

Chemisch-analytische und elektrophoretische Untersuchungen an Seren von *Uromastyx acanthinurus* Bell, 1825 (Sauria: Agamidae)

Andreas Haßl, Dora Haßl

Ameisgasse 63/4/12, A-1140 Wien, Österreich

Abstract. As only little information about the blood chemistry of reptiles is available, a contribution for the establishment of standard values of serum parameters from *Uromastyx acanthinurus* is given. The sera were tested for their contents of total protein, glucose, triglycerides, cholesterol, uric acid, urea, creatinine, bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, - γ -glutamyl-transferase, iron, and calcium. In a countercurrent electrophoresis the serum proteins were separated according to their electrophoretic mobility. Additionally, the molecular masses of the proteins were determined by a discontinuous polyacrylamid gel electrophoresis in the presence of sodiumdodecylsulfate. By means of these techniques the albumin and the 7S-antibodies from the Spiny-tailed lizard sera were characterized.

Zusammenfassung. Seren von Afrikanischen Dornschwänzen (*Uromastyx acanthinurus*) wurden chemisch-analytischen und elektrophoretischen Untersuchungen unterzogen um einerseits den Gehalt der Seren an esamtproteinen und den wichtigsten klinischen Parametern zu messen und andererseits die Mobilität der Serumproteine festzustellen. Zusätzlich wurden die Molekulargewichte des Albumins und der Antikörper in einer SDS-PAGE bestimmt.

Einleitung

Die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter von Seren sowie die Quantifizierung der Serumproteine stellen wichtige diagnostische Hilfsmittel in der Human- und, in zunehmendem Maße, auch in der Veterinärmedizin dar. Bedauerlicherweise sind allerdings von den meisten Reptilienarten, obwohl einige davon beliebte Zoo- und Heimtiere sind, kaum Daten über die Serochemie und über die Immunbiologie bekannt. Wir haben daher versucht, die Normalwerte bestimmter chemischer Parameter aus Seren von Afrikanischen Dornschwänzen (*Uromastyx acanthinurus*) zu ermitteln, wichtige Proteine aus diesen Seren zu isolieren und zu charakterisieren.

Material und Methoden

Die zu unserer Untersuchung herangezogenen Dornschwänze (Nr. 1-3, Angaben zu den Tieren siehe Tab. 1) kamen zwischen 1974 und 1979 als Jungtiere in unseren Besitz, vermutlich stammen sie alle aus Marokko. Seitdem wurden die Tiere in konventioneller Terrarienhaltung gepflegt. Die Punktion erfolgte in der von Joger et al. (1986) beschriebenen Methode Anfang Juli 1986. Die gewonnene Blutmenge schwankte zwischen 200 und 800 μl . Nach dem Zentrifugieren bei 200 g (10 min) wurde das Serum abpipettiert und bei 4° C gelagert. 20 μl Serum des Tieres Nr. 2 wurde auf 1 ml mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; 0,116 M, pH 7,2) aufgespült und mit Polyäthylenglykol (PEG; a.m.u. 6 kDa) versetzt (Endkonzentration des PEG: 50%). Die gefällten Globuline wurden gesammelt, repräzipitiert, gewaschen und in 20 μl PBS gelöst. Mit den Seren und mit den gefällten Globulinen (Ig) wurden, soweit wie möglich und sinnvoll, folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Gesamteiweißbestimmung:

Die Proteinbestimmungen wurden mittels des Protein Assays (Bio Rad. Lab., Wien, Österreich) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Serumalbumin vom Rind wurde als Standard benutzt.

2. Klinisch-chemische Bestimmungen:

Die klinisch-chemischen Bestimmungen wurden in einem Zentrifugalanalyser (Cobas Mira, La Roche, Wien) nach Vorschrift der Herstellerfirma und mit Reagenzien von La Roche durchgeführt. Es wurde der Glucose-, Triglyceride-, Cholesterin-, Harnsäure-, Harnstoff-, Creatinin-, Bilirubin-, Aspartat-Aminotransferase- (GOT), Alanin-Aminotransferase- (GPT), T-Glutamyltransferase- (GGT), Eisen- und Calciumgehalt der Seren gemessen.

3. Bestimmung der Komplementaktivität der Seren:

10 μl von jedem Serum wurden mit 100 μl des Hämolytischen Systems einer Komplementbindungsreaktion (Hammelythrozyten und komplementbindende, lysierende Kaninchenantikörper gegen diese roten Blutkörperchen, geeigneter Puffer; Hersteller: Hygiene-Institut der Universität Wien) gemischt. Nach 60 min bei 37° C wurde die Reaktion mit freiem Auge abgelesen und beurteilt.

4. Serumelektrophorese (Gegenstromelektrophorese):

Die Serumelektrophorese wurde in einer in der Humanmedizin üblichen Weise auf Celluloseacetatfolien mit Elektrophoresegeräten (Microzone Cell R-101, RD-2 Duostat) und Reagenzien der Fa. Beckmann (Wien) durchgeführt (Puffer: Barbitalpuffer pH 8,6; Laufzeit: 20 min bei 23 mA const., 500 V). Die Proteine wurden mit Ponceau Rot gefärbt und die Intensität der Färbung mit einem R-112 Densitometer (Beckmann) bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

5. Molekulargewichtsbestimmung der Serumproteine mittels SDS-PAGE: Elektrophoresen mit Kunststoffgelen (Polyacrylamid; PAGE) als Trägermedien wurden zu sehr effizienten Methoden in der Proteingemischttrennung entwickelt. Die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu den Puffern ermöglicht es, die Proteine ausschließlich nach ihren Molekularmassen (a.m.u.) zu separieren und die a.m.u. exakt zu bestimmen. Wir führten eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli (1970) durch, um zusätzlich zur Molekulargewichtsbestimmung der wichtigsten Serumproteine auch die Bandenmuster der Seren und der Globulinfraktion unter normalen und unter reduzierenden Bedingungen zu studieren. Die SDS-PAGE in Stichworten: Trenngel: ein PAA-Gradientengel 7,5-12,5%; Sammelgel: 3%; Laufstrecke: 0 cm; Laufdauer: 556 Vh bei 20 mA const.; Proben: 5 µl Serum bzw. Globulin in 50 µl Probenpuffer, in einem Parallelversuch wurden die Proben mit 3 µl 2-Mercaptoäthanol versetzt, käufliche Standardproteine (Bio-Rad); Färbung: Coomassie-blue R-250; eine detaillierte Beschreibung der SDS-PAGE-Technik und der Färbung findet sich in Haßl et al. (1987).

Ergebnisse

Die klinisch-chemischen Parameter der Seren sowie einige Kenngrößen der untersuchten Tiere sind in Tabelle 1 aufgelistet. In den Seren konnte keinerlei Komplementaktivität festgestellt werden. Die Ergebnisse der Gegenstromelektrophoresen sind in Abbildung 1, die der SDS-PAGE in Abbildung 2 dargestellt.

Diskussion

In der Literatur werden einige Werte für Serumparameter bei Reptilien angegeben: Gesamtprotein: 3000 bis 7800 mg/dl, für *Uromastix hardwickii*: 3200 mg/dl (De Smet, 1978a); Glucose: >150 mg/dl, für *Uromastix* sp.: 120 mg/dl; Calcium: 9,2-11,6 mg/dl; Harnstoff: <5 mg/dl; Harnsäure: im Normalbereich des Menschen (< 7 mg/dl); Eisen: bis 209 µg/dl (Dessauer, 1970, 1974). Die von uns in den Dornschwanzseren ermittelten Werte fügen sich sehr gut in diese Angaben ein, die hohen Glucosewerte könnten eine Folge der Terrarienhaltung sein (Tabelle 1).

Obwohl im Serum von Agamen (*Agama caudospinosa*) komplementbindende Antikörper festgestellt wurden (Ingram und Molyneux, 1984a), scheinen Kreuzreaktionen zwischen dem Komplementsystem dieser Echsenfamilie und jenem von Säugetieren nicht aufzutreten oder nur sehr schwach ausgebildet zu sein (Ingram und Molyneux, 1984a, b). Die von uns untersuchten Seren zeigten keine Reaktion mit komplementbindenden Säugetierantikörpern, die Durchführung handelsüblicher Komplementbindungsreaktionen mit Dornschwanzseren könnte sich daher als nicht zielführend erweisen.

Gegenstromelektrophoresen von Seren verschiedener Reptilienarten führen zu einer unterschiedlichen Zahl von Fraktionen (Dessauer, 1974; Ingram und Molyneux,

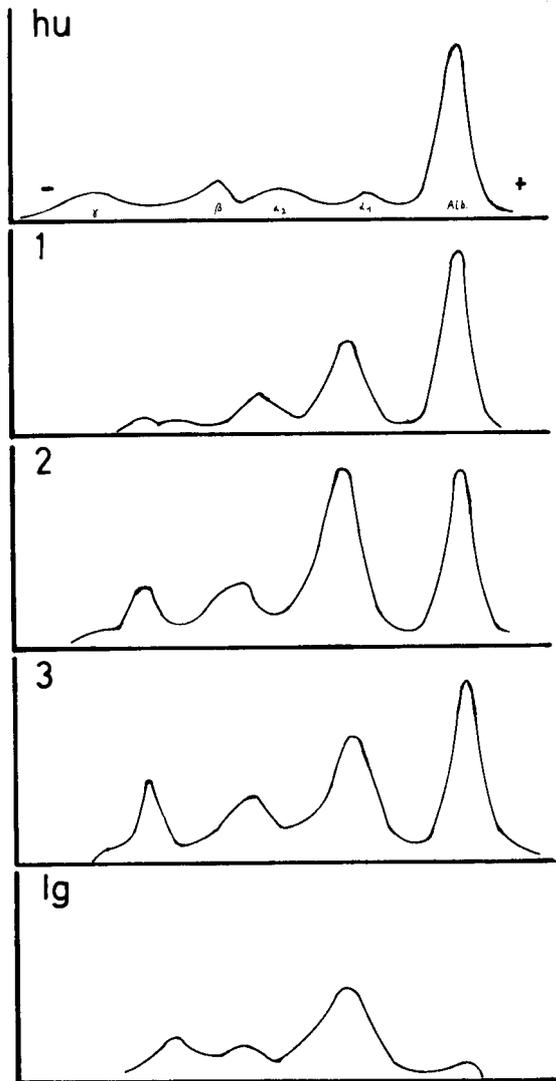


Abbildung 1. Diagramme der Gegenstromelektrophoresen von Seren: hu ... menschliches Kontrollserum, 1-3 ... Seren von *Uromastix acanthinurus*, Tier Nr. 1-3, Ig ... Globulinfraktion des Tieres Nr. 2.

1984b, c; Will, 1975). Die Mobilität dieser Fraktionen kann zwar untereinander und mit jener von Humansen verglichen werden (Masat und Dessauer, 1968; Will, 1975), eine ungeprüfte Homologisierung einzelner Banden erscheint uns jedoch nicht zulässig, da sich die Bandenmuster der verschiedenen Seren deutlich unterscheiden. Durch die von uns durchgeführte Abtrennung der Globulinfraktion vom Restserum ist es möglich, den Albuminpeak zu lokalisieren. Die Albuminmenge im Serum scheint

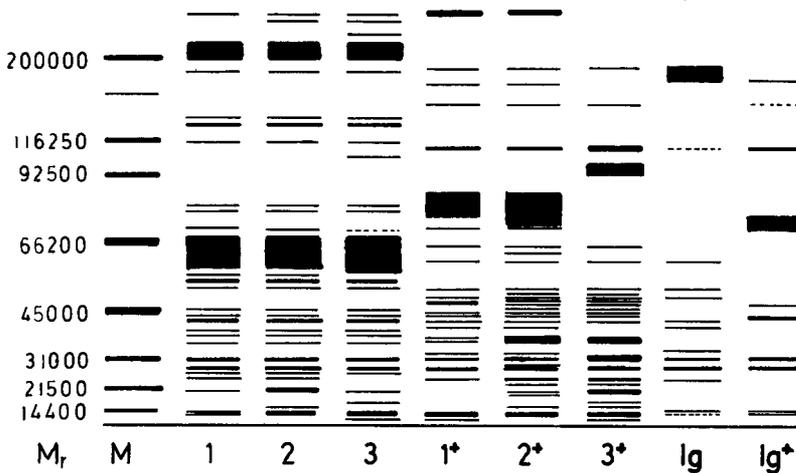


Abbildung 2. Zeichnung der SDS-PAGE-Ergebnisse: M ... Markerproteine, 1-3 ... Seren von *Uromastix acanthinurus* Nr. 1-3, Ig ... Globulinfraktion des Tieres Nr. 2, + ... Proben mit 2-Mercaptoäthanol.

vom Wassergehalt des Lebensraumes abhängig zu sein (Dessauer, 1974), doch ist sie in Reptilienserum durchwegs niedriger als in Humanserum (Masat und Dessauer, 1968, eigene Ergebnisse). Durch die Variabilität des Albumingehaltes in Dornschwanzserum lassen sich die Unterschiede in den Mustern der Serumelektrophoresen zwischen den eigenen Untersuchungen und Literaturangaben mühelos erklären (Dessauer, 1970). Das (fast) vollständige Fehlen einer Fraktion mit einer Mobilität ähnlich jener von hu-

Tabelle 1. Ergebnisse der chemisch-analytischen Studie an Seren von *Uromastix acanthinurus*. nd ... keine Daten vorhanden.

Tier Nr.	1	2	3
Geschlecht	♂	♀	♀
Körperlänge (cm)	29,6	28	24,5
Gewicht (g)	245	200	115
Gesamteiweiß (mg/100 ml)	4660	nd	nd
Glucose (mg/100 ml)	172	158	222
Triglyceride (mg/100 ml)	114	330	110
Cholesterin (mg/100 ml)	392	310	516
Harnsäure (mg/100 ml)	6,08	4,06	4,96
Harnstoff (mg/100 ml)	1,8	3,0	2,2
Creatinin (mg/100 ml)	0,12	0,26	0,2
Bilirubin (mg/100 ml)	0,26	nd	nd
GOT (U/l)	16	nd	nd
GPT (U/l)	16	nd	nd
GGT (U/l)	10	nd	10
Eisen (µg/100 ml)	104	90	116
Calcium (mg/100 ml)	11,1	12,4	13,3

manen γ -Globulinen in den Seren gesunder Agamen wurde auch von anderen Autoren festgestellt (Dessauer, 1974; Ingram und Molyneux, 1984c). Es wird vermutet, daß die niedermolekularen Serumantikörper von Reptilien (= IgG/IgY) in der "p-Fraktion (β_2)" zu finden sind (Ambrosius und Rudolph, 1978), wohingegen das Auftauchen von IgM-Antikörpern (auch bei Reptilien ein Anzeichen für eine akute Krankheitsphase?) zum Entstehen eines (erhöhten) " γ -Globulin"-Peaks führt (Ingram und Molyneux, 1984b).

Die Diskussion der Ergebnisse der SDS-PAGE gestaltet sich schwierig, da keine Erfahrungen mit der Auftrennung von Reptilienserum mittels dieser Technik vorliegen. Es kann allerdings festgehalten werden, daß ein Hauptteil der Serumproteine im Molekularmassenbereich zwischen 60 und 68 kDa zu liegen kommt. Das Fehlen dieser Proteine in der Globulinfraktion (Abb. 2) führt zur begründeten Annahme, daß es sich dabei um die Albumine handelt. Das Molekulargewicht von *U. acanthinurus-Albumin* ist somit deutlich kleiner als von De Smet (1978b) angegeben (für Squamata: 74 kDa), liegt jedoch in dem von Masat und Dessauer (1968) für Reptilien ermittelten Bereich (65-75 kDa). Die Globulinfraktion zeigt eine starke Bande bei 168 kDa; dieses a.m.u. entspricht exakt der Größe von IgY-Serumantikörpern (Ambrosius und Rudolph, 1978). Ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Antikörpern ist der Zerfall dieser Bande und das Auftreten einer neuen Bande (a.m.u. 60-70 kDa) nach Reduzierung der Schwefelbrücken (Abb. 2: 1 + , 2 + , Ig +). Dabei handelt es sich vermutlich um die Schweren Ketten der Antikörper. Eine Erklärung für das abweichende Bandenmuster des Tieres Nr. 3 (Abb. 2: 3 +) konnte nicht gefunden werden.

Danksagung. Frau Dr. Hannelore Dazinger danken wir für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Gegenstromelektrophoresen und der analytischen Untersuchungen.

Literatur

- Ambrosius, H., Rudolph, W. (1978): Grundriß der Immunbiologie. Jena, Gustav Fischer.
- De Smet, W.H.O. (1978a): The total protein content in the blood serum of vertebrates. Acta zool pathol. Antverp. 70: 35-56.
- De Smet, W.H.O. (1978b): Study on the serum albumin and globulin of the vertebrates. Acta zool. pathol. Antverp. 70: 57-83.
- Dessauer, H.C. (1970): Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In: Biology of Reptilia, Vol. 3, p. 1-72. Gans, C., Parsons, T.S., eds., London, Academic Press.
- Dessauer, H.C. (1974): Plasma proteins of Reptilia. In: Chemical Zoology, Vol. 9, p. 187-216. Florkin, M., Scheer, B.T., eds., New York, London, Academic Press.
- Haßl, A., Auer, H., Hermentin, K., Picher, O., Aspöck, H. (1987): Experimental studies on circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in intermediate hosts: criteria for detection and structural properties. Zbl. Bakt. Hyg. A. 263: 625-634.
- Ingram, G.A., Molyneux, D.H. (1984a): A comparison of selected immunological techniques used to detect anti-Leishmanial antibodies in the sera of two reptile species. J. Immunol. Methods 75: 53-64.
- Ingram, G.A., Molyneux, D.H. (1984b): Antigen distribution and humoral response in the lizard, *Agama caudospinosum*, after injection with *Leishmania agamae*. Dev. Comp. Immunol. 8: 339-349.
- Ingram, G.A., Molyneux, D.H. (1984c): Response of European Green Lizards *Lacerta viridis* following administration of *Leishmania agamae* promastigotes. Vet. Parasitol. 17: 1-15.
- Joger, U., Wallikewitz, E., Hauschild, A. (1986): Hormon- und serochemische Untersuchungen zur

Bestimmung des Geschlechtes und zur Überprüfung des Gesundheitszustandes bei *Trachydosaurus rugosus* (Gray, 1827). *Salamandra* **22** (1): 21-28.

Laemmlli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Masat, R.J., Dessauer, H.C. (1968): Plasma albumins of reptiles. *Comp. Biochem. Physiol.* 25: 119-128. Will, R. (1975): Die Verschiebungen des Bluteiweißbildes (Dysproteinaemien) bei Lebererkrankungen von Reptilien (Boidae, Pythonidae, Varanidae). *Zbl. Vet. Med. B.* 22: 635-655.

Eingegangen am 30. Januar 1987