tasche eines SDS-Gels verdaut, die Spaltprodukte elektrophoretisiert, auf eine geeignete Membran geblottet und sequenziert.

Der Edman-Abbau wird dadurch limitiert, dass in einer Analyse nur die N-terminale Sequenz von etwa 30-60 AS-Resten erhalten werden können. Durch die Herstellung von solchen Bruchstücken wird diese Limitation umgangen.

Ob es sich bei den Sequenzen von Spot 11 und 12 um Peptide handelt, die spezifische Ak zu binden vermögen, also antigen wirksam sind, ist zu diesem Zeitpunkt nicht sicher. So wäre es ebenso denkbar, dass sie lediglich unspezifische Reste dieser antigenen Proteinen ohne Immunreaktivität darstellen.

Sie können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen angesehen werden.

Im allgemeinen stellt der Vergleich der Sequenzen mit allen bekannten Sequenzen in gesammelten Datenbanken den folgenden Schritt dar. Jedoch existieren über Sarcoptes-Milben noch keinerlei Daten.

Will man das Ergebnis der Sequenzanalyse nun nutzen, so ist dies nur in Versuchsreihen mittels Ausschlussverfahren möglich.

So wäre es denkbar, durch Kopplung der bekannten AS an stark immunogene Substanzen (z.B. Tetanustoxin) eine Peptidsynthese durchzuführen. Empfehlenswert ist dabei, nur die AS zu verwenden, die eindeutig identifiziert werden konnten. Bei Spot 11 wären das die AS in Position 2-9, bei Spot 12 die in Position 5-13.

Daraus ergäben sich drei Möglichkeiten:

1. Das hergestellte Peptid kann zur Immunisierung von Tieren verwendet werden. Die dadurch gebildeten polyklonalen Ak müssten in einer Qualitätskontrolle das entsprechende Peptid, das aus diesen AS besteht, erkennen können. Im Anschluss daran müsste in einer weiteren Qualitätskontrolle durch Elektrophorese und Blot (evtl. auch durch Einsatz im ELISA) überprüft werden, ob die Ak die Ag im Milbenextrakt erkennen.
2. Von dem hergestellten Peptid könnte eine Verdünnungsreihe hergestellt und im ELISA zum Einsatz gebracht werden. Das Ziel sollte sein, dass die von den Tieren gebildeten Ak an das synthetisierte Peptid binden können. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Ak schon kurze Peptidsequenzen erkennen können, die

Wahrscheinlichkeit aber eher gering ist, dass die durch die 2-D Elektrophorese isolierten und ansequenzierten Ag genau diese Epitope enthalten.

3. Durch weitere Sequenzierungen ist festzustellen, ob sich das Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierung bestätigt. Durch Steigerung der Proteinmengen und Herstellungen von Peptidbruchstücken wie oben beschrieben, ist es wahrscheinlich, dass die Menge der erhaltenen Informationen beträchtlich gesteigert werden kann.