

6 SUMMARY

Temesgen Samuel (1998):

Purification of the 28 kDa and 18 kDa Antigens of *Babesia equi* from Erythrocyte Proteins by Preparative Isoelectric Focusing and Ion Exchange Chromatography

Diagnostic antigen proteins of *Babesia equi* were purified by preparative isoelectric focusing and anion exchange chromatography of lysed preparations of infected erythrocytes. Target proteins of 28 kDa and 18 kDa were first identified by isoelectric focusing and Western blotting. Four of the isoelectric focusing fractions with pH 5.3 to 5.7 contained protein bands of 28 kDa, which were detected only by a positive serum pool. The 18 kDa protein, also detected only by the positive serum pool, focused at pH gradients 5.5 to 5.7.

Further purification of the proteins was done by anion exchange chromatography. Effluent proteins from extracted *Babesia equi*-infected as well as non-infected erythrocytes were examined by SDS-PAGE and Western blotting.

The flowthrough fractions of extract from infected erythrocytes contained a 29 kDa protein recognised by both positive and negative serum pools. Examination of non-infected donor horse erythrocytes revealed that this protein was of erythrocyte origin. Specifically reacting 28 kDa protein bands were detected in fractions eluted by salt gradients between 0.32 and 0.54 M NaCl. When the electrophoresis system was shifted from glycine-SDS-PAGE to tricine-SDS-PAGE, the 28 kDa band resolved into multiple bands, indicating polymorphism. The 18 kDa protein was hardly soluble in CHAPS.

Both 28 kDa and 18 kDa proteins appeared to be low abundance antigen proteins. Especially the 18 kDa protein was detectable only after concentration. The 29 kDa antigen

is supposed to be an altered isoantigen of erythrocyte origin, whose reaction with isoantibodies becomes accentuated following infection of the erythrocyte

Perspectives on possible extension of the purification and utilisation of the proteins are discussed

7 ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Temesgen Samuel (1998):

Reinigung von 28-kDa- und 18-kDa-*Babesia equi*-Proteinen aus infizierten Erythrozyten mittels präparativer Isoelektrischer Fokussierung und Ionenaustauschchromatographie

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Reinigung *Babesia equi*-spezifischer Antigene für die Anwendung in serologischen Tests

Zunächst wurden Zielantigene mittels präparativer Isoelektrischer Fokussierung identifiziert. Durch die Fokussierung wurden die gesamten Proteine aus *Babesia equi* infizierten Erythrozyten fraktioniert. Für die Fraktionierung wurde eine Gesamtmenge von 35 mg Protein im Fokussierungspuffer, der 2 % NP-40 und 9,5 M Harnstoff enthielt, gelöst. In 20 untersuchten Fraktionen waren nur in den Fraktionen, deren pH-Werte 2,7-5,8 betragen, Proteine nachweisbar. Mittels Darstellung dieser Fraktionen im Western Blot wurden zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 28 kDa und 18 kDa identifiziert. Das 28-kDa-Protein wurde in vier Fraktionen (pH 5,3-5,7) nachgewiesen. Die vier Fraktionen enthielten zusätzlich ein 29-kDa-Protein, das sowohl von Seren infizierter sowie nicht infizierter Pferde erkannt wurde. Das 18 kDa Protein wurde in Fraktionen mit pH-Werte von 5,5-5,7 nachgewiesen.

Die Reinigung der identifizierten Proteine erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie. *Babesia equi*-infizierte Erythrozyten wurden aus *in vitro*-Kulturen bei einer PPE von 7 % geerntet und mittels Glycerol lysiert. Eine Präparation nicht infizierter Pferdeerythrozyten erfolgte in gleicher Weise. Das Lysat wurde in einem Extraktionspuffer mit 10 mM CHAPS gelöst, die Proteine extrahiert und mittels Anionenaustausch-

chromatographie in drei Gruppen getrennt. Proteine im Durchfluß, Proteine, die bei einem Salzgradienten von ca. 0,17 M NaCl und Proteine, die bei einem Salzgradienten zwischen 0,29 M und 0,60 M NaCl eluiert wurden. Mittels Western Blot-Darstellung der Proteine im Durchfluß wurde ein 29-kDa-Protein identifiziert, das sowohl mit einem positiven als auch mit einem negativen Serum reagierte. Durch Anionenaustauschchromatographie von nicht infizierten Pferdeerythrozyten wurde nachgewiesen, daß dieses Protein von den Erythrozyten stammte. Die bei niedriger Salzkonzentration eluierten Proteine wurden von keinem Kontrollserum erkannt. Die Eluate der 0,32- bis 0,54-molaren NaCl-Konzentrationen enthielten ein spezifisch reagierendes 28-kDa-Protein. Die Darstellung dieser Fraktionen im Western Blot nach Glycin-SDS-PAGE zeigte eine 28-kDa-Bande, während sich im Western Blot nach Tricin-SDS-PAGE dieselben Proteine in mehrere Banden auftrugen.

Die in diesen Verfahren identifizierten 28-kDa- und 18-kDa-Proteine sind *Babesia equi*-spezifische Antigene, die im Parasit nur in sehr geringeren Konzentrationen vorkommen. Das 18-kDa-Protein konnte nur im Anreicherungsverfahren und nach Extraktion nachgewiesen werden. Das 29-kDa-Protein stellt ein erythrozytares Isoantigen dar.

Im weiteren wäre eine Prüfung der Fraktionen, die die spezifischen Antigene enthalten, im ELISA sinnvoll. Die gegen diese Proteine hergestellten Antikörper könnten für das Screening einer cDNA-Bank und die entsprechende Herstellung rekombinanter Proteine verwendet werden. Weiterhin ist die Untersuchung der eventuellen Enzym Eigenschaften des 28-kDa-Protein von Interesse.