

Chromatographische und immunologische Untersuchungen über Antigenkomponenten von *Toxoplasma gondii*

A.Hassl, Gabriela Barnert, H. Aspöck

Einleitung

Für die Serodiagnose von Toxoplasma-Infektionen stehen verschiedene Antikörpertitrations-Verfahren zur Verfügung. Eines davon, der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), ist ein besonders kostengünstiger Screening-Test. Seiner weiteren Verbreitung und einer breiten Anwendung — z. B. im Rahmen der serologischen Überwachung der Schwangeren — stehen allerdings seine mangelnde Vergleichbarkeit und seine geringe Standardisierung entgegen. Die in den Enzymimmuntests benutzten Antigene sind in den verschiedenen Kits und Präparationen unterschiedliche, nicht definierte Mischungen von Parasiten- und Wirtsproteinen. Wir haben versucht, das von uns benutzte Antigen mittels einer Gelfiltration zu zerlegen, dann die Antigenität der Fraktionen im ELISA zu bestimmen, und anschließend die Proteine einzelner Fraktionen in einer SDS-PAGE zu charakterisieren. Ziel der Arbeit war es, zu erkunden, ob durch eine Sortierung der Antigenproteine nach ihrer Größe die Isolierung einer Fraktion mit erhöhter Spezifität möglich ist.

Methoden

Trophozoiten von *Toxoplasma gondii* (Stamm BK) wurden intraperitoneal in Mäusen (Stamm Him:OF1 [Swiss] SPF) gezüchtet und jeweils 2 Tage p. i. geerntet. Die Trophozoiten (Kontamination mit Wirtszellen: < 1 %) wurden dreimal in 145 mM Kochsalzlösung gewaschen, in a. d. resuspendiert (1 ml $\times 10^9$ Parasitenzellen) und beschallt (Sonifer Cell Disruptor B-30, Branson Sonic Power Co., USA). Das Homogenat wurde bei 3000 g 20 min. zentrifugiert, dann wurde der Proteingehalt bestimmt (Protein Assay, Bio-Rad Lab., Wien) und auf 1,2 mg/ml durch Einengung mittels Polyäthylenglykol (20 kDA) eingestellt. Abschließend wurde das Antigen 24 Stunden gegen PBS (116 mM Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) + 0,02% NaN_3 dialysiert. Dieses Rohantigen wurde bis zum Gebrauch in kleinen Portionen tiefgefroren (-20° C) aufbewahrt.

Jeweils 300 μl des Antigens wurden auf eine 60 X 1,6 cm Säule, gefüllt mit Sephacryl S-300 (Pharmacia Ges. m. b. H., Wien) aufgetragen und filtriert. (Puffer: PBS + 0,02% NaN_3 ; 12 ml $\times \text{cm}^{-2} \text{Xh}^{-1}$. Detektion: AU 280 nm.) Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt gesammelt, gegen a. d. dialysiert, lyophilisiert und in coating buffer resuspendiert (Proteingehalt aller Peaks: 10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$). Die Molekulargewichtsbestimmung der Peaks erfolgte mit Hilfe käuflicher Markerproteine (Pharmacia Ges. m. b. H.).

Neun Seren von Schwangeren mit einem hohen IgG-Titer im Indirekten Immunfluoreszenztest (> 1 : 1000) und vier Seren ohne meßbaren Antikörpertiter wurden in einem ELISA gegen die Antigenfraktionen getestet. (ELISA: Mikrotiterplatten: Nunc, Kamstrup, Dänemark; ELISA-Puffer: PBS + 2% BSA + 0,25% Tween 20; Testmengen: 100 μl ; Serumverdünnung: 1 : 1000; Inkubationszeiten: 2 Stunden; Konjugat: Anti-Mensch-Ziegen-IgG/PO (Cappel; Cochranville, PA, USA) Verdünnung: 1 : 2000; Sub-

strat: 0,005% H₂O₂ + gereinigte 5-Amino-hydroxybenzoesäure; Ablesung: Extinktion bei 492 nm).

Weiters wurden Seren von vier i. m. und s. c. mit Rohantigen immunisierten Kaninchen (IHA-Titer > 1 : 256.000) und zwei negative Kontrollseren von SPF-Kaninchen im ELISA getestet. Der Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt, lediglich das Konjugat war ein Anti-Kaninchen-Ziegen-IgG/PO (Nordic; Tilburg, NL) 1 : 1000.

Das Rohantigen sowie die Proteine der Peaks Nr. 2 und Nr. 3 wurden einer SDS-PAGE nach LAEMMLI (9) unter reduzierenden Bedingungen unterzogen. (Trenngel: 12,5%, Sammelgel: 6%, 6 mA konstanter Widerstand über Nacht). Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue R-250 in der allgemein üblichen Art. Die Molekulargewichte wurden mittels käuflicher Standards (Bio-Rad. Lab.) ermittelt.

Ergebnisse

In der Gelfiltration konnte das Toxoplasma-Rohantigen in sechs reaktive Fraktionen zerlegt werden. Die Lage der Peaks und die Fraktionsgrenzen sind in Abb. 1 dargestellt. Die Molekulargrößen der Peak-Maxima und die Antigenität der Fraktionen sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind Abb. 2 zu entnehmen.

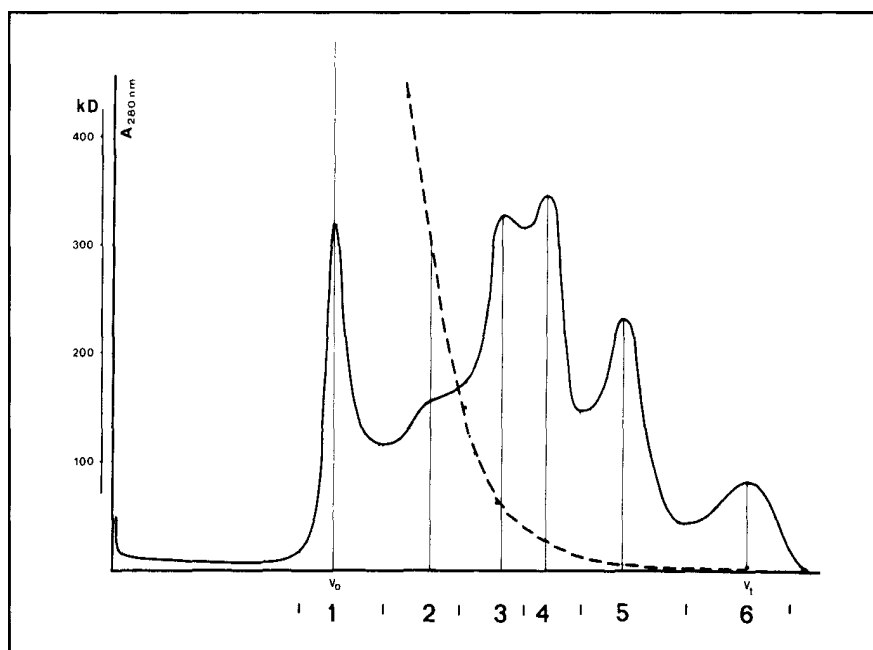


Abb. 1

Ergebnis der Gelfiltration von Toxoplasma-Rohantigen

Abszisse: Volumen; Fraktionen mit Fraktionsgrenzen • Ordinate: Extinktion bei 280 nm;

Molekulargewichte in kDa strichliert: Kurve der Molekulargewichtsstandards

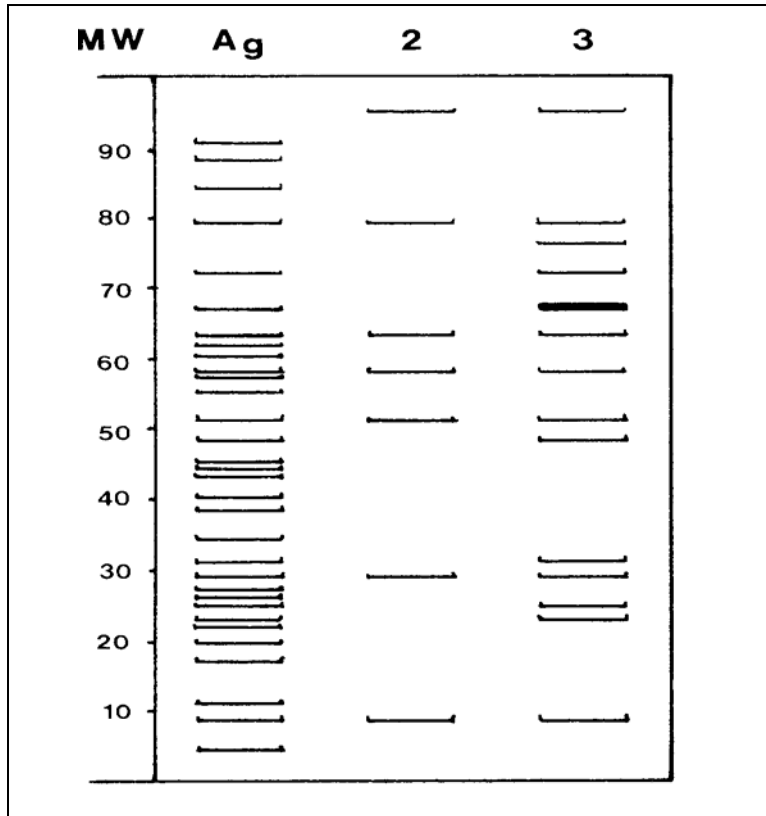


Abb. 2

Ergebnisse der Elektrophorese (MS-PAGE)

MW: Molekulargewichte der Proteine in kDa Ag: Rohantigen • 2, 3: Peak Nr. 2, 3

Diskussion

Die Gelfiltration ist ein sehr leistungsfähiges Trennsystem, das besonders zur Verarbeitung großer Probenmengen bei geringem technischen und personellen Aufwand geeignet ist. Sie hat gegenüber anderen Techniken den Vorteil, daß die antigenen Strukturen der Proteine unverändert erhalten bleiben. Diese Eigenschaften lassen sie als Routineverfahren zur Antigenaufbereitung besonders geeignet erscheinen. Wir haben daher die Gelfiltration gewählt, um das Proteingemisch unseres ELISA-Antigens, eines Trophozoitenlysats, zu zerlegen.

Das Lysat zerfiel durch die Chromatographie in sechs deutlich unterscheidbare Fraktionen. Klammert man die für dieses Gel (Sepahcyl S-300) zu großen ($> 10^3$ kDa) und die zu kleinen Proteine (< 1 kDa) aus den weiteren Betrachtungen aus, bleiben Fraktionen mit einem Molekulargewicht (Peak-Maximum) von 320, 65, 27 und 6 kDa. Für jedes dieser Fraktionsgewichte läßt sich in der Literatur mindestens ein Beleg finden: HUGHES und VAN KNAPEN (7) und HUGHES (5) beschrieben ein Antigen von 324 bzw. 325 kDa Größe, HUGHES und BALFOUR (6) und CHUMPITAZI et al. (2) eine somatischen Antigenbestandteil von 61 bzw. 64,5 kDa, HANDMAN und REMINGTON (3), JOHNSON et al. (8)

TABELLE 1

Molekulargewichte und Antigenität der Fraktionen aus der Gelfiltration von *Toxoplasma*-Antigenen

Nr.	MG in kDa	+ HS		- HS		+ KS		- KS	
		EX.	S.	EX.		EX.	S.	EX.	
1	> 10 ³	0,247	0,048	0,092		0,305	0,057	0,007	
2	320	0,393	0,021	0,058		kD	kD	kD	
3	65	0,196	0,099	0,004		} 0,093	0,039	0,001	
4	27	0,222	0,084	0,051					
5	6	0,160	0,026	0,060		0,149	0,083	0,002	
6	< 1	0,150	0,050	0,065		0,049	0,023	0,001	
Puffer				max. 0,010					

Nr. = Peak Nr. • MG = Molekulargewicht des Peakmaximums HS = Humansenen

KS = Kaninchensenen • Ex. = Extinktion S = Standardabweichung

kD = keine Daten vorhanden

und PARTANEN et al. (10) konnten durch ganz unterschiedliche Methoden ein offenbar quantitativ dominierendes (Oberflächen-) Antigen von 27 - 29 kDa nachweisen, und POTASMAN et al. (11) fand schließlich ein IgM-reaktives 4 kDa Protein im *Toxoplasma*-Lysat. Die von uns isolierten Fraktionen bestehen natürlich ihrerseits wiederum aus vielen Einzelproteinen, jedoch führt das überdurchschnittlich häufige Auftreten bestimmter Proteine zur Ausbildung der Einzelpeaks. Eine Gelfiltration kann sich daher als durchaus sinnvolle erste Stufe in einer Kette von Reinigungsschritten erweisen.

Antigene konnten, wie zu erwarten, in jeder Fraktion nachgewiesen werden, jedoch waren die Stärken der Immunreaktionen deutlich unterschiedlich. Die Fraktion Nr. 2 mit einem Peak-Maximum von 320 kDa erwies sich als stärkstes und spezifischstes Antigen (höchste Extinktion, geringste Schwankungsbreite). In der SDS-PAGE zerfiel diese Fraktion in eine geringe Anzahl von Banden, was auf eine relativ homogene Zusammensetzung dieser Fraktion schließen läßt. Es zeichnet sich somit die Möglichkeit der Isolierung einer definierbaren Antigenfraktion ab.

Weitere Untersuchungen werden zeigen, welcher Weg einzuschlagen ist, um das ELISA-Antigen besser zu charakterisieren. Für analytische Belange ist die Isolierung ausgewählter Proteine aus Zellysaten durch eine Kombination verschiedener Reinigungstechniken (z. B. Chromatographie und Elektrophoresen [4]) eine vielversprechende Möglichkeit. Für die Herstellung von Routinetest-Antigen eignen sich hingegen besonders Kombinationen verschiedener chromatographischer Methoden, da sie die Reinigung beträchtlicher Substanzmengen erlauben.

Zusammenfassung

Ein wäßriges Lysat von *Toxoplasma gondii*-Trophozoiten wurde in einer Gelfiltration in Fraktionen mit Molekulargewichten von > 10³, 320, 65, 27, 6 und < 1 kDa zerlegt. Die Fraktionen wurden getrennt ge-

sammelt und gegen Human- und Versuchstierseren in einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay getestet. Sie erwiesen sich als unterschiedlich reaktiv. Die Fraktion mit der höchsten Reaktion (320 kDa) wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt, um ihre Proteinzusammensetzung zu studieren. Die Gelfiltration erwies sich als nützlicher erster Schritt, um komplexe Antigengemische zu zerlegen und einzelne Bestandteile zu reinigen.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Trophozoitenlysate, Gelfiltration, ELISA, SDS-PAGE

Summary

Chromatographic and immunological investigations on antigen constitution of *Toxoplasma gondii*

An aqueous lysate of *Toxoplasma gondii* trophozoites was divided into fractions with molecular weights of $> 10^3$, 320, 65, 27, 6, and < 1 kd respectively by gel filtration. The fractions were separately collected and individually tested against human and rabbit antisera in an ELISA. The fractions proved to be of different reactivity. The fraction with the highest reactivity (320 kd) was separated in a SDS-PAGE to analyse its protein composition. Gel filtration turned out to be a useful primary step for the separation of complex antigen mixtures and for the purification of independent components.

Key words

Toxoplasma gondii, trophozoite lysate, gel filtration, ELISA, SDS-PAGE.

Literatur

1. ASPÖCK, H. FLAMM, H. (1984):
Die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft.
Api bioMerieux-Monographien 1, 10 - 26.
2. CHUMPITAZI, B., AMBROISE-THOMAS, P., CAGNARD, M., AUTHEMAN, J. (1987):
Isolation and characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from in vitro culture in MRC 5 and Vero cells.
Int. J. Parasitol. 17, 829 - 834.
3. HANDMAN, E., REMINGTON, J. F. (1980):
Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*.
Immunol. 40, 579 - 588.
4. HASSL, A., HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1987):
Isoelectric focusing of *Toxoplasma gondii* antigens.
Zbl. Bakt. Hyg. A 265, 499 - 500.

5. HUGHES, H. P. A. (1981):
Characterization of the circulating antigen of *Toxoplasma gondii*.
Immunology Letters 3, 99 - 102.
6. HUGHES, H. P. A., BALFOUR, A. H. (1981):
An investigation of the antigenic structure of *Toxoplasma gondii*.
Parasite Immunol. 3, 235 - 248.
7. HUGHES, H. P. A., KNAPEN, F. van (1982):
Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production.
Int. J. Parasitol. 12, 433 - 437.
8. JOHNSON, A. M., McDONALD, P. J. NEOH, S. H. (1983):
Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol. 69, 459 - 464.
9. LAEMMLI, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature 227, 680 - 685.
10. PARTANEN, P., TURUNEN, H. J. PAASIVUO, R., FORSBLOM, E., SUNI, J., LEINIKKI, P. O. (1983):
Identification of antigenic components of *Toxoplasma gondii* by an immunoblotting technique.
FEBS 158, 252 - 254.
11. POTASMAN, I., ARAUJO, F. G., DESMONTS, G., REMINGTON, J. S. (1986):
Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection.
J. Inf. Dis. 154, 650 - 657.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. A. Hassl
Hygiene-Institut der Universität Wien
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien
Austria