

**Phl p 1: Klonierung und Expression des Majorallergens aus dem
Wiesenslieschgras *Phleum pratense* in der Hefe *Pichia pastoris* und
anschließende funktionelle und strukturelle Charakterisierung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Marco Pöppelmann
aus Westerhorn

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. A. PETERSEN

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. KRISTEN

Tag der Disputation: 06. Dezember 2002

Hamburg, den 20. November 2002

Prof. Dr. U. Wienand

Dekan

Abkürzungsverzeichnis.....

1. Einleitung	1
1.1 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie	1
1.2 Mögliche Allergie-fördernde Einflüsse.....	5
1.3 Therapiemöglichkeiten	7
1.4 Funktion der Allergene	9
1.5 Bisherige funktionelle Untersuchungen am Phl p 1	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Natürliches und rekombinantes Allergen	17
2.1.3 Primäre und sekundäre Antikörper	17
2.1.4 Nährmedien und Puffer	18
2.1.5 Oligonukleotide	20
2.1.6 Vektoren.....	21
2.1.7 Bakterien- und Hefestämme.....	22
2.1.8 DNA- und Proteinmarker	22
2.1.9 Computerprogramme	23
2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	24
2.2.2 Isolierung und Reinigung von DNA.....	24
2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren	25
2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	26

2.2.3.1	Elution von DNA aus Agarosegelen	27
2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR- Produkten	28
2.2.6	Klonierung	30
2.2.6.1	Restriktion von DNA mit Hilfe von Enzymen	31
2.2.6.2	Enzymatische Dephosphorylierung von DNA	31
2.2.6.3	Ligation von DNA-Inserts in Vektor-DNA	32
2.2.7	Herstellung und Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> - Zellen	32
2.2.8	DNA-Sequenzierung	34
2.2.9	Herstellung und Transformation von elektrokompenten <i>Pichia</i> <i>pastoris</i> -Zellen	35
2.2.9.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	40
2.2.9.2	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	41
2.2.9.3	Produktion von rekombinanten Proteinen	41
2.2.9.3.1	Eukaryotische Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine	41
2.2.9.3.2	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	42
2.2.10	Screening einer Mais-cDNA-Bank	43
2.2.10.1	Infektion von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -XL1-Blue-Zellen mit Phagen	43
2.2.10.2	Herstellung einer DIG-markierten Sonde	44
2.2.10.3	Hybridisierung und Detektion von Zea m 1-cDNA	45
2.2.10.4	Rescreening	47
2.2.10.5	<i>In vivo</i> -Excision mit dem ExAssist-Helferphagen	48

2.3 Proteinbiochemische Methoden	50
2.3.1 Herstellung von Graspollenextrakten	50
2.3.2 Isolierung von nPhl p 1 aus Graspollenextrakt	50
2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	51
2.3.4 Isolierung von rPhl p 1 aus <i>Pichia pastoris</i> -Kulturüberstand mit Hilfe eines gegen nPhl p 1 gerichteten monoklonalen Antikörper ..	51
2.3.4.1 Fällung und Reinigung von Antikörpern aus Hybridoma- Überständen	51
2.3.4.2 Kopplung von Antikörpern zur Affinitätschromatographie.....	52
2.3.4.3 Aufreinigung von rPhl p 1	53
2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.3.6 Färbung von Proteinen in Gelen.....	56
2.3.6.1 Färbung mit RotiBlue-Coomassie	56
2.3.6.2 Silberfärbung.....	56
2.3.7 Blotting auf Nitrocellulose-Membranen (NC-Membranen).....	57
2.3.7.1 Western-Blot.....	57
2.3.7.2 India Ink-Färbung	58
2.3.7.3 Färbung mittels AuroDye	59
2.3.7.4 Immunologische Detektion Membran-gebundener Proteine nach Western-Blot.....	59
2.3.7.5 Blotting auf PVDF-Membranen	60
2.3.7.6 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	60
2.3.8 N-terminale Sequenzierung von Proteinen	61
2.3.9 Massenbestimmung durch MALDI-TOF-MS.....	61
2.3.10 Untersuchungen zur Proteaseaktivität.....	61
2.3.10.1 Zymogramme.....	62
2.3.10.2 Bestimmung der Proteasespezifität durch Inhibitoren.....	63

2.3.10.3	Proteasecharakterisierung mittels APIzym-Test	64
2.3.10.4	Proteasecharakterisierung mittels Spaltung fluorochromer Substrate	65
2.3.11	Sequenzvergleich von Phl p 1 mit bekannten Cysteinproteasen	66
2.3.12	Keimung von <i>Phleum pratense</i> - und <i>Zea mays</i> -Pollen.....	66
3.	Ergebnisse	68
3.1	Sequenzvergleich von Phl p 1 mit Cysteinproteasen	68
3.2	Strukturelle Charakterisierung von rPhl p 1	73
3.2.1	Expression von rPhl p 1 in <i>Pichia pastoris</i>	73
3.2.2	Chromatographische Aufreinigung von rPhl p 1 aus Kulturüberstand	73
3.2.3	Massenbestimmung von rPhl p 1 mittels N-terminaler Sequenzierung und MALDI-TOF-Massenspektrometrie	76
3.2.4	Versuche zur Steigerung der Expressionsrate von rPhl p 1	77
3.2.4.1	Langzeitkultur von rPhl p 1 in <i>Pichia pastoris</i>	77
3.2.4.2	Klonierung von rPhl p 1 in dem optimierten Hefevektor pPIC9K.....	79
3.3	Funktionelle Charakterisierung von rPhl p 1	83
3.3.1	Aktivitätsuntersuchungen mittels Zymogramm	83
3.3.2	Hemmung von Proteasen mit Hilfe von Inhibitoren	84
3.3.3	Bestimmung des Substratspektrums der Protease aus <i>Pichia pastoris</i>	85
3.3.4	Untersuchungen zur Proteaseaktivität mittels fluorochromer Substrate	87
3.4	Auslösung der Proteaseaktivität von Phl p 1	90
3.5	Voruntersuchungen für <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Studien zur Funktion von Phl p 1	98

3.5.1	Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum.....	98
3.5.2	Bestimmung der Allergensequenz vom Zea m 1.....	99
3.5.3	Pollenschlauchwachstumstest mit Zea mays-Pollen	104
4.	Diskussion	105
4.1	Strukturelle Charakterisierung von rPhl p 1	106
4.1.1	Untersuchung der zwei rPhl p 1-Produkte nach Expression in <i>Pichia pastoris</i>	106
4.1.2	Strategien zur Erhöhung der Ausbeute von rPhl p 1	109
4.2	Funktionelle Charakterisierung von rPhl p 1	111
4.2.1	Verbesserung der Zymogramm-Technik	111
4.2.2	Detektion einer Serinprotease im Hefekulturüberstand	114
4.2.3	Überprüfung von proteolytischer Aktivität in verschiedenen Testsystemen	116
4.2.4	Darstellung der Proteaseaktivität des N-terminal verkürzten Phl p 1 (vrPhl p 1).....	117
4.3	Sequenzvergleiche von Phl p 1 zu bekannten Cysteinproteasen...	121
4.4	Funktionelle Wirkung der Gruppe I-Gräserallergene	128
4.4.1	Phl p 1 gehört zu den β -Expansinen	128
4.4.2	Wirkmechanismus des Phl p 1 nach Cosgrove et al. (1997 b)	130
4.4.3	Vermutete Wirkungsweise von Phl p 1 als Protease	132
4.5	Möglicher Einfluss von Phl p 1 auf den Pathomechanismus der Allergie.....	136
5.	Zusammenfassung.....	140
6.	Ausblick.....	142
7.	Literaturverzeichnis	144

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
AK	Antikörper
AOX	Alkoholoxidase
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMDY	Buffered Minimal Dextrose & Yeast extract
BMGY	Buffered Minimal Glucose & Yeast extract
BMMY	Buffered Minimal Methanol & Yeast extract
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälbermägen
CPY	Carboxypeptidase Y
CPYS	Carboxypeptidase Y aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylentetraessigsäure
EMBL	Europäisches Labor für Molekularbiologie (European Molecularbiology Laboratory, Mainz)
FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fluid phase liquid chromatography
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
M	Molar (mol/l)
mAk	monoklonaler Antikörper

MCS	Multiple cloning site
MES	2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure
NaJ	Natriumjodid
NBT	Nitroblau-tetrazolium-chlorid
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnological Information
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Saline)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
SwissProt	Proteindatenbank
TE	Tris-EDTA
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

Nukleinsäuren:

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
NTP	Nukleotidtriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure

Aminosäuren:

A (Ala)	Alanin	M (Met)	Methionin
C (Cys)	Cystein	N (Asn)	Asparagin
D (Asp)	Asparaginsäure	P (Pro)	Prolin
E (Glu)	Glutaminsäure	Q (Gln)	Glutamin
G (Gly)	Glycin	S (Ser)	Serin
H (His)	Histidin	T (Thr)	Threonin
I (Ile)	Isoleucin	V (Val)	Valin
K (Lys)	Lysin	W (Trp)	Tryptophan
L (Leu)	Leucin	Y (Tyr)	Tyrosin
Hyp	Hydroxyprolin		

1. Einleitung

Die Allergie gilt heutzutage als Umweltkrankheit Nummer eins, da laut Schätzungen etwa 22 % der Bevölkerung in den Industrienationen (mit steigender Tendenz) an ihr leiden (Jarvis und Burney, 1997). Sie ist als eine Veränderung der Immunantwort gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen zu verstehen, die in eine schädigende Überreaktivität münden kann.

Je nach immunologischem Effektormechanismus lassen sich vier verschiedene Typen der Allergie unterscheiden: Die Typ I-Allergie ist IgE-vermittelt und wird auch als Allergie vom Soforttyp bezeichnet. In der Regel wird die Typ II-Allergie durch IgG-Antikörper vermittelt. Dabei kommt es zu einer zytotoxischen Reaktion infolge einer Aktivierung des Komplementsystems und Zerstörung körpereigener Zellen. Die Typ III-Allergie wird durch Immunkomplexe ausgelöst, die lokale Entzündungen verursachen. Die Reaktionen einer Typ IV-Allergie (Allergie vom verzögerten Typ) werden bei sensibilisierten Personen durch modifizierte körpereigene oder fremde Proteine verursacht, wenn die T-Lymphozyten erneut mit diesen Proteinen in Kontakt kommen. Allerdings tritt die Reaktion erst nach Tagen auf (Janeway und Travers, 1995).

1.1 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Die häufigste Erscheinungsform der immunologischen Überreaktion ist die Typ I-Allergie. Deren Symptome zeichnen sich durch allergisches Asthma, Konjunktivitis, Rhinitis, Urticaria und im geringem Umfang auch durch die Anaphylaxie aus. Verursacht werden die Beschwerden von Allergenen aus unterschiedlichen Quellen, z. B. von Tieren (sekretierte und exkretierte Allergene) (Chapman und Wood, 2001). Ferner gehören Pollen aus monokotylen und dikotylen Pflanzen, Milben, Insekten, Schimmelpilze, Nahrungsmittelbestandteile und Medikamente (z. B. Penicillin) zu den häufigsten Allergenquellen (Sonenthal und Shaughnessy, 1993). Die isolierten Allergene werden nach der international festgelegten Allergennomenklatur bezeichnet. Den drei ersten Buchstaben des Gattungsnamens folgen der erste Buchstabe des Artnamens und einer die Allergengruppe bezeichnende Nummer (King et al., 1994).

Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie lässt sich in zwei Phasen einteilen: die Sensibilisierung mit einem Allergen und die allergische Reaktion nach erneuter Exposition mit dem gleichen Allergen. In Abb. 1 ist der Pathomechanismus schematisch dargestellt.

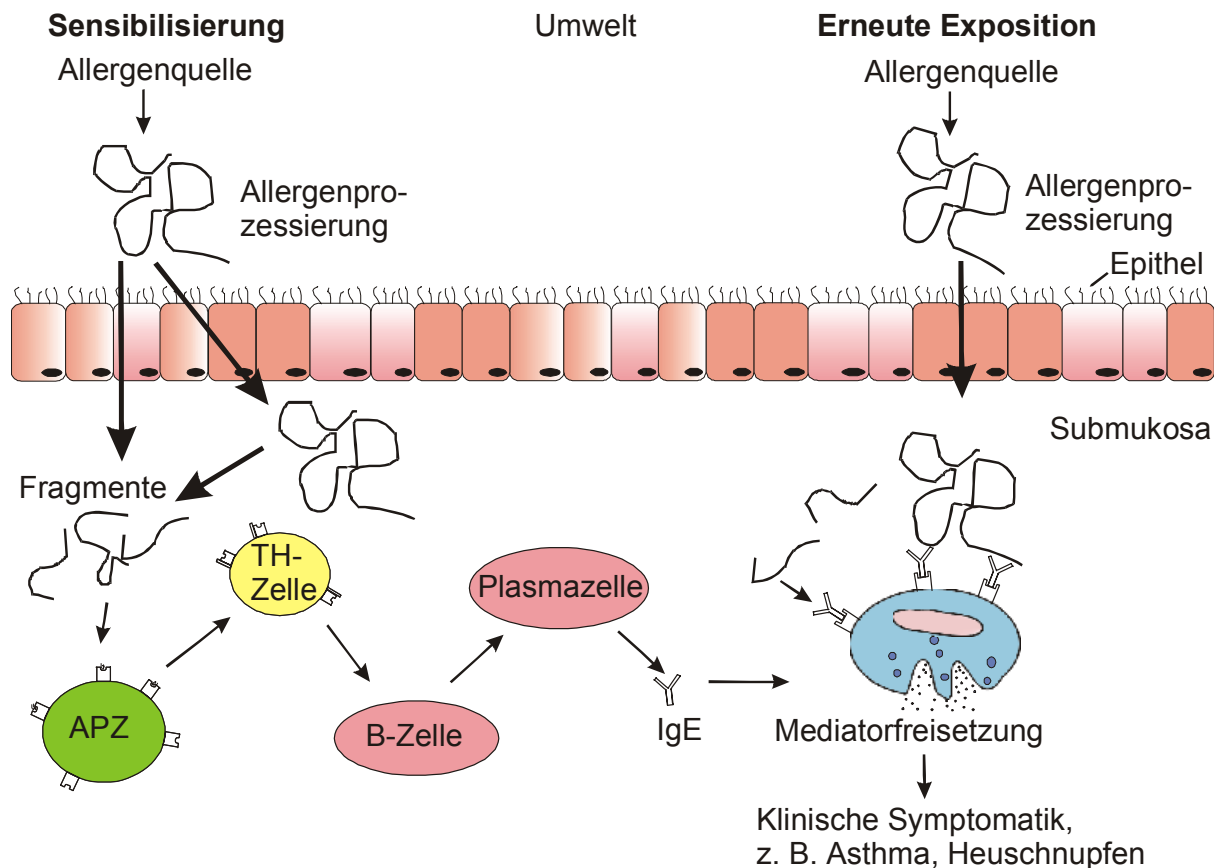


Abb. 1: Pathomechanismus der Typ I-Allergie (verändert nach Holgate et al., 1996). APZ = Antigen-präsentierende Zelle; B-Zelle = B-Lymphozyt; IgE = Immunglobulin E; TH-Zelle = T-Helferzelle.

Die Sensibilisierung eines Organismus durch ein Allergen erfolgt nach Überwindung der epithelialen Barriere. Das Allergen oder Allergenfragmente werden anschließend von Antigen-präsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) aufgenommen. Durch proteolytischen Abbau in den Lysosomen wird das Allergen in Form von Peptiden (etwa 10 bis 12 Aminosäuren) an den MHC II-Rezeptor gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert (Vercelli, 1995). An diesen Peptid-MHC II-Rezeptor-Komplex binden T-Lymphozyten (CD4+-T-Zellen) spezifisch über ihren T-Zellrezeptor (TCR). Die Entwicklung der CD4+-T-Zellen aus

Vorläuferzellen und deren Differenzierung in T-Helferzellen vom Typ 1 oder Typ 2 (TH1- und TH2-Zellen) ist in Abb. 2 dargestellt.

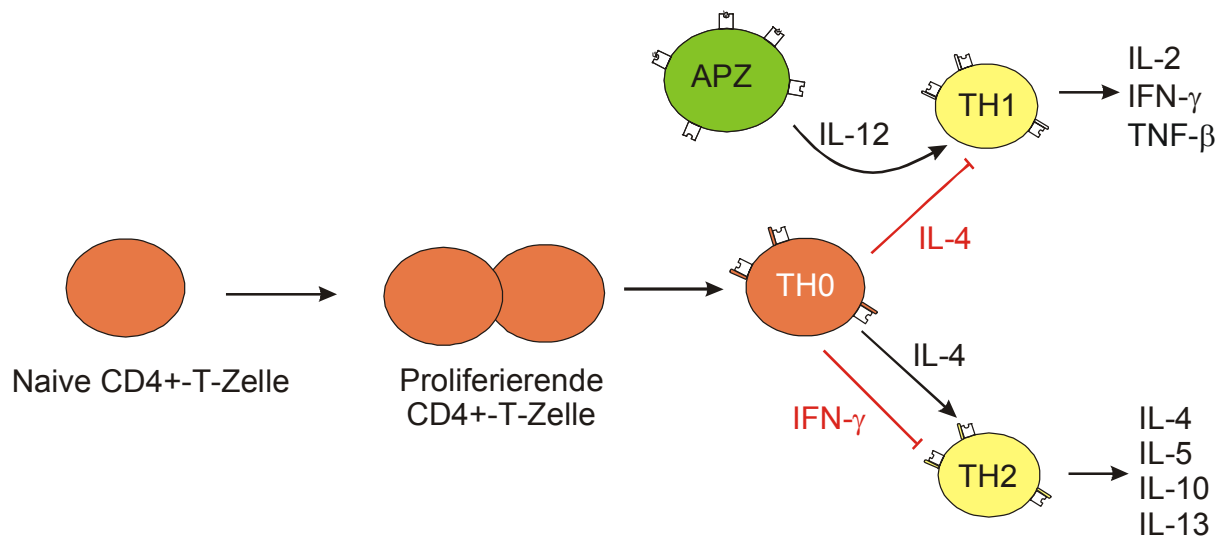


Abb. 2: Entwicklungsstadien von CD4+-T-Zellen. APZ = Antigen-präsentierende Zelle; B-Zelle = B-Lymphozyt; IgE = Immunglobulin E; IL = Interleukin; IFN-γ = Interferon-γ; TH-Zelle = T-Helferzelle; TNF-β = Tumornekrose Faktor-β.

Naive CD4+-T-Zellen proliferieren nach dem Erstkontakt mit einem an den MHC II-Rezeptor gebundenen antigenen Peptidfragment und unter Bildung von IL-2 (Sagerström et al., 1993). Aus diesen Zellen entwickeln sich unreife TH0-Zellen, die sowohl TH1- als auch TH2-Zell-spezifische Cytokine (TH1-Cytokine = IL-2, IFN-γ, TNF-β; TH2-Cytokine = IL-5, IL-10) sekretieren (Bendelac und Schwartz, 1991; Mori et al., 1995). Für die Proliferation einer TH1-Zelle aus TH0-Zellen ist IL-12 essentiell (Manetti et al., 1993), welches von Antigen-präsentierenden Zellen gebildet wird (Übersicht in Kapsenberg et al., 1999). Durch die Produktion von IFN-γ wird ein Milieu gefördert, das die „TH1-Immunantwort“ ermöglicht und die Entwicklung von TH2-Zellen unterdrückt. Die TH1-Zellen vermitteln durch die Aktivierung von Makrophagen die zelluläre Immunantwort (Salgame et al., 1991). Obwohl IL-12 zu den TH1-Zell-spezifischen Cytokinen zählt, ist es in Verbindung mit einer Antigenstimulation in der Lage, eine transiente und sehr geringe Expression von IFN-γ in TH2-Zellen zu induzieren (Manetti et al., 1994). Des weiteren kann es eine IL-4-Produktion von TH2-Zellen verstärken (Jeannin et al., 1995). Ein Mangel von IL-12 führt in Verbindung mit einer Überproduktion von IL-13 zu einer TH2-polarisierten Antwort mit den Folgen einer allergischen Reaktion (Wills-Karp, 2001).

Das TH2-Zell-spezifische Cytokin IL-4 sorgt für eine verstärkte TH2-Immunantwort bei einer gleichzeitigen Unterdrückung einer TH1-Zellproliferation.

Die TH2-Zellen aktivieren B-Lymphozyten (s. Abb. 1), die sich dann zu IgE-produzierenden Plasmazellen entwickeln (Maggi, 1998). In Mäusen sekretieren die T-Helferzellen vom Typ 2 im Zusammenspiel mit zusätzlichen co-stimulatorischen Signalen IL-4 und IL-13, die die Antikörperproduktion von IgE und IgG1 fördern (Romagnani, 1998). Ferner können die von TH2-Zellen produzierten Cytokine IL-5 und IL-10 im Zusammenspiel mit IL-4 und IL-13 viele Funktionen von Makrophagen inhibieren und besitzen somit direkten Einfluss auf die zelluläre Immunantwort (Nakamura et al., 1997). Nachfolgend wird als co-stimulatorisches Signal der CD40-Ligand auf den TH2-Zellen hochreguliert, der mit dem CD40-Molekül auf der B-Zelloberfläche in Kontakt tritt (Armitage et al., 1993). Durch die Stimulierung mittels IL-4 und IL-13 sowie dem Zellkontakt zu CD4⁺-T-Zellen proliferiert die B-Zelle und es kommt zu einem Isotypenwechsel der Immunoglobulinklasse von IgM zu IgE (van der Stoep et al., 1994). Die Differenzierung der B-Zellen zu IgE-sezernierenden Plasmazellen wird durch IL-10 gefördert (Choe und Choi, 1998). Die IgE-Antikörper binden mit ihrem Fc-Teil an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI), der vorwiegend auf Mastzellen und basophilen Granulozyten (Basophile) vorhanden ist (Metzger et al., 1982). Das an die Zelloberfläche gebundene IgE bindet nach erneutem Kontakt des Organismus mit der Allergenquelle das Allergen. Dadurch werden die IgE-Rezeptoren quervernetzt, was schließlich zu einer Degranulation der Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten führt (Kagey-Sobotka et al., 1982). Das freigesetzte Histamin führt zu einer kurzzeitigen lokalen Reaktion in den Blutgefäßen, der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt (Chand und Eyre, 1975). Ein längeranhaltender Effekt wird durch weitere Mediatoren wie z. B. Leukotriene erreicht, die nach Mastzell- bzw. Basophilenaktivierung synthetisiert werden (Schleimer et al., 1985). Etwa sechs Stunden nach dem Allergenkontakt kommt es innerhalb der Spätphase der Typ I-Allergie, die etwa sechs bis zwölf Stunden andauern kann, zu lokalen und systemischen Reaktionen. Innerhalb dieser Zeit haben eosinophile Granulozyten die Haut und das Lungengewebe infiltriert und lösen durch Ausschüttung von Mediatoren und toxischen Substanzen eine inflammatorische Reaktion aus (Massey, 1993). Diese Zellen werden vor allem von IL-5 und GM-CSF (Granulocyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) angelockt, die auch das Überleben der Zellen während der Spätphase sichern (Ohnishi et al., 1993). Die Hauptaufgabe der

Eosinophilen besteht in der Abwehr von Parasiten wie z. B. Helminthen, die nicht phagozytiert werden können und durch Läsion unschädlich gemacht werden (Scott et al., 1989). Basophile, Mastzellen, sowie spezielle CD4⁺-T-Zellen sekretieren IL-5 und nehmen dadurch direkten Einfluss auf das Anlocken, das Wachstum und die Differenzierung der Eosinophilen (Schleimer et al., 1985).

Sämtliche Untersuchungen sind *in vitro* oder in Mäusen durchgeführt worden. Insbesondere beim Menschen scheint eine klare Trennung zwischen TH1- oder TH2-vorherrschendem Milieu nicht möglich zu sein. Dennoch gibt es eine Abgrenzung zwischen beiden Antworten durch die von den jeweiligen T-Zelltypen sekretierten Cytokinen. Sie stimulieren das Wachstum der einen T-Zellsubpopulation und inhibieren gleichzeitig das Wachstum der anderen, was als Crossregulation bezeichnet wird (Morel und Oriss, 1998).

1.2 Mögliche Allergie-fördernde Einflüsse

Die Allergie stellt eine komplexe Krankheit dar, die durch viele Faktoren beeinflusst wird. Umweltbedingte und genetische Einflüsse spielen dabei eine wesentliche Rolle, wobei kein Punkt für sich isoliert betrachtet werden kann. Vielmehr beeinflussen die Umweltfaktoren im Zusammenspiel mit dem genetischen Hintergrund die Entwicklung einer Allergie (Skadhauge et al., 1999).

Eine Prädisposition für eine Allergie scheint schon im Mutterleib festgelegt zu sein (Cookson, 1999). Im intrauterinen Gewebe entwickeln sich vermehrt TH2-Zellen bei einer gleichzeitigen IgE-Produktion. Dabei kann die mütterliche Ernährung eine TH2-Proliferation begünstigen (Howarth, 1998). Besitzt schon die Mutter eine Allergie, so ist das Risiko, an einer Allergie zu erkranken, doppelt so hoch im Vergleich zu einem allergischen Vater (Aberg, 1993). Ein Asthma-auslösendes Gen ist bislang noch nicht identifiziert worden. Es gibt jedoch Hinweise, dass bestimmte Genloci auf Chromosom 5 im Zusammenhang mit einem erhöhten IgE-Serumspiegel und einer bronchialen Hyperreagibilität stehen (Martinez, 1997). Auf diesem Chromosom sind eine Reihe von Genclustern der Cytokine (IL-4, IL-13, IL-5, IL-3, GM-CSF, IL-6 und IL-9) lokalisiert, die mit ursächlich für eine allergische Reaktion sind (Holgate et al., 1995). Ein Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Leucin an Position 181 innerhalb der Transmembrandomäne der β -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI),

dessen Genlocus auf dem Chromosom 11 liegt, ist ein weiterer genetischer Marker einer Atopie (Shirakawa et al., 1994). Ferner scheint ein direkter Zusammenhang zwischen HLA-Klasse II (Human Leucocyte Antigen und ist die genetische Bezeichnung für humane Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC)) und einer IgE-vermittelten Immunantwort auf Allergene zu existieren (Cardaba et al., 1996; Matsuoka et al., 1996). Es wird außerdem diskutiert, dass die Struktur des T-Zellrezeptors einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Allergie ausübt (Chen et al., 1996).

Lopez et al. (1999) zeigten, dass die Ausbildung einer Atopie im starken Maße von Umweltbedingungen abhängt. Dabei spielen die Gase Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Ozon eine eher untergeordnete Rolle (Charpin et al., 1999). Eine wesentlich größere Bedeutung wird dem Dieselruß zugeschrieben. Dieser kann in Verbindung mit Allergenen wie z. B. Can f 1 (Hauptallergen vom Hund), Fel d 1 (Hauptallergen der Katze), Bet v 1 (Hauptallergen aus Birkenpollen), Der p 1 (Hauptallergen der Hausstaubmilbe) sowie Lol p 1 (Hauptallergen aus Lolchgraspollen), die an den Rußpartikeln haften können, das allergische Asthma fördern (Takano et al., 1997; Knox et al., 1997). Ein weiterer Risikofaktor stellt der mittels Passivrauchen eingeatmete Zigarettenrauch dar, wie an Mäusen gezeigt wurde (Rumold et al., 2001).

Obwohl eine starke genetische Prädisposition gegenüber Umweltfaktoren ein höheres Risiko für eine allergische Erkrankung darstellt (Svanes et al., 1999), besitzen frühkindliche Infektionen, die vermutlich die Antwort der TH-Zellen modulieren, einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung einer Allergie (Howarth, 1998). Eine Reduktion der Infektionsrate aufgrund des westlichen Lebensstandards scheint an der Zunahme allergischer Erkrankungen beteiligt zu sein (Howarth, 1998). So besitzen z. B. Kinder aus Familien, die einen anthroposophischen Lebensstil bevorzugen, eine wesentlich geringere Präferenz gegenüber einer Atopie als solche, die z. B. viele Impfungen und Antibiotika bekommen, sowie wenig Lactobazillen-haltige Nahrung gegessen haben (Alm et al., 1999). Endotoxin und andere bakterielle Komponenten, wie sie vermehrt z. B. auf Bauernhöfen vorkommen, könnten eine protektive Funktion ausüben und eine Allergie verhindern (von Mutius et al., 2000). Allerdings können Lipopolysaccharide (LPS), Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, unterschiedliche T-Zellreaktionen hervorrufen. So konnte gezeigt werden, dass LPS aus *Escherichia coli* in Verbindung mit einem

Allergen eine TH1-ähnliche Antwort induziert. Andererseits fördert LPS von *Porphyromonas gingivalis*, einem oralen Pathogen, eine Ausprägung in Richtung eines TH2-Milieus (Pulendran et al., 2001). Viren, die den oberen respiratorischen Trakt infizieren, können eine Verstärkung von Asthma bewirken, indem sie eine erhöhte IL-5-Produktion bei gleichzeitiger Abnahme der IFN- γ -Produktion induzieren (Coyle et al., 1996 a). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge, die eine inflammatorische Reaktion bewirken. So konnte anhand des respiratorischen syncytialen Virus (RSV) in Mäusen klar gezeigt werden, dass es nach einer Infektion zu einer Hyperreaktivität und einer verstärkten Sensibilisierung gegenüber einem Allergen kommt (Schwarze et al., 1997). Neben einer viralen Infektion können auch ungünstige psychosoziale Faktoren eine Allergie fördern (Smith und Nicholson, 2001). Sehr kontrovers diskutiert wird die Frage, ob die steigende Tendenz der Atopie mit der fehlenden Konfrontation der Menschen der westlichen Welt mit Helminthen einhergeht (sog. „Urwaldhypothese“). Parasitäre Würmer induzieren eine TH2-Antwort und können so die Immunabwehr beeinflussen. Obwohl viele Daten für eine protektive Funktion von Würmern gegenüber einer Asthmaentwicklung sprechen, gibt es keine überzeugenden Beweise für diese These (Weiss, 2000).

1.3 Therapiemöglichkeiten

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist für eine effektive Behandlung einer allergischen Erkrankung mit definierten Allergenen bislang am effektivsten. Da Allergenextrakte nicht standardisiert sind und aufgrund der Vielzahl an Proteinen zudem die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks besteht, wurden in den letzten Jahren vermehrt chemisch und strukturell veränderte Allergene für die SIT eingesetzt. Dabei spielen immer mehr rekombinante Allergene eine Rolle. Diese werden schon verstärkt für die Diagnose eingesetzt und bieten den Vorteil isolierte Einzelallergene testen zu können, während die Aufreinigung aus Extrakten zum Teil zu aufwendig ist (Schmid-Grendelmeier und Crameri, 2001). Ein rekombinant hergestelltes Hauptallergen aus dem Birkenpollen (Bet v 1) wurde so modifiziert, dass ausschließlich die Produktion von IgG-Antikörpern induziert wird. Aufgrund der fehlenden IgE-bindenden Epitope kann das Immunsystem in Richtung einer TH1-

Antwort moduliert werden (Vrtala et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der SIT ist die Synthese von nicht-anaphylaktischen Peptiden. Daher wurde angestrebt, die B-Zellepitope zu modifizieren, um eine IgE-Bindung und eine nachfolgende Mediatorausschüttung von Effektorzellen zu verhindern. Durch den Erhalt der T-Zellepitope sollte dann eine Toleranz gegenüber dem modifizierten Allergen induziert werden (Akdis und Blaser, 2000). Solche B-Zellepitop-depletierten Peptide konnten für zwei Hauptallergene aus dem Wiesenlieschgras (Phl p 1, Phl p 5b) hergestellt werden (Schramm et al., 1999; Focke et al., 2001).

Nicht nur die Proteinsequenz, sondern auch die dreidimensionale Struktur (die Konformation) eines Proteins kann bei der Allergenität des Moleküls eine große Rolle spielen. Konformationell veränderte Phospholipase A2, das Hauptallergen aus dem Bienengift, führt zu einer TH1-geprägten Immunantwort und zeigt einen neuen Weg in der Immuntherapie (Akdis et al., 1998). Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht in der Eliminierung der Allergenität eines Proteins durch die Produktion von Antisense-RNA, wie es am Beispiel von Lol p 5, einem Allergen aus dem Lolchgraspollen, gezeigt wurde (Bhalla et al., 2001). Diese Methode ist jedoch kaum praktikabel, da Pollen eine Vielzahl an Allergenen besitzen und diese Methode für jedes Einzelallergen durchgeführt werden müsste.

Wesentlich effektiver scheint eine DNA-Vakzinierung zu sein. Mäuse wurden bereits erfolgreich mit Allergen-DNA geimpft, die die T-Zellepitope von Der p 1 und Der p 2, zwei Hauptallergene aus der Hausstaubmilbe, beinhaltet. Dadurch wurde eine Verschiebung zu einer TH1-Antwort erreicht (Kwon et al., 2001). Außerdem scheint die Allergen-Impfung in Verbindung mit bakterieller DNA, die viele CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) beinhalten, einen positiven Therapieeffekt zu besitzen. CpG-ODN können B-Lymphozyten aktivieren und eine Sekretion von TH1-Cytokinen induzieren (Kline et al., 1998; Serebrisky et al., 2000). Neuere Daten lassen darauf schließen, dass eine Kombination von CpG-ODN und Allergen-DNA einen günstigeren Verlauf für eine TH1-Antwort nimmt als die Kombination von CpG-ODN und Allergen-Protein (Hochreiter et al., 2001).

Ein weiterer Ansatz ist die Injektion von Anti-IgE-Antikörpern, durch die die Konzentration des IgE im Serumspiegel reduziert werden kann (Coyle et al., 1996 b). Aber auch diese Methode stellt aus finanziellen und fehlenden kurativen Gründen keine echte Alternative zu der SIT dar.

1.4 Funktion der Allergene

Die große Frage, was ein Antigen letztlich zum Allergen macht, ist nach wie vor nicht beantwortet. Allergene sind für gewöhnlich Proteine oder Glykoproteine mit einer Masse zwischen 5 und 60 kDa, wobei die meisten 20 bis 40 kDa aufweisen (Sonenthal und Shaughnessy, 1993). Möglicherweise spielt die Funktion wie z. B. eine enzymatische Aktivität eines Proteins für die Allergenität und die Induktion einer allergischen Entzündung eine entscheidende Rolle. Einen Überblick über viele bekannte Einzelallergene mit deren natürlichen Funktionen ist in einem Übersichtsartikel von Bufe (1998) zusammengefasst worden.

Die folgenden Beispiele machen die Vielzahl der *in vivo*-Funktionen der Allergene deutlich.

1. Transportproteine:

Zu den wichtigsten Allergenen der Säugetiere, die von Katzen, Hunden, Ratten, Mäusen, Pferden und Rindern sekretiert oder exkretiert werden, zählt die Familie der Lipocaline (Chapman und Wood, 2001). Lipocaline sind eine sehr diverse Gruppe von über 50 Proteinen, deren Funktion die Bindung und der Transport von kleinen hydrophoben Molekülen ist. Sie besitzen eine Masse von 16 bis 20 kDa und zeigen untereinander nur eine sehr geringe Sequenzidentität zwischen 20 und 25 %. Allerdings existieren drei konservierte strukturell wichtige Bereiche, in denen die Liganden gebunden werden (Chapman und Wood, 2001). Ein weiteres allergen wirkendes Transportprotein ist das aus der Mücke *Chironomus riparius* (= *thummi*) isolierte Hämoglobin (Chi t 1) (Tee et al., 1985).

2. Speicherproteine:

Sehr bedeutende Allergene, die über die Nahrung aufgenommen werden, sind die Speicherproteine. Am bekanntesten sind die Viciline, zu denen das Ara h 1 aus der Erdnuss (Burks et al., 1997) und das Gly m 1 aus der Sojabohne (Shutov et al., 1996) gehören. Nahrungsmittelallergene zeichnen sich im allgemeinen durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Degradation durch Proteasen des Gastrointestinaltraktes aus. Nach Inkubation von Ara h 1 mit Verdauungsenzymen entstehen viele Protease-resistente Fragmente, die noch mehrere IgE-bindende Epitope besitzen (Maleki et al., 2000). Eine weitere bedeutende Gruppe der

Nahrungsmittelallergene werden durch die Lipidtransferproteine repräsentiert. Dies sind kleine und sehr stabile Moleküle mit einer Größe von etwa 10 kDa, die als erstes in Rosaceen gefunden wurden. Sie gehören zu einer strukturell stark homologen Proteinfamilie, die auch in anderen Pflanzen wie z. B. Nüssen gefunden wurden (Asero et al., 2000).

3. Strukturproteine:

Allergie-induzierende Strukturproteine sind die u. a. in Pflanzenpollen verbreiteten Profilinen, zu denen das Bet v 2 aus der Birke (Valenta et al., 1991) und Phl p 11 aus dem Wiesenlieschgras zählen (Valenta et al., 1994). Innerhalb der Crustaceen ist die Tropomyosin-Familie mit einer Masse zwischen 34 und 36 kDa als Quelle relevanter Strukturallergene zu nennen, die über die Nahrung aufgenommen werden (z. B. Met e 1 (Leung et al., 1994); Pen a 1 (Daul et al., 1994); Pan s 1 (Leung et al., 1998)).

4. Pflanzen-spezifische Enzyme:

Diese Beispiele machen deutlich, dass von der Funktion eines Proteins nicht zwangsläufig auf dessen Allergenität geschlossen werden kann. So ist Phl p 13 als eine Polygalacturonase identifiziert worden (Suck et al., 2000). Ein Hauptallergen aus der Olive, Ole e 9, ist als eine 1,3- β -Glucanase klassifiziert worden (Huecas et al., 2001). Beide Enzyme sind als Zellwand-modifizierende Proteine nur bei den höheren Pflanzen vertreten.

5. Proteaseinhibitoren:

Eine wesentlich weitere Verbreitung finden Proteaseinhibitoren. Sie kommen z. B. im Tierreich (Fel d 3 als Cysteinproteaseinhibitor der Katze (Ichikawa et al., 2001)) oder auch im Pflanzenreich (Hor v 1 als Trypsininhibitor der Gerste (Barber et al., 1989); Sol t 2, Sol t 3.0101, Sol t 3.0102 und Sol t 4 als Cathepsin D-, Cysteinprotease- und Trypsininhibitor der Kartoffel (Seppala et al., 2001)) vor.

6. Serinproteasen:

Die Klasse der Serinproteasen ist durch den Aufbau des katalytisch wirksamen aktiven Zentrums charakterisiert, in dem die Aminosäuren His 57, Asp 102 und

Ser 195 (auf die Trypsinsequenz als am besten untersuchte Serinprotease bezogen) für die Substratumsetzung verantwortlich sind.

Während die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ (Api m 1) aus dem Bienengift keine Auswirkung auf die spezifische Aktivierung und Cytokinproduktion von T-Lymphozyten bzw. auf die IgE-Synthese von B-Lymphozyten besitzt (Wymann et al., 1998), können proteolytisch aktive Allergene den Organismus an vielen Stellen schädigen. Aus Pilzen sind solche Proteine isoliert und als Serinproteasen charakterisiert worden (Pen c 1 (Su et al., 1999); Pen c 2 (Chow et al., 1999; Pen n 13 (Chow et al., 2000)). Sie können mit Epithelzellen interagieren und sie morphologisch verändern. Weiterhin sind die Pilzproteasen in der Lage, die Integrität der Zellen zu stören und die Produktion proinflammatorischer Cytokine zu induzieren (Robinson et al., 1990; Kauffman et al., 2000).

7. Cysteinproteasen:

Die Cysteinproteasen werden hinsichtlich der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren Cys 25, His 159 und Asn 175 (auf die Papainsequenz bezogen) klassifiziert.

Am besten ist das Hauptallergen aus der Hausstaubmilbe, der Cysteinprotease Der p 1, untersucht (Chua et al., 1988). Die Daten, in wie weit die Funktion von Der p 1 eine Rolle bei der Allergenität bzw. der Pathogenese der Allergie spielt, wurden durch *in vitro*-Untersuchungen und *in vivo* an Mäusen erzielt. Anhand dieser Ergebnisse wurden Modelle entwickelt, die bislang aber noch nicht *in vivo* nachgestellt werden konnten.

Aufgrund der Cysteinprotease-Aktivität von Der p 1 könnte dieses Allergen in der Lage sein, die Permeabilität durch das Bronchialepithelium zu erhöhen (Herbert et al., 1995), die Zellen zu lösen, sowie die Produktion proinflammatorischer Cytokine anzuregen (Tomee et al., 1998). Durch Spaltung bestimmter Peptide innerhalb von Tight Junctions, als leistenartige, undurchlässige Verbindung der Außenflächen von zwei aneinanderliegenden Zellmembranen Bestandteil der Permeabilitätsbarriere von Epithelzellen, kommt es zu der Erhöhung der Permeabilität und einem Eindringen des Gesamtallergens in den Organismus (Wan et al., 1999; Wan et al., 2000). In dem Kreislauf angelangt, ist Der p 1 zu einer Spaltung von dem niedrigaffinen IgE-Rezeptor (CD23) von B-Zellen fähig. Der lösliche Rezeptor (sCD23) führt zu einer Erhöhung des löslichen IgE mit einer gesteigerten IgE-Produktion (Schulz et al.,

1995; Gough et al., 1999). Als Folge der Spaltung des CD23-Moleküls kommt es im Lungengewebe zu einer verstärkten Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und einer erhöhten bronchialen Hyperreaktivität infolge der von den Eosinophilen sekretierten Cytokine (Riffo-Vasquez et al., 2000). Durch die Abspaltung des IL-2-Rezeptors von TH1-Zellen und der damit verbundenen Verlagerung der Immunantwort zu einem TH2-geprägten Milieu trägt Der p 1 auf T-Zell-Ebene zu einer allergischen Reaktion bei (Schulz et al., 1998 b). Einen natürlichen Schutz gegenüber der proteolytischen Aktivität wird von dem im bronchialen Gewebe lokalisierten α_1 -Antiprotease-Inhibitor vermittelt (Hewitt et al., 1995), der allerdings durch Zigarettenrauch in seiner inhibitorischen Funktion gestört sein und die Wirkung von Der p 1 sogar noch potenzieren kann (Evans und Pryor, 1994; Rusznak et al., 2001). Zwei aus der Ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*) isolierte Endopeptidasen können diesen α_1 -Antiprotease-Inhibitor sowie Neuropeptide, die eine bronchiale Hyperreaktivität vermindern, spalten. Aufgrund der fehlenden Wirkung der Neuropeptide kommt es zu einer Verengung der Atemwege und zu einer Hyperreaktivität der Lunge und damit zu einer Förderung des Asthmas (Bagarozzi et al., 1996). Diese und weitere vaso- und neuroaktiven Peptide werden von einer Protease aus Mesquitepollen (*Prosopis velutina*) hydrolysiert (Matheson und Travis, 1998). Der f 3, eine Serinprotease der Hausstaubmilbe, erzeugt durch die Spaltung zweier Komponenten des Komplementsystems zwei Anaphylatoxine, die chemotaktisch wirken und eine Histaminsekretion aus Mastzellen verursachen (Maruo et al., 1997). Enzymatisch aktives Papain, die bekannteste Cysteinprotease, kann im Gegensatz dazu eine allergische Reaktion bei Mäusen induzieren (Chambers et al., 1998). Dies zeigt deutlich, dass ein Protein aufgrund seiner enzymatischen Aktivität direkt an der Ausbildung einer Allergie beteiligt sein kann. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten kann sich dieser Effekt sogar noch verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass gegen das Hauptallergen des Lolchgrases (Lol p 1) gerichtete Antikörper auch die Cysteinprotease Bromelain binden können (Pike et al., 1996).

Diese Beispiele machen deutlich, wie wichtig die Funktion eines Proteins zur Ausbildung einer Allergie sein kann. Die Kenntnis der Funktion eines Allergens kann ein besseres Verständnis für den Pathomechanismus einer allergischen Erkrankung vermitteln.

1.5 Bisherige funktionelle Untersuchungen am Phl p 1

Das Gruppe I-Allergen aus dem Wiesenlieschgras *Phleum pratense* (Phl p 1) gehört zu den Hauptallergenen und wird von 95 % der Seren aller Gräserpollenallergiker detektiert. Zu den Hauptallergenen zählen die Allergene, gegen die mindestens 50 % der Allergiker reagieren, von denen wiederum 50 % einen erhöhten IgE-Serumspiegel gegen diese Proteine besitzen (King et al., 1994; Freidhoff et al., 1986).

Die Gräsergruppe I-Allergene sind Glykoproteine mit einer Masse von 31 bis 36 kDa und einem Kohlenhydratanteil von etwa 5 % (Petersen et al., 1995 a). Der Anteil dieser Proteine am Trockengewicht von Graspollen beträgt ca. 5 % (Fahlbusch et al., 1993). Sie wurden schon in zahlreichen Arten identifiziert und charakterisiert wie dem Bermudagrass *Cynodon dactylon* (Mathiesen et al., 1991), dem Lolchgras *Lolium perenne* (Cottam et al., 1986), dem Reis *Oryza sativa* (Xu et al., 1995), dem Kanarengras *Phalaris aquatica* (Suphioglu und Singh, 1995), dem Wiesenrispengras *Poa pratensis* (Lin et al., 1988) und dem Mais *Zea mays* (Broadwater et al., 1993). Innerhalb der Gruppe I-Allergene besteht eine hohe Identität der Aminosäuresequenz von bis zu 95 % (Laffer et al., 1996).

Das Wiesenlieschgras findet in Nord- und Zentraleuropa eine weite Verbreitung. Deshalb wurde das Gruppe I-Allergen Phl p 1 als Modellprotein für die Gruppe I-Allergene näher untersucht. Es besitzt eine N-Glykosylierungsstelle und potentielle Phosphorylierungsstellen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Ferner sind in der Sequenz sieben Cysteinreste vorhanden (Petersen et al., 1995 b).

Die Gruppe I-Allergene (einschließlich des Phl p 1) gehören zu den β -Expansinen, die u. a. bei Reifungsvorgängen in Früchten eine Rolle spielen (Cosgrove et al., 1997 a), indem sie die pflanzliche Zellwand erweichen können (Cosgrove et al., 1997 c), wobei der Zellwand-erweichende Mechanismus bislang noch nicht geklärt ist. Sie werden von den α -Expansinen abgegrenzt, die in schnell wachsenden Geweben vorkommen, nicht glykosyliert und fest mit der Zellwand verbunden sind (McQueen-Mason et al., 1992; McQueen-Mason und Cosgrove, 1995). Es existieren im wesentlichen zwei kontroverse Hypothesen über den Wirkmechanismus der β -Expansine. Cosgrove et al. (2000 b) favorisieren das Modell, nach dem die Expansine nicht-kovalente Bindungen zwischen Zellwand-Polysacchariden lösen und

es aufgrund des inneren Turgordrucks der Zelle zu einem Auseinandergleiten der „Matrixkohlenhydrate“ und damit zu einer Streckung der pflanzlichen Zelle kommt.

Die zweite Hypothese wurde von Grobe et al. (1999) nach der Klonierung und Expression von Phl p 1 in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* aufgestellt. Nach der Expression konnte eine proteolytische Aktivität detektiert werden, die auf das rekombinante Allergen rPhl p 1 zurückgeführt wurde. Es gab durch experimentelle Daten und Sequenzvergleiche Hinweise darauf, dass es sich bei den β -Expansinen möglicherweise um neuartige Cysteinproteasen handeln könnte. Allerdings konnte bei dem natürlichen Allergen nPhl p 1 bislang nur eine schwache Aktivität nachgewiesen werden (Grobe et al., 1999). Es wird vermutet, dass die proteolytische Aktivität des Phl p 1, ähnlich wie es für Der p 1 gezeigt wurde, einen wesentlichen Einfluss auf die Sensibilisierung und Manifestation der Allergie haben könnte.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Expressionssystem der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* sollte sich ein eukaryotisches Protein mit den wichtigsten posttranslationalen Modifizierungen wie z. B. Glykosylierungen und Ausbildung von Cysteinbrücken darstellen lassen. Demzufolge sollte das Phl p 1 in der Hefe exprimiert und anschließend bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Nach der Isolierung sollte dann die proteolytische Aktivität des rekombinanten sowie des natürlichen Allergens unter definierten Bedingungen induziert werden. Durch die nähere Charakterisierung der Funktion des Allergens ließen sich die Auswirkungen des Proteins auf den Pathomechanismus der Allergie besser verstehen. Außerdem sollte ein Einblick in die natürliche Funktion des Proteins im Pollen erhalten werden.

Die genaue Kenntnis der Wirkungsweise und der Zielstrukturen des Allergens würde einen Einblick in den Mechanismus vermitteln, der aus einem potentiell harmlosen Antigen ein Allergen entstehen lässt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Bio-Rad, Hercules; USA
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose, NA	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ampholyte	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
APIzym-Test	BioMérieux, Lyon, Frankreich
APS	Bio-Rad
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Biotin	Sigma
Bisacrylamid	Bio-Rad
BCIP	Serva
Bromphenolblau	Merck
BSA	Pierce, Rockford, USA
CAPS	Sigma
Centriprep-10	Millipore, Eschborn, Deutschland
CentriSep Spin Säulen	Perkin-Elmer, Foster City, USA
CIAP	Roche, Mannheim, Deutschland
Complete® Proteinase Inhibitor Gemisch	Roche
CONCERT Rapid Plasmid Purification Systems	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
Coomassie Protein Reagenz	Pierce
Crocein Scarlet	Serva

Cryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Dextrose	Sigma
DTT	Merck
DMSO	Merck
Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin-Elmer
E64	Sigma
EDTA	Merck
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
FCS	Gibco BRL
GeneClean II Kit	Bio 101, Vista, USA
Glycerin	Sigma
Glycin	Merck
India Ink	Pelikan, Hannover, Deutschland
Jodacetessigsäure	Sigma
Kaliumphosphat, mono- und dibasisch	Merck
Kolloidalen Coomassie-Färbelösung RotiBlue	Roth
Methanol	Merck
N-Ethylmaleimid	ICN, Costa Mesa, USA
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
PefablocSC®	Roche
PMSF	Sigma
Proteinmarker	Bio-Rad
PVDF-Membran	Millipore
Pyronin G	Serva
QIAquick PCR Reinigungskit	Qiagen
Rapid Ligation Kit	Clontech
Restriktionsendonukleasen	Roche, New England Biolabs
SDS	Bio-Rad
Select Agar	Gibco BRL
Sterilfilter, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sorbitol	Sigma

Taq-DNA-Polymerasen und Reaktionspuffer	Roche, Pharmacia
TEMED	Bio-Rad
Tris	Serva
Tween 20	Serva
Ultroser	Gibco, BRL
Yeast Nitrogen Base	Difco

2.1.2 Natürliches und rekombinantes Allergen

Das natürliche Phl p 1 wurde nach der Methode von Suck et al. (1999) aufgereinigt und wurde wie der rPhl p 1 exprimierende *Pichia pastoris*-Klon von Herrn PD Dr. Arnd Petersen zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper:

Monoklonale, gegen nPhl p 1 gerichtete, Antikörper wurden von Herrn PD Dr. A. Petersen zur Verfügung gestellt (Tab. 1).

Tab. 1: Phl p 1-spezifische mAk und deren Epitope (A. Petersen, pers. Mitteilung).

Bezeichnung	Epitop (AS-Nummerierung)
HB7	GDKWLDAKSTWYD (15 bis 27)
IG12	KPPFSG (48 bis 53)
Bo14	PEGW (227 bis 230)

Sekundäre Antikörper:

AP-Maus-anti-Human IgE	Allergopharma, Hamburg, Deutschland
AP-Ziege-anti-Human IgG/IgM H+L	Dianova
AP- α -DIG-AK	Roche

2.1.4 Nährmedien und Puffer

LB-Medium:	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) (1,5 % Select Agar für LB-Agar)
Top-Agar:	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) 0,75 % Select Agar
YPD-Medium:	2 % Dextrose (w/v) 1 % Hefeextrakt (w/v) 2 % Trypton (w/v)
MD-Agarplatten:	1,6 % Agar (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 1 % Dextrose (w/v) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)
MG-Agarplatten:	1,6 % Agar (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 1 % Glycerin (v/v) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)
MM-Agarplatten:	1,6 % Agar (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 0,5 % Methanol (v/v) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)
BMDY:	4×10^{-5} % Biotin (w/v) 1 % Dextrose (w/v) 1 % Hefeextrakt (w/v) 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,0) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)

BMGY:	4 x 10 ⁻⁵ % Biotin (w/v) 1 % Glycerin (w/v) 1 % Hefeextrakt (w/v) 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,0) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)
BMMY:	4 x 10 ⁻⁵ % Biotin (w/v) 1 % Hefeextrakt (w/v) 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,0) 0,5 % Methanol (v/v) 1,34 % YNB ((w/v) Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, sterilfiltriert)

Für das Immunoblotting verwendete Lösungen:

TBS-Tween:	100 mM Tris/HCl (pH 7,4) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,05 % Tween 20 (v/v)
TBS:	100mM Tris/HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂
NBT:	0,033 % NBT (w/v) in TBS (pH 9,5)
BCIP:	0,5 % BCIP (w/v) in A. bidest.

Die im APIzym-Test eingesetzten Substrate:

2-Naphthyl-Phosphat (am Phosphatrest spaltbar), 2-Naphthyl-Butyrat, 2-Naphthyl-Caprylat, 2-Naphthyl-Myristat, L-Leucin-2-Naphthylamid (am Leucinrest spaltbar), L-Valyl-2-Naphthylamid (am Valinrest spaltbar), L-Cystin-2-Naphthylamid (am Cystinrest spaltbar), N-Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphthylamid (am Argininrest spaltbar) sowie N-Glutaryl-Phenylalanin-2-Naphthylamid (am Phenylalaninrest spaltbar).

2.1.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit zu Sequenzierungen und Klonierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt:

Tab. 2: Die zur Sequenzierung und Klonierung eingesetzten Primer. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen (*Eco* RI $\Rightarrow$ GAA TTC; *Not* I $\Rightarrow$ GCG GCC GCT).

Name	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'	Position
5' AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	pPIC9: 855 – 875
3' AOX1	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC	pPIC9: 1327 – 1347
5'-rphlp1-EcoRI	<u>GAA TTC</u> ATC CCC AAG GTC CCC	nPhl p 1: 87 – 101
3'-rphlp1-EcoRI	<u>GAA TTC</u> TCA AAA TTG AAC TTG CCG GAA G	nPhl p 1: 853 – 874
3'-rphlp1-NotI	<u>GCG GCC GCT</u> CAA AAT TGA ACT TGC CGG AAG	nPhl p 1: 853 – 874
N-Term Phl p 1	<u>GAA TTC</u> AAG CCC CCG TTC AGC GGC	nPhl p 1: 228 – 245
5'-Probe	TGC GGC AAC ACC CCC ATC TTC AAG TCC GGC	nPhl p 1: 255 – 284
3'-Probe	ACC CCT CGG TAG ACC TCC TAG CTG TGG	nPhl p 1: 654 – 680

2.1.6 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt:

Tab. 3: Auflistung der eingesetzten Vektoren.

Name	Größe	Referenz
PCR 2.1-Topo	3,9 kb	Stratagene
pPIC9	8,0 kb	Invitrogen
pPIC9K	9,3 kb	Invitrogen
pBluescript KS	3,0 kb	Stratagene

Eine in den Lambda ZAP®II-Vektor eingebaute Mais cDNA-Bank wurde freundlicherweise von Herrn Dr. T. Dresselhaus (Institut für Allgemeine Botanik) von der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Bakterien- und Hefestämme

Tab. 4: Die zur Klonierung eingesetzten Bakterienstämme bzw. der Hefestamm.

Bakterienstamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> K-12 DH5 α	F'(ϕ 80d Δ (lacZ)M15), recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17 (r κ -m κ +), supE44, relA1, deoR, Δ lacZYA- argF), U169		Stratagene
<i>E. coli</i> K-12 VCS 257	F', tonA53, dapD8, lacY1, glnV44 (supE44), Δ (gal- uvrB)47, λ^- , tyrT58 (supF58), gyrA29, Δ (thyA57), hsdS ₃		Stratagene
<i>E. coli</i> K-12 XL1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, laqI ^q Z Δ M15, Tn10(tet ^r)]		Bullock et al. (1987)
Hefestamm			
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	his4, pep4	Mut ⁺ , His ⁻	Invitrogen

2.1.8 DNA- und Proteinmarker

Marker VII (DNA):

8576 bp	3639 bp	1525 bp	710 bp
7427 bp	2799 bp	1482 bp	492 bp
6106 bp	1953 bp	1164 bp	359 bp
4899 bp	1882 bp	992 bp	

Low Molecular Weight Marker (BioRad) (Protein):

Phosphorylase b:	97,4 kDa	Carboanhydrase:	31,0 kDa
BSA:	66,2 kDa	Trypsin Inhibitor (Soja):	21,5 kDa
Ovalbumin:	45,0 kDa	Lysozym:	14,4 kDa

2.1.9 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme von den entsprechenden Servern wurden eingesetzt (Tab. 5):

Tab. 5: Darstellung der verwendeten Computerprogramme.

Anwendung	Computerprogramm	Server
Sequenzvergleich mit einer Datenbank	BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Paarweiser Sequenzvergleich	BL2SEQ Version 3.2	http://workbench.sdsc.edu/index.html
Gleichzeitiger Vergleich von mehreren Sequenzen	CLUSTAL W Version 1.81	http://workbench.sdsc.edu/index.html
Übersetzung der Nukleinsäure in die Proteinsequenz	Translator	http://www.mbshortcuts.com
Signalsequenzbestimmung	SignalP V1.1	http://www.cbs.dtu.dk
Bestimmung der Molekülmasse und des isoelektrischen Punktes	ProtParam Tool	http://www.expasy.ch

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Zur schnellen Reproduktion von Plasmiden wurden transformierte *E. coli*-Zellen in LB-Medium inkubiert. Hierzu wurden 3 ml LB-Medium mit je einem Klon beimpft und üN bei 37 °C und 120 rpm inkubiert.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium: s. 2.1.4

2.2.2 Isolierung und Reinigung von DNA

Um DNA-Moleküle von Kontaminanten zu reinigen, wurden unterschiedliche Reinigungsmethoden durchgeführt.

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Methode der Isolierung von Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschchromatographie beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Nach der Lyse der Zellen und anschließender Neutralisation wird chromosomale DNA zusammen mit den restlichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation sedimentiert. Die renaturierte Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung und kann mittels einer spezifischen, Oberflächen-modifizierten Silikagelmatrix aus der Lösung entfernt werden. Somit wird eine schnelle Reinigung von Plasmid-DNA mit hoher Reinheit und in hoher Ausbeute erreicht.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium: s. 2.1.4

Zellsuspensionspuffer: 150 mM Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA

	100 µg/ml RNase
Zellyselösung:	200 mM NaOH
	1 % SDS (w/v)
Neutralisationspuffer:	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 M NaCl
	10 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA

Für die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA wurde das CONCERT Rapid Plasmid Purification Systems (Gibco BRL) eingesetzt.

3 ml einer in LB-Medium gewachsenen üN-Kultur wurden für 1 min bei 15000 x *g* sedimentiert. Das Pellet wurde in 210 µl Zellsuspensionspuffer aufgenommen und bis zur Homogenität resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 210 µl Zellyselösung hinzugegeben, durch fünfmaliges Invertieren des Gefäßes gemischt und nachfolgend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 280 µl Neutralisationspuffer und fünfmaligem Invertieren des Gefäßes wurde der Ansatz für 10 min bei RT und anschließend bei 15000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zentrifugationssäule geladen und 1 min bei 15000 x *g* über die Säule transferiert. Das Effluent wurde verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl Waschpuffer für 1 min bei 15000 x *g* gewaschen. Zur Elution der gebundenen Plasmid-DNA wurden je 75 µl auf 70 °C erwärmter TE-Puffer auf die Säule pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und 2 min bei 15000 x *g* eluiert.

2.2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren

Durch Behandlung mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol können Proteine aus einer DNA-haltigen Lösung extrahiert werden, um die Reinheit der DNA-Präparation zu verbessern. Die beiden organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform wirken als denaturierende Agenzien, während Isoamylalkohol während der Zentrifugation für eine bessere Phasentrennung sorgt. Die Proteine werden in den organischen Lösungsmitteln, die DNA hingegen in der wässrigen Lösung angereichert.

Zur Reinigung und Lagerung einer DNA-Lösung wurde eine Phenolextraktion nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

TE-Puffer: s. 2.2.2.1
3 M Kaliumacetat (pH 5,0)

Eine DNA-Lösung wurde auf ein Volumen von 200 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und mit dem halben Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 15000 x *g* und 4 °C wurde die obere wässrige, DNA enthaltene Phase abgenommen und zur weiteren Extraktion in ein neues Gefäß überführt. Diese proteinarme Phase wurde nun mit je einem halben Volumen TE-gesättigtem Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen Phase und Überführung in ein neues Gefäß wurde das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und anschließend die wässrige von der organischen Phase durch Zentrifugation getrennt. Nach Zugabe von dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat zur DNA haltigen Phase wurde die Lösung für 30 min bei –80 °C inkubiert. Zur Sedimentation der DNA wurde ein abschließender Zentrifugationsschritt für 20 min bei 15000 x *g* und 4 °C durchgeführt. Störende Salze wurden durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol entfernt. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Unter physiologischen Bedingungen liegen DNA-Moleküle aufgrund ihrer geladenen Phosphat-Gruppen als Polyanionen vor. In einem elektrischen Feld hängt ihre Beweglichkeit weitgehend von drei Parametern ab: Lineare, doppelsträngige DNA wandert durch die Gelmatrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Zehnerlogarithmus $\log_{10}$ des Molekulargewichts ist. Zudem spielt die Agarosekonzentration im Laufverhalten der DNA eine entscheidende Rolle. Ebenso wichtig ist die Konformation der DNA (geschlossen zirkular, geöffnet zirkular und linear) bei der Auftrennung.

Verwendete Reagenzien:

TAE-Puffer:	0,04 M Trisacetat (pH 7,5)
	0,001 M EDTA
Probenpuffer:	0,35 % (w/v) Bromphenolblau
	0,35 % (w/v) Xylencyanol
	25 % (w/v) Ficoll

Um DNA elektrophoretisch aufzutrennen, wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzupipettiert, die noch flüssige Agarose auf einen Gelträger gegossen und ein Kamm in die Agarose gesteckt. Der Kamm wurde anschließend entfernt und der Träger nach Erstarren der Agarose in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Bevor die Proben in die Taschen appliziert wurden, wurden die Proben sowie ein DNA-Längenstandard mit 1/10 Probenpuffer versetzt. Nach Auftragung der Proben wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 V für ca. 50 min durchgeführt. Eine Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Bestrahlung bei 302 nm.

2.2.3.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von doppelsträngiger DNA aus Agarosegelen wurde der Geneclean II Kit (Bio 101, Vista, USA) benutzt.

Verwendete Lösungen:

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstück wurde für 5 min bei 50 °C mit 800 µl NaI (GeneClean II Kit) inkubiert. Anschließend wurden 10 µl sorgfältig gemischte Silikapartikel (Glasmilch; GeneClean II Kit) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für weitere 5 min bei RT inkubiert, wobei er alle 1 bis 2 min durch Schwenken gemischt wurde. Durch Zentrifugation für 10 sek. bei 15000 x g wurde

die Glasmilch mit der daran gebundenen DNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, während die sedimentierte DNA dreimal mit je 700 µl New Wash (GeneClean II Kit) gewaschen wurde. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer resuspendiert und für 3 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 sek. bei 15000 x *g* zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Die so erhaltenen DNA-haltigen Überstände wurden vereinigt und bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C gelagert.

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch in einer Quarzküvette mit einer Dicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Photometer (Amersham-Pharmacia). Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Die Reinheit einer DNA-Präparation wurde durch Bildung des Quotienten der bei 260 und 280 nm gemessenen Extinktionen bestimmt. Der Quotient sollte bei einer reinen Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, mit der spezifisch DNA-Fragmente amplifiziert werden können. Im Wesentlichen besteht sie aus drei sich wiederholenden Teilen: Als erstes wird die Template-DNA denaturiert. Im folgenden binden spezifische Oligonukleotidprimer an die DNA. Zum Abschluss eines Zyklus wird die DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert (Saiki et al., 1988).

Es wurde in der Arbeit die *Taq*-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) verwendet. Diese zeigt bei der Synthese eine terminale Transferase-Aktivität, was am 3'-Ende zu einem Nukleotidüberhang (meist Adenosin) führt. Außerdem besitzt die *Taq*-DNA-Polymerase selbst bei Temperaturen unterhalb des Temperaturoptimums eine genügend starke Aktivität. Zur DNA-Amplifikation wurde schließlich die „Hot-Start“-Technik angewandt (D'Aquila et al., 1991). Zusätzlich

verfügt die *Taq*-DNA-Polymerase über eine 5'→3'-, nicht jedoch über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und einer damit gleichbedeutenden als „proofreading“ bezeichneten Fehlerkorrektur (Lundberg et al., 1991).

Verwendete Puffer:

TAE-Puffer: 0,04 M Tris/Acetat (pH 7,5)
 0,001 M EDTA

Die PCR wurde eingesetzt, um 141 bp am 5'-Ende der Phl p 1-cDNA zu eliminieren. Hierzu wurde eine PCR mit Hilfe der Primer N-Term Phl p 1 und 3'-AOX 1 in einem Thermocycler (Perkin Elmer Cetus) durchgeführt. Als Template diente der in dem Vektor pPIC9 inserierte Phl p 1-Wildtyp (720 bp). Die Annealing-Temperatur der Primer wurde 5 °C unterhalb der in folgender Formel berechneten Schmelztemperatur gewählt, wobei A, T, G und C für die jeweiligen Nucleotide stehen:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$$

Der Ansatz wurde wie folgt in einem PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

100 ng Template
5 µl dNTPs (10 mM)
5 µl 5'-Primer ((20 pM) N-Term Phl p 1)
5 µl 3'-Primer ((20 pM) 3'-AOX 1)
10 µl 10x *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer
1 µl *Taq*-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
ad 100 µl A. bidest.

Anschließend wurden die Proben mit 100 µl Mineralöl überschichtet und mit folgendem Programm amplifiziert:

Tab. 6: Schema zur Durchführung einer PCR.

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	Aktion
1 Zyklus	95 °C	5 min	Hot Start = Denaturierung
Je 20 Zyklen	95 °C	30 sek.	Denaturierung
	58 °C	1 min	Annealing
	72 °C	2 min	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5 min	Finale Elongation zur Vervollständigung der Stränge

Nach Durchführung der PCR wurden 10 µl des Ansatzes zur Kontrolle des PCR-Produktes in einem 1%igen (w/v) Agarosegel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Da Nukleotide, Primer und Polymerase bei der weiteren Verwendung des Amplifikats stören könnten, wurde der Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Reinigungskits nach Herstellerangaben (QIAGEN) gereinigt.

Es wurde das 5-fache Volumen Puffer PB zu dem PCR-Ansatz pipettiert und auf eine Spin Säule gegeben. Die doppelsträngige DNA wurde an die Säule gebunden, so dass nach Zentrifugation für 60 s bei 15000 x g die meisten Nukleotide, Primer und Polymerase-Moleküle aus dem Ansatz entfernt wurden. Der anschließende Waschschrift mit 750 µl Puffer PB und die zweimalige Zentrifugation für 60 s bei 15000 x g entfernte alle restlichen Kontaminanten. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 50 µl A. bidest. eluiert.

2.2.6 Klonierung

Bevor ein in der PCR amplifiziertes und gereinigtes DNA-Molekül (s. 2.2.5) als Insert bzw. Gen in einem pro- oder eukaryontischen System exprimiert werden kann, muss es in eine Vektor-DNA inseriert werden.

Im ersten Schritt wurde die Vektor-DNA hydrolysiert. Anschließend wurden die durch die Restriktion entstandenen freien 5'-Phosphatgruppen enzymatisch entfernt. Somit konnte das Insert in die Vektor-DNA eingebaut und nachfolgend exprimiert werden.

2.2.6.1 Restriktion von DNA mit Hilfe von Enzymen

Zum Öffnen von doppelsträngiger zirkulärer DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt. Diese Enzyme erkennen palindromische Nukleotidsequenzen. Nach der Hydrolyse der DNA durch die verwendeten Enzyme entstanden am 5'-Ende der DNA überstehende Enden.

Die enzymatische Hydrolyse von doppelsträngiger DNA mittels Endonukleasen wurde hinsichtlich von Temperatur- und Salzbedingungen nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Im allgemeinen wurde folgender Ansatz durchgeführt:

1-3	µg Vektor-DNA
1	µl 10x Restriktionspuffer
0,5	µl Restriktionsenzym
ad 10 µl A. bidest.	

Der Ansatz wurde für 1-3 h bei 37 °C und in der nach den Herstellerangaben für das Enzym optimalen Pufferzusammensetzung inkubiert.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Restriktion und zur Entfernung der Enzyme wurde der Ansatz in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend aus dem Gel eluiert und mit Hilfe der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

2.2.6.2 Enzymatische Dephosphorylierung von DNA

Bei der Ligation von Insert-DNA in linearisierte Vektor-DNA kommt es sehr häufig zu einer Religation des Vektors. Um eine Rezirkulation von restringierter, linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurden endständige 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen (CIAP) enzymatisch entfernt. Es wurde folgender Ansatz durchgeführt:

10 µl DNA-Lösung (1-3 µg)
5 µl 10x Inkubationspuffer
0,1 U CIAP
ad 50 µl A. bidest.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und der Vektor durch Elution aus dem Gel mit dem GeneClean II Kit (s. 2.2.3.1) gereinigt.

2.2.6.3 Ligation von DNA-Inserts in Vektor-DNA

Durch die Verwendung von DNA-Ligasen können Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden von linearisierten DNA-Doppelsträngen gebildet werden. Um eine möglichst hohe Effizienz der Ligation zu erreichen, wurde die Insert-DNA im 2-5fachen Überschuss zu der Vektor-DNA zugegeben.

Die Durchführung der Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde ein Verhältnis von DNA-Inserts zu linearisierter Vektor-DNA von 2:1 bis 5:1 in einem Gesamtvolumen von maximal 20 µl (DNA-Insert + Vektor-DNA + 10 µl Ligationspuffer + 1 U T4-Ligase) gewählt. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 85 µl A. bidest., 20 µg Glycogen (in 1 µl) und 250 µl 96 % Ethanol (bei -20 °C gelagert), die Fällung der ligierten DNA für 1 h bei -80 °C. Nach Zentrifugation des Ansatzes bei 4 °C und 15000 x g für 15 min wurde der Überstand über dem DNA-Pellet abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und abschließend in 10 µl A. bidest. aufgenommen. Bis zur Transformation (s. 2.2.7 und 2.2.9.2) wurde das gelöste Pellet bei 4 °C gelagert.

2.2.7 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen können durch die Anwendung verschiedener Methoden kompetent gemacht werden, so dass sie mit Vektoren transformiert werden können. In dieser Arbeit wurde die Elektroporation eingesetzt. Dabei werden die kompetenten Zellen

für eine kurze Zeit einem sehr hohen Spannungsimpuls ausgesetzt. Innerhalb dieser Zeit werden die Zellmembranen durchlässig für Moleküle wie z. B. Plasmide, nach deren Aufnahme die Zellen auf Selektivagar ausplattiert werden. Durch die Plasmide wird z. B. eine Antibiotikaresistenz vermittelt, so dass nur solche Klone, die ein Plasmid enthalten, wachsen können.

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

200 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer üN-Kultur beimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8$ bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation der Zellen für 15 min bei 4000 x g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 200 ml 4 °C kaltem A. bidest. resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 10 ml 4 °C kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und erneut sedimentiert. Abschließend wurde das Sediment in 1 ml 4 °C kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und in 50 µl-Aliquots portioniert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden mittels Elektroporation in einem Gene Pulser (Equibio Easyject Optima) transformiert.

Hierzu wurden 50 µl der bei -80 °C gelagerten Zellsuspension aufgetaut und mit mindestens 80 ng DNA bzw. dem Ligationsansatz (s. 2.2.6.3) in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette für 2 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde einem Spannungsimpuls von 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF ausgesetzt, wobei die Zeitkonstante bei etwa 5,0 msec. ± 0,3 msec. lag. Dem Ansatz wurden sofort 500 µl LB-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden die Zellen auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Transformation und Ermittlung von Klonen mit den gewünschten Plasmiden wurde Plasmid-DNA isoliert. Die DNA wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse bzw. PCR zur Amplifikation gesuchter Zielsequenzen untersucht. Um die Sequenz des Amplifikats zu prüfen, wurde eine DNA-Sequenzierung (s. 2.2.8) durchgeführt.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenz wurde nach der Methode von Sanger et al. (1977) in einem ABI 377 (Applied Biosystems) unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten (Succinylfluorescein) Didesoxy-Nukleotiden bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer unvollständigen enzymatischen Synthese von fluoreszenz-markierten DNA-Bruchstücken mittels 2',3'-Didesoxynucleotiden, die bei der Synthese zu einem Kettenabbruch führen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Syntheseprodukte kann die Sequenz durch Anregung der in die DNA inkorporierten, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten Nukleotide durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert und ausgewertet werden.

Verwendete Lösungen:

ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Polyacrylamid-

Harnstoff-Gel (4 %): 30 g Harnstoff
 6,0 ml 40 % Acrylamidlösung (w/v)
 6,0 ml 10x TBE-Puffer
 ad 60 ml A. bidest.

Diese Komponenten wurden nach obigem Ansatz
zusammengegeben, durch einen 0,2 µm Filter filtriert und
anschließend entgast. Durch Zusatz von 24 µl TEMED und 180 µl
10 % APS (w/v) polymerisierte das Gel für 1,5 h bei RT aus.

10x TBE-Puffer: 0,9 M Tris
 0,9 M Borsäure
 0,02 M EDTA

Probenpuffer: Formamid/25 mM EDTA, pH 8 (4:1)
 Dextranblau

Zum Einsatz kamen vektor- und genspezifische Primer. Diese wurden zusammen mit der zu untersuchenden DNA und einem ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) in einer PCR nach folgendem Protokoll eingesetzt:

ad 20 µl A. bideest.

Die Säule wurde mit 800 µl A. bidest. für 30 min hydratisiert und anschließend für

Im Unterschied zu der sehr viel weiter verbreiteten Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Existieren zwei Seiten, die für die AOX-Reduktion. Das AOX-Gen ist im Gegensatz

zum AOX2-Gen für die Mehrheit der Alkoholoxidase-Aktivität in der Zelle verantwortlich und wird durch Methanol induziert, während es durch Glukose reprimiert wird.

Der *P. pastoris*-Stamm SMD1168 besitzt eine Mutation in dem Histidinoldehydrogenase-Gen (*HIS4*). Dadurch ist eine Selektion von Transformanten möglich, die durch den Expressionsvektor das vollständige *HIS4*-Gen erhalten haben. Außerdem besitzt der Stamm in methanolhaltigem Medium eine dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate (methanol utilization plus [Mut⁺] phenotype).

Die verwendeten Expressionsvektoren besitzen 3'-AOX1-Sequenzen sowie ein *HIS4*-Gen. Nach enzymatischer Linearisierung des Vektors werden die Zellen transformiert. Der linearisierte Vektor kann durch zwei verschiedene Ereignisse in das *P. pastoris*-Genom integriert werden. Zum einen kann ein einmaliges Crossover in den *his4*-Locus erfolgen (Insertion). Bei einem Gene-Replacement findet zwischen dem Vektor und dem Genom ein Crossover am AOX1-Promotor und dem 3'-AOX1-Ende statt. Als Folge dessen wird die AOX1-kodierende Region deletiert, so dass die Transformanten das *HIS4*-Gen besitzen (His⁺) und nur langsam in methanolhaltigem Medium wachsen (Mut^s). Die Abb. 3 macht diesen Zusammenhang noch einmal deutlich.

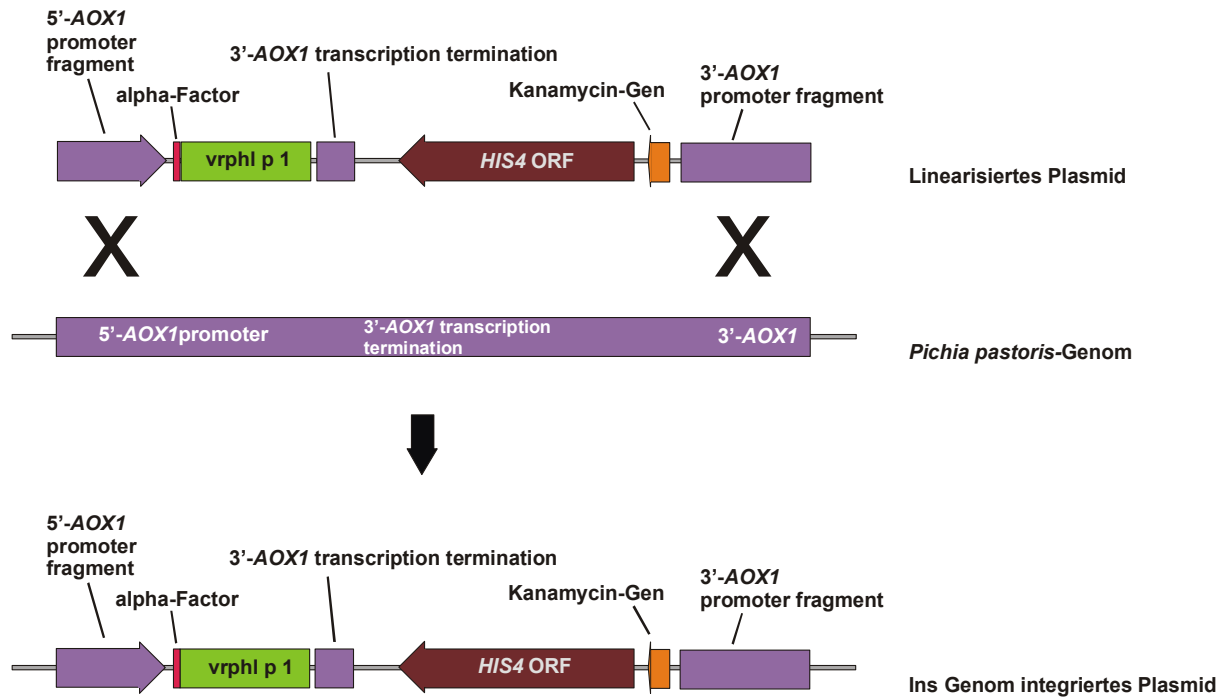


Abb. 3: Darstellung der Integration von rekombinanter DNA (pPIC9-vrphl p 1) in das Hefegenom. alpha-Factor = Sekretions-Signalsequenz aus *S. cerevisiae*; 3'-AOX1 transcription termination = Terminationssequenz für die RNA-Polymerase; *HIS4* ORF = Histidinol-Dehydrogenase-Gen; vrphl p 1 = verkürztes rekombinantes phl p 1-Gen.

Die Integration der rekombinanten DNA in das Genom erfolgt während eines Gene-Replacements über die in beiden Sequenzen homologen 5'-AOX- bzw. 3'-AOX-Promotorsequenzen. Dadurch entstehen Transformanten, die nur langsam in methanolhaltigem Medium wachsen (Mut^s).

Mit Hilfe des α -mating factors, einer Sekretions-Signalsequenz aus *S. cerevisiae* lässt sich das zu exprimierende Gen nach Induktion aus dem Kulturüberstand aufreinigen (Higgins und Cregg, 1998 b).

Die Integration von mehreren rekombinanten DNA-Fragmenten in das Hefegenom erfolgt spontan in etwa 50 bis 80 % aller His⁺-Transformanten (Cereghino et al. 2000). Der Vektor pPIC9K (s. Abb. 4 a) besitzt zusätzlich ein Kanamycinresistenzgen.

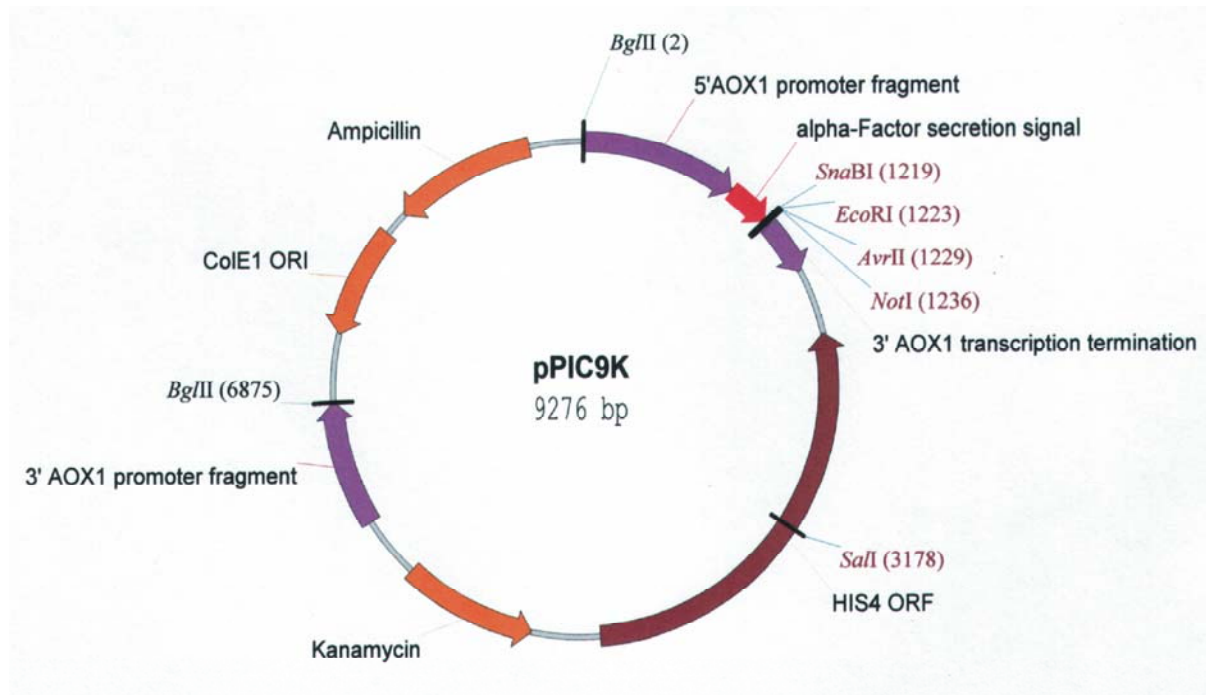


Abb. 4 a: Darstellung des Plasmids pPIC9K.

Der 9276 bp große Vektor besitzt den ColE1-Replikationsstartpunkt (ColE1 ORI) sowie ein Ampicillinresistenzgen (Ampicillin). Das Kanamycinresistenzgen (Kanamycin) liegt innerhalb der Expressionskassette, die zwischen den 5'-AOX- und 3'-AOX-Promotorfragmenten liegt. Innerhalb der Kassette ist die Sekretionssignalsequenz (alpha-Factor secretion signal), in der Multiple Cloning Site die Erkennungssequenzen für die Enzyme *Sna* BI, *Eco* RI, *Avr* II und *Not* I, die 3'-AOX-Terminationssequenz der RNA-Polymerase (3' AOX transcription termination) sowie das Histidinol-Dehydrogenasegen (*HIS4* ORF) dargestellt. Zudem sind die Schnittstellen des Restriktionsenzym *Bgl* II eingezeichnet.

Mit Hilfe der Kanamycinresistenz lassen sich in einer *in vivo*-Untersuchung Klone detektieren, die mehrere Kopien der rekombinanten DNA enthalten. Das bakterielle Kanamycingen vermittelt in *Pichia pastoris* Resistenz gegen das Substrat G418. Der Grad der Resistenz hängt dabei von der Anzahl der ins Genom integrierten Resistenzgene ab. Je mehr Gene eingebaut sind, desto resistenter ist die Hefe. Aufgrund der Lage des Resistenzgens in dem Plasmid innerhalb der Expressionskassette (s. Abb. 4 b) gibt der Grad der Resistenz über die Häufigkeit des Rekombinantionsereignisses Auskunft.

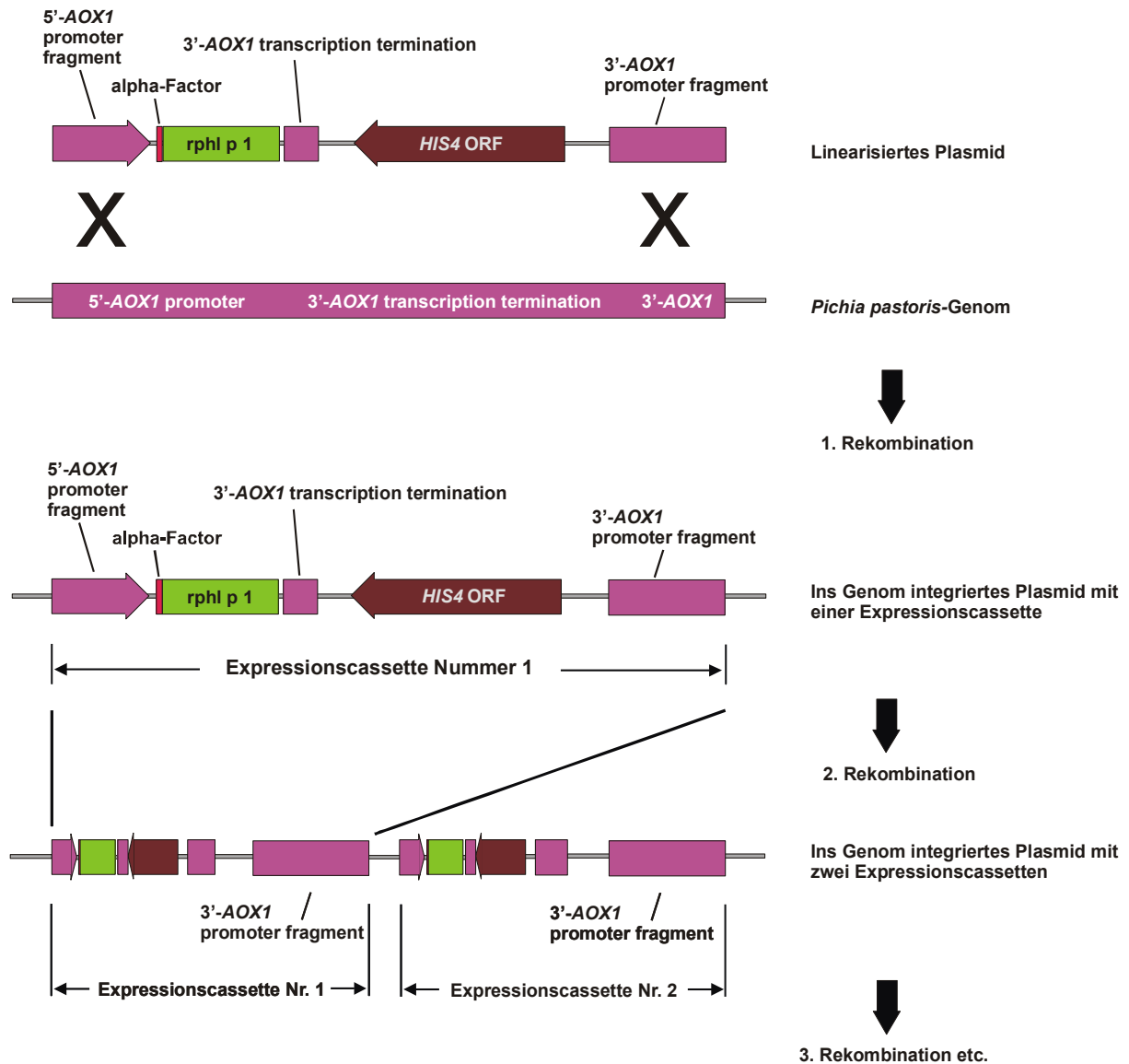


Abb. 4 b: Schematische Darstellung der multiplen Integration der rekombinanten DNA (pPIC9K-rphl p 1) in das Genom von *Pichia pastoris*. alpha-Factor = Sekretions-Signalsequenz aus *S. cerevisiae*; 3'-AOX1 transcription termination = Terminationssequenz für die RNA-Polymerase; *HIS4* ORF = Histidinol-Dehydrogenase-Gen; rphl p 1 = rekombinantes phl p 1.

Das linearisierte Plasmid pPIC9K-rphl p 1 wird über die 5' AOX- bzw. 3' AOX-Promotorfragmente in das Genom eingebaut (1. Rekombination). Bei einer weiteren Integration von rekombinanter DNA ins Genom wird zu der ersten Expressionskassette eine weitere in einem 2. Rekombinationsschritt hinzugefügt. Bis zu 1 bis 5, in Ausnahmefällen über 20, Integrationsereignisse sind möglich.

Eine Toleranz gegenüber hohen G418-Konzentrationen bedeutet, dass eine hohe Kopienzahl der Expressionskassette und damit der rekombinanten DNA in das Genom eingebaut wurde.

Mit Hilfe der PCR (s. 2.2.5) wurde ein Amplifikat mit folgendem Template und Primern erhalten:

Template = Vektor-Insert-Produkt pPIC9-rphl p 1;

5'-Primer = 5'-rphlp1-EcoRI, der eine *Eco* RI-Schnittstelle enthielt;

3'-Primer = 3'-rphlp1-NotI, der eine *Not* I-Schnittstelle enthielt.

In einem weiteren Ansatz wurden folgendes Template und Primer eingesetzt:

Template = Vektor-Insert-Produkt pPIC9-rphl p 1;

5'-Primer = 5'-rphlp1-EcoRI, der eine *Eco* RI-Schnittstelle enthielt;

3'-Primer = 3'-rphlp1-EcoRI, der ebenfalls eine *Eco* RI-Schnittstelle enthielt

2.2.9.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA in *Pichia pastoris*-Zellen wurde die Methode der Elektroporation durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

YPD-Medium: s. 2.1.4

Sorbitol: 1 M Sorbitol in A. bidest.

Nach einem Protokoll von Becker & Guarente (1991) wurden *Pichia pastoris*-Zellen in 50 ml YPD-Medium üN bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Etwa 10-50 µl der üN-Kultur wurden in 500 ml YPD überimpft und solange bei 30 °C kultiviert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,3-1,5 erreicht hatten, die einer Zellzahl von ca. $6,5-7,5 \times 10^7$ Zellen/ml entspricht. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C wurden die Zellen geerntet. Das Pellet wurde in 500 ml 4 °C kaltem A. bidest. resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 20 ml 4 °C kaltem 1 M Sorbitol aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 4 °C kaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und bis zur Elektroporation auf Eis gelagert.

2.2.9.2 Transformation von *Pichia pastoris*-Zellen

Verwendete Reagenzien:

MD-Agarplatten: s. 2.1.4

Nach der Methode von Becker & Guarente (1991) wurden 80 µl der Zellsuspension mit 10 µg durch das Restriktionsenzym *Bgl II* linearisierte DNA in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit einer Wandstärke von 0,2 cm für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω in einem Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA). Nach sofortiger Zugabe von 1 ml 4° C kaltem 1 M Sorbitol wurden anschließend unterschiedliche Aliquots des Transformationsansatzes auf MD-Agarplatten ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Expression und der Nachweis der rekombinanten Proteine.

2.2.9.3 Produktion von rekombinanten Proteinen

2.2.9.3.1 Eukaryotische Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

s. 2.1.4

Um die Expression des rekombinanten Gens zu kontrollieren, wurde ein Teil eines auf Minimal Dextrose (MD)-Agarplatten vereinzelt gewachsenen Klones mit einer Impföse auf eine Minimal Glycerin (MG)-Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Nach zwei Tagen wurde ein Teil des auf der MG-Agarplatte gewachsenen Klones auf eine MM-Agarplatte übertragen und einen Tag bei 30 °C inkubiert. Auf die MM-Agarplatte wurde eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) gelegt und für 5 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran von der Platte wieder abgenommen und dreimal in TBS-Tween (pH 7,4) gewaschen. Dieser sogenannte „Yeastern Blot“ wurde wie ein Western-Blot (s. 2.3.7.1) entwickelt: Nach üN-Inkubation mit 1:200 in TBS-Tween (pH 7,4) verdünnten gegen Phl p 1 gerichteten

mAk IG12 wurde die Membran dreimal mit TBS-Tween (pH 7,4) gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation für 2 h mit 1:10000 in TBS-Tween (pH 7,4) verdünntem AP-konjugierten Sekundärantikörper. Durch zweimaliges Waschen mit TBS-Tween (pH 7,4) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran mit TBS (pH 9,5) äquilibriert. Nach Zugabe der Substratlösung (NBT/BCIP im Verhältnis 30:1) konnten positive Klone detektiert werden, die rPhl p 1 exprimierten. Zur Bestimmung des Mut-Phänotyps von solchen positiven Klonen wurden diese parallel auf MD- und Minimal Methanol (MM)-Agarplatten ausgestrichen und zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.9.3.2 Expression in *Pichia pastoris*

Das verwendete Plasmid pPIC9 besitzt eine Sekretions-Signalsequenz (alpha-mating-factor) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Durch den Einbau des gewünschten Genproduktes hinter diese Signalsequenz wird das Produkt nach Methanolinduktion in das Kulturmedium sekretiert. Anschließend ist eine schnelle und effektive Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie aus dem Medium (s. 2.3.4.3) möglich.

Verwendete Lösungen:

s. 2.1.4

Für die Anzucht und Induktion von rPhl p 1- bzw. vrPhl p 1-exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen erfolgte die Kultivierung in 20 ml BMDY (pH 6) bei 150 rpm und 30 °C üN. Diese üN-Kultur wurde anschließend in 500 ml BMDY (pH 6) in 2l-Kolben bei gleichen Bedingungen für weitere 24 h bis zu einer Zelldichte bei OD₆₀₀ von 1-2 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g und RT für 5 min sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 500 ml BMGY (pH 6) resuspendiert und bei 150 rpm und 30 °C üN inkubiert, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 15-20 erreicht hatten. Die Zellen wurden wie oben sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml BMMY (pH 6) aufgenommen. Der nachfolgenden Inkubation üN bei 150 rpm und 30 °C folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1500 x g. Das Pellet wurde verworfen, während der Überstand mit dem darin enthaltenen rPhl p 1 ein weiteres Mal bei 1500 x g für

10 min zentrifugiert wurde. Der erhaltene Überstand wurde jeweils über Filter (Sartorius) mit den Porengrößen 8 µm, 0.8 µm, 0.45 µm und 0.2 µm vorgereinigt. Im Anschluß daran wurde das Filtrat in einer Amicon-Druckzelle mittels Stickstoffgas über einen Filter (Amicon) mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa ca. 10- bis 50-fach aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Zur Inhibition einer proteolytischen Aktivität wurde in einem Ansatz dem filtrierten und eingengten Kulturüberstand von vrPhl p 1-exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen eine Tablette Proteaseinhibitorgemisch (α-Complete) nach Anleitung des Herstellers (Roche) hinzugefügt. Anschließend wurden beide Ansätze mittels Centricon Plus-20 entsalzt, in A. bidest aufgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei –20 °C gelagert.

2.2.10 Screening einer Mais-cDNA-Bank

Komplementäre DNA (cDNA)-Banken repräsentieren die Informationen, die von der Messenger-RNA (mRNA) in einem bestimmten Stadium oder Zustand eines Organismus ausgehend vom Genom kodiert sind. RNA-Moleküle sind sehr labil und nur schwer zu amplifizieren. Deswegen wird die RNA in eine stabile cDNA umgeschrieben und in einen Lambdavektor integriert, der sich selbst replizieren kann. Nachfolgend kann die originale genetische Information isoliert und untersucht werden.

2.2.10.1 Infektion von kompetenten *Escherichia coli*-XL1-Blue-Zellen mit Phagen

Mit Hilfe der in dem Medium enthaltenen Maltose werden die Bakterienzellen für die Aufnahme von Lamdaphagen präpariert. Die Internalisierung der Phagen erfolgt über den von den Zellen exprimierten und an der Oberfläche präsentierten Maltoserezeptor, an den die Phagen adhärieren.

Verwendete Medien:

Kompetenzmedium:	1 % Trypton (w/v)
	0,5 % Hefeextrakt (w/v)
	1 % NaCl (w/v)
	10 mM MgSO ₄
	0,2 % Maltose (w/v)
LB-Agar:	s. 2.1.4
Top-Agar:	s. 2.1.4

E. coli-XL1-Blue-Zellen wurden üN in 10 ml Kompetenzmedium bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min bei 1000 x *g* sedimentiert und in 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. 600 µl von dieser Zellsuspension wurden mittels 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Zu der Suspension wurden 50000 Phagen gegeben, für 10 min bei 37 °C geschüttelt und für weitere 5 min ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-Phagen-Suspension in 7 ml 50 °C warmen Topagar pipettiert, auf eine große LB-Agarplatte ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

2.2.10.2 Herstellung einer DIG-markierten Sonde

Um aus einer Mais-cDNA-Bank das Gruppe I-Allergen *zea m 1* zu isolieren, wurde ausgehend von der *phl p 1*-Gensequenz eine DIG-markierte Sonde mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers generiert.

In einer PCR wird mit spezifischen Primern aus einer bekannten Sequenz eine Sonde generiert, in die Digoxigenin-11-dUTP inkorporiert wurde. Nach Digoxigenin- (DIG) Markierung dieser Sonde kann aus einer cDNA-Bank die zur markierten DNA komplementäre Sequenz detektiert werden. Das Prinzip der Methode der DIG-Markierung und Detektion beruht dabei auf gängigen Methoden mit radioaktiv markierten Sonden.

Mit Hilfe der Primer 5'-Probe und 3'-Probe wurde in einer PCR eine 435 bp lange Sonde amplifiziert, in die DIG-markiertes dUTP eingebaut wurde. Als Template diente der in dem Vektor pPIC9 inserierte *phl p 1*-Wildtyp. Der Ansatz wurde wie folgt in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipetiert:

100 ng Template
 5 µl PCR DIG-Mix (200 µM dNTP, inklusive DIG-dUTP)
 5 µl Senseprimer ((20 pM) 5'-Probe)
 5 µl Antisenseprimer ((20 pM) 3'-Probe)
 5 µl PCR Puffer mit MgCl₂
 0,75 µl Enzymmix, Expand High Fidelity (2,6 U/µl)
 ad 50 µl A. bidest.

Anschließend wurden die Proben mit 100 µl Mineralöl überschichtet und mit folgendem Programm amplifiziert:

Tab. 7: PCR-Schema zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde.

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	Aktion
1 Zyklus	95 °C	2 min	Hot Start = Denaturierung
10 Zyklen	95 °C	10 sek.	Denaturierung
	68 °C	30 sek.	Annealing
	72 °C	2 min	Elongation

Nach der Amplifikation wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Für die Hybridisierung wurden 25 ng des PCR-Ansatzes pro 1 ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

2.2.10.3 Hybridisierung und Detektion von Zea m 1-cDNA

Nach Fixierung einer cDNA-Bank auf einem Filter kann die Sonde mit der komplementären Sequenz in der cDNA-Bank hybridisieren. Der Nachweis der Sonde und somit der gesuchten cDNA erfolgt mittels eines gegen DIG gerichteten Antikörpers an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch die Umsetzung von NBT/BCIP mit Hilfe des Enzyms erfolgt nach der Methode von Leary et al. (1983) eine Färbung.

Verwendete Lösungen:

Denaturierungslösung:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1 M Tris/HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl
20x SSC:	0,3 M Na-Citrat (pH 7,0) 3 M NaCl
Prähybridisierungslösung:	5x SSC 1 % Blocking Reagenz (v/v) 0,1 % Laurylsarcosinat (w/v) 0,02 % SDS (v/v)
Hybridisierungslösung:	Prähybridisierungslösung inklusive Sonde
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure (pH 7,5) 150 mM NaCl
Blockierungspuffer:	Maleinsäurepuffer inklusive 1 % Blocking Reagenz (Roche)

Nachdem sich auf den üN bei 37 °C inkubierten Agarplatten Plaques gebildet hatten, wurden die Platten für 1 h bei 4 °C gelagert. Nach 2-minütiger Auflage einer Hybond-N-Nylonmembran (132 mm Durchmesser; Amersham) wurde die Membran erst 5 min in Denaturierungslösung, danach 15 min in Neutralisationslösung und abschließend 10 min in 2x SSC inkubiert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und danach 2 h bei 80 °C gelagert. Die Membran wurde im Anschluss daran 2 h bei 68 °C in Prähybridisierungslösung äquilibriert. Danach wurde die Membran mit 20 ml auf 68 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung in eine Hybridisierungstüte eingeschweißt (kleine Platten wurden mit 6 ml Hybridisierungslösung eingeschweißt) und üN bei 68 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal je 5 min bei RT mit 2x SSC + 0,1 % SDS (w/v) gewaschen. Darauf folgte ein zweimal 15-minütiges Waschen mit 0,5x SSC + 0,1 % SDS (w/v) bei der „Hybridisierungstemperatur“ von 68 °C.

Zur Detektion wurde die Membran zunächst für 1 min in Maleinsäurepuffer äquilibriert. Nach 30-minütiger Inkubation in Blockierungspuffer wurde die Membran schließlich für weitere 30 min mit 1:5000 in Blockierungspuffer verdünntem

Nachweisantikörper (mit alkalischer Phosphatase markierter α -DIG-AK) inkubiert. In Maleinsäurepuffer erfolgten zwei je 15-minütige Waschschriffe. Nachfolgend wurde eine 10-minütige Inkubation in TBS-Puffer angeschlossen. Die Färbung erfolgte zum Abschluss wie unter 2.3.7.4 (Western-Blot) angegeben. Durch das Entfernen der Substratlösung und dem anschließenden Waschen in A. bidest. wurde die Färbung gestoppt.

2.2.10.4 Rescreening

Um die Phagen mit dem gewünschten cDNA-Fragment zu isolieren, wurde ein Rescreening durchgeführt. Dabei wurden im Wesentlichen die unter 2.2.10.2 und 2.2.10.3 beschriebenen Methoden angewendet.

Nach Freisetzung der Phagen aus einer Agarplatte wurden wiederum kompetente *E. coli*-XL1-Blue-Zellen mit den isolierten Phagen infiziert. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung und Detektion von cDNA mittels einer DIG-markierten Sonde.

Verwendete Lösungen:

SM-Medium:	0,1 M NaCl
	0,05 M MgSO ₄
	0,05 M Tris (pH 7,5)
	0,01 % (w/v) Gelatine

Die nach der Detektion auf der Membran gefärbten und somit die cDNA enthaltenen Klone wurden aus der LB-Agarplatte mit der Rückseite einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und üN bei 4 °C in je 150 µl SM-Medium inkubiert. Zu dem Medium wurde anschließend 3 % Chloroform (v/v) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 10000 x g für 10 min. Das im Überstand befindliche Phagenlysat wurde abgenommen, mit 1 % Chloroform versetzt und bei 4 °C gelagert.

Um den Phagentiter zu bestimmen, wurde wie in 2.2.10.2 eine üN-Kultur von Phagen-kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Zellen in 10 ml Kompetenzmedium vorbereitet. Mittels Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g wurden die Zellen sedimentiert und in 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Mit 10 mM MgSO₄ wurden

4 x 200 µl der Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden die Aliquots mit je einer Phagenverdünnung (von 10⁻² bis 10⁻⁵) für 10 min bei 37 °C geschüttelt und für weitere 5 min ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien-Phagen-Suspensionen in je 3 ml Topagar auf kleine Agarplatten ausplattiert. Nach der üN-Inkubation bei 37 °C wurde eine Hybond-N-Membran (82 mm Durchmesser) aufgelegt und eine Hybridisierung und Detektion wie in 2.2.10.3 durchgeführt.

Das Rescreening wurde so lange wiederholt, bis alle Plaques auf den Agarplatten als cDNA tragende Klone detektiert werden konnten. Aus dem erhaltenen Phagenlysats wurde im Anschluss eine *in vivo*-Excision durchgeführt.

2.2.10.5 *In vivo*-Excision mit dem ExAssist-Helferphagen

Das aus einer cDNA-Bank identifizierte Gen muss für weitere Untersuchungen (z. B. Sequenzierung, s. 2.2.8) in einen Phagen verpackt werden, der sich in einem *E. coli*-Stamm nicht replizieren kann, um damit eine Lyse und Reinfektion der Bakterienzellen zu vermeiden.

Hierzu wird mittels eines Helferphagen das Bluescript Phagemid des Lambda ZAP Vektors ausgeschnitten. Der Helferphage hat aufgrund einer Mutation die Fähigkeit zur Replikation in bestimmten *E. coli*-Stämmen wie z. B. SOLR-Zellen verloren. Somit kann nur das ausgeschnittene Phagemid inklusive des identifizierten Gens in dem Wirt repliziert werden (Sambrook et al., 1989).

Aus transfizierten *E. coli*-XL1-Blue-Zellen wurde mit Hilfe des ExAssist-Helferphagen das pBluescript SK-Plasmid ausgeschnitten.

Zunächst wurde eine üN-Kultur von XL1-Blue- in Kompetenzmedium und SOLR-Zellen in LB-Medium bei 30 °C vorbereitet. Am folgenden Tag wurden 200 µl der XL1-Blue-Zellen (OD₆₀₀ = 1,0) mit 250 µl des Phagenlysats (entspricht 1 x 10⁷ pfu/ml) und 1 µl Helferphagen (entspricht 1 x 10⁶ pfu/µl) bei 37 °C für 15 min inkubiert. Nach Zusatz von 3 ml LB-Medium zu dem Ansatz folgte eine Inkubation für weitere 3 h bei 37 °C.

Nach dem Erhitzen auf 70 °C für 20 min wurde der Ansatz bei 1000 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. 10 bzw. 1 µl des Überstandes wurden

zusammen mit 200 µl SOLR-Zellen ($OD_{600} = 1,0$) 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

Die so erhaltenen Einzelkolonien wurden üN in 5 ml LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid wurde isoliert und anschließend eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Graspollenextrakten

Um Untersuchungen an Gräserpollenbestandteilen durchzuführen, wurden Proteine aus dem Pollen extrahiert und zur weiteren Analyse aufgereinigt.

Für die Herstellung von Pollenextrakten wurden 5 g *Phleum pratense* Pollen (ARTU Biologicals, Lelystad, Niederlande) in 25 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) unter Zusatz von einer Tablette Complete (Roche) zur Proteaseinhibition gelöst und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C wurde der Überstand durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Anschließend wurde dem Filtrat zur Fällung der Proteine festes Ammoniumsulfat hinzugegeben, bis eine 1 M Lösung entstand.

2.3.2 Isolierung von nPhl p 1 aus Graspollenextrakt

Die Isolierung von nPhl p 1 erfolgte mittels mehrerer aufeinander folgender chromatographischer Aufreinigungsschritte nach der von Suck et al. (1999) entwickelten Methode.

Verwendete Reagenzien:

Startpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 M Ammoniumsulfat

Laufmittel:	100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0)
-------------	--

Nach der Ammoniumsulfatfällung (s. 2.3.1) wurde als weiterer Schritt zur Aufreinigung von nPhl p 1 eine hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) durchgeführt. Eine mit 70 ml Phenylsepharose High Performance gepackte C26/40-Säule (Amersham-Pharmacia) wurde mittels einer FPLC (ÄKTAprime; Amersham-Pharmacia) mit Startpuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min äquilibriert. Anschließend

wurde Gräserpollenextrakt auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 5 ml/min aufgetrennt.

Die nicht-bindenden Fraktionen, in denen das nPhl p 1 enthalten war, wurden vereinigt und mittels Centriprep-10 (10 kDa Ausschlussgröße, Millipore, Eschborn, Deutschland) auf ein Zehntel des Volumens eingengt. Die restlichen Proteine wurden von der Säule mit A. bidest. eluiert und bei –20 °C gelagert.

Zur Isolierung des nPhl p 1 wurde eine Gelfiltration (Größenausschlußfiltration) durchgeführt, bei der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Nachdem eine XK 50/60 Säule (Pharmacia) mit 1 l Superdex 75 prep grade (durchschnittliche Matrixgröße 34 µm, Pharmacia) gepackt wurde, wurden die eingengten, Phl p 1 enthaltenen Fraktionen auf die Säule geladen. Mit dem Laufmittel wurden die Proteine bei einer Flussrate von 5 ml/min aufgetrennt. Drei Fraktionen wurden gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (1976) mit dem Coomassie Protein Assay Reagenz (Pierce) durchgeführt. Es wurden 20 µl der zu bestimmenden Proteinprobe in 1 ml Reagenz pipettiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Ultrospec III, Pharmacia) bestimmt. Eine BSA-Verdünnungsreihe von 64,5 µg bis 1 mg pro ml diente zur Ermittlung einer Standardreihe. Als Leerwert wurde A. bidest. anstelle der Proteinlösung eingesetzt.

2.3.4 Isolierung von rPhl p 1 aus *Pichia pastoris*-Kulturüberstand mit Hilfe eines gegen nPhl p 1 gerichteten monoklonalen Antikörper

2.3.4.1 Fällung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Verwendete Medien und Puffer:

RPMI 1640 Medium:	10 % (v/v) Fötales Kälberserum
	1 % (v/v) Penicillin

	1 % (v/v) Streptomycin
	1 mM Glutamat
	1 mM Pyruvat
Bindungspuffer:	20 mM Natriumdihydrogenphosphat
	20 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	durch Titrieren der Phosphatlösungen wurde pH 8,9 eingestellt
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin/HCl (pH 3,0)
Kopplungspuffer:	0,2 M Natriumhydrogencarbonat (pH 8,3)
	0,5 M NaCl

Zur Gewinnung des mAk IG12 für die nPhI p 1-Isolierung wurden Hybridomzellen in RPMI 1640 Medium mit 2 % Ultrosor (Gibco, BRL) bei 37 °C kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend durch einen Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser vorgereinigt. Durch tropfenweise Zugabe von einem gleichgroßen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurden die Proteine des Filtrats gefällt und über Nacht gerührt. Während der anschließenden Zentrifugation bei 4500 x g für 30 min wurden die Antikörper pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Bindungspuffer aufgenommen, üN gegen Bindungspuffer dialysiert und durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert. Das Filtrat wurde in 2 ml-Aliquots auf eine Protein A-Säule gegeben und diese mit Bindungspuffer gespült. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Elutionspuffer isoliert. Die Elutionfraktionen wurden vereinigt und anschließend lyophilisiert. Anschließend erfolgte eine Dialyse üN gegen Kopplungspuffer.

2.3.4.2 Kopplung von Antikörpern zur Affinitätschromatographie

Die kovalente Kopplung von monoklonalen Antikörpern an eine Säulenmatrix (HiTrap-Säulen; Pharmacia) ermöglicht die spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus einem Proteingemisch. Bei Verwendung von NHS-aktivierter Sepharose als Säulenmatrix wird der Antikörper effizient über die primären Aminogruppen gekoppelt.

Verwendete Puffer:

Puffer A:	0,5 M Diethanolamin (pH 8,3) 0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl
Puffer B:	0,1 M Natriumacetat (pH 4,0) 0,5 M NaCl

Zunächst wurde die Säule zur Aktivierung mit 1 mM HCl gespült. Der mAk IG12 wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml und nach Angaben des Herstellers (Pharmacia) an die HiTrap-Affinitätssäule HT5 gekoppelt. Anschließend wurden der in Kopplungspuffer aufgenommene mAk auf die Säule gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Freie NHS-Gruppen wurden durch alternierendes Spülen mit Puffer A und B abgesättigt und ungebundene mAk abgetrennt.

2.3.4.3 Aufreinigung von rPhl p 1

Zur Aufreinigung von exprimiertem rPhl p 1 aus Kulturüberständen in *Pichia pastoris*-Zellen wurde eine Affinitätschromatographie mittels einer FPLC (ÄKTAprime; Pharmacia) bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Als Säule wurde eine mit IG12 gekoppelte HT5 HiTrap-Säule (s. 2.3.4.2) eingesetzt.

Verwendete Puffer:

Waschpuffer:	20 mM Natriumdihydrogenphosphat 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat durch Titrieren der Phosphatlösungen wurde pH 7,0 eingestellt
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin/NaOH, pH 11,0

Nach Start des Programms wurden 5 ml des eingengten Expressionsüberstandes (s. 2.2.9.3.2) in die Probenschleife und anschließend auf die Säule appliziert. Nach Spülen der Probenschleife mit 10 ml Waschpuffer wurde die Säule mit der Probe beladen. Mit weiteren 15 ml Waschpuffer wurden die nicht an die Säule gebundenen

Proteine entfernt. Anschließend wurden mit 15 ml Elutionspuffer die gebundenen Proteine von der Säule eluiert. Mit weiteren 25 ml Waschpuffer wurde die Säule und zum Abschluss das gesamte System mit A. bidest. gespült. Zur Konservierung wurden die Pumpen und die Säule mit 20 % Ethanol gewaschen.

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970). In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden zwei unterschiedliche Gel- und Puffersysteme verwendet, die zu einer Konzentrierung der Proteinproben im Sammelgel und danach zur Trennung von Proteingemischen im Trenngel führten. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug T = 4 % und C = 2,7 %, die vom Trenngel T = 12 – 15 % und C = 2,7 %. Dabei bedeutet T (= Total) die Gesamtkonzentration aus Acrylamid (Ac) und Bisacrylamid (Bis), während C (= Crosslinker) den Vernetzungsgrad angibt und sich nach folgender Formel berechnet:

$$\% T = \frac{Ac + Bis}{100} \times 100 \qquad \% C = \frac{Bis}{Ac + Bis} \times 100$$

Durch Verwendung eines SDS-haltigen Probenpuffers wird die Eigenladung der Proteine durch das SDS überlagert. Dadurch werden die so gebildeten anionischen Protein-SDS-Komplexe im Gelsystem nach Molekulargewichten getrennt. Eine Molekulargewichtsbestimmung der Proteine ist anhand von mitgeführten Markerproteinen möglich, da eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und der Laufstrecke besteht.

Verwendete Lösungen:

Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer (4x):	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
Probenpuffer,	
reduzierend (2x):	20 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	2 mM EDTA
	2 % (w/v) SDS

25 % (w/v) Glycerin
 0,3 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
 Probenpuffer,
 nicht-reduzierend (2x): wie reduzierender Probenpuffer (2x), nur ohne β -Mercaptoethanol
 Elektrodenpuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 384 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

Zusammensetzung der Gellösungen:

Tab. 8: Zusammensetzung für das Gießen von zwei SDS-PAGE-Gelen nach Laemmli (1970).

Reagenz	12 % Trenngel	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
A. bidest.	5,5 ml	3,9 ml	2,9 ml
Acrylamidlösung (30 % inkl. 0,8 % Bisacrylamidlösung)	6,5 ml	8,1 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer (4x)	4,0 ml	4,0 ml	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	-	1,3 ml
Pyronin G	-	-	16 μ l
10 % (w/v) SDS	163 μ l	163 μ l	51 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l	5 μ l
10 % (w/v) APS	100 μ l	100 μ l	30 μ l

Die Gekassetten wurden zunächst zu ca. 2/3 mit Trenngel-Lösung befüllt. Nach Aushärtung des Trenngels wurden die Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen und sofort ein Gelkamm in die Sammelgel-Lösung gesteckt.

Zur Aufbereitung der Proben wurden die Proteinlösungen 1:2 mit 2x reduzierendem Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Als Molekulargewichtsstandard diente ein Gemisch (Low marker; Biorad) mit Markerproteinen folgender Molekulargewichte: 14,4; 21,5; 31,0; 45,9; 66,2; 97,4 kDa. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in einer Vertikalkammer (Phase) in Elektrodenpuffer unter den folgenden Bedingungen:

- | | |
|-----------|---|
| 1. 50 V: | bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel übergetreten waren |
| 2. 100 V: | bis die Proben die Mitte des Trenngels erreichten |
| 3. 150 V: | bis die Lauffront den unteren Gelrand erreichte |

2.3.6 Färbung von Proteinen in Gelen

Zur Visualisierung der in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden die Gele entweder mit der kolloidalen Coomassie-Färbelösung RotiBlue oder einer Silberlösung inkubiert.

2.3.6.1 Färbung mit RotiBlue-Coomassie

Herstellung der RotiBlue-Gebrauchslösung:

- 60 ml A. bidest.
- 20 ml 100 % (v/v) Methanol
- 20 ml 5x RotiBlue-Konzentrat

Die SDS-Gele wurden üN in der kolloidalen Coomassie-Färbelösung RotiBlue (Roth) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geschwenkt. Nach Abgießen der Färbelösung konnten die blau gefärbten Proteinbanden vor einem transparenten Hintergrund detektiert werden.

2.3.6.2 Silberfärbung

Als Alternative zur Färbung mit RotiBlue wurden die Proteine in SDS-Gelen mittels einer Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernik (1988) nachgewiesen.

Reagenzien für die Silberfärbung:

- | | |
|---------------|---------------------|
| Fixierlösung: | 30 % (v/v) Ethanol |
| | 10 % (v/v) Eisessig |

Inkubationslösung:	30 % (v/v) Ethanol 0,5 M (w/v) Natriumacetat 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat
Silberlösung:	0,1 % (w/v) Silbernitrat 0,02 % (w/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat 0,01 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA
Glycerinpuffer:	2 % (v/v) Glycerin 7 % (v/v) Eisessig

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Gele zunächst für 30 min bzw. bis zu 2 h in Fixierlösung und anschließend üN in Inkubationslösung gelagert. Daraufgehend wurden die Gele dreimal 10 min in A. bidest. gewaschen und für 1 h in Silberlösung geschwenkt. Nach kurzem Spülen mit A. bidest. wurden die Proteine durch Inkubation in Entwicklerlösung angefärbt. Diese Reaktion wurde nach Entfernen der Entwicklerlösung durch Zugabe der Stopplösung beendet.

Zur Konservierung wurden die mit Coomassie oder Silberlösung gefärbten Polyacrylamidgele für mehrere Stunden in Glycerinpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Lagen in Glycerinpuffer getränkter Einmachfolie eingeschlagen und üN bei RT getrocknet.

2.3.7 Blotting auf Nitrocellulose-Membranen (NC-Membranen)

2.3.7.1 Western-Blot

Für immunologische Untersuchungen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mit Hilfe des Elektrobottings auf NC-Membranen transferiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde nach dem Prinzip des Semi-Dry-Bottings in

einem diskontinuierlichen Puffersystems nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Anodenpuffer I:	300 mM Tris/HCl (pH 10,4) 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM Tris/HCl (pH 10,4) 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 9,4) 40 mM 6-Aminohexansäure 10 % (v/v) Methanol
TBS-Tween:	s. 2.1.4

Auf die angefeuchteten Graphitplatten des Elektrobotters wurden zwei Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier (GB003; Schleicher & Schuell) geschichtet, eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier sowie die im gleichen Puffer äquilibrierte NC-Membran. Darauf wurde das SDS-PAGE-Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen gelegt und anschließend zwei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt.

Das Blotting erfolgte mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 30 min.

Ein Blockieren freier Bindungsstellen auf der NC-Membran wurde durch eine 30-minütige Inkubation in TBS-Tween (pH 7,4) erreicht.

2.3.7.2 India Ink-Färbung

Eine unspezifische Färbung membrangebundener Proteine wurde durch Verwendung von einer India Ink-Färbelösung durchgeführt.

Verwendete Reagenzien:

India Ink-Lösung:	0,1 % (v/v) Pelikan Calligraphy Ink in TBS-Tween (pH 7,4)
TBS-Tween:	s. 2.1.4

Nach Fixierung von Proteinen auf NC-Membranen und anschließendem Blockieren (s. 2.3.7.1) konnten mittels zweistündiger Inkubation mit einer India Ink-Lösung (Hancock und Tsang, 1983) Proteine angefärbt werden. Durch anschließendes Waschen der Membran in TBS-Tween wurde ungebundenes India Ink entfernt.

2.3.7.3 Färbung mittels AuroDye

Als Alternative zu der Färbung membrangebundener Proteine, die mit India Ink nur schwach oder gar nicht angefärbt wurden, wurden die Proteine mit AuroDye (Amersham) nachgewiesen.

Nach dem Blotten wurden die NC-Membranen für 4 h bis üN in der gebrauchsfertigen AuroDye-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Membranen kurz in A. bidest. gewaschen.

2.3.7.4 Immunologische Detektion Membran-gebundener Proteine nach Western-Blot

Für die immunologische Charakterisierung von Proteine wurden mAk und Patientenserum eingesetzt.

Verwendete Reagenzien:

s. 2.1.4

Primärantikörper:

mAk: HB7 (1:20 verdünnt)
IG12 (1:200 verdünnt)
Bo14 (1:20 verdünnt)

Patientenserum: 1:20 verdünnt

Sekundärantikörper:

AP-mouse- α -human IgE (1:5000 verdünnt)
AP-goat- α -mouse IgG und IgM (1:10000 verdünnt)

Alle Antikörperverdünnungen wurden in TBS-Tween durchgeführt.

Nach dem Blotten und der Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Membran in RT und leichtem Schütteln mit verdünntem mAk oder Patientenserum inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBS-Tween (pH 7,4) entfernt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem verdünnten AP-konjugierten Sekundärantikörper. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden nach zweimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBS-Tween (pH 7,4) entfernt. Nach Äquilibrierung der Membran für 10 min in TBS (pH 9,5) wurde der Puffer verworfen und als Substratlösung NBT/BCIP (im Verhältnis 30:1) nach Leary et al. (1983) verwendet. Durch das Abgießen der Substratlösung und anschließendem Waschen in A. bidest. wurde die Farbreaktion gestoppt.

2.3.7.5 Blotting auf PVDF-Membranen

Für eine N-terminale Proteinsequenzierung (s. 2.3.8) wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. 2.3.5) durch Semi-Dry-Blotting nach der Methode von Matsudaira (1987) auf PVDF-Membranen transferiert.

Verwendeter Puffer:

CAPS-Puffer:	10 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (pH 11,0)
	10 % (v/v) Methanol

Hierzu wurden die Membranen kurz in 100 % Methanol und anschließend für 5 min in CAPS-Puffer inkubiert. Das Elektroblothing wurde wie unter 2.3.7.1 durchgeführt, wobei alle Filterpapiere in CAPS-Puffer getränkt wurden.

2.3.7.6 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Verwendete Reagenzien:

Coomassie-Lösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blau R-250
	50 % (v/v) Methanol
Entfärberlösung:	50 % Methanol (v/v)

Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proteine wurden für 30 min mit der Coomassie-Lösung angefärbt. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärberlösung wurde überschüssiger Farbstoff entfärbt und die Membran anschließend getrocknet.

2.3.8 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die Analyse der Aminosäuresequenz von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip des Edman-Abbaus in einem 476 A Protein-Sequencer mit online PTH-Aminosäure-Analysator (Applied Biosystems). Dazu wurden geblottete bzw. flüssige Proben (> 100 pmol) eingesetzt, automatisch abgebaut und als PTH-Aminosäuren detektiert. Durch Vergleich mit einer Standardmischung der PTH-AS (Phenylthiohydantoin-Derivate) konnte jede AS anhand ihrer Retentionszeit identifiziert werden.

2.3.9 Massenbestimmung durch MALDI-TOF-MS

Zur exakten Massenbestimmung des rPhl p 1 wurde eine Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) durchgeführt. Vor der Durchführung wurde die Probe gegen A. bidest. dialysiert und zum vollständigen Entsalzen mittels reverse phase-HPLC gereinigt. Anschließend wurden ca. 20 pmol Protein mit α -Cyanosäure als Matrix kokristallisiert und mit dem und als externen Standard bestimmt (freundlicherweise von Herrn PD Dr. B. Lindner, LG Biophysik Borstel, durchgeführt).

2.3.10 Untersuchungen zur Proteaseaktivität

Zur Charakterisierung und Ermittlung der Spaltspezifität von Proteasen wurden unterschiedliche Methoden durchgeführt.

Zur Untersuchung einer Proteaseaktivität wurde die Methode des Zymogramm, eines SDS-PAGE-Geles mit inkorporiertem Magermilchpulver als Proteasesubstrat, durchgeführt (s. 2.3.10.1). Durch die Vorinkubation mit Inhibitoren und einem im Anschluss durchgeführtem Zymogramm konnten die Proteasen näher klassifiziert

werden (s. 2.3.10.2). Eine genauere Charakterisierung der Spaltspezifität wurde durch einen semiquantitativen APlzym-Test ermittelt, der unterschiedliche Proteasesubstrate beinhaltete (s. 2.3.10.3).

2.3.10.1 Zymogramme

Zur Untersuchung von Proteaseaktivität wurden Zymogramme mit inkorporiertem Magermilchpulver durchgeführt.

Verwendete Puffer:

Aktivierungspuffer

nach Grobe et al.

(1999) für

nPhI p 1/rPhI p 1: 0,1 M Glycin (pH 3,6)

5 mM DTT

10 mM Cystein

10 mM CaCl₂

Probenpuffer,

nicht-reduzierend (2x): s. 2.3.5

Prinzipiell erfolgte die Herstellung wie unter 2.3.5 beschrieben. Statt A. bidest. wurde 0,25 % (w/v) Magermilchpulver in die SDS-Gele nach folgendem Schema zugefügt:

Tab. 9: Ansatz für zwei Zymogramm-Gele.

Reagenz	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
0,25 % (w/v) Magermilchpulverlösung	3,9 ml	2,9 ml
Acrylamidlösung (30 % inkl. 0,8 % Bisacrylamidlösung)	8,1 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer (4x)	4,0 ml	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	1,3 ml
Pyronin G	-	16 µl
SDS (10 %)	163 µl	51 µl
TEMED	16 µl	5 µl
APS (10 %)	100 µl	30 µl

Vor Auftragung der Proben auf das Zymogel wurden diese mit dem gleichen Volumen nicht-reduzierenden oder reduzierenden Probenpuffer 5 min bei RT inkubiert. Die Elektrophorese wurde unter den bei SDS-PAGE beschriebenen Bedingungen durchgeführt (s. 2.3.5). Um für Cysteinproteasen optimale enzymatische Bedingungen zu schaffen, wurden die Zymogele kurz in A. bidest. gespült und anschließend üN bei 30 °C in Aktivierungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine im Gel mit RotiBlue gefärbt. Zur Konservierung der Zymogele wurden diese wie unter 2.3.6.2 angegeben in Glycerinpuffer inkubiert und in Einmachfolie eingeschlagen.

2.3.10.2 Bestimmung der Proteasespezifität durch Inhibitoren

Um Proteasen näher zu klassifizieren, wurden die zu untersuchenden Enzyme mit spezifischen Inhibitoren inkubiert. In einem anschließenden Zymogel wurden die Proben aufgetrennt. Durch eine Inhibition der Aktivität konnte dann den Enzymen eine entsprechende Proteaseklasse zugeordnet werden.

Verwendete Puffer:

Aktivierungspuffer: s. 2.3.10.1

Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C von je 10 µg rPhl p 1 und die bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung von rPhl p 1 nicht-gebundenen Fraktion in Aktivierungspuffer mit folgenden Inhibitoren wurde ein Zymogramm (s. 2.3.10.1) durchgeführt:

- 200 µM E64 (in 50% Ethanol)
- 40 µM N-Ethylmaleimid (in A. bidest.)
- 4 mM Jodacetessigsäure (in A. bidest.)
- 80 mM Pefabloc SC (in A. bidest.)
- 4 mM PMSF (in Isopropanol)

Anschließend wurden die Proben 1:2 mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Probenpuffer verdünnt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend in einem Zymogel aufgetrennt. Das Gel wurde 1 h bei 30 °C in Aktivierungspuffer geschüttelt und anschließend mit RotiBlue gefärbt.

2.3.10.3 Proteasecharakterisierung mittels APlzym-Test

Um die Spaltspezifität einer Protease näher zu charakterisieren, wurde der APlzym-Test (BioMérieux) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Verwendete Puffer und Reagenzien:

Aktivierungspuffer für die Carboxypeptidase Y nach Margolis et al. (1978):	50 mM MES (pH 6,0)
Aktivierungspuffer für nPhl p 1/rPhl p 1:	s. 2.3.10.1
Zym A:	25 % (v/v) Tri-Hydroxy-Methyl-Amino- Methan 3 % (v/v) HCl 10 % (w/v) Laurylsulfat
Zym B:	0,35 % (w/v) Fast Blue BB in 2- Methoxyethanol

Es wurden je 10 µg Protein (Carboxypeptidase Y, die von *Pichia pastoris*-Zellen exprimierte Hefeprotease, rPhl p 1, nPhl p 1) in jedes der 10 Näpfe einer Testreihe in einem Gesamtvolumen von 60 µl gegeben. Nach einer Inkubation für 16 h bei 30 °C wurde der Test nach Zugabe von jeweils 3 Tropfen Zym A- und Zym B-Reagenz entwickelt und nach Vergleich mit einer Farbtabelle qualitativ ausgewertet.

2.3.10.4 Proteasecharakterisierung mittels Spaltung fluorochromer Substrate

Der Einsatz spezifischer, Fluoreszenz-markierter Substrate, die aus wenigen Aminosäuren bestehen, erlaubt eine exakte Bestimmung der Spaltungsspezifität von Proteasen. Nach Inkubation der Enzyme wird der Abbau der Substrate in einem Fluoreszenz-Spektrometer gemessen.

Verwendete Puffer:

Aktivierungspuffer für nPhl p 1/rPhl p 1/ Protease aus <i>Pichia pastoris</i> :		s. 2.3.10.1
Aktivierungspuffer für Cathepsin B nach Turk et al. (1994):		100 mM Natriumdihydrogenphosphat 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat durch Titrieren der Phosphatlösungen wurde pH 6,2 eingestellt 1 mM EDTA 5 mM DTT
Substrate:	50 mg Z-Arg-Arg-AMC in 1 ml 50 % Methanol 10 mg Boc-Val-Leu-Lys-AMC in 1 ml 100 % Methanol	

Um eine optimale Umsetzung der Substrate zu erreichen, wurden die Proteasen (5 µg/ml) zunächst für 2 Stunden in den entsprechenden Aktivierungspuffern vorinkubiert.

In einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Fluorolog SPEX Industries Inc., Edison, New Jersey) wurden in eine Meßküvette 200 µM eines Substrates in einem Volumen von 1 ml für 50 sek. inkubiert. Anschließend wurden die voraktivierten Proteasen zu den Substraten gegeben und die Extinktion über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet. Bei einer Temperatur von 30 °C wurden die Substrate bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$ angeregt, während bei $\lambda_{\text{em}} = 394 \text{ nm}$ die Extinktion gemessen wurde.

2.3.11 Sequenzvergleich von Phl p 1 mit bekannten Cysteinproteasen

Mit Hilfe eines Vergleiches von Aminosäuresequenzen durch Einsatz bestimmter Software-Programme ist es möglich, eine Verwandtschaft zwischen verschiedenen Proteinen zu ermitteln. Ein solches Alignmentprogramm ist das BL2SEQ Version 3.2 von dem Server des San Diego Supercomputer Center. Dieses Programm vergleicht zwei manuell eingegebene Sequenzen mittels einer Matrix miteinander und bestimmt die Homologie der Sequenz oder von Sequenzbereichen.

Für die Vergleiche der Phl p 1- mit der Papain- und der Der p 1-Sequenz wurde in Abhängigkeit von der Qualität der Homologie die PAM70-Matrix eingesetzt, während für den Vergleich mit Cathepsin B die BLOSUM62-Matrix gewählt wurde. Die Zahlen hinter den Matrizes geben die evolutionäre Zeit an. Diese Zeit beschreibt die Mutationshäufigkeit, innerhalb derer 1 % Prozent der Aminosäurenreste mutiert sind. Diese Zahlen werden manuell vorgegeben, wobei durch eine hohe Zahl in dem Aminosäurevergleich eine hohe Sensitivität, aber nur geringe Selektivität erreicht wird. Umgekehrt wird durch eine niedrige Zahl eine geringe Sensitivität, aber eine hohe Selektivität erhalten.

2.3.12 Keimung von *Phleum pratense*- und *Zea mays*-Pollen

Um zu überprüfen, welche natürliche Funktion Phl p 1 besitzt und an welchen Zielstrukturen das aktivierte Protein angreift, wurden Pollenschlauchwachstumstests durchgeführt. Möglicherweise ist das Molekül an der Auskeimung und des

Auswachsens des Pollenschlauches beteiligt. Um einen Einblick in die Funktion zu erhalten, sollten *Phleum pratense*-Pollen *in vitro* zum Keimen angeregt werden.

Verwendete Medien:

Nach Kristen und
Kappler (1995):

10 % (w/v) Sucrose
0,01 % (w/v) Borsäure
3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
10 mM MES
mit KOH auf pH 5,6 eingestellt

Nach Ma et al. (1999):

2 mM Citratphosphat (pH 5,8)
0,44 M Sucrose
1 mM CaCl_2
1 mM Borsäure
1 mM MgSO_4

Maispollenkeimungsmedium
nach Gibbon et al. (1999):

550 mM Sucrose
1,27 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
1 mM KNO_3
200 μM Borsäure

Es wurden bei 4 °C gelagerte und frisch präparierte Pollen über Nacht bei Raumtemperatur in dem von Kristen und Kappler (1995) verwendeten Medium inkubiert. Zusätzlich wurde ein von Ma et al. (1999) für die Auskeimung von Lilienpollen eingesetztes Medium für die Pollenschlauchuntersuchungen am *Phleum pratense*-Pollen verwendet.

Parallel dazu wurden die gleichen Untersuchungen bei den frisch gesammelten und bis zu zwei Tage alten Pollen von *Zea mays* in dem von Gibbon et al. (1999) verwendeten Medium durchgeführt, wobei die Zuckerendkonzentration bei 30 % Sucrose lag.

Das Auskeimen der Pollenschläuche wurde unter einem Mikroskop beobachtet.

3. Ergebnisse

Nach bisherigen Untersuchungen gehört Phl p 1 zu den Cysteinproteasen. Allerdings besitzt es eine der Serinprotease Trypsin ähnliche Spaltspezifität. Hinsichtlich der Struktur und der Funktion des Phl p 1 gibt es noch einige ungeklärte Fragen, die im Laufe der Arbeit geklärt werden sollen.

Um Phl p 1 genau zu klassifizieren, wurde zunächst die Proteinsequenz mit Hilfe eines Programms mit Cystein- und Serinproteasen verglichen. Anschließend sollte die Struktur und die Funktion des aktiven Phl p 1 näher untersucht werden. Hierzu sollten Testsysteme entwickelt und etabliert werden, die die Enzymaktivität *in vivo* ermöglichen sollten.

3.1 Sequenzvergleich von Phl p 1 mit Cysteinproteasen

Die Funktion des Allergens Phl p 1 ist trotz vorheriger Untersuchungen weiterhin unklar. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Phl p 1 mit bekannten Cysteinproteasen sollte Aufschluss darüber geben, ob dem Allergen die natürliche Funktion einer proteolytischen Aktivität zugrunde liegt. Aus diesem Grunde wurde der Vergleich der Phl p 1-Sequenz mit Papain, Cathepsin B und Der p 1 mit Hilfe des Alignmentprogramms BL2SEQ Version 3.2 von dem Server des San Diego Supercomputer Center durchgeführt.

Zunächst ist der Vergleich der Cysteinprotease Cathepsin B mit Papain quasi als Positivkontrolle aufgeführt, wobei jeweils die Gesamtsequenzen gegenübergestellt wurden (s. Tab. 10).

Tab. 10: Vergleich der Aminosäuresequenz von Cathepsin B (Cath. B) mit der Sequenz von Papain. Es wurde die Matrix BLOSUM62 zugrunde gelegt. Erwartungswert = Wahrscheinlichkeit der Homologie zweier Sequenzen bzw. Sequenzbereiche.

Aminosäurevergleich von Cathepsin B (339 AS) mit Papain (405 AS)

Protein	Erwartungswert	Identität	Homologie
Cath. B	2×10^{-24}	89/312	134/312
Papain		(28%)	(42%)

In der Tab. 10 sind der Erwartungswert, Identität und Homologie dargestellt. Der Erwartungswert gibt die Wahrscheinlichkeit an, in wie weit zwei miteinander verglichene Sequenzen oder Sequenzbereiche homolog sind. Je niedriger dieser Wert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer engen Verwandtschaft zweier miteinander verglichenen Proteine. Ist also eine hohe Verwandtschaft zweier Sequenzen festgestellt worden, so ist davon auszugehen, dass sich beide Proteine auch hinsichtlich ihrer Funktion ähneln.

In der Spalte „Identität“ ist zu sehen, dass von 312 verglichenen nur 89 Aminosäuren identisch waren, was einer Identität von 28 % entsprach. Von den 312 Aminosäuren waren 42 % beider Sequenzen homolog (134 von 312 in Spalte „Homologie“).

Trotz der relativ geringen Übereinstimmung hinsichtlich der Identität beider Sequenzen zeigte sich dennoch ein hoher Verwandtschaftsgrad (2×10^{-24}). Das liegt daran, dass bei der Berechnung des „Erwartungswertes“ die Länge der vergleichbaren Sequenzabschnitte mitberücksichtigt wird. Ebenso entscheidend sind Aminosäureeinschübe und Lücken in der Sequenz.

Das Ergebnis eines Sequenzvergleichs zwischen der Phl p 1-Sequenz mit der am besten charakterisierten Cysteinprotease Papain ist in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Vergleich der Aminosäuresequenz von Phl p 1 mit der Sequenz von Papain. Es wurde die Matrix PAM70 zugrunde gelegt. Erwart. = Wahrscheinlichkeit der Homologie zweier Sequenzen bzw. Sequenzbereiche und verdeutlicht den Austausch gegen homologe Aminosäuren; Iden. = Identität; Hom. = Homologie.

Aminosäurevergleich von Phl p 1 (263 AS) mit Papain (405 AS)

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	83 TPIFKSGRGCGSC 95	1.1	7/13 (53%)	9/13 (68%)
Konsensus	TP+ K+ CGSC			
Papain	147 TPV-KNQGSCGSC 158			

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	210 IALKESWGAIW 220	0.045	6/11 (54%)	8/11 (72%)
Konsensus	I +K SWG+ W			
Papain	304 ILIKNSWGTGW 314			

Bei dem Vergleich der Sequenz von Phl p 1 mit derjenigen von Papain wurde PAM70 als Suchmaske zugrunde gelegt, da hiermit die höchstmöglichen Homologien erzielt wurden. Trotz Eingabe der gesamten Sequenzen war zunächst festzustellen, dass es sich im Falle der verglichenen Papain-Sequenz um einen Teil des katalytischen Zentrums der Protease handelte. Innerhalb des Bereiches der Phl p 1-Sequenz von Aminosäureposition 210 bis 220 ergab sich mit der Papain-Sequenz von Aminosäureposition 304 bis 314 ein Erwartungswert von 0,045. Außerdem waren innerhalb dieser beiden Bereiche 6 Aminosäuren identisch (unter „Iden.“ zu erkennen) und 8 homolog (unter „Hom.“ aufgeführt). Eine weitere Homologie ergab sich in dem Bereich 83 bis 95 (Phl p 1-Aminosäuresequenz) mit den Aminosäuren 147 bis 158 der Papain-Sequenz mit einem Erwartungswert von 1,1. Darin waren 7 Aminosäuren identisch und 9 homolog.

Das Ergebnis zeigt, dass zwei bestimmte Bereiche der Phl p 1-Sequenz zu dem katalytischen Zentrum von Papain homolog sind.

Um das Resultat zu bestätigen, wurde ein Vergleich mit der ebenfalls gut charakterisierten Cysteinprotease Cathepsin B durchgeführt (Tab. 12).

Tab. 12: Vergleich der Aminosäuresequenz von Phl p 1 mit der Sequenz von Cathepsin B. Es wurde die Matrix BLOSUM62 zugrunde gelegt. Erläuterung zur Legende s. Tab. 11.

Aminosäurevergleich von Phl p 1 (263 AS) mit Cathepsin B (339 AS)

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz
Phl p 1	6 SVLLVVALFAVFLGSAHGIPKVPP-----GPNITATYGDKWLDKSTWYGK---PTA 54
Konsensus	S++L+ L A L SAH P P N T G + + ++ K
Cath. B	4 SLILLSCLLA--L TSAHDKPSFHP LSDDLIN YINKQNTTWQAGRN FYNVDISY LKKLCGTVL 63

Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
55 AGPKDNGGACGYKDVKPP-FSGMTGCGNTPIFKSGR---GCGSCF 96	0.025	29/108 (26%)	39/108 (35%)
GPK G +D+D P F N P R CGSC+			
64 GGPKLPGRVAFGEDIDLPE TFDAREQWSNCPTIGQIRDQGSCGSCW 109			

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	203 EKGKDKWIALKESWGAIW 220	0.59	7/18 (38%)	8/18 (43%)
Konsensus	E G W+A SW W			
Cath. B	288 ENGVPYWLA-ANSWNLDW 304			

Bei dem Vergleich der Phl p 1-Sequenz mit Cathepsin B wurde die Matrix BLOSUM62 zugrunde gelegt, um die höchstmögliche Homologie zu erhalten. Nach Eingabe der gesamten Sequenzen wurde hierbei ein wesentlich längerer Sequenzbereich am N-Terminus miteinander verglichen. Ebenfalls wie nach Vergleich mit Papain wurde ein Bereich des katalytischen Zentrums des Cathepsin B (GCGSC, AS 91 bis 95) mit der Phl p 1-Sequenz verglichen. Der Erwartungswert betrug 0,025 und liegt damit unterhalb der Werte im Vergleich mit Papain (1.1, s. Tab. 11), was auf eine engere Verwandtschaft zum Cathepsin B hindeutete. Von den insgesamt 108 Aminosäuren, die miteinander verglichen wurden, waren 26 % identisch und 35 % homolog. Am C-terminalen Bereich der Aminosäuren 203 bis 220 der Phl p 1-Sequenz war eine Identität zu den Aminosäuren 288 bis 304 des Cathepsin B von 38 % sowie eine Homologie von 43 % festzustellen. Der Erwartungswert für diesen Bereich lag bei 0,59.

Die Phl p 1-Sequenz zeigt somit sowohl Homologien zu Bereichen des katalytischen Zentrums von Papain und Cathepsin B als auch zur Prosequenz des Cathepsin B.

Ein weiterer Vergleich wurde mit dem Hauptallergen aus der Hausstaubmilbe (Der p 1), einer ebenfalls gut charakterisierten Cysteinprotease, durchgeführt (Tab. 13).

Tab. 13: Vergleich der Aminosäuresequenz von Phl p 1 mit Der p 1. Es wurde die Matrix PAM70 zugrunde gelegt. Erläuterung zur Legende s. Tab. 11.

Aminosäurevergleich von Phl p 1 (263 AS) mit Der p 1 (320 AS)

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	83 TPIFKSGRGCGSC 95	0.064	9/13 (69%)	9/13 (69%)
Konsensus	TPI G GCGSC			
Der p 1	121 TPIRMQG-GCGSC 132			

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	198 AVDI----KEGKDKWIALKESWGAIW 220	0.027	10/27 (37%)	13/27 (48%)
Konsensus	AV+I G D WI + SW + W			
Der p 1	269 AVNIVGYSNAQGVDYWI-VRNSWDTNW 294			

Als Grundlage für den Vergleich der Phl p 1- mit der Der p 1-Sequenz diente zum Erreichen der bestmöglichen Homologie die Matrix PAM70. Analog wie beim Vergleich mit Papain wies auch im Falle des Der p 1 der Bereich des katalytischen Zentrums mit der Phl p 1-Sequenz die größte Sequenzübereinstimmung auf. Innerhalb der Aminosäurepositionen 198 bis 220 (Phl p 1) und 269 bis 294 (Der p 1) wurde ein Erwartungswert von 0,027 erreicht. 37 % der Aminosäuren waren identisch und 48 % homolog. Im Bereich der Aminosäurepositionen 83 bis 95 (Phl p 1) und 121 bis 132 (Der p 1) ergab sich ein Erwartungswert von 0,064. Die Identität und Homologie der Aminosäuren betrug jeweils 69 %.

Ein Vergleich von Phl p 1 mit den typischen Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin ergab keine signifikante Homologie (ohne Abbildung).

Abschließend ist festzustellen, dass Phl p 1 homologe Sequenzabschnitte mit Cysteinproteasen besitzt. Nach den ermittelten Erwartungswerten besteht jedoch keine enge Verwandtschaft zu bekannten Cysteinproteasen.

3.2 Strukturelle Charakterisierung von rPhl p 1

3.2.1 Expression von rPhl p 1 in *Pichia pastoris*

Viele Allergene wie das Phl p 1 sind posttranslational modifiziert. Diese Modifizierungen könnten einen Einfluss auf die Allergenität des Moleküls besitzen. Deshalb wurde die Hefe *Pichia pastoris* als eukaryontisches Expressionssystem genutzt. Zur näheren Charakterisierung von Phl p 1 hinsichtlich Struktur und Funktion wurde es rekombinant in einem *Pichia pastoris*-Klon exprimiert.

Nach Kultivierung des von Grobe et al. (1999) hergestellten Klons SMD1168-49 in Flüssigmedien erfolgte eine rasche Zellvermehrung in den Anzuchtmedien BMDY und BMGY. Durch Überführen der Zellen in das Methanol-haltige Medium BMMY wurde die Expression induziert. Das Phl p 1-Insert war hinter die Sekretions-Signalsequenz (α -mating factor) einkloniert worden, damit das Protein in das Endoplasmatische Reticulum exportiert und weiter im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert wird. Das rekombinante Phl p 1 wurde in das Kulturmedium sekretiert und konnte chromatographisch aus dem Überstand isoliert werden.

3.2.2 Chromatographische Aufreinigung von rPhl p 1 aus Kulturüberstand

Zur genaueren Analyse wurde rPhl p 1 aus dem Kulturüberstand einer Expression aus *Pichia pastoris* mittels affinitätschromatographischer Aufreinigung isoliert.

Nach Expression des rekombinanten Proteins in einem Methanol-haltigen Medium (BMMY-Medium, s. 2.2.10) wurde der Kulturüberstand mit dem darin enthaltenen rPhl p 1 zur Entfernung von Zellen zunächst zentrifugiert und anschließend filtriert. Zur Konzentrierung wurde der Überstand etwa 50fach eingeeengt. Über eine Säule, an die der gegen Phl p 1 gerichtete mAk IG12 gekoppelt war, wurde das rekombinante Allergen affinitätschromatographisch aus dem Kulturüberstand isoliert. Anschließend wurde rPhl p 1 in einem SDS-Gel untersucht.

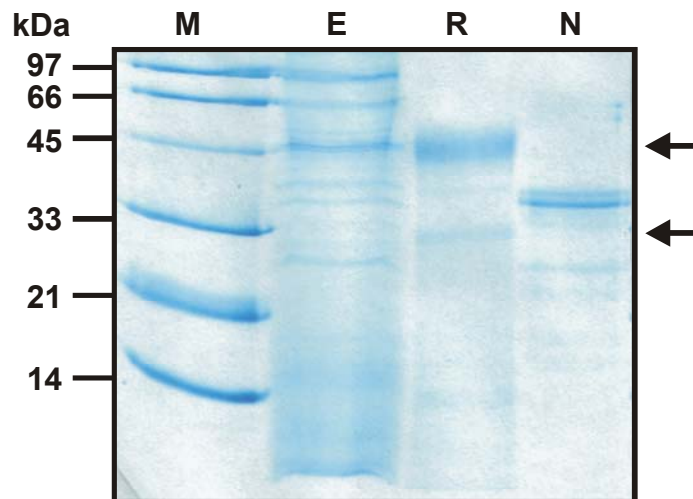


Abb. 5: Nachweis von rPhl p 1 nach Expression aus *Pichia pastoris*-Zellen in einem 15%igen SDS-Gel nach RotiBlue-Färbung. E = Effluent nach affinitätschromatographischer Abtrennung von rPhl p 1 aus *P. pastoris*-Kulturüberstand, R = rPhl p 1, die Pfeile markieren das 30- bzw. das 45 kDa-Protein, N = nPhl p 1, M = Molekulargewichtsmarker.

Abb. 5 zeigt die Proteine des Effluents (von der Säule nicht gebundenes Probenmaterial) und das rPhl p 1 aus dem Eluat nach SDS-PAGE.

Die Auftrennung des rekombinanten Phl p 1 (Spur R) wies eine deutliche, aber diffuse Bande bei etwa 45 kDa (s. Pfeil) auf. Des weiteren war eine schwächere Bande bei etwa 30 kDa (s. Pfeil) zu sehen. Im niedermolekularen Bereich wurden bei 13 kDa weitere Proteine angefärbt. Das Effluent (E) zeigte eine Vielzahl von Proteinen über nahezu den gesamten Molekulargewichtsbereich, wobei die Proteine bei 97, 66, 45, 30 und 15 kDa am intensivsten gefärbt wurden. Unterhalb von etwa 20 kDa war eine diffuse Färbung der Proteine zu detektieren.

Als Kontrolle wurde zusätzlich das natürliche Allergen und zur Abschätzung der Massen der Proteine ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Sehr deutlich waren die 35 und 37 kDa großen Isoformen des nPhl p 1 sichtbar (Spur N).

Um die rekombinanten Moleküle mit dem natürlichen Allergen immunologisch zu vergleichen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach SDS-PAGE-Blot wurden die Proteine mittels der Phl p 1-spezifischen mAk HB7, IG12 und Bo14 nachgewiesen.

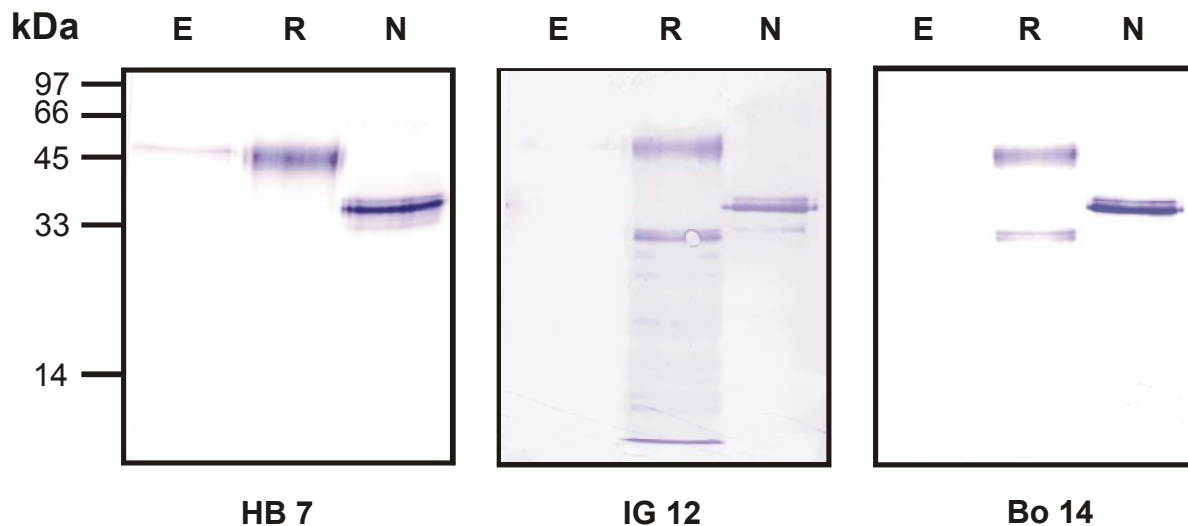


Abb. 6: Detektion von rPhl p 1 (R) nach Expression aus *Pichia pastoris*-Zellen und nPhl p 1 (N) im Western Blot mittels Phl p 1-spezifischer mAk. In Spur E ist das Effluent des Zellkulturüberstandes nach affinitätschromatographischer Abtrennung von rPhl p 1 aufgetragen worden.

Abb. 6 zeigt deutlich, dass der mAk HB7, der gegen den N-terminalen Bereich des Phl p 1 gerichtet ist, das 45 kDa, nicht jedoch das 30 kDa große rekombinante Allergen detektierte. Im Gegensatz dazu erkannte der IG12-Antikörper beide Formen des rPhl p 1. Außerdem band dieser mAk an Komponenten im niedermolekularen Bereich, was auf rPhl p 1-Bruchstücke hindeutete. Der C-terminal bindende mAk Bo14 detektierte ebenso wie der IG12-Antikörper Proteinbanden von 30 kDa und 45 kDa. In der Probe des natürlichen Allergens banden alle drei Antikörper an die beiden Isoformen von 35 und 37 kDa.

Nach Durchführung eines Blots mit dem rekombinanten Protein und einer anschließenden Untersuchung mit Hilfe von 20 Gräserpollen-Allergikerseren konnten die 30 wie auch die 45 kDa-Proteinbande detektiert werden (ohne Abbildung).

Der Nachweis von Zuckerstrukturen mit Hilfe des Lektins Con A zeigte eine starke Glykosylierung des 45 kDa-Proteins, so dass dieses Molekül sehr wahrscheinlich hyperglykosyliert war (ohne Abbildung). Ein weiterer Hinweis darauf, dass der Massenunterschied aufgrund von zusätzlichen Kohlenhydraten am 45 kDa-Protein zu erklären ist, war die leicht diffuse Bande nach Auftrennung in der SDS-PAGE. Im Gegensatz dazu wurde das 30 kDa-Protein als diskrete Bande nachgewiesen (s. Abb. 5 und 6).

Es besteht somit zwischen nPhl p 1 und rPhl p 1 ein eklatanter Größenunterschied von ca. 5 bzw. 10 kDa. Zu dem wurde das rekombinante Protein mit zwei

unterschiedlichen Molekulargewichten exprimiert, obwohl nur ein Gen in das *Pichia pastoris*-Genom inseriert wurde.

Das rekombinante Protein wurde mittels affinitätschromatographischer Aufreinigung nahezu vollständig aus dem Kulturüberstand (E) entfernt.

Nach Dialyse der rPhl p 1-haltigen Proben gegen A. bidest. und anschließender Aufkonzentrierung ergab die Proteinbestimmung eine Ausbeute zwischen 200-800 µg rPhl p 1 aus 500 ml Kulturüberstand.

3.2.3 Massenbestimmung von rPhl p 1 mittels N-terminaler Sequenzierung und MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Um die Aminosäuresequenz der beiden 30 und 45 kDa großen rekombinanten Allergene nach SDS-PAGE zu ermitteln, wurde eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Aufgrund sehr geringer Probenkonzentration (ca. 50 pmol) und der Verunreinigung durch Begleitproteine war die Bestimmung schwierig, erlaubte aber den eindeutigen Nachweis der N-terminalen Sequenzen (Tab. 14).

Tab. 14: Aminosäurevergleich nach N-terminaler Sequenzierung von nPhl p 1 und rPhl p 1.

Protein	Masse	N-terminale Aminosäuresequenz
nPhl p 1	35/37 kDa-Protein	I P K V P P G
rPhl p 1	45 kDa-Protein	Y I P K V P P G
	30 kDa-Protein	Y I P K V P P G

In Tab. 14 sind die Ergebnisse der Ansequenzierung von nPhl p 1 und rPhl p 1 vergleichend dargestellt. Sie stimmen in den ersten sieben Aminosäuren vollständig überein. Klonierungsbedingt besitzen die rekombinanten Moleküle als erste Aminosäure zusätzlich einen Tyrosinrest.

Zur exakten Bestimmung der Molekülmassen der nach SDS-PAGE 30 und 45 kDa großen rPhl p 1-Moleküle sollte eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Nach Durchführung der Methode ließen sich keine Proteinpeaks detektieren. Deshalb wurde eine Entsalzung der Proben mittels reverse phase-HPLC

vorgenommen. Trotzdem war mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie keine Bestimmung der Massen möglich.

3.2.4 Versuche zur Steigerung der Expressionsrate von rPhl p 1

Um die Ausbeute von rekombinantem Phl p 1 aus *Pichia pastoris* (200-800 µg aus 500 ml Kulturüberstand) zu erhöhen, bestand zum einen die Möglichkeit, eine Steigerung der Expressionsrate über eine längere Kultivierungszeit zu erreichen. Zum anderen wurde eine Verbesserung der Ausbeute durch eine Klonierung von rPhl p 1 in einen optimierten Hefvektor angestrebt.

3.2.4.1 Langzeitkultur von rPhl p 1 in *Pichia pastoris*

Zur Steigerung der Ausbeute wurden die Zellen (Klon SMD1168-49) über einen Zeitraum von einer Woche in Methanol-haltigem Medium kultiviert. Nach täglichem Wechsel des Kulturüberstandes wurden zur Kontrolle der Expression SDS-PAGE-Gele und Zymogramme durchgeführt. Das Zymogramm wurde, wie unter 2.3.10.1 beschrieben, nach Elektrophorese im Aktivierungspuffer inkubiert und anschließend mittels RotiBlue gefärbt (Abb. 7).

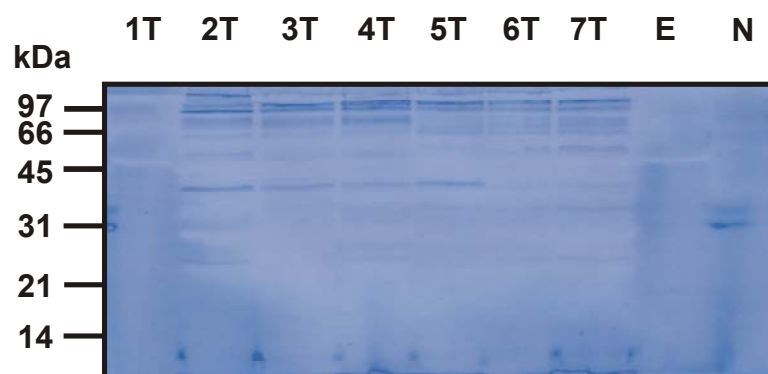


Abb. 7: Untersuchung zur Langzeitkultur von rPhl p 1 in *Pichia pastoris* im Zymogramm. Auftragung von Kulturüberständen: 1T = Kultur nach 1 Tag; 2T = Kultur nach 2 Tagen; 3T = Kultur nach 3 Tagen; 4T = Kultur nach 4 Tagen; 5T = Kultur nach 5 Tagen; 6T = Kultur nach 6 Tagen; 7T = Kultur nach 7 Tagen; E = Effluent nach rPhl p 1-Depletierung; N = nPhl p 1.

Wie in Abb. 7 dargestellt, waren die aufgrund proteolytischer Aktivität entstandenen transparenten Banden in dem gefärbten Gel deutlich zu erkennen. Diese Banden erstreckten sich über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 20 bis 97 kDa. Nach Kultivierung der Zellen über einen Tag war eine transparente Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen, die von der Aktivität der Protease aus *P. pastoris* ausging. Am vierten Tag ließen sich noch distinkte Banden mit proteolytischer Aktivität erkennen, während ab dem fünften bis zum achten Tag die Spur aufgrund der vollständigen Hydrolyse des Caseins fast völlig aufgeheilt erschien. Vermutlich waren zusätzliche Proteasen aufgrund von lysierten Zellen freigesetzt worden. Außerdem waren weitere, Protease-resistente Proteine im Zymogramm als blau gefärbte Banden im höhermolekularen Bereich zu erkennen.

Zur Überprüfung, ob durch die Langzeitkultur die Konzentration des rPhl p 1 in dem Kulturüberstand von *Pichia pastoris*-Zellen gesteigert wurde, wurde zunächst ein Immunoblot durchgeführt (Abb. 8).

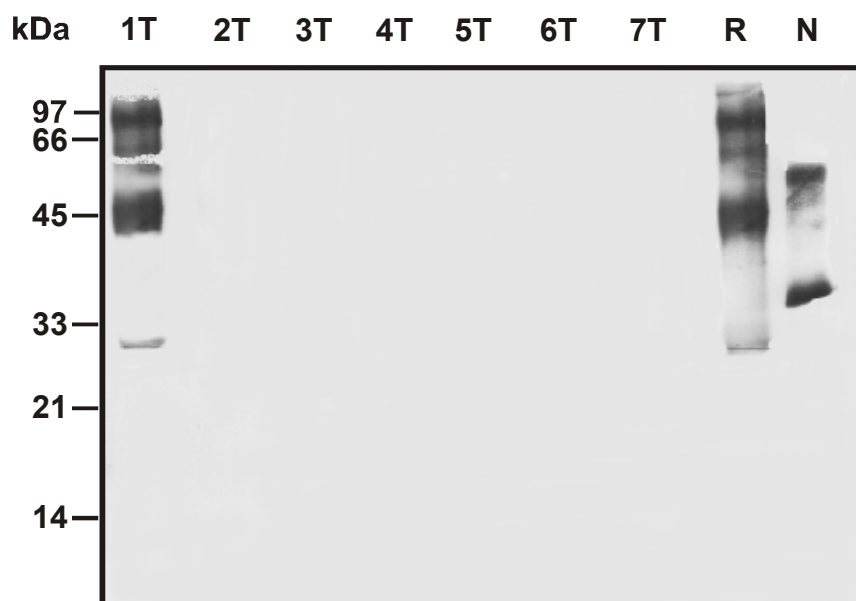


Abb. 8: Untersuchung von rPhl p 1-exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen einer Langzeitkultur nach Detektion mit Hilfe des mAk Bo14 im Immunoblot. Auftragung von Kulturüberständen von Expression über 1 Tag (1T), 2 Tage (2T), 3 Tage (3T), 4 Tage (4T), 5 Tage (5T), 6 Tage (6T) und 7 Tage (7T); R = rPhl p 1 einer Kontrollexpression nach einem Tag; N = nPhl p 1.

Der Kulturüberstand von rPhl p 1-exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen wurde an unterschiedlichen Tagen geerntet und in einem Immunoblot mit dem mAk Bo 14 detektiert. Die Untersuchung mit den mAk HB 7 und IG 12 ergab im Immunoblot das

gleiche Ergebnis (ohne Abbildung). In der ersten Spur (1T) war eine breite diffuse Bande bei 30 kDa sowie bei 45 kDa zu sehen. Des weiteren waren Banden im Bereich von 60 bis 90 kDa detektierbar. Eine von der Langzeitkultur unabhängige Kontrolle von einer Expression über einen Tag, wie sie sonst durchgeführt wurde, zeigte das rPhl p 1 (R). In dieser Bahn wurde immunologisch das gleiche Proteinmuster wie in der Langzeitkultur nach einem Tag nachgewiesen. Das Ergebnis des Blots zeigte, dass ab dem vierten Tag der Expression kein rPhl p 1 mehr detektiert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass das rekombinante Allergen bei längerer Kultivierung vollständig degradiert wurde.

Zur Kontrolle des monoklonalen Antikörpers Bo14 war nPhl p 1 aufgetrennt worden. Dabei war deutlich infolge von Dimerisierung des Allergens bei etwa 70 kDa eine Bande sowie das Monomer bei 35 kDa zu sehen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch eine Kultivierung von rPhl p 1 exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen über mehrere Tage keine Steigerung der rPhl p 1-Konzentration erreicht werden konnte. Dementsprechend wurden für weitere Untersuchungen Expressionsüberstände nach einem Tag geerntet und das rPhl p 1 aufgereinigt.

3.2.4.2 Klonierung von rPhl p 1 in dem optimierten Hefvektor pPIC9K

Als weitere Möglichkeit zur Steigerung der Expressionsrate wurde versucht, die für Phl p 1 kodierende DNA (phl p 1) in den Vektor pPIC9K und anschließend in das Hefegenom zu transferieren. Mit Hilfe des Vektors pPIC9K lässt sich in einem *in vivo*-Screening die Kopienzahl der in das Genom inserierten DNA aufgrund vermittelter Antibiotikaresistenz abschätzen. Somit ließe sich über eine erhöhte phl p 1-Kopienzahl im Genom die Expressionsrate von Phl p 1 steigern.

Zur Klonierung der Allergen-DNA in den Vektor pPIC9K wurde mit Hilfe der PCR ein 720 bp großes Amplifikat aus dem Vektor-Insert-Produkt pPIC9-rphl p 1 generiert. Der verwendete 5'-Primer (5'-rphlp1-EcoRI) enthielt eine *Eco* RI-Schnittstelle, während der 3'-Primer (3'-rphlp1-NotI) eine *Not* I-Schnittstelle besaß. Nach der PCR wurde der Vektor pPIC9K mit Hilfe der Enzyme *Eco* RI und *Not* I geöffnet. In der Abb. 9 ist die Auftrennung von dem PCR-Amplifikat und dem geschnittenen Vektor zu sehen.

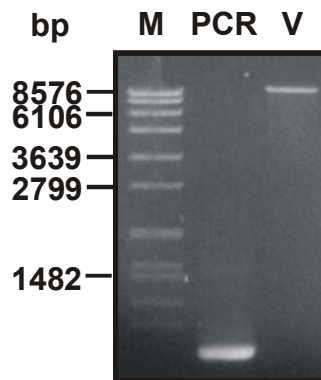


Abb. 9: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts rphl p 1 und des linearisierten Vektors pPIC9K in einem Agarosegel. PCR = amplifiziertes rphl p 1; V = linearisierter Vektor; M = DNA-Molekulargewichtsmarker.

Im Agarosegel zeigte das PCR-Amplifikat erwartungsgemäß eine Größe von etwa 700 bp, während der mittels Enzymen linearisierte Vektor eine Größe von 9,3 bp besaß.

Nach Ligation der amplifizierten rphl p 1-DNA in das Plasmid wurden elektrokompente *E. coli*-Zellen (DH5α) mittels Elektroporation transformiert und kultiviert. Um zu überprüfen, ob rphl p 1 in pPIC9K inseriert und anschließend in *E. coli*-Zellen amplifiziert wurde, wurde die DNA aus transformierten Zellen isoliert und nach entsprechender Restriktion mittels *Eco* RI und *Not* I im Gel überprüft (Abb. 10).

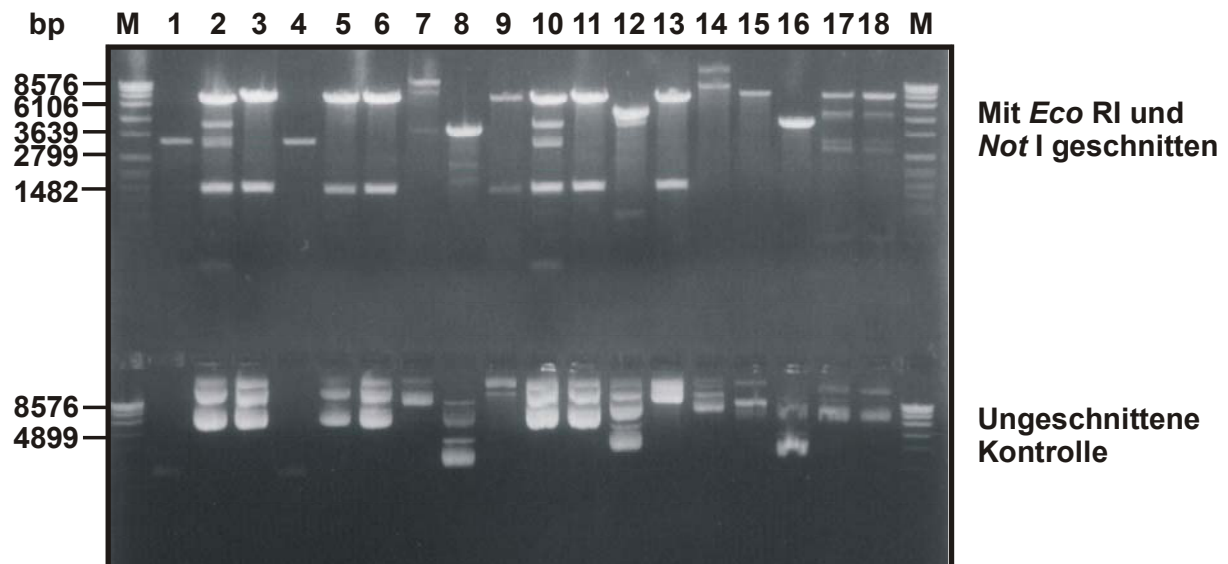


Abb. 10: Restriktionsanalyse von pPIC9K-rp1 p 1-Konstrukten in einer Agarosegelelektrophorese. Nach Restriktion der isolierten DNA-Konstrukte wurden diese in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Klone 1-18 = mittels *Eco* RI und *Not* I kloniertes rp1 p 1; M = DNA-Längenstandard VII.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse. Nach Vergleich der Größen der getrennten DNA-Moleküle mit dem DNA-Längenstandard konnte nach Restriktion weder eine der Vektorgröße entsprechende Bande von 9,3 kb noch die des Inserts von etwa 720 bp detektiert werden. Vielmehr waren zusätzliche DNA-Fragmente entstanden wie z. B. in den Spuren 2 und 10 erkennbar war. Außerdem wurde zur Überprüfung von rp1 p 1-pPIC9K-Produkten eine PCR mit rp1 p 1-spezifischen Primern durchgeführt. Eine gelungene Reamplifikation wäre ein Beweis für die erfolgreiche Klonierung. Insgesamt wurden etwa 600 Klone untersucht, aber es konnte kein Klon detektiert werden, der das Insert enthielt.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch den Vektor verursacht wurde, wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α mittels Elektroporation mit dem Vektor ohne Insert transformiert. Nach Kultur auf Selektionsagar Δ N bei 37 °C wurde ein Klon in Selektionsmedium kultiviert. Zur Analyse des Vektors wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit den Enzymen *Eco* RI und *Not* I geschnitten.

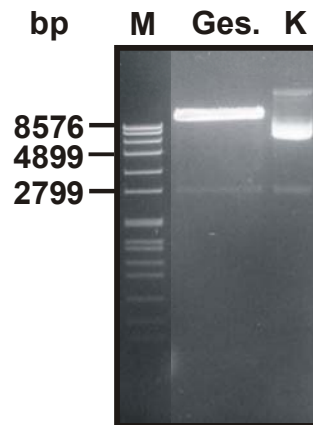


Abb. 11: Auftrennung von Plasmid-DNA (pPIC9K) in der Agarosegelelektrophorese. Ges. = mittels *Eco* RI und *Not* I restringierter Vektor; K = nichtgeschnittener Vektor; M = DNA-Marker.

In Abb. 11 ist der *Eco* RI-/*Not* I-geschnittene Vektor aufgetragen (Ges.), der erwartungsgemäß bei etwa 9,3 kb zu erkennen war. Daneben wurde das ungeschnittene Plasmid (K) aufgetrennt. Deutlich waren hier bei etwa 8,3 und 12 kb Banden sichtbar, die aufgrund der natürlicherweise vorkommenden DNA-Konformation (coiled und supercoiled) zustande kam und dadurch das Laufverhalten der DNA-Moleküle beeinflusst hatten. Das Ergebnis zeigte somit, dass die Enzyme den Vektor geschnitten und dadurch seine Konformation verändert hatte. Von 54 untersuchten Klonen trugen 52 den Vektor mit der richtigen Größe, während die anderen Klone nur Vektorfragmente enthielten.

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass das Insert in dem *E. coli*-Stamm DH5 α einen toxischen Effekt verursachte und dadurch weder der Vektor noch die *rhl* p 1-DNA detektiert werden konnte, wurden weitere *E. coli*-Stämme (VCS257, XL1-Blue, JM109) mit dem *rhl* p 1-pPIC9K-Konstrukt transformiert.

Nach der DNA-Isolierung wurde die DNA wie oben geschnitten. Insgesamt wurden mit Hilfe dieser Methode je *E. coli*-Stamm etwa 300 Klone untersucht. Ebenso wie nach Verwendung des DH5 α -Stammes konnten keine das Insert enthaltende Klone detektiert werden. Zudem wurden ebenfalls unterschiedlich große DNA-Bruchstücke erkannt.

Die Klonierung des Inserts mittels *Eco* RI und *Not* I konnte demzufolge nicht erfolgreich durchgeführt werden. Da das Enzym *Not* I nur eine geringe Aktivität besitzt, wurde in einem weiteren Ansatz *rhl* p 1 mit *Eco* RI-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende hergestellt. Eine Überprüfung von weiteren 500 Klonen ergab erneut unterschiedlich große DNA-Fragmente (ohne Abbildung).

Somit konnte mit dieser Strategie die phl p 1-Gensequenz nicht stabil in den gewünschten Expressionsvektor eingebaut werden.

Da die Ausbeute von rPhl p 1 nicht weiter erhöht werden konnte, wurde der Expressionsüberstand nach einem Tag filtriert und aufgereinigt.

3.3 Funktionelle Charakterisierung von rPhl p 1

3.3.1 Aktivitätsuntersuchungen mittels Zymogramm

Um Phl p 1 bezüglich seiner postulierten proteolytischen Aktivität näher zu charakterisieren, sollte das Substratspektrum der Protease zunächst anhand von rPhl p 1 näher eingegrenzt werden. rPhl p 1 wurde dazu in *Pichia pastoris* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt, dialysiert und etwa 500fach aufkonzentriert.

Die Ermittlung der Proteaseaktivität erfolgte in einem Zymogramm, in dem Milchpulver als Proteasesubstrat eingegossen wurde. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben im Zymogramm-Gel wurde das Gel üN in Aktivierungspuffer inkubiert und anschließend mit RotiBlue gefärbt (Abb. 12).

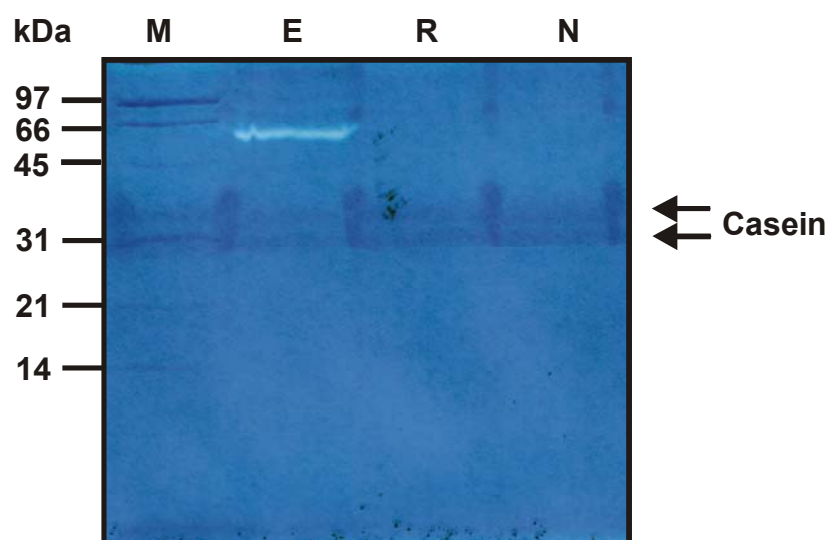


Abb. 12: Untersuchung von nPhl p 1 (N) und rPhl p 1 (R) hinsichtlich proteolytischer Aktivität mittels Zymogramm. E = Effluent nach affinitätschromatographischer Abtrennung von rPhl p 1 aus *P. pastoris*-Kulturüberstand; M = Molekulargewichtsmarker.

Proteolytische Aktivität war in einem Zymogramm als eine transparente Bande vor einem blau gefärbten Hintergrund zu erkennen (Abb. 12). Bei 31 und 33 kDa waren zwei Proteinbanden sichtbar, die sich über die gesamte Breite des Gels erstrecken. Dabei handelte es sich um das während der Elektrophorese zum Teil ebenfalls aufgetrennte im Milchpulver enthaltene Casein. In Vorversuchen mit Molekulargewichtsmarkern konnte nachgewiesen werden, dass das Substrat nicht das Laufverhalten der Proteine im Gel während der Elektrophorese veränderte.

In den Bahnen, in denen das Effluent, das rekombinante und das natürliche Allergen aufgetrennt wurden, waren keine weiteren Proteinbanden sichtbar. Weder rPhl p 1 noch das natürliche Allergen zeigten aufgehellte Bereiche, die auf eine proteolytische Aktivität hinweisen würden. Auch nach Vorinkubation von rPhl p 1 und nPhl p 1 in Aktivierungspuffer für bis zu 16 h konnte nach anschließender Auftrennung im Zymogramm keine Aktivität nachgewiesen werden.

In dem Zymogel war trotz des darin enthaltenen SDS im Effluent eine transparente Bande bei etwa 50 kDa sichtbar. Sie war sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen detektierbar. Aufgrund proteolytischer Aktivität wurde an dieser Stelle das Substrat hydrolysiert. Diese Aktivität wurde ebenfalls im Kulturüberstand von nicht transformierten Zellen detektiert. Das Effluent bzw. der Kulturüberstand von nicht transformierten Zellen wurde in weiteren Untersuchungen zur Proteaseaktivität eingesetzt.

3.3.2 Hemmung von Proteasen mit Hilfe von Inhibitoren

Zur Klassifizierung der aus *Pichia pastoris* sekretierten Protease wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. rPhl p 1 und das Effluent wurden mit den Cysteinproteaseinhibitoren E64, N-Ethylmaleimid, Jodacetessigsäure, sowie den Serinproteaseinhibitoren Pefabloc SC und PMSF inkubiert. Zur Visualisierung vorhandener Proteaseaktivität wurde anschließend ein Zymogramm durchgeführt (Abb. 13).

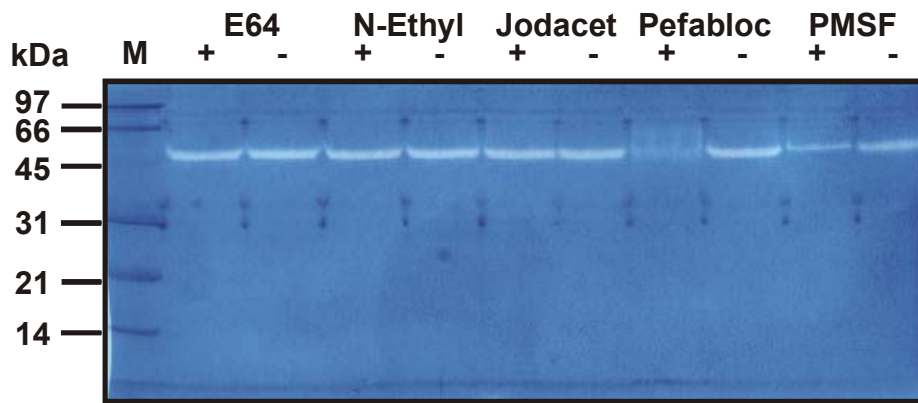


Abb. 13: Bestimmung der Enzymklasse von der aus *Pichia pastoris* sekretierten Protease im Zymogramm unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren. Der Überstand wurde vor der Auftrennung mit den Cysteinprotease-spezifischen Inhibitoren E64 (E64), N-Ethylmaleimid (N-Ethyl), Jodacetessigsäure (Jodacet) bzw. Serinprotease-spezifischen Inhibitoren Pefabloc SC (Pefabloc) und PMSF (PMSF) inkubiert (je mit + gekennzeichnet). Als Kontrolle wurden die Proteine in den Lösungsmitteln, in denen die jeweiligen Inhibitoren aufgenommen wurden, aufgetragen (mit – kenntlich gemacht). M = Molekulargewichtsmarker.

Transparente, Proteaseaktivität anzeigende Banden waren bei etwa 50 kDa in allen Lösungsmittelkontrollen zu erkennen. Außerdem war eine transparente Bande auch nach Vorinkubation der Probe mit E64, N-Ethylmaleimid und Jodacetessigsäure vor Auftrennung im Zymogramm identifizierbar. Demgegenüber erschien keine aufgehellte, proteolytisch aktive Bande, wenn die Protease mit PMSF und Pefabloc SC vorinkubiert wurde. Diese beiden Substanzen sind als Serinprotease-spezifische Inhibitoren beschrieben worden. Demnach handelt es sich bei der aus *Pichia pastoris* sekretierten Protease um eine Serinprotease.

Ein entsprechender Ansatz, in dem rPhl p 1 und nPhl p 1 mit Inhibitoren inkubiert wurden, zeigte im Zymogramm keine transparente Banden (ohne Abbildung). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Proteaseaktivität von nPhl p 1 bzw. rPhl p 1 nicht nachgewiesen werden konnte.

3.3.3 Bestimmung des Substratspektrums der Protease aus *Pichia pastoris*

Zur Überprüfung, ob die in dem Effluent detektierte Proteaseaktivität mit der von Grobe et al. (1999) gefundenen und dem rPhl p 1 zugeschriebenen Aktivität

übereinstimmt, wurden Untersuchungen mittels Apizym-Test durchgeführt. Dieser Test beinhaltet synthetische Substrate, die ein sehr breites Spektrum abdecken.

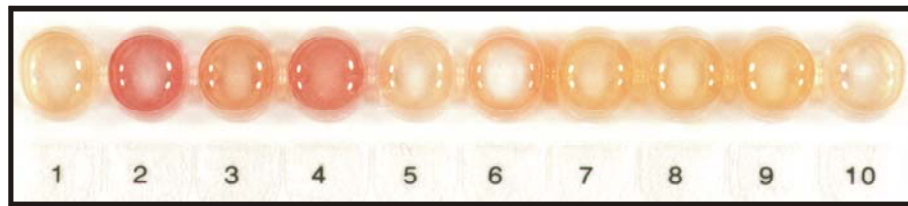


Abb. 14: Bestimmung der Substratspezifität von der Protease aus *Pichia pastoris* im APIzym-Test. Als Puffer wurde 50 mM MES, pH 6,0 (Aktivierungspuffer für Serinproteasen) eingesetzt. 1 = Kontrolle; 2 = 2-Naphthyl-Phosphat; 3 = 2-Naphthyl-Butyrat; 4 = 2-Naphthyl-Caprylat; 5 = 2-Naphthyl-Myristat; 6 = L-Leucin-2-Naphthylamid; 7 = L-Valyl-2-Naphthylamid; 8 = L-Cystin-2-Naphthylamid; 9 = N-Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphthylamid; 10 = N-Glutaryl-Phenylalanin-2-Naphthylamid.

Abb. 14 zeigt, dass einige Substrate durch die im Kulturüberstand enthaltene *Pichia pastoris*-Protease (s. 3.3.1) bzw. durch andere im Überstand vorhandene Enzyme umgesetzt wurden. Der Überstand wurde in einem Puffer inkubiert, der Serinproteasen aktiviert (MES-Puffer).

In Napf #1 war als Kontrolle die Eigenfarbe der Probe zu sehen. Die Substrate der Näpfe #2 bis #4 sowie im schwachen Maße auch des Napfes #6 wurden hydrolysiert, was an den bräunlich gefärbten Farbkomplexen in den Näpfen zu erkennen war. Der Kulturüberstand enthielt somit alkalische Phosphatasen (Napf #2), eine Esterase-Lipase (Napf #3), eine Esteraseaktivität (Napf #4) sowie eine Leucin-Arylamidase (Napf #6).

Durch die Inkubation des rPhl p 1-depletierten *Pichia pastoris*-Kulturüberstands in Aktivierungspuffer (typisch für die Aktivierung von Cysteinproteasen) war keine Proteaseaktivität zu erkennen (nicht abgebildet).

Aufgrund der möglichen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der Protease aus *Pichia pastoris* zu der Carboxypeptidase Y, einer Serinprotease aus *Saccharomyces cerevisiae*, wurde diese ebenfalls in einem weiteren Test eingesetzt. Die Carboxypeptidase Y besaß im Gegensatz zur Protease aus *Pichia pastoris* die gleiche Spezifität wie Chymotrypsin, einer gut charakterisierten Serinprotease (ohne Abbildung).

Um eine vermeintliche Cysteinproteaseaktivität von nPhl p 1 und rPhl p 1 zu überprüfen bzw. eine Serinproteaseaktivität auszuschließen, wurden die Proben in einem für Cysteinproteasen typischen Aktivierungspuffer (pH 3,6) bzw. in für Serinproteasen typischen Puffer (MES, pH 6,0) inkubiert.

Nach Inkubation der Teststreifen mit nPhl p 1 bzw. rPhl p 1 besaßen sämtliche Näpfe eine blassgelbe bzw. farblose Lösung (ohne Abbildung). Auch nach längerer Inkubation verfärbten sich die Lösungen in den Näpfen nicht. Ein hier nicht gezeigter Ansatz, in dem die Allergene in MES-Puffer inkubiert und anschließend in dem APIzym-Test eingesetzt wurden, führte ebenfalls zu keiner Farbveränderung und somit zu keinem Umsatz der Substrate in den Näpfen.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder nPhl p 1 noch rPhl p 1 mit den bisherigen Methoden proteolytisch aktiviert werden konnten. Die Protease aus *Pichia pastoris* scheint eine andere Spezifität als die Carboxypeptidase Y aus *S. cerevisiae* zu besitzen. Die im rPhl p 1-depletierten *Pichia pastoris*-Kulturüberstand vorhandene Protease besaß im Gegensatz zu der von Grobe et al. (1999) beschriebenen Proteaseaktivität keine Trypsin-ähnliche Spaltung. Somit besitzt die in dem Testsystem eingesetzte, rPhl p 1-enthaltene Probe eine andere Substratspezifität als die Protease aus *Pichia pastoris*.

3.3.4 Untersuchungen zur Proteaseaktivität mittels fluorochromer Substrate

Um einen möglichen negativen Effekt des in den Zymogramm-Gelen vorhandenen SDS auf die Proteaseaktivität von nPhl p 1 bzw. rPhl p 1 auszuschließen, wurde eine Untersuchung mit fluorochromen Substanzen durchgeführt, die von der Cysteinprotease Cathepsin B hydrolysiert werden. Ausgehend von einer Homologie der Aminosäuresequenz zwischen Phl p 1 und Cathepsin B (35 %, s. 3.1) wurden die Substrate Z-R-R-AMC und Boc-V-L-K-AMC eingesetzt. Die Proteasen wurden in den entsprechenden Puffern für 2 h vorinkubiert, bevor sie für die Messungen eingesetzt wurden. Eine fehlende Vorinkubation führte bei Cathepsin B zu keiner Hydrolyse der Substrate (ohne Abbildung). In einem Fluorometer wurde die Spaltung der Substrate mittels der Protease aus *Pichia pastoris*, rPhl p 1 und nPhl p 1 mit der von Cathepsin B verglichen (Abb. 15 a).

Fluoreszenz von Z-Arg-Arg-AMC

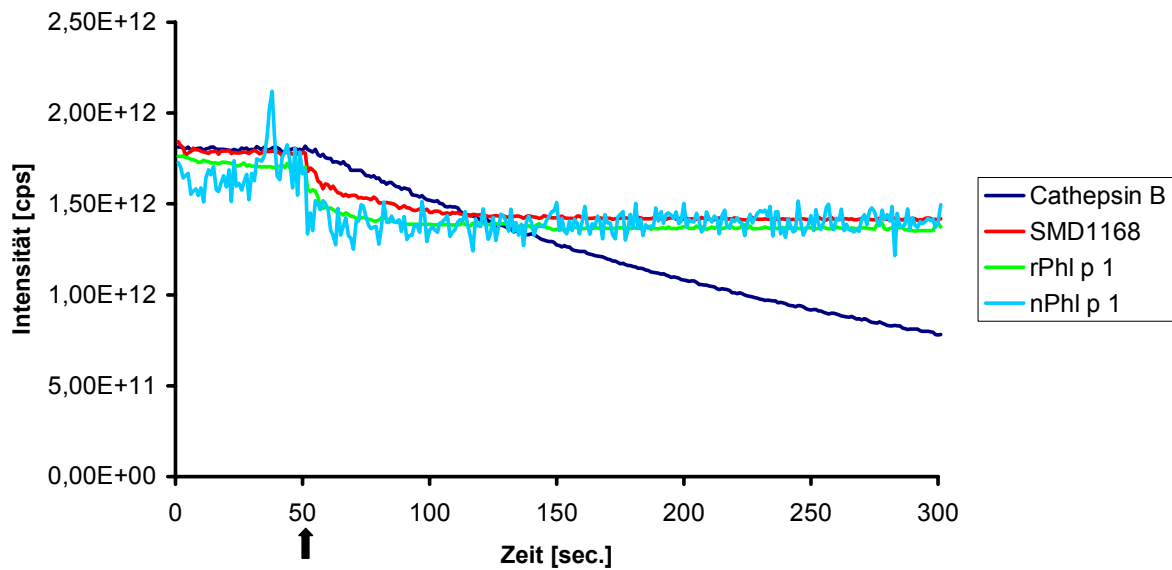


Abb. 15 a: Bestimmung der Enzymaktivität durch proteolytische Spaltung des fluorochromen Substrates Z-R-R-AMC. Getestet wurden nPhl p 1, rPhl p 1, Cathepsin B (Positivkontrolle) und SMD1168 = Kulturüberstand von untransformierten *P. pastoris*-Zellen (Negativkontrolle); Pfeil = Zugabe der Proteasen.

In dem Diagramm (Abb. 15 a) ist die Intensität der Fluoreszenz (in cps angegeben) von Z-R-R-AMC in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Zur Einstellung einer Basislinie wurde zunächst nur das Substrat in die Meßküvette gegeben. Nach 50 sek. erfolgte die Zugabe der Probe (Pfeil im Spektrogramm). Die als Positivkontrolle eingesetzte Cysteinprotease Cathepsin B, die in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde wie die übrigen Proteine, bewirkte innerhalb von 250 sek. eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um etwa die Hälfte durch Spaltung des Substrates. Während des gleichen Zeitraumes veränderte sich die Fluoreszenzintensität lediglich direkt nach Zugabe der eingesetzten Proteine nPhl p 1, rPhl p 1 bzw. des Kulturüberstands von *P. pastoris*-Zellen. Es war nur eine geringe Abnahme zu beobachten, die auf die Zugabe der Proteine und der damit verbundenen Verdünnung zurückzuführen war. Allerdings stabilisierte sich der Intensitätswert schon innerhalb von 20 sek. und blieb dann auf einem konstanten Niveau bis zum Ende der Messung erhalten, ohne dass das Substrat gespalten wurde. Somit handelte es sich bei der kurzzeitigen Abnahme der Fluoreszenz um einen Effekt, der von der Probenzugabe und nicht von einer

möglichen Enzymwirkung ausgeht, da die Zugabe von Lösungen ohne Proteine die gleiche kurzzeitige Abnahme in der Fluoreszenz zeigte.

Zur weiteren Untersuchung zur Proteaseaktivität der Allergene wurde ein weiteres Cathepsin B-spezifisches Substrat eingesetzt. In Abb. 15 b ist das Ergebnis der hydrolytischen Spaltung von Boc-V-L-K-AMC dargestellt.

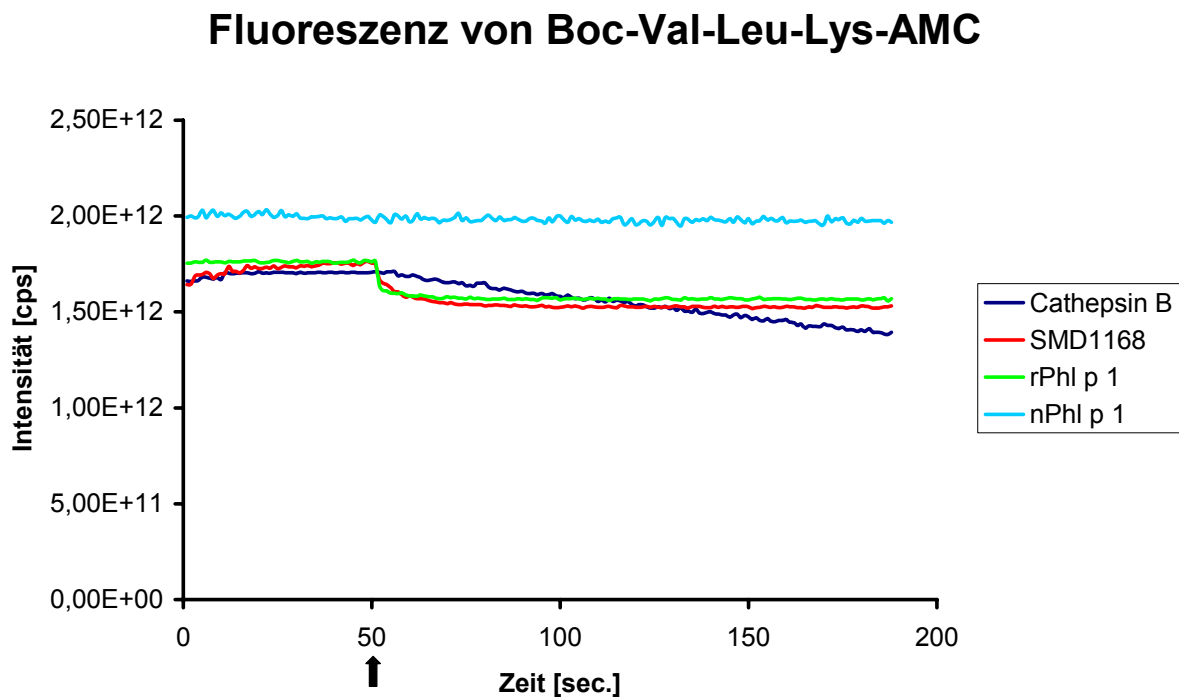


Abb. 15 b: Bestimmung der Enzymaktivität durch proteolytische Spaltung des fluorochromen Substrates Boc-V-L-K-AMC. Getestet wurden nPhl p 1, rPhl p 1, Cathepsin B (Positivkontrolle) und SMD1168 = Kulturüberstand von untransformierten *P. pastoris*-Zellen (Negativkontrolle); Pfeil = Zugabe der Proteasen.

Der Messzeitraum betrug insgesamt 200 sek. Nach 50 sek. wurden die zu untersuchenden Proben dem Substrat zugegeben (Pfeil im Spektrogramm). Deutlich war ein Absinken der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von rPhl p 1 sowie von rPhl p 1-depletiertem Kulturüberstand von *P. pastoris*-Zellen zu erkennen. Nach weiteren 20 sek. veränderte sich das erreichte Niveau nicht mehr. Der Zusatz des natürlichen Allergens führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Intensität, während die Kontrollprotease Cathepsin B eine Abnahme der Fluoreszenzintensität durch proteolytische Spaltung verursachte.

Somit sind weder das rekombinante noch das natürliche Allergen in der Lage, die eingesetzten Substrate zu hydrolysieren. Auch die in dem Kulturüberstand enthaltene Protease aus *Pichia pastoris* zeigte mit diesem Substrat keine spezifische Spaltung.

3.4 Auslösung der Proteaseaktivität von Phl p 1

Cysteinproteasen wie z. B. Cathepsin B besitzen am N-Terminus eine Prosequenz, die die proteolytische Aktivität inhibiert. Der N-terminale Phl p 1-Abschnitt zeigt mit der Cathepsin B-Prosequenz homologe Bereiche (s. 3.1). In der Abb. 16 sind noch einmal die N-Termini beider Sequenzen gegenübergestellt.

		← Signalsequenz → ▼ ←	Prosequenz	→
Cath. B	4	SLILLSCLLA--L TSAHD	<u>KPSFHPLSDDLIN YINKQNTTWQAGRN FYNVDISYLKKLCGTVL</u>	63
Phl p 1	6	SVLLVVALFAVFLGSAHG	<u>IPKVPP-----GPNITATYGD KWLDAKSTWYGK---PTA</u>	54
		← Prosequenz → ▼ ←	reifes Protein	→
Cath. B	64	<u>GGPKLPGRVAFGEDID</u>	LPETFDAREQWSNCPTIGQIRDQGSCGSCW	109
Phl p 1	55	<u>AGPKDNGGACGYKDVD</u>	KPP-FSGMTGCGNTPIFKSGR---GCGSCF	96

Abb. 16: Vergleich des N-Terminus der Cathepsin B (Cath. B)- mit der Phl p 1-Sequenz. ▼ markiert die jeweilige Schnittstelle zwischen Signal- und Prosequenz (unterstrichen dargestellt) bzw. zwischen Prosequenz und dem reifen (proteolytisch aktiven) Protein.

Über einen Analogievergleich wurde die entsprechende Phl p 1-Prosequenz bestimmt (Abb. 16) und mittels molekularbiologischen Techniken abgespalten, indem ein am 5'-Ende der DNA-Sequenz verkürztes Phl p 1-Fragment (vrphl p 1) in den Vektor pPIC9 kloniert wurde. Mit Hilfe von Primern wurde aus der rphl p 1-pPIC9-DNA ein um 140 bp verkleinertes Fragment amplifiziert. Am verkürzten 5'-Ende wurde eine *Eco* RI-Schnittstelle eingefügt. Zunächst wurde das verkürzte rphl p 1-Fragment in den TA-Vektor pCR2.1 einkloniert, um eine zusätzliche *Eco* RI-Schnittstelle durch den Vektor in der rphl p 1-Gensequenz zu erhalten. Nach Restriktion mit *Eco* RI wurde das Phl p 1-Fragment wieder herausgeschnitten und in den mit der alkalischen Phosphatase (CIAP) behandelten Vektor pPIC9 ligiert. Nach Transformation des Konstruktes in *E. coli*-Zellen (DH α) wurde das Vektor-Insert-Produkt nach einer Restriktionsanalyse, bei der die aus den transformierten

Bakterienzellen isolierte Plasmid-DNA mittels *Eco* RI geschnitten wurde, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 17).

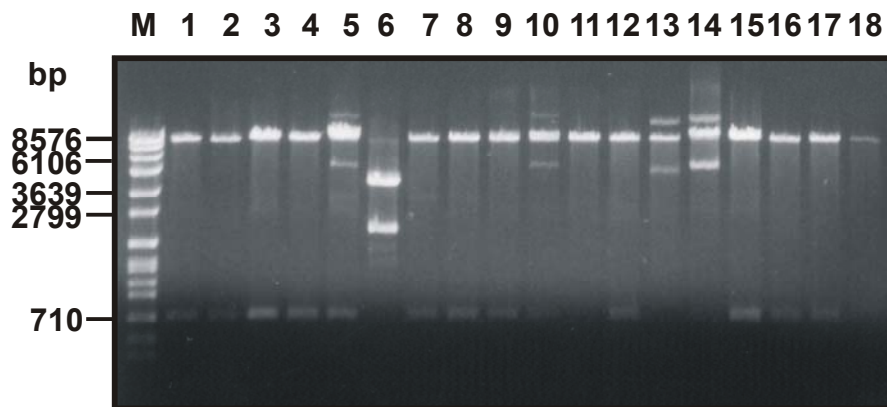


Abb. 17: Restriktionsanalyse von 18 Klonen (1-18), bei denen die isolierte Plasmid-DNA *vrphl* p1-pPIC9 mit *Eco* RI geschnitten wurde. M = DNA-Molekulargewichtsmarker.

Die DNA-Auftrennung der Klone 1 bis 4, 7, 8, 9, 12, 15, 16 und 17 zeigten erwartungsgemäß je eine Bande bei 8,0 kb und etwa 650 bp, die dem Vektor bzw. dem *vrphl* p 1-Fragment entsprachen. Die anderen Klone besaßen nach Restriktion DNA-Konstrukte mit anderen Größen. Nach DNA-Sequenzierung (nicht gezeigte Ergebnisse) konnte die Orientierung des Inserts innerhalb des Vektors bestimmt werden. Plasmide, in denen das verkürzte *rphl* p 1 (*vrphl* p 1) im richtigen Leseraster des Vektors inseriert war, wurden mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Bgl* II linearisiert. Anschließend wurden elektrokompente *P. pastoris*-Zellen mit der restringierten DNA transformiert. Die transformierten Zellen wurden zur schnellen Anzucht auf Minimal Dextrose (MD)-Agarplatten kultiviert und anschließend auf Minimal Glycerin (MG)-Platten überführt, da die in den MD-Platten enthaltene Glukose den *AOX1*-Promotor reprimiert. Nach Kultivierung der Klone für einen weiteren Tag auf Minimal Methanol (MM)-Platten wurde ein Yeastern Blot durchgeführt. Dabei konnte das rekombinante Protein *vrPhl* p 1 im Immunoblot mit Hilfe des mAk IG12 detektiert werden.

Zur Isolierung des *vrPhl* p 1 wurde der Expressionsüberstand eines Klons in einer Amicon-Druckkammer auf das 10fache eingengt. Mit Hilfe einer Säule, an die der *Phl* p 1-spezifische mAk IG 12 gekoppelt war, wurde das *vrPhl* p 1 aus dem Überstand chromatographisch isoliert (Abb. 18).

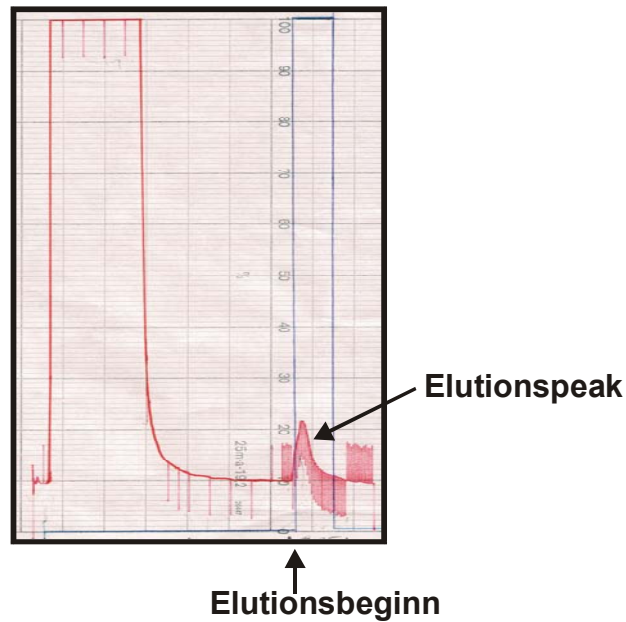


Abb. 18: Darstellung eines Chromatogramms zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von vrPhl p 1 aus Expressionsüberstand von *P. pastoris*-Zellen. Die Proteine wurden bei 254 nm detektiert (rote Linie). Der Wechsel der Puffer wurde über den Schreiber aufgezeichnet und ist in blau zu sehen.

Die Absorption der Probe bei 254 nm (rote Linie) wird in einem Chromatogramm dargestellt (Abb. 18). Mit einem Pfeil wird der Beginn der Elution angezeigt. Der hohe Peak vor der Elution machte deutlich, dass die meisten Proteine nicht an der Säule gebunden wurden (Effluent). Im Vergleich zu der Konzentration der nichtgebundenen Proteine war die Konzentration der eluierten Proteine sehr gering.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den eluierten Proteinen um das vrPhl p 1 handelte, wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 19).

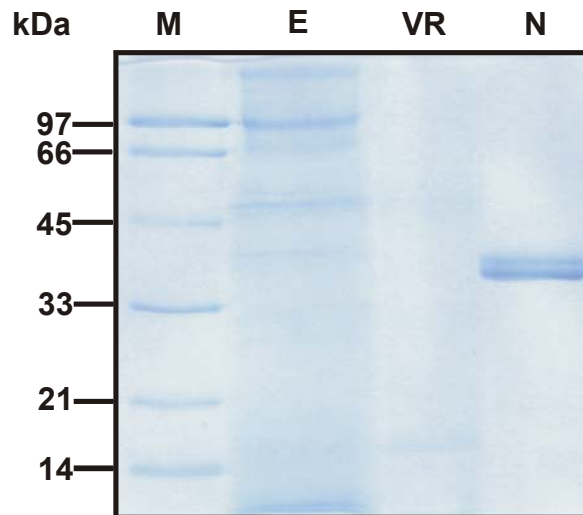


Abb. 19: Detektion von vrPhl p 1 nach Expression in *Pichia pastoris* in einem SDS-PAGE-Gel mittels RotiBlue-Färbung. Fraktionen: E = Effluent nach affinitätschromatographischer Abtrennung von vrPhl p 1 mittels mAk IG 12; VR = verkürztes rPhl p 1; N = nPhl p 1; M = Molekulargewichtsmarker.

In Abb. 19 ließ sich nur sehr schwach das vrPhl p 1 (Spur VR) bei etwa 17 kDa anfärben, was von der erwarteten Größe von 30 kDa abwich. Im Gegensatz dazu zeigte das Effluent eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen. Insbesondere waren Banden bei 40, 50, 66 und 99 kDa zu erkennen. Unterhalb von 40 kDa ließen sich keine distinkten Banden nachweisen, sondern es war nur eine diffuse Anfärbung zu detektieren. Im Gegensatz dazu waren in der Spur N, die das nPhl p 1 zeigte, nur die beiden Banden von 35 und 37 kDa zu erkennen.

Zum immunologischen Nachweis von vrPhl p 1 wurde ein Western-Blot durchgeführt und anschließend mit den mAk HB 7, IG 12 und Bo 14 sowie mit Gräserpollen-Allergikerseren entwickelt. Während sich das als Kontrolle aufgetragene nPhl p 1 detektieren ließ, wurde das vrPhl p 1 von keinem der mAk bzw. von keinem Gräserpollen-Allergikerserum nachgewiesen (ohne Abbildung).

Um eine mögliche proteolytische Aktivität des vrPhl p 1 zu bestimmen, wurde das gereinigte vrPhl p 1 in einem Zymogramm untersucht (Abb. 20).

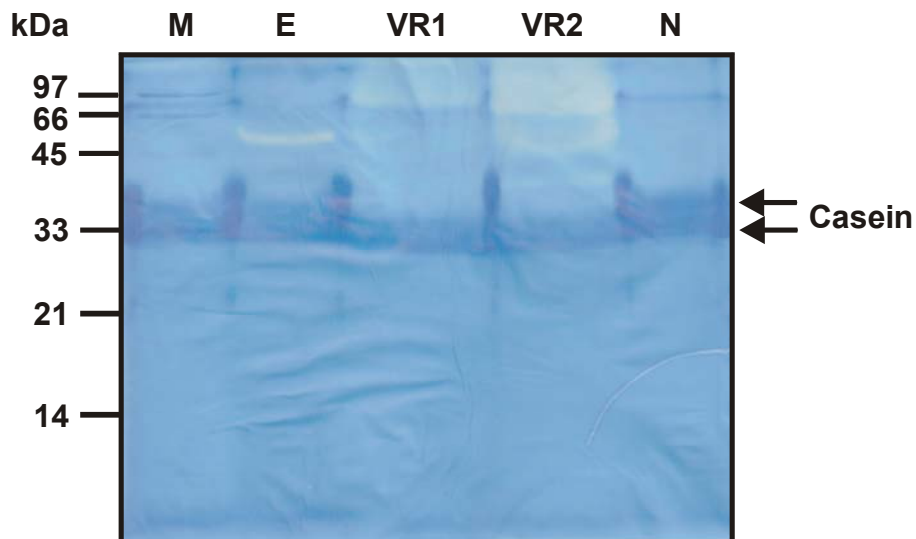


Abb. 20: Untersuchung von vrPhl p 1 aus *Pichia pastoris* auf Proteaseaktivität in einem Zymogramm. E = Effluent nach affinitätschromatographischer Abtrennung von vrPhl p 1; VR1+2 = aufgereinigte vrPhl p 1-Expressionen, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden; N = nPhl p 1; M = Molekulargewichtsmarker.

Es wurden zwei voneinander unabhängige, affinitätschromatographisch aufgereinigte Expressionsüberstände eingesetzt, wobei die Kultur „VR2“ im Gegensatz zu „VR1“ zur Verbesserung der Kultivierungsbedingungen in einem Schikanekolben inkubiert wurde.

Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, waren in den Spuren VR1 und VR2 ähnliche transparente Proteinmuster mit proteolytischer Aktivität sichtbar. Nach Entfernung der Prosequenz wurde ein theoretisches Molekulargewicht des verkürzten rPhl p 1 von etwa 30 kDa erwartet. Im Gegensatz zur Protease aus *Pichia pastoris* (E in Abb. 20) waren aber keine diskreten Banden sichtbar. Es waren lediglich bei etwa 40, 45 und 90 kDa proteolytische Aktivität anzeigende, negativ gefärbte Bereiche zu erkennen. Scheinbar war vrPhl p 1 schon während der Auftrennung proteolytisch aktiv. Es ergaben sich zudem Unterschiede im Bandenmuster von VR1 bzw. von VR2, was mit den unterschiedlichen Kulturbedingungen zusammenhängen könnte. Durch die stärkere Sauerstoffzufuhr erhöhte die Inkubation in einem Schikanekolben die Ausbeute von vrPhl p 1.

Das nach affinitätschromatographischer Abtrennung von vrPhl p 1 erhaltene Effluent in Spur E zeigte eine diskrete, aufgehellte Bande bei etwa 50 kDa, die von der Protease aus *Pichia pastoris* (s. 3.3.1) verursacht wurde, während das natürliche Allergen wiederum proteolytisch inaktiv war.

Da das vrPhl p 1-Molekül proteolytisch aktiv war, sollte überprüft werden, ob vrPhl p 1 die inhibierende Prosequenz des natürlichen Allergens abspalten und nPhl p 1 dadurch in eine proteolytisch aktive Form überführen kann.

Hierzu wurde das nPhl p 1 gemeinsam mit dem vrPhl p 1 für eine Stunde in einem für Cysteinproteasen geeigneten Aktivierungspuffer (pH 3,6) bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das natürliche Allergen mit Kulturüberstand von nicht transformierten *Pichia pastoris*-Zellen eingesetzt (Abb. 21).

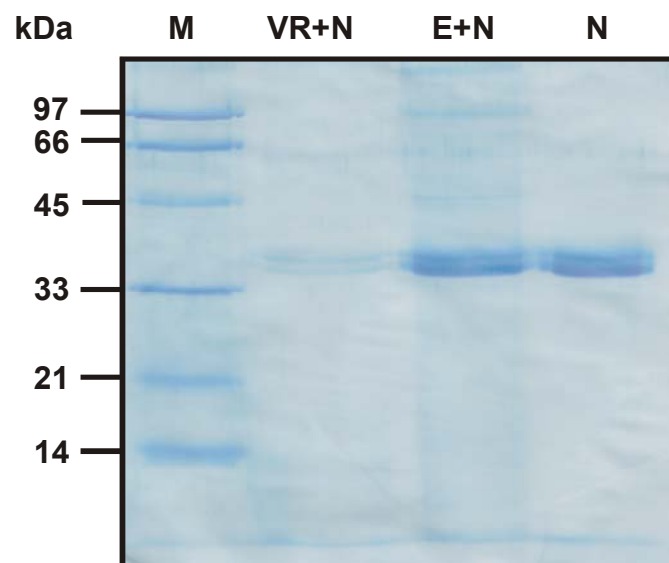


Abb. 21: Untersuchung der Stabilität von nPhl p 1 nach Inkubation mit vrPhl p 1 und der Protease aus *Pichia pastoris*-Zellen in einem 15%igen SDS-Gel nach RotiBlue-Färbung. VR+N = mit vrPhl p 1 inkubiertes nPhl p 1; E+N = Kulturüberstand von *Pichia pastoris*-Zellen; N = nPhl p 1; M = Molekulargewichtsmarker.

Die Inkubation von vergleichbaren Konzentrationen von nPhl p 1 mit vrPhl p 1 (Spur VR+N) resultierte in einer deutlichen Abnahme der Intensität der anfärbbaren nPhl p 1-Doppelbande im Vergleich zu der Kontrolle N, in der nur das nPhl p 1 inkubiert wurde. Diese Intensitätsabnahme zeigt, dass infolge der vrPhl p 1-Aktivität das natürliche Allergen als Substrat degradiert wurde. Im Gegensatz dazu erfolgte nach Inkubation des nPhl p 1 mit Kulturüberstand von untransformierten *Pichia pastoris*-Zellen kein Abbau des Allergens. Die Intensität der Proteinbanden in diesem Ansatz entsprach derjenigen der Kontrolle N. Demnach geht die Proteasewirkung eindeutig auf vrPhl p 1 und nicht auf eine Hefe-eigene Protease zurück.

In einem Immunoblot wurde das entsprechende Bandenmuster bestätigt (Abb. 22).

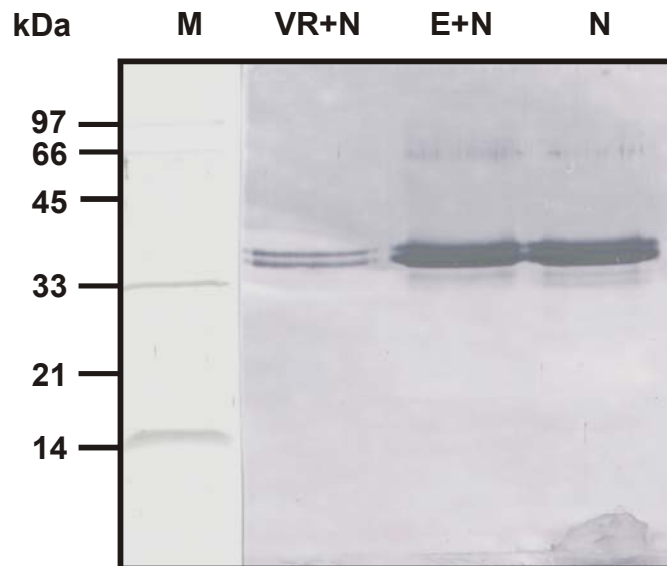


Abb. 22: Nachweis der proteolytischen Wirkung von vrPhl p 1 auf nPhl p 1 im Westernblot. nPhl p 1 wurde nach Vorinkubation mit vrPhl p 1 bzw. *Pichia pastoris*-Kulturüberstand mit Hilfe des mAk IG12 detektiert. Erläuterung zur Legende s. Abb. 21.

In Abb. 22 erscheint die mittels mAk IG 12 nachgewiesene nPhl p 1-Doppelbande nach Inkubation mit vrPhl p 1 weniger intensiv gefärbt als das ohne Zusätze bzw. mit dem Kulturüberstand von untransformierten *Pichia pastoris*-Zellen inkubierte nPhl p 1. Die letzten beiden Ansätze stellten die Negativkontrolle dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass das vrPhl p 1 das natürliche Allergen degradiert und dadurch im SDS-PAGE-Gel und im Westernblot im Vergleich zur Kontrolle schwächer erscheint.

Zur Bestimmung der Spaltspezifität des vrPhl p 1 wurde ein APIzym-Test durchgeführt. Nach Inkubation der Teststreifen mit vrPhl p 1 in Aktivierungspuffer (pH 3,6) wurde bestimmt, dass das verkürzte rekombinante Allergen anhand des eingesetzten Substrates die gleiche Spezifität wie die Serinprotease Trypsin hat und nach Arginin-Resten spaltet (ohne Abbildung).

Um das vrPhl p 1 in der Proteinfärbung nachzuweisen, wurde das Allergen in *Pichia pastoris* exprimiert und nach Ultrafiltration einem Teil des Kulturüberstandes sofort ein Proteaseinhibitorgemisch (α -Complete) hinzugefügt. Anschließend wurden beide Ansätze mittels SDS-PAGE und nachfolgender Silber- bzw. Coomassiefärbung analysiert (Abb. 23).

Abb. 23 a:

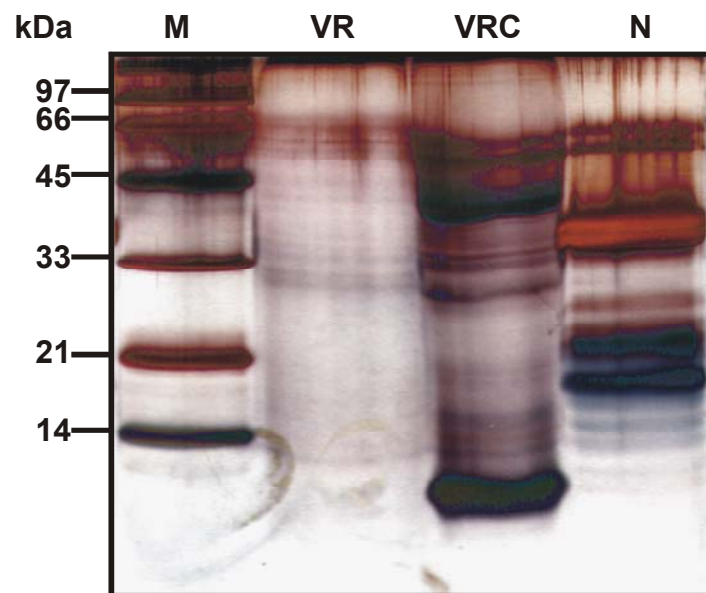


Abb. 23 b:

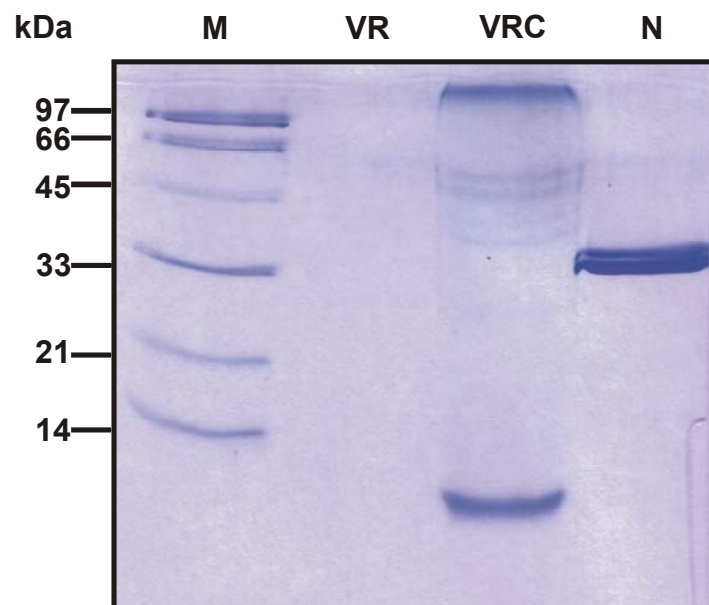


Abb. 23: Auftrennung von vrPhl p 1 mit und ohne Proteaseinhibitorzusatz mittels SDS-PAGE und anschließender Silber- (23 a) bzw. Coomassiefärbung (23 b). VR = vrPhl p 1; VRC = mit Proteaseinhibitoren inkubiertes vrPhl p 1; N = nPhl p 1.

Im Silber-gefärbten Gel ließen sich in der Spur von vrPhl p 1 trotz verlängerter Entwicklungszeit (etwa 30 min) keine Banden detektieren, was auf eine starke proteolytische Aktivität des Proteins hindeutet. Vielmehr war über den Molekulargewichtsbereich von 14 bis 97 kDa nur eine schwache Hintergrundfärbung erkennbar. Hingegen war nach Inkubation von vrPhl p 1 mit dem Proteaseinhibitorgemisch (VRC) eine starke Färbung von Proteinen bei ca. 10 und 40 kDa sichtbar. Außerdem war eine Doppelbande bei 60 und 62 kDa und weiterhin einzelne Banden bei 28, 30 und 33 kDa zu erkennen. Das als Kontrolle aufgetragene nPhl p 1 zeigte unerwarteter Weise bei 60 und 66 je eine Bande. Sehr intensiv waren die beiden Banden bei 35 und 37 kDa sichtbar. Weiterhin konnten ebenfalls Banden bei 17, 23 und 28 kDa detektiert werden.

Demgegenüber waren nach Färbung mit RotiBlue nur wenige Proteine zu sehen. Das vrPhl p 1 war nicht sichtbar. Das mit dem Gemisch der Inhibitoren vorbehandelte vrPhl p 1 zeigte eine Doppelbande zwischen 45 und 50 kDa. Die intensivste Bande lag bei 10 kDa. Das natürliche Allergen zeigte wiederum zwei Banden bei 35 und 37 kDa.

Trotz Vorbehandlung mit dem Proteaseinhibitorgemisch war eine Detektion von vrPhl p 1 immunologisch nicht möglich, da die verkürzte Allergenform offensichtlich eine starke proteolytische Aktivität besitzt.

3.5 Voruntersuchungen für *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur Funktion von Phl p 1

3.5.1 Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum

Gräserpollen haben nur eine kurze Vitalität, so dass *in vitro*-Keimungsversuche meistens fehlschlagen. Dennoch wurde versucht, ein Pollenschlauchwachstum an *Phleum pratense*-Pollen mit dem Medium von Kristen und Kappler (1995) zu induzieren. Am wachsenden Pollenschlauch sollte dann die Wirkung der proteolytisch aktiven Proteasen (Expansine) untersucht werden.

Zur Überprüfung, in wie weit Phl p 1 an der Auskeimung des Pollenschlauches beteiligt ist, wurden zunächst bei 4 °C gelagerte Pollen über Nacht in dem von Kristen und Kappler (1995) verwendeten Medium inkubiert. Parallel dazu wurde ein

von Ma et al. (1999) für die Auskeimung von Lilienpollen eingesetztes Medium für die Pollenschlauchuntersuchungen am *Phleum pratense*-Pollen verwendet. Auch nach Veränderung der Osmolaritäten durch Erhöhung der Saccharose-Konzentration in verschiedenen Konzentrationsreihen konnte in keinem der beiden Medien ein Pollenschlauchwachstum beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden frische *Phleum pratense*-Pollen in den Lösungen inkubiert. Schon nach 30 min konnten in dem von Kristen und Kappler (1995) verwendeten Medium bei einigen Pollen deutliche Schläuche detektiert werden (Abb. 23).

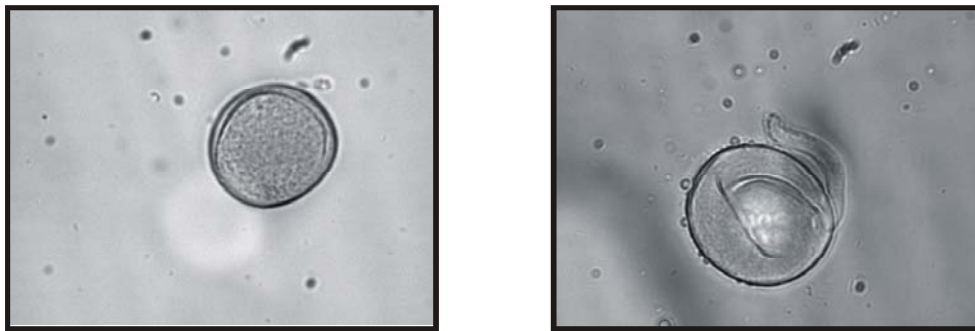


Abb. 24: Darstellung eines ungekeimten (links) und eines gekeimten (rechts) *Phleum pratense*-Pollen in 400x Vergrößerung.

Der ausgewachsene Pollenschlauch ist in Abb. 24 (rechts) zu erkennen. Nach etwa 70 min war das Pollenschlauchwachstum abgeschlossen. Die Keimungsrate betrug nur etwa 2 bis 3 %, was für weitere Untersuchungen viel zu gering war, um statistisch signifikante Aussagen über den Einfluss von zugesetzten Proteasen machen zu können. Der sowohl mit gelagerten als auch mit frischen *Phleum pratense*-Pollen durchgeführte Pollenschlauchwachstumtest zeigte somit eindeutig, dass diese Gräserpollen für einen solchen Test nicht geeignet sind.

3.5.2 Bestimmung der Allergensequenz vom Zea m 1

Maispollen ist als Modellorganismus für Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum besser geeignet als *Phleum pratense*-Pollen. Das Gruppe I-Maisallergen Zea m 1 besitzt eine Homologie von 74 % zu Phl p 1, wobei die N-terminale Sequenz, die die möglicherweise funktionell wichtige Prosequenz trägt,

bisher nicht bestimmt wurde. Deswegen wurde versucht, das vollständige Zea m 1 aus einer cDNA-Bank zu isolieren und davon die Aminosäuresequenz abzuleiten.

Um das Maisallergen Zea m 1 aus einer cDNA-Bank zu isolieren, wurde zunächst ein Immunoscreening mit dem gegen nPhl p 1 gerichteten mAk IG12 durchgeführt. Es konnten von 12 mittels dieser Methode erhaltenen und untersuchten Klonen 7 verschiedene und schon charakterisierte Polygalakturonasen, deren Sequenzen von der Zea m 1-Sequenz abwichen, identifiziert werden.

Aus diesem Grunde wurde die Identifizierung des zeam 1-Gens aus der cDNA-Bank mittels einer selbst hergestellten, DIG-markierten und zeam 1-genspezifischen Sonde durchgeführt. Die Sonde wurde von identischen Bereichen der phl p 1-DNA-Sequenz abgeleitet. Nach Fixierung der DNA auf einem Filter wurde dieser mit einer sondenhaltigen Lösung inkubiert. Zea m 1-exprimierende Klone wurden anschließend vereinzelt. Das Phagemid wurde mittels Helferphagen aus den XL 1-Blue-Zellen ausgeschnitten und damit SOLR-Zellen transfiziert. Die anschließende Sequenzierung ergab einen Klon, der die vollständige zeam 1-DNA-Sequenz (zeam 1.1) mit insgesamt 1170 Nukleotiden besaß.

In der folgenden Abbildung 25 ist die komplette Nukleinsäuresequenz von zeam 1.1 inklusive der untranslatierten Bereiche zu sehen:

1	GGC ACG AGC ACT GAT CCA AGA CAA AAC ATG GCT GTG AAT GTG AGC	45
46	ACC ATG TGG TCG TTG ATG CAG GCA CAA GTT GCG ATG GTT GTG GCG	90
91	TTG TCC TTC TTG GTG AGC GGC GCA TGG TGC GGT CCT CCC AAA GTC	135
136	CCC CCT GGC AAG AAC ATC ACG GGC ACC TAT GGC AAG GAC TGG TTA	180
181	GAC GCT AAA GCA ACA TGG TAT GGC AAG CCG ACG GGT GCC GGT CCC	225
226	GAC GAC AAT GGT GGC GGC TGC GGG TAC AAG GAC GTG AAC AAG CCC	270
271	CCC TTC AAT AGC ATG GGC GCG TGC GGC AAC ATC CCC ATC TTC AAG	315
316	GAT GGT CTG GGT TGT GGG TCC TGC TTC GAG ATC AAG TGC GAT AAG	360
361	CCT GTG GAG TGC TCC GGC AAG CCC GTG GTG GTG CAC ATT ACA GAC	405
406	ATG AAC TAT GAG CCT ATC GCG GCG TAC CAC TTC GAT TTG GCA GGC	450
451	ACG GCG TTT CGG CGC CAT GGC CAA AAA GGG TTA GGA GGG AGA AGC	495
496	TTG CGC AAG GCG GGC ATC ATC GAC ATG CAG TTC CGA AGG GTC AAG	540
541	TGC AAG TAC GGG CTC CAA GGT CAC CTT CCA TCT AAA GGG GTG CGG	585
586	GCC CCA ACT ACC TGG CGG CTG CTG GTC AAG TAC GTC GAC GGC GAC	630
631	GGT GAC ATT GTG GCG GTG GAC ATC AAG GAG AAG GGC TCC GAC ACG	675
676	TAC GAG CCC CTG AAG CAC TCT TGG GGT GCC ATC TGG AGG AAG GAC	720
721	AGC GAC AAA CCG CTT AAG GGA CCC CTC ACC GTC CGC CTC ACT ACC	765
766	GAG GGA GGC ACC AAG ACC GTC TAC GAC GAT GTC ATC CCT GCC AAC	810
811	TGG AAG GCC AAC ACC GCC TAC ACC GCC AAA TAA TTA ACT TTA GTG	855
856	CTA ACA ATA CTT TAA GCC GGA CTA TGC TAG CTA TAC TAG ATT GGG	900
901	TTG GAT CCC AAG CAA TGC ATT ACA CAT GCA TGC ATT GGA CCG GTG	945
946	ATA TCT ATT TGC TAC CAC TAC CCT ATT ACG ACA GTG ATG CTG GCG	990
991	CCA ACA ATA ATG GCG TCA TCC TCC TTC TCC ATC TTC TCC ATC TCC	1035
1036	ATA TAT AGC TAG AGT GAG ACT TCG CTG TTG TTT AAA AGA GAA GAG	1080
1081	TTA AGA AAT GGA TTG ACA AGT TAT ATA ATA AGT GCC TAA TGA AAT	1125
1126	ATT TGA TAG GCC TTC ATT TGT TAT AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1170

Abb. 25: Darstellung der vollständigen zeam 1.1-Sequenz aus einer cDNA-Bank. In fettgedruckten Buchstaben ist das mutmaßliche Start- (ATG) sowie das Stoppcodon (TAA) hervorgehoben.

Mittels des Programms Translator wurde die neu identifizierte zeam 1-Nukleinsäure in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Anschließend wurde ein Vergleich von sechs verschiedenen Gruppe 1-Allergenen mit der neu entdeckten Sequenz mit Hilfe des Programms CLUSTAL W (1.81) durchgeführt. Der mutmaßliche Beginn des translatierten Bereiches der Zea m 1.1-Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des Programms SignalP V1.1 bzw. aufgrund des Vergleiches der Länge der Signalsequenz anderer Gräsergruppe I-Allergene festgelegt (Abb. 26):

← Signalsequenz → ▼	
Zea m 1.1	-----MWSLMQAQVAMVVALSFLVSGAWCGPPKVPFGK NIT GTYGKDWL
Zea m 1	-----
Phl p 1	-----MASSSSVLLVVVLFVAVFLGSAYG-IPKVPPGP NIT ATYGDKWL
Lol p 1	-----MASSSSVLLVVALFVAVFLGSAHG-IAKVPPGP NIT AEYGDKWL
Hol l 1	-----MASSSRVLLLLVAALFVAVFLGSAHG-IAKVPPGP NIT ATYGDEWL
	***** ** ** *
Zea m 1.1	DAKATWYGKPTGAGPDDNGGGCGYKDVNKPPFNSMGACGNIPFKDGL CGSC FEIKCDK
Zea m 1	-----MTACGNVPIFKDGK CGSC YEVRCKE
Phl p 1	DAKSTWYGKPTGAGPKDNGGACGYKDVKPPFSGMTGCGNTPIFKSGR CGSC FEIKCTK
Lol p 1	DAKSTWYGKPTGAGPKDNGGACGYKNVDKAPFNGMTGCGNTPIFKDGR CGSC FEIKCTK
Hol l 1	DAKSTWYGKPTGAGPKDNGGACGYKDVKPPFSGMTGCGNTPIFKDGR CGSC FEIKCTK
	* * ***** * * * * * * * * * * * * * *
Zea m 1.1	PVECSGKPVVVHITDMNYEPIAAYHFDLAGTAFRRHGQKGLGGRSLRKAGIIDMQFRRVK
Zea m 1	KPECSGNPVTVFITDMNYEPIAPYHFDLSGKAFGSLAKPGLN-DKLRHCGIMDVEFRRVR
Phl p 1	PEACSGEPVVVHITDDNEEPIAPYHFDLSGIAFGSMAKKGDE-QKLSRAGEVEIQFRRVK
Lol p 1	PESCSGEAVTVTITDDNEEPIAPYHFDLSGHAFGSMAKKGEE-QNVRSALELELQFRRVK
Hol l 1	PESCSGEPVTVHITDDNEEPIAPYHFDLSGHAFGSMAKKGEE-QKLSRAGELELKFRRVK
	** * * * * * * * * * * * * *
Zea m 1.1	CKY--GLQGHLPKSGVRAPTTWRLLVKYVDGDGDIVAVDIKEKGSPTYEPLK HSWG AIWR
Zea m 1	CKYPAGQKIVFHIEKGCNPNYVAVLVKFVADDGDIVLMEIQDKLSAEWKPMK LSWG AIWR
Phl p 1	CKYPEGTKVTFHVEKGSNPNYLALLVKFVSGDGDVAVDIKEKGDKWIALK ESWG AIWR
Lol p 1	CKYPDDTKPTFHVEKASNPNYLAILVKYVDGDGDVAVDIKEKGDKWIELK ESWG AVWR
Hol l 1	CKYPDGTKPTFHVEKGSNPNYLALLVKYIDGDGDVAVDIKEKGDKWIELK ESWG AVWR
	*** * * * * * * * * *
Zea m 1.1	KDSDKPLKGPLTVRLTTEGGTKTVYDDVIPAN---WKANTAYTAK-----
Zea m 1	MDTAKALKGPFSIRLTSESGKKVIAKDIIIPAN---WRPDAVYTSNVQFY-----
Phl p 1	IDTPEVLKGPFTRVYTTEGGTKGEAKDVIPEG---WKADTAYESK-----
Lol p 1	IDTPDKLTGPFTVRYTTEGGTKSEFEDVIPEG---WKADTSYSAK-----
Hol l 1	VDTPDKLTGPFTVRYTTEGGTKGEAEDVIPEG---WKADTAYEAK-----
	* * * * * * * *

Abb. 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen von sechs verschiedenen Gruppe I-Allergenen mit der neu bestimmten, kompletten Zea m 1.1-Sequenz. Rote, fettgedruckte Buchstaben = Glykosylierungsstelle; blaue, fettgedruckte Buchstaben = konservierte Bereiche des aktiven Zentrums; * = homologe Aminosäuren; ▼ = Spaltstelle der Signalsequenz.

In Abb. 26 ist deutlich die Verwandtschaft der vollständigen Zea m 1-Aminosäuresequenz (Zea m 1.1) mit den bekannten Gruppe I-Allergenen zu erkennen. Mit Hilfe des Programms BL2SEQ (Matrix = BLOSUM62) wurde eine Identität zwischen Zea m 1.1 mit Phl p 1 von 63 % sowie eine Homologie von 71 % ermittelt. Zwischen der bislang in der Datenbank vorhandenen Zea m 1-Sequenz und der neuen Zea m 1.1-Sequenz lag die Homologie bei ebenfalls 70 %, während nur 53 % der Aminosäuren identisch waren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Zea m 1-Sequenz im Vergleich zu den übrigen Gruppe I-Allergenen ein langer N-terminaler Abschnitt fehlt.

Das Zea m 1.1-Molekül besitzt im N-terminalen Bereich ebenso wie die anderen Gräserallergene eine Glykosylierungsstelle (NIT), so dass es sich bei Zea m 1.1 um die vollständige Zea m 1-Sequenz handelt.

Mit Hilfe des Programms SignalP V1.1 wurde die Schnittstelle der Signalsequenz zwischen der Aminosäureposition 40 und 41 (AWC-GP) ermittelt, so dass das prozessierte Protein die Sequenz GPPKVPPGKNIT... besitzt. Mittels des Programms ProtParam Tool konnte ein theoretisches Molekulargewicht von 30273,7 Da sowie ein intrinsischer isoelektrischer Punkt von 9,21 bestimmt werden.

In Tab. 15 ist ein Vergleich des N-Terminus von Zea m 1.1 mit der mutmaßlichen Phl p 1-Prosequenz dargestellt.

Tab. 15: Vergleich der Prosequenz von Phl p 1 mit Zea m 1.1. Es wurde die Matrix BLOSUM62 zugrunde gelegt. Erwart. = Erwartungswert; Iden. = Identität; Hom. = Homologie; Kons. = Konsensus. Erläuterung zur Legende s. Tab. 11.

Vergleich der Phl p 1- (47 AS) mit der Zea m 1.1-Prosequenz (48 AS)

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz	Erwart.	Iden.	Hom.
Phl p 1	2 PKVPPGPNITATYGDKWLDASTWYGKPTAAGPKDNGGACGYKDVD 47	2×10^{-24}	37/46 (80%)	39/46 (84%)
Kons.	PKVPPG NIT TYG WLDK+TWYGKPT AGP DNGG CGYKDV+			
Zea m 1.1	3 PKVPPGKNITGTYGKDWLDKATWYGKPTGAGPDDNGGCGYKDVN 48			

Aus der Tab. 15 ist ersichtlich, dass zwischen den Prosequenzen der Gruppe I-Allergene aus dem Lieschgras und dem Mais eine sehr hohe Homologie von 84 % und eine Identität von 80 % besteht. Der sehr niedrige Erwartungswert von 2×10^{-24} zeigt die sehr enge Verwandtschaft beider Proteine.

Es konnte also ein Mais-Gruppe I-Allergen mit einer vollständigen Prosequenz detektiert werden. Der Mais kann demnach statt des Lieschgrases als Modellorganismus für Pollenschlauch-Wachstumsuntersuchungen benutzt werden, um die Phl p 1- bzw. die äquivalenten Zea m 1-Konstrukte für die Untersuchungen einzusetzen.

3.5.3 Pollenschlauchwachstumstest mit *Zea mays*-Pollen

Da die Pollensäcke und Pollen der Maispflanze größer sind als die von *Phleum pratense*, lassen sie sich leichter präparieren, um den Pollen zu entnehmen. Außerdem ist die Pollenernte beim Mais leichter, weil blühende Maispflanzen häufig verfügbar sind. Die Kultivierung der Maispollen erfolgte in einem nach Gibbon et al. (1999) modifizierten zuckerhaltigen Medium. Schon nach 20 min keimten die Maispollen. Nach etwa 70 min wurde die maximale Schlauchlänge erreicht. Die Keimungsrate von frischen und bis zu zwei Tage alten Maispollen lag bei maximal 70 %. Waren die Pollen älter als zwei Tage, keimten nur noch sehr wenige aus. Die Keimungsrate lag dann bei nur noch etwa 2-8 %. Deshalb waren diese Untersuchungen sehr eng auf die Blütezeit des Mais beschränkt.

Weiterführende Untersuchungen, in wie weit die Zugabe von proteolytisch aktivem Phl p 1 bzw. Zea m 1 einen Einfluss auf die Keimung der Pollen hat, konnten im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der zeitlichen Beschränkung auf die Blütezeit der Pflanzen nicht weiter durchgeführt werden.

4. Diskussion

Phl p 1 ist ein Majorallergen, das von 95 % aller Gräserpollenallergikern erkannt wird. Aus diesem Grunde könnte dieses Protein ein entscheidender Induktor für die Pathogenese der Gräserpollenallergie sein. Als Protease (Grobe et al., 1999) wäre das Molekül ein entscheidender Weichensteller in Richtung der Typ-I-Allergie, ähnlich wie es für das Der p 1, das Hausstaubmilbenallergen, in *in vitro*-Versuchen nachgewiesen wurde. Eine Aufklärung der Funktion von Phl p 1 kann somit einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Auslösung und des Pathomechanismus der Gräserpollenallergie leisten.

Bislang gibt es kontroverse Meinungen bezüglich der *in vivo*-Funktion von Phl p 1. Die von Cosgrove et al. (1997 b) aufgestellte Hypothese geht davon aus, dass die Gruppe I-Allergene Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulosefibrillen lösen und mittels einer Hydrolasefunktion auf die Hemizellulosen wirken. Bislang gibt es für diese Theorie keine direkten experimentellen Befunde.

Grobe et al. (1999) konnten eine proteolytische Aktivität im Kulturüberstand von Phl p 1-transformierten *Pichia pastoris*-Zellen detektieren. Eine immunologische Charakterisierung des rekombinanten Proteins war nur unzureichend möglich, da das Molekül sehr instabil war. Abgeleitet von der Aminosäuresequenz besitzt Phl p 1 (geringfügig) homologe Teilbereiche zu C1-Cysteinproteasen, die aber (in seiner Arbeit) nicht von den gängigen Computerprogrammen bestätigt werden konnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zum einen darin, die Struktur des im eukaryontischen Expressionssystems der Hefe *Pichia pastoris* exprimierten Gräserpollenallergens Phl p 1 zu charakterisieren und mit dem natürlichen Allergen zu vergleichen. Des weiteren sollte die Funktion des Allergens als mögliche Protease näher bestimmt werden, da es bisher für die Proteasewirkung nur einige Indizien gab.

4.1 Strukturelle Charakterisierung von rPhl p 1

4.1.1 Untersuchung der zwei rPhl p 1-Produkte nach Expression in *Pichia pastoris*

Für die Charakterisierung des rekombinant hergestellten Phl p 1 muss gewährleistet werden, dass die Struktur des Proteins mit dem des natürlichen vergleichbar ist. Hierbei ist die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken für ein funktionell aktives Molekül sowie die N- und O-Glykosylierung für eine dem nPhl p 1 aus dem Lieschgras entsprechende Struktur sicher zu stellen.

Zum Studium der funktionellen und biochemischen Eigenschaften eines Proteins werden in der Regel pro- oder eukaryontische Expressionssysteme verwendet. Gegenüber den prokaryontischen Expressionssystemen in *E. coli* besitzen die Eukaryoten den Vorteil, posttranslationale Modifizierungen durchführen zu können (Romanos et al., 1992). Aufgrund der Proteinfaltung, die bei eukaryontischen, Cystein-haltigen Proteinen insbesondere durch die Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert wird, könnte eine dem natürlichen Molekül entsprechende räumliche Struktur erhalten werden. Um der Struktur des natürlichen Gräserpollenallergens Phl p 1 möglichst nahe zu kommen, wurde das Protein in dem eukaryontischen Expressionssystem der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Innerhalb des N-Terminus von Phl p 1 liegt die Aminosäuresequenz N-I-T, die dem N-Glykosylierungsmotiv (N-X-S/T) für Eukaryonten entspricht. An dieser Stelle ist beim natürlichen Phl p 1 ein N-Glykan gebunden (Petersen et al., 1995 b).

Zudem ist die Hefe *Pichia pastoris* in der Lage, O-Glykosylierungen durchzuführen (Cereghino et al., 2000). Diese strukturell wichtigen posttranslationalen Modifizierungen können eine wichtige Rolle bei der IgE-Reaktivität eines Moleküls spielen (Petersen et al., 1999 a) und wurden von Wicklein (pers. Mitteilung) im nPhl p 1 nachgewiesen.

Die Verwendung des *Pichia pastoris*-Expressionssystem bietet gegenüber *E. coli* außerdem den Vorteil, dass die heterologe DNA über Rekombination stabil in das Hefegenom eingebaut wird (Cereghino et al., 2000). Somit sind Expressionen des rekombinanten Proteins im großen Maßstab möglich. So konnten z. B. Huecas et al. (1999) ein strukturell vergleichbares Allergen nach 96 h mit einer maximalen Konzentration von 60 mg des Glykoproteins Ole e 1 (das Gruppe I-Allergen aus der

Olive mit einem Molekulargewicht von 18,5 kDa) pro l Kulturmedium in *Pichia pastoris*-Zellen exprimieren, während sich nur maximal 800 µg rPhl p 1 aus 500 ml Hefe-Kulturüberstand affinitätschromatographisch aufreinigen ließen. Das native nOle e 1 besitzt einen Kohlenhydratanteil, der etwa 5 % vom Gesamtgewicht ausmacht (Batanero et al., 1994). Allerdings enthält das Olivenallergen im Gegensatz zum Phl p 1 keine freien Sulfhydryl-Gruppen (Villalba et al., 1993).

Hefezellen besitzen als Expressionssysteme allerdings den Nachteil, dass z. B. bei *S. cerevisiae* Hyperglykosylierungen mit bis zu 150 Mannoseresten auftreten können (Cregg et al., 1993). Die in *Pichia pastoris* exprimierten Glykoproteine weisen dagegen meist nur N-Glykane aus 9 bis 12 Mannoseresten vom sogenannten „High Mannose-Typ“ (Miele et al., 1997) auf. Die Größe von ca. 10 Monosaccharideinheiten kommt der im natürlichen Phl p 1 recht nahe (Petersen et al., 1995 a).

Zur genaueren Charakterisierung des rekombinanten Allergens wurde der von Grobe et al. (1999) verwendete rPhl p 1-exprimierende *Pichia pastoris*-Klon eingesetzt.

Durch die Klonierung des rPhl p 1 als Fusionsprotein mit der Sekretionssignalsequenz (alpha-mating Factor secretion signal) wurde erreicht, dass das Allergen nach Abspaltung der Signalsequenz durch intrazelluläre Proteasen in das Medium sekretiert wurde (Brake et al., 1984). Anschließend konnte dann das Allergen affinitätschromatographisch mittels des kovalent an eine Säule gebundenen Phl p 1-spezifischen mAk IG12 aus dem Überstand isoliert werden.

Im Gegensatz zu Grobe et al. (1999) wurde das rPhl p 1 stabil erhalten und konnte aus Mediumüberstand isoliert untersucht werden. Die beschriebenen Degradationsprodukte wurden nicht beobachtet. Allerdings gab es bei ihm Unterschiede in der Aktivität zwischen den einzelnen Expressionen, bei denen inaktive, stabile Produkte entstanden sind (K. Grobe, pers. Mitteilung). Demnach sind die Kultur- bzw. Expressionserfolge in der Hefe noch nicht standardisiert.

Mit Hilfe der Auftrennung in einer SDS-PAGE wurden nach der Expression von rPhl p 1 in *Pichia pastoris* zwei Moleküle mit einem Molekulargewicht von 30 und 45 kDa detektiert, die erheblich vom erwarteten Molekulargewicht des nPhl p 1 mit seinen beiden Isoformen von 35 und 37 kDa abwichen.

Das 45 kDa-Protein zeigte eine sehr diffuse Bande. Der Größenunterschied zu nPhl p 1 zusammen mit der unscharfen Bande und einer starken Reaktion mit dem Lektin Con A deutet auf eine Hyperglykosylierung hin, wie sie auch schon für andere

in *Pichia pastoris* exprimierten Proteine beschrieben wurde (Godbole et al., 1999) und für eine entsprechend geringere Migration im SDS-PAGE-Gel verantwortlich ist (Pratap et al., 2000). Die Hefe ist in der Lage, Monosaccharideinheiten an Serin- und Tyrosinreste zu binden (Letourneur et al., 2001), wobei es kein vorhersagbares Motiv wie für N-Glykosylierungen gibt. Diese O-Glykosylierungen könnten ebenso das Laufverhalten des Proteins in einer SDS-PAGE beeinflussen. Mit Hilfe der drei mAk HB 7, IG 12 und Bo 14 konnte im Western Blot eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei dem 45-kDa-Protein um ein Phl p 1-Produkt handelte. Die mAk detektierten Epitope auf unterschiedlichen Abschnitten des Moleküls: HB 7 band innerhalb der Aminosäureposition 15 bis 27 des nPhl p 1, IG 12 im Bereich 48 bis 55 und Bo 14 von 227 bis 230 (A. Petersen, persönliche Mitteilung). Der Molekulargewichtsunterschied zwischen dem 45 kDa-Protein und dem nPhl p 1 könnte an einer mangelhaften Abspaltung des Fusionsanteils, der eine Masse von etwa 14 kDa besitzt, zu erklären sein. Da dieser Fusionsanteil (alpha-mating Factor secretion signal) ebenfalls glykosyliert ist (Sreekrishna et al., 1997), kann der erhöhte Kohlenhydratanteil im 45 kDa-Protein damit erklärt werden, dass es sich um ein Konstrukt aus Signalsequenz und rPhl p 1 handelt. Allerdings zeigte die N-terminale Sequenzierung, dass die Signalsequenz korrekt prozessiert und das Protein den gleichen N-Terminus wie das nPhl p 1 besitzt, so dass das 45 kDa-Protein nicht aus dem Phl p 1-Anteil mit zusätzlichem Fusionsprotein bestand.

Im Gegensatz zum 45 kDa schweren Protein wurde nach der immunologischen Detektion bzw. Proteinfärbung mit Silber oder RotiBlue das 30 kDa-Protein als eine distinkte Bande erhalten, was auf eine nur sehr schwache oder fehlende Glykosylierung des Proteins hindeutet. Diese Bande liegt im Bereich des theoretisch errechneten Molekulargewichts für das nPhl p 1 von 25973 Da.

Nach immunologischer Detektion des 30 kDa-Proteins mit den mAk IG 12 und Bo 14 konnte klar gezeigt werden, dass dieses Molekül ebenfalls vom rPhl p 1 stammt. Allerdings war nach den Ergebnissen mit Hilfe des HB 7-Antikörpers das 30 kDa-Protein nicht nachweisbar. Daraus ist zu schließen, dass der N-Terminus fehlt. Allerdings konnte nach Sequenzierung festgestellt werden, dass das 30 kDa-Protein genau wie das 45 kDa-Protein die N-terminale Sequenz des nPhl p 1 aufwies.

Die Möglichkeit, dass das 30 kDa-Protein eine andere Faltung besaß, so dass der N-Terminus für den HB 7-Antikörper nicht mehr zugänglich war, konnte nahezu

ausgeschlossen werden. Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgekocht und mit Jodacetamid versetzt. Dadurch wurden die reduzierten Cysteinreste carboxymethyliert, wodurch eine Rückbildung der Disulfidbrücken ausgeschlossen werden konnte.

Da mittels SDS-PAGE nur eine ungenaue Bestimmung des Molekulargewichts möglich ist, wurde zur genauen Überprüfung der Molekulargewichte der rekombinanten Proteine freundlicherweise von PD Dr. B. Lindner (Laborgruppe Biophysik, Forschungszentrum Borstel) eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode ließe sich die Frage beantworten, ob die nach SDS-PAGE aufgetretenen Massenunterschiede tatsächlich existieren oder ob die Unterschiede trotz der drastischen Versuchsbedingungen (SDS als Detergenz und 0,3 % (v/v) β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel) noch unterschiedliche Konformationen der Moleküle vorkommen. Das mittels Affinitätschromatographie gereinigte rPhl p 1 mit seinen beiden Proteinen wurde mit Hilfe von reverse phase-HPLC aufgetrennt. Nach Durchführung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte jedoch keine Masse bestimmt werden. Es konnte aufgrund der Auftrennung über eine reverse phase-HPLC zum einen ausgeschlossen werden, dass störende Fremdionen in den Proben enthalten waren und zum anderen zu wenig Material für die Untersuchung vorhanden war.

Somit konnte das Molekulargewicht der im SDS-PAGE-Gel 45 kDa großen Bande nicht weiter bestimmt werden.

4.1.2 Strategien zur Erhöhung der Ausbeute von rPhl p 1

Da die Ausbeute von rekombinantem Protein sehr gering war, wurde zum einen durch Verlängerung der Expressionszeit und zum anderen durch eine Umklonierung des rphl p 1-Gens in einen Vektor, mit dem *in vivo* multiple Integrationen der rekombinanten DNA in das Hefegenom erfolgen können, versucht, den Ertrag zu steigern.

Ursprünglich wurden die rPhl p 1-exprimierenden Zellen für fünf Tage kultiviert, wobei die Expression über einen Tag durchgeführt und eine Ausbeute von etwa 200-800 μ g rPhl p 1 aus 500 ml Kulturüberstand erzielt wurde. Nach Kultivierung in einem Fermenter ist eine sehr hohe Ausbeute möglich. Das Tetanustoxin Fragment C

wurde in einer Konzentration von 12 g/l in *Pichia pastoris* exprimiert (Clare et al., 1991 a). Unter der Annahme, dass eine längere (nicht fermentative) Kultivierungszeit die Ausbeute von rekombinantem Protein steigern könnte, wurden zunächst transformierte Hefezellen über einen Zeitraum von insgesamt sieben Tagen exprimiert. Aufgrund der in dieser Kultur sehr hohen Zellzahl lysierte ein geringer Prozentsatz von Zellen, wodurch ebenfalls Proteasen freigesetzt werden (Higgins und Cregg, 1998 a).

Schon zwei Tage nach Induktion der Expression konnte in Folge starker, durch Hefeproteasen verursachter Degradation kein rPhl p 1 im Kulturüberstand, weder proteinbiochemisch noch immunologisch, nachgewiesen werden. Die Belüftung während der Expression ist ein sehr kritischer Parameter wie am Beispiel des humanen Serumalbumins gezeigt wurde (Sreekrishna, 1993). Ohne Belüftung wurde nur eine Konzentration von weniger als 1 µg/ml im Kulturüberstand erreicht, mit Luftzufuhr konnten 52 µg/ml humanes Serumalbumin aufgereinigt werden. Selbst nach Verringerung der Zelldichte und Verbesserung der Belüftung der Zellen konnte das Auftreten der Proteasen und der damit verbundenen Degradation von rPhl p 1 nicht vermieden werden.

Die zweite Möglichkeit, um den Ertrag an rekombinantem Protein zu steigern, bestand darin, mehrere rphl p 1-Gene in das Hefegenom einzubauen. Multiple Geninsertionen in einem Locus erfolgen spontan in 1 bis 10 % aller Rekombinationen (Higgins und Cregg, 1998 a). Zur einfachen und schnellen Überprüfung der multiplen Insertion sollte das rphl p 1-Gen in den Vektor pPIC9K umklont werden. Innerhalb der Expressionskassette dieses Vektors befindet sich ein Kanamycinresistenzgen. Nach Einbau der Kassette ins Genom und Start der Expression sollte sich die Zahl der eingebauten Kassetten anhand der Resistenz gegen steigende Antibiotikakonzentrationen abschätzen lassen. Auf entsprechende Weise konnte z. B. der epidermale Mauswachstumsfaktor mEGF in Abhängigkeit der Anzahl der ins Genom inserierten Gene bis zu einer Konzentration von 48,7 µg/ml bei 19 Genkopien im Vergleich zu 1,5 µg/ml bei einer Genkopie exprimiert werden (Clare et al., 1991 b). Eine noch größere Ausbeute wurde mit dem humanen TNF-Gen erreicht: Bei einer Anzahl von mehr als 20 Kopien im Hefegenom wurde eine Konzentration von 10 g/l erreicht (Sreekrishna, 1993).

Nach Umklonierung des rphl p 1-Gens in den Vektor konnte trotz Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Stämme kein stabiles Insert-Vektor-Konstrukt detektiert

werden. Es sind vielmehr Fragmente mit differierenden Größen entstanden, obwohl Rekombinations-defiziente *E. coli*-Stämme verwendet wurden. Möglicherweise sind die Bakterienzellen in der Lage, eukaryontische Promotoren zu erkennen und das daran anschließende Gen in einem schwachen Maße zu exprimieren. Dadurch wäre es denkbar, dass das rphl p 1-Gen bzw. das Genprodukt einen toxischen Effekt besäße und die Zellen das Gen sowie den Vektor umordnen würden. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung gestützt, dass die detektierten Transformanten allesamt wesentlich kleinere Kolonien bildeten als die in der Vektor-Kontrolle ohne rphl p 1-transformierte Zellen. Dementsprechend war es auch nach Überprüfung von etwa 1000 Klonen unter Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Stämme nicht möglich, ein pPIC9K-rphl p 1-Konstrukt zu detektieren, welches für die Umklonierung in das Hefesystem geeignet gewesen wäre.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde weiterhin der von Grobe et al. (1999) verwendete rPhl p 1-exprimierende *Pichia pastoris*-Klon eingesetzt. Dabei wurden die Expressionsbedingungen für weitere Untersuchungen von rPhl p 1 nicht verändert, sondern es wurden transformierte Kulturen inkubiert und anschließend das rekombinante Allergen affinitätschromatographisch aufgereinigt. Als Alternative zu dem Hefesystem würde sich das Baculovirussystem anbieten. Die in diesem System verwendeten Insektenzellen sind ebenfalls in der Lage, posttranslationale Modifizierungen durchzuführen, die denen des natürlichen Moleküls recht nahe kommen.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von rPhl p 1

4.2.1 Verbesserung der Zymogramm-Technik

Nach den Ergebnissen von Grobe et al. (1999) besitzt Phl p 1 eine nachweisbare Proteaseaktivität. Allerdings könnte diese Aktivität auf eine sekretierte Hefeprotease zurückzuführen sein, da der Kulturüberstand nicht aufgereinigt und somit das rPhl p 1 nicht isoliert wurde. Zur Detektion dieser Aktivität wurden Zymogramme mit eingegossenem Casein durchgeführt, die eine schnelle Bestimmung von proteolytischen Aktivitäten erlauben. Der Nachteil dieses Nachweises bestand darin, dass mit einem Proteingemisch und nicht mit definierten Substanzen gearbeitet wurde (Grobe et al., 1999). Wie auch in anderen Arbeiten zu sehen ist (Leber und

Balkwill, 1997; Kaino et al., 1998), ist aufgrund der schlechten Auflösung des Zymogramms keine Zuordnung der Molekulargewichte zu den aufgetrennten Proteinen möglich.

Deshalb stand im Vordergrund der Untersuchungen zunächst, die Methode des Zymogramms zu verbessern (Poppelmann et al., 2002). Im Anschluss daran sollte rPhl p 1 hinsichtlich einer Proteaseaktivität mit Hilfe der Zymogramme charakterisiert werden.

Um das Molekulargewicht von Proteasen abschätzen zu können, ist die Durchführung eines hochauflösenden Zymogramms erforderlich. Hierzu wurde zunächst die Substratkonzentration von 1 auf 0,25 % (w/v) Magermilchpulverlösung verringert. Mit Hilfe der Anfärbung des Zymogramms durch die colloidale Coomassie-Lösung RotiBlue, die eine höhere Sensitivität gegenüber anderen Coomassie-Lösungen besitzt, wurde ein sehr guter Kontrast erhalten. Die Reduktion des Substrates erlaubte nun eine genaue Zuordnung der Molekülmassen anhand von Markerproteinen. Das im Magermilchpulver enthaltene Casein hatte keinerlei störende Auswirkungen auf die Migration der Proteine. Aufgetrennte Proteine hoben sich als stärker gefärbte Banden vor dem blaugefärbten Hintergrund ab. Durch diese hochauflösenden Zymogramme ist eine direkte Zuordnung des Molekulargewichtes von aktiven Proteasen möglich.

Affinitätschromatographisch aus *Pichia pastoris*-Kulturüberstand gereinigtes rPhl p 1 sowie das Effluent und das natürliche Allergen wurden im Zymogramm aufgetrennt. Dabei konnte das nPhl p 1 proteinchemisch detektiert, eine proteolytische Aktivität jedoch nicht festgestellt werden. Das galt auch für das rPhl p 1. Dagegen zeigte die Auftrennung des Effluents eine aktive Protease, die anhand einer distinkten, nicht gefärbten Bande zu erkennen war. Dieses Protein hatte ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Die bei Grobe et al. (1999) trotz des im Zymogramm-Gel enthaltenen SDS entdeckte Aktivität, die dem rPhl p 1 zugerechnet wurde, besaß ein Molekulargewicht zwischen 45 und 50 kDa. Eine genaue Zuordnung der Masse war seinerzeit aufgrund des hohen Substratgehaltes und der schlechten Auftrennung nicht realisierbar gewesen.

Aufgrund der Optimierung der Zymogramm-Methode war es nun möglich, die aufgetrennten Proteine direkt aus dem Zymogramm auf eine Nitrozellulosemembran zu blotten und immunologisch nachzuweisen. Die geringe Caseinkonzentration im Zymogel besaß keine blockierende Wirkung und störte nicht den immunologischen

Nachweis der aufgetrennten Proteine. Aus diesem Grund war eine Detektion mit den monoklonalen Antikörpern bei gleichzeitiger Aktivitätsuntersuchung möglich. Da im Effluent immunologisch kein rPhl p 1 nachweisbar war, musste die beobachtete Aktivität demnach von einer endogenen Hefeprotease stammen, die mit etwa 50 kDa deutlich gegenüber einer Masse des rPhl p 1 von 30 bzw. 45 kDa abgegrenzt werden konnte.

Eine Inaktivität des natürlichen und rekombinanten Proteins könnte mit dem im Zymogramm vorhandenen denaturierend wirkenden Agens SDS zusammenhängen. Allerdings gibt es auch den genau gegenteiligen Effekt, dass nämlich solch ein Agens zu einer autokatalytischen Aktivierung einer Protease führen kann (Springman et al., 1990). In Pflanzen sind sogar viele Proteasen beschrieben worden, die *in vitro* über einen durch SDS verursachten Konformationswechsel stimuliert werden (Yamada et al., 2000). So zeigte eine Protease aus dem Mais nach Aktivierung mit 0,4 % SDS eine optimale Substratumsetzung (Yamada et al., 1998). Auch eine endogene Hefeprotease weist unter diesen Versuchsbedingungen im Zymogramm proteolytische Aktivität auf.

Nach Immunodetektion konnte klar gezeigt werden, dass nPhl p 1 und rPhl p 1 den kompletten N- und C-Terminus tragen. Aufgrund der ähnlichen Struktur von Cathepsin B und Phl p 1 wurde der Möglichkeit nachgegangen, ob ein N-terminaler Abschnitt inhibierend wirken könnte. Die N-terminale Prosequenz einiger Proteasen wie z. B. Cathepsin B übt inhibierende Einflüsse auf das Molekül aus, wobei das Cathepsin B nach Vorinkubation in einem Aktivierungspuffer proteolytisch aktiv wird (Fox et al., 1992; Chen et al., 1996; Groves et al., 1996). Nach vergleichenden Sequenzuntersuchungen scheinen nPhl p 1 und rPhl p 1 ebenfalls eine Prosequenz zu besitzen und könnten deswegen proteolytisch inaktiv sein. Erst nach Abspaltung des N-Terminus wären diese Proteine in der Lage Substrat zu spalten. Eine Auftrennung von aktivem nPhl p 1 bzw. rPhl p 1 im Zymogramm und nachfolgendem Western-Blot würde zeigen, dass auf jeden Fall der N-terminal bindende HB 7-Antikörper kein proteolytisch aktives Molekül detektieren würde. Obwohl der HB 7-mAk das 30 kDa-rekombinante Protein nicht detektiert, ist dieses Molekül proteolytisch inaktiv.

Eine gezielte Aktivierung durch Abspaltung des N-Terminus wurde mittels Inkubation von nPhl p1, wie in der Literatur beschrieben, mit verschiedenen sich selbst aktivierenden Proteasen wie z. B. Papain, Pepsin oder Trypsin versucht (James und

Sielecki, 1986; Khan et al., 1999; Dahl et al., 2001). So benötigt die pflanzliche Cysteinprotease Aleurain zur Prozessierung ihrer inaktiven Form eine weitere Cysteinprotease (Vernet et al., 1991). Nach Überprüfung der Phl p 1-Aminosäuresequenz bezüglich möglicher Schnittstellen der Proteasen schien eine Aktivierung mittels Papain am wahrscheinlichsten gewesen. Papain spaltet zwischen bestimmten Aminosäuren, die mit einem Sequenzbereich übereinstimmen, der in unmittelbarer Nachbarschaft zum postulierten aktiven N-terminalen Cys-Rest der Phl p 1-Sequenz liegt (Portaro et al., 2000). Somit würde die Prosequenz abgetrennt und Phl p 1 in einen proteolytisch aktiven Zustand überführt werden. Das Ergebnis dieser Versuche zeigte, dass der N-Terminus trotz Einsatzes verschiedener Konzentrationen von Papain nicht selektiv abgespalten werden konnte. Vielmehr wurde das Allergen offensichtlich nahezu vollständig degradiert, so dass keine Aktivität von Phl p 1 detektiert werden konnte.

4.2.2 Detektion einer Serinprotease im Hefekulturüberstand

Nach affinitätschromatographischer Abtrennung von rPhl p 1 aus dem Kulturüberstand wurde im Zymogramm eine proteolytische Aktivität im Effluent festgestellt. Aufgrund der optimierten Zymogramntechnik konnte das Molekulargewicht der Protease abgeschätzt werden. Das aktive Enzym besaß eine Masse von etwa 50 kDa. Da in einem Kontrollansatz mit nicht-transformierten Hefezellen dieses aktive Enzym ebenfalls im Kulturüberstand detektiert werden konnte, handelte es sich eindeutig um eine endogene Hefeprotease. Ein solcher Befund ist um so erstaunlicher, da in der Literatur zwar auch über Proteine und sogar Proteasen berichtet wurde, die von den Hefezellen selber sekretiert werden (Clare et al. 1991 b). Die beschriebenen Proteasen sollen aber bei einem sauren pH-Wert von z. B. 3,6, wie er in dieser Arbeit in dem Aktivierungspuffer eingestellt wurde, inaktiv sein (Brierley et al. 1994).

Um zu überprüfen, ob die Kontamination des rPhl p 1 mit der Hefeprotease die enzymatische Aktivität des Allergens bei Grobe et al. (1999) vorgetäuscht hatte, wurde versucht, die Protease zu isolieren und anschließend genauer zu charakterisieren. Nach Aufreinigung des Hefekulturüberstandes mittels Gelfiltration und Überprüfung des Reinheitsgrades der Protease in SDS-PAGE-Gelen und

Zymogrammen war die proteolytische Aktivität über etwa 200 Fraktionen in je 1 ml verteilt. Weder in Silber-gefärbten noch in mit RotiBlue entwickelten Gelen konnte ein Protein identifiziert werden, das dem Molekulargewicht der aktiven Protease entspricht. Das bedeutet also, dass das Enzym nur schwach exprimiert wurde, aber andererseits hochaktiv war.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurden Inhibitionsstudien mit anschließenden Zymogrammen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Hefeprotease mit Pefabloc SC und PMSF gehemmt werden konnte. Diese beiden Substanzen inhibieren spezifisch Serinproteasen, wobei Pefabloc SC ebenfalls im gewissen Umfang mit dem an der katalytischen Triade beteiligten Cysteinrest von Cysteinproteasen interagieren kann. Die von Grobe et al. (1999) entdeckte proteolytische Aktivität konnte ebenfalls mit diesen beiden Inhibitoren inaktiviert werden. Allerdings stellten sie zusätzlich eine Inhibition durch den Zusatz von N-Ethylmaleimid und Jodacetessigsäure sowie mit Cu^{2+} -Ionen fest, was für eine Hemmung von Cysteinproteasen spricht.

Die Protease aus *Pichia pastoris* gehört möglicherweise zu der Klasse der Serinproteasen. Bislang ist in einer Veröffentlichung eine Carboxypeptidase Y (CPY) aus *Pichia pastoris* beschrieben worden (Ohi et al. 1995), die eine Sequenzidentität von 61 % zu der Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt. Diese Carboxypeptidase Y zählt zu der Familie der Serinproteasen und besitzt ein ungewöhnlich breites pH-Optimum, das sie von anderen Serinproteasen unterscheidet (Jung et al., 1999). Zur Überprüfung, ob es sich bei der im *P. pastoris*-Kulturüberstand vorhandenen Protease um die CPY handelte, wurde die CPY aus *S. cerevisiae* (CPYS) in Zymogrammen sowie im Apizymtest eingesetzt. In SDS-freien Assays besitzt die CPYS ein breites Substratspektrum und spaltet Proteine am C-Terminus (Stevens et al. 1986; Valls et al. 1987). Es konnte in den Zymogrammen sowie im Apizymtest gezeigt werden, dass die CPYS eine andere Substratspezifität als die Protease aus *P. pastoris* besaß. Demzufolge handelt es sich bei der *P. pastoris*-Protease in der vorliegenden Arbeit nicht um die von Ohi et al. (1995) aus *P. pastoris* identifizierte CPY.

4.2.3 Überprüfung von proteolytischer Aktivität in verschiedenen Testsystemen

Es konnte anhand der Zymogramme klar gezeigt werden, dass das rPhl p 1 proteolytisch inaktiv und im Hefekulturüberstand eine Protease vorhanden ist. Die *P. pastoris*-Protease besitzt eine andere Spezifität als die von Grobe et al. (1999) charakterisierte Protease. Das in den Zymogelen vorhandene SDS könnte durch seine Anlagerung an nPhl p 1 und rPhl p 1 deren proteolytische Aktivität hemmen, weshalb weitere Untersuchungen in SDS-freien Testsystemen durchgeführt wurden. Nach der Durchführung eines Apizymtests mit synthetischen Substraten, der zum halbquantitativen Enzymnachweis entwickelt wurde und auch den Nachweis von Enzymaktivitäten eines komplexen, nicht gereinigten Extraktes erlaubt, konnte keinerlei proteolytische Aktivität von nPhl p 1 und rPhl p 1 detektiert werden. Die internen Kontrollen zeigten, dass der Enzymnachweis funktionierte. Wie bereits erwähnt, kann die Phl p 1-Inaktivität durch eine fehlende Abspaltung der Prosequenz begründet werden.

Phl p 1 besitzt Homologien zu Sequenzbereichen von Cathepsin B, die essentiell für eine proteolytische Aktivität sind. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass der N-Terminus des Phl p 1 homolog zur Prosequenz von Cathepsin B ist. Aufgrund dieser Anzeichen wurden in einem fluorometrischen Testsystem Substrate (Z-R-R-AMC; Boc-V-L-K-AMC) eingesetzt, die spezifisch von Cathepsin B bzw. von Cathepsin B-homologen Proteasen hydrolysiert werden. In diesem System sollten aktives rPhl p 1 bzw. nPhl p 1 ebenfalls diese fluorochromen Substrate spalten können. Nach Voraktivierung von Cathepsin B in einem Aktivierungspuffer (beinhaltete DTT als Reduktionsmittel), bei der die inhibierende Prosequenz durch Autokatalyse abgespalten und die Protease in eine aktive Form überführt wurde (Mach et al., 1994), war eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten, die aus der Spaltung der Substrate resultierte. Als Kontrolle spaltete auch Proteinase K (ein Proteingemisch unterschiedlicher Proteasen) die Substrate. Demgegenüber konnten weder die als weitere Kontrolle eingesetzte *P. pastoris*-Protease, noch nPhl p 1 bzw. rPhl p 1 trotz Voraktivierung in einem DTT-haltigen Aktivierungspuffer die Substrate spalten. Dabei ist unklar, ob die Substrate nicht hydrolysiert wurden aufgrund der noch vorhandenen inhibierenden Prosequenz oder wegen der mangelnden Zugänglichkeit des Allergens für die Substrate. Wie bereits erwähnt, scheint eine Prozessierung von Proteasen eine notwendige Voraussetzung für deren Aktivität zu

sein. Da in den Versuchen eine solche Abspaltung der postulierten inhibierenden Prosequenz von Phl p 1 nicht beobachtet worden ist, könnte dies der Grund für die fehlende Aktivität sein. Auf der anderen Seite sind die verwendeten Substrate spezifisch für Cathepsin B. Trotz einer strukturellen und phylogenetischen Verwandtschaft zweier Proteasen ist ein gemeinsames Substratspektrum nicht garantiert. Als gutes Beispiel dieser Aussage ist der experimentelle Befund der CPYS im Apizymtest zu sehen, bei der ganz klar eine Chymotrypsin- aber nicht Trypsin-ähnliche Spaltung bestimmt wurde.

Es konnte also experimentell kein Nachweis einer Cysteinprotease-Aktivität von nPhl p 1 und rPhl p 1 erbracht werden, obwohl bei Sequenzvergleichen mit Cysteinproteasen eine eindeutige Homologie in funktionell wichtigen Bereichen (inklusive dem N-Terminus) gefunden wurde.

4.2.4 Darstellung der Proteaseaktivität des N-terminal verkürzten Phl p 1 (vrPhl p 1)

Die Prosequenz spielt eine große funktionelle Rolle bei den Proteasen. Ein typisches Merkmal für sekretorische und lysosomale Proteasen ist nach Rawlings und Barret (1994) die innerhalb der Prosequenz liegende N-Glykosylierungsstelle N-I-T. Eine solche ist auch bei Phl p 1 vorhanden. Für die Aktivität der Enzyme spielt diese Glykosylierungsstelle keine Rolle, wohl aber für deren Schutz gegenüber Proteolyse wie es an der Streptokinase gezeigt wurde (Pratap et al., 2000). Viele Mitglieder der Familie der C1-Cysteinproteasen besitzen an zweiter Position des reifen, aktiven Enzyms einen Prolinrest, der wahrscheinlich eine Proteolyse am N-Terminus vermeidet (Rawlings und Barret, 1994). Die Inhibitionswirkung der Prosequenz kommt im Allgemeinen über Salzbrücken, wie z. B. bei der 44 Aminosäuren langen, N-terminalen Prosequenz des inaktiven Pepsinogens, mit dem katalytischen Zentrum zustande. Die Bindung kann durch einen niedrigen pH-Wert aufgehoben und das Vorläufermolekül mittels Autokatalyse in die aktive Protease überführt werden (James und Sielecki, 1986). Beim Phl p 1 konnte unter diesen Bedingungen keine autokatalytische Aktivierung erzielt werden. Auch nach längerer Inkubationszeit in einem für Cysteinproteasen geeigneten Puffer mit niedrigem pH-Wert war keine proteolytische Aktivität zu beobachten.

Natürliches Phl p 1 besitzt zusammen mit seiner Leadersequenz eine von der Proteinsequenz abgeleitete Masse von etwa 31 kDa (inklusive Kohlenhydrate). Der Vorläufer des aktiven Papains, das inaktive Prepropapain, besitzt nach Expression im Baculovirussystem eine Masse von 39 kDa. Nach Aktivierung unter sauren Bedingungen kommt es durch einen autokatalytischen Mechanismus zu einer Abspaltung der Prosequenz. Die daraus resultierende aktive Protease besitzt eine Masse von 24,5 kDa (Vernet et al., 1991), während Phl p 1 ohne mutmaßliche Prosequenz eine Masse von etwa 23 kDa besitzen würde. Eine vergleichbare Masse von 24 kDa besitzt das reife Caricain, das wie Papain unter sauren Bedingungen aktiviert wird (Groves et al., 1996). Dieses Enzym gehört mit einer 106 Aminosäuren langen Prosequenz ebenso wie Papain zu den Cysteinproteasen mit langen Propeptiden, wohingegen Cathepsin B eine sehr viel kürzere Prosequenz besitzt (Chan et al., 1986). Die Masse des aktiven Cathepsin B (ohne Prosequenz) liegt bei etwa 30 kDa. Der Vergleich von Phl p 1 mit Cathepsin B zeigt, dass einige Bereiche innerhalb des N-Terminus miteinander homolog sind. Wie Cathepsin B werden auch andere Cysteinproteasen als inaktive Proenzyme exprimiert. Nach Abspaltung der N-terminalen Prosequenz werden z. B. Bromelain und Clostripain in ihre aktiven Formen überführt. Das Propeptid ist ebenfalls an der korrekten Proteinfaltung und an der Expression beteiligt (Vernet et al., 1991). Die Cysteinproteasen besitzen im Allgemeinen eine Prosequenz mit einer Länge von mehr als 90 Aminosäuren. So ist z. B. die des Papains 107 Aminosäuren lang (Cohen et al., 1986). Im Gegensatz dazu besitzt Cathepsin B ein relativ kurzes Propeptid von 62 Aminosäuren (Chan et al., 1986), während Der p 1 ein ungewöhnlich kurzes Propeptid von 13 Aminosäuren besitzt (Chua et al., 1988). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu Cathepsin B könnte Phl p 1 ebenfalls eine inhibierende Prosequenz besitzen, die nach Sequenzvergleich eine mutmaßliche Länge von 47 Aminosäuren besitzt. In Abb. 27 wurden vier reife Cysteinproteasen mit dem N-Terminus von Phl p 1 verglichen.

	1	10	20	25
Papain	I P E Y V D - - - -	W R Q K G A V T P V K N Q G S	C G S C	
Actinidin	L P S Y V D - - - -	W R S A G A V V D I K S Q G E	C G G C	
Bromelain	V P Q S I D - - - -	W R D Y G A V T S V K N Q N P	C G A C	
Cathepsin B	L P E S F D A R E Q W S N C P T I A Q I R D Q G S	C G S C		
Phl p 1	K P P F S G - - - -	M T G C G N T P I F K S G R G	C G S C	

▲

Abb. 27: Vergleich der ersten 25 Aminosäuren von aktivem Papain, Actinidin, Bromelain und Cathepsin B (Kamphuis et al., 1985) mit der Phl p 1-Sequenz. Die Nummerierung bezieht sich auf die Papain-Sequenz. Der Pfeil markiert den an zweiter Stelle befindlichen Pro-Rest. Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren die erste Konsensussequenz der ersten funktionellen Domäne.

Abb. 27 zeigt deutlich, dass Phl p 1 ohne die mutmaßliche Prosequenz wie die aktiven Proteasen an zweiter Stelle einen Pro-Rest besitzt. Es liegen mit Ausnahme des Cathepsin B 24 Aminosäuren zwischen der ersten Aminosäure der reifen Proteine bis zum reduzierten, katalytisch essentiellen Cys-Rest.

Aus diesen Gründen wurde als mögliche Schnittstelle der Prosequenz angenommen, dass die zweite Aminosäure im reifen Protein ein Prolin ist. Aufgrund dieser Daten wurde ein verkürztes, rekombinantes phl p 1-Genfragment (vrphl p 1) mittels PCR hergestellt, dessen Genprodukt ein Protein mit einer Masse von etwa 26 kDa war. Nach Expression und affinitätschromatographischer Isolierung des vrPhl p 1 aus dem Kulturüberstand mit dem monoklonalen Antikörper IG12 erfolgte die Elution unter basischen Bedingungen, um eine mögliche Aktivierung von vrPhl p 1 auszuschließen. Das vrPhl p 1 ließ sich nach SDS-PAGE weder mittels Coomassie- noch mit Silberfärbung detektieren. Das war ein recht überraschender Befund, da eine Silberfärbung sensitiver als die photometrische Detektion (280 nm) während der Chromatographie ist. Eine Erklärung dafür wäre, dass das vrPhl p 1 aufgrund der fehlenden Prosequenz eine so hohe Aktivität besaß, dass es sich selbst degradierte und deshalb in der später durchgeführten SDS-PAGE nicht zu detektieren war. Der bei der SDS-PAGE eingesetzte Sammelgelpuffer sowie der Probenpuffer besaßen einen pH-Wert von 6,8. Diese Verschiebung des pH-Wertes in den leicht sauren Bereich könnte zu einer Aktivitätssteigerung des vrPhl p 1 geführt haben, obwohl der Wert weit von dem im Aktivierungspuffer für rPhl p 1 eingestellten pH-Wert von 3,6 abwich. Die tierische Cysteinprotease Cathepsin H besitzt einen für die Aktivität optimalen pH-Wert von 6,8 und damit den gleichen Wert, wie er im SDS-PAGE-

Sammelgelpuffer und im Probenpuffer eingestellt worden war (Turk et al., 1997). Somit wäre eine Aktivität des vrPhl p 1 auch bei einem fast neutralen pH-Wert denkbar. Da kein Substrat vorhanden war, muss sich vrPhl p 1 selber degradiert haben. In einem Zymogramm konnte tatsächlich in der vrPhl p 1-enthaltenen Probe eine deutliche Proteaseaktivität gezeigt werden. Eine Co-Aufreinigung einer Hefeprotease zusammen mit vrPhl p 1 konnte ausgeschlossen werden: Nach der Aufreinigung von dem rPhl p 1-Gesamt-molekül wurde lediglich in dem Effluent, in dem sich die *P. pastoris*-Protease befand, eine proteolytische Aktivität detektiert, nicht jedoch in der rPhl p 1-enthaltenen Fraktion. Im Gegensatz zu der *P. pastoris*-Protease, die ebenfalls nach affinitätschromatographischer Aufreinigung von vrPhl p 1 in dem Effluent vorhanden war, zeigte die Auftrennung bzw. Aktivität des verkürzten rekombinanten Allergens im Zymogramm ein diffuses Bandenmuster. Dementsprechend musste die Aktivität in der Probe tatsächlich von vrPhl p 1 ausgehen. Für einen spezifischen Nachweis wurde ein Zymogramm durchgeführt, geblottet und anschließend mit den mAk HB 7, IG 12 und Bo 14 inkubiert. Während im Zymogramm deutlich die proteolytische Aktivität zu erkennen war, konnte keiner der mAk das hochaktive vrPhl p 1 detektieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund von Grobe et al. (1999), die das proteolytisch aktive rPhl p 1 ebenfalls nicht mehr als Proteinbande im Gel nachweisen konnten.

Ein weiteres Indiz für eine proteolytische Aktivität des verkürzten rekombinanten Allergens ergab die Inkubation von nPhl p 1 mit vrPhl p 1. Als Kontrollen dazu wurden das natürliche Allergen mit der Hefeprotease aus dem Expressionsüberstand nicht transformierter *P. pastoris*-Zellen sowie das Allergen ohne Zusätze inkubiert. Im Vergleich zu diesen Kontrollen waren die Banden des nPhl p 1 nach SDS-PAGE deutlich schwächer, was einen proteolytischen Abbau bewies. Da die Hefeprotease dazu nicht in der Lage war, musste die Degradation von nPhl p 1 durch vrPhl p 1 verursacht worden sein. Offensichtlich besitzt das verkürzte rekombinante Allergen ganz bestimmte Schnittstellen innerhalb der nPhl p 1-Sequenz, so dass nPhl p 1 scheinbar vollständig von vrPhl p 1 degradiert wird, da keine Fragmente im SDS-PAGE-Gel nachweisbar waren. Diese Beobachtung wird durch den Befund erhärtet, dass das verkürzte rekombinante Allergen in dem APIzym-Test eine Trypsin-ähnliche Spaltspezifität besitzt und damit Substrate an Argininresten hydrolysieren kann, wie es schon Grobe et al. (1999) an rPhl p 1 zeigen konnten.

Um das vrPhl p 1 für eine strukturelle Untersuchung zu stabilisieren, wurde nach einer Expression und Einengung des filtrierten Kulturüberstandes ein Proteaseinhibitorgemisch (α -Complete) hinzugegeben. Obwohl direkt nach affinitätschromatographischer Aufreinigung erneut das Inhibitorgemisch hinzugefügt wurde, ließ sich in der SDS-PAGE eine nur schwache Bande erst nach langer Exposition in der Silberfärbung bei etwa 26 kDa detektieren. Da sich aber noch weitere Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten anfärbten, war nicht ganz klar, ob es sich bei dem 26 kDa-Protein tatsächlich um vrPhl p 1 handelte, weil dieses Protein in einem Western-Blot mittels Phl p 1-spezifischen mAk nicht identifiziert werden konnte. Der einzige spezifische Nachweis, dass es sich bei dem proteolytisch aktiven Molekül um vrPhl p 1 handelte, war damit die Detektion des Moleküls während der Aufreinigung. Weiterführende Experimente zur Bestimmung der Substratspezifität konnten nicht durchgeführt werden, da die Konzentration von vrPhl p 1 zu gering war.

Für weitere strukturelle Untersuchungen von vrPhl p 1 müsste die Aktivität in weiteren Experimenten spezifisch ausgeschaltet werden, ohne die Struktur des Moleküls zu verändern.

4.3 Sequenzvergleiche von Phl p 1 zu bekannten Cysteinproteasen

Die Cysteinproteasen sind in 21 Familien eingeteilt (C1 bis C21), deren Aktivität von einem Cystein- und Histidin- sowie einem für die Aktivität weniger bedeutsamem Asparaginrest im aktiven Zentrum abhängt (Rawlings und Barret, 1994). Etwa die Hälfte der Cysteinpeptidasen (C3 bis C9, C16, C18 und C21) kommen ausschließlich in Viren vor. Die Familien C11, C15 und C20 repräsentieren Proteasen aus Bakterien, während die restlichen Klassen allesamt aus Eukaryonten stammen. C1, C2 und C10 werden als Papain-ähnliche Familien bezeichnet, obwohl sie Proteasen mit einer großen Varianz der Aktivität enthalten, in unterschiedlichen Organismen vorkommen (Baculoviren, Eubakterien, Hefe sowie vermutlich in allen Protozoen, Pflanzen und Tieren) und mehr oder weniger homolog zu der bekanntesten und namensgebenden Cysteinprotease Papain sind (Rawlings und Barret, 1994).

Phl p 1 ist nach Grobe et al. (1999) eine neuartige Cysteinprotease, wie aufgrund von Experimenten und Sequenzvergleichen mit Cysteinproteasen gezeigt wurde. Die Vergleiche wurden jedoch nicht Computer unterstützt durchgeführt. Bislang führte eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des Allergens mit Proteindatenbanken wie SwissProt oder BLAST nicht zu Proteasen. Allerdings besitzen gerade die Cysteinproteasen untereinander so unterschiedliche Sequenzen und räumliche Strukturen, dass eine Klassifizierung einer neuen Protease mittels Computerprogrammen nur sehr schwer möglich ist (Berti und Storer, 1995). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die am besten untersuchte prozessierte Cysteinprotease Papain. Im Allgemeinen besitzen die C1-Cysteinproteasen drei in der Primärstruktur voneinander getrennte Domänen, die die für die Aktivität verantwortlichen und hoch konservierten katalytischen Aminosäuren Cys 25, His 159 und Asn 175 beinhalten (auf die Papainsequenz bezogen). Weiterhin spielt Gln 19 eine wichtige Rolle bei der Katalyse, da diese Aminosäure hilft, die richtige aktive Konformation einzunehmen (Rawlings und Barret, 1994). Asn 175 unterstützt His 159 bei der Orientierung des Imidazoliumrings, wobei erstere offensichtlich nicht essentiell ist, da der Cysteinprotease Bromelain diese Aminosäure fehlt (Ritonja et al., 1989). Weiterhin soll Trp 177 eine ebenfalls essentielle Aminosäure sein (Berti und Storer, 1995). Alle weiteren Aminosäuren sind variabel, was sich durch die Diversität der Sequenzen innerhalb der C1-Cysteinproteasen widerspiegelt. Mit Hilfe des Alignmentprogramms BL2SEQ Version 3.2 von dem Server des San Diego Supercomputer Center war es möglich, die gesamte Aminosäuresequenz von Phl p 1 nacheinander mit Papain, Cathepsin B und Der p 1 zu vergleichen. Cathepsin B ist eine lysosomale Thiol-Endopeptidase mit einer Homologie (40 %) zu Papain (Takio et al., 1983). Das Hauptallergen der Hausstaubmilbe Der p 1 ist ebenfalls eine sehr gut charakterisierte Cysteinprotease und besitzt zu Papain eine Homologie von 24 % und zu Cathepsin B von 21 % (Chua et al., 1988; Schulz et al., 1998 a; Schulz et al., 1995).

Der aufgrund der engen Verwandtschaft durchgeführte Kontrollvergleich, in der die Papain- mit der Cathepsin B-Sequenz verglichen wurde, zeigte einen niedrigen Erwartungswert an (2×10^{-24}). Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob zwei miteinander verglichene Sequenzen bzw. Sequenzbereiche homolog sind. Dabei drückt ein sehr niedriger Wert eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Homologie wie in dem oben genannten Beispiel aus. Ist ein hoher Verwandtschaftsgrad zweier

Sequenzen festgestellt worden, so werden sich die Proteine auch hinsichtlich der Funktion ähneln. Weitere Parameter zur Identifizierung der Verwandtschaft zweier Sequenzen ist der prozentuale Anteil der identischen und der homologen Aminosäuren.

Das Allergen Phl p 1 besitzt wie Papain insgesamt sieben Cysteinreste, wobei sechs davon Disulfidbrückenbindungen eingehen können (Petersen et al., 1995 b). Das bedeutet, dass ein Cysteinrest reduziert vorliegen könnte, da das nPhl p 1 nach Untersuchungen in der 2D-PAGE zu ca. 90 % als Monomer vorliegt. Der Vergleich der Phl p 1-Sequenz erbrachte dabei zwei bei Papain für die Katalyse verantwortliche Sequenzmotive, wobei das eine Motiv den Bereich mit dem von uns postulierten reduzierten Cysteinrest beinhaltet. In Tab. 16 ist das Ergebnis des Sequenzvergleiches mittels des Alignmentprogramms BL2SEQ Version 3.2 für den ersten homologen Sequenzbereich zwischen Phl p 1, Papain, Cathepsin B und Der p 1 zusammenfassend dargestellt. Die funktionell hochkonservierten und bei allen vier Proteinen vorhandenen Motive sind markiert.

Da die Gesamtsequenzen der Proteine miteinander verglichen wurde, ist die Nummerierung der Aminosäuren verschoben. Der in der Literatur als der in der katalytischen Triade aktive Cys 25-Rest des Papain entspricht in der unteren Tabelle 16 dem Cys 158.

Tab. 16: Vergleich des ersten funktionell wichtigen Bereiches von Phl p 1 mit Papain, Cathepsin B und Der p 1. Die fettgedruckten Buchstaben markieren den bei allen vier Proteinen vorhandenen Konsensusbereich.

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz		
Phl p 1	92	CGSC	95
Papain	155	CGSC	158
Cathepsin B	105	CGSC	108
Der p 1	129	CGSC	132

Wie aus Tabelle 16 eindeutig hervorgeht, besitzt Phl p 1 ein bei den Cysteinproteasen Papain, Cathepsin B und Der p 1 für die Funktion essentiellen Sequenzabschnitt, obwohl der Erwartungswert für diesen Bereich nach Vergleich der Phl p 1- mit der Papain-Sequenz bei 1.1, mit Cathepsin B bei 0.025 und mit Der p 1 bei 0.064 lag. In Relation zum Kontrollvergleich (Papain mit Cathepsin B), der einen Erwartungswert von 2×10^{-24} ergab, scheint die Verwandtschaft von Phl p 1 in diesem

Sequenzabschnitt zu den Cysteinproteasen sehr gering zu sein. Trotzdem scheint dem in der Phl p 1-Sequenz an Position 95 vorhandenen Cysteinrest eine der mit Cys 25 (Cys 158 in Tab. 16) innerhalb der ersten für die Aktivität verantwortlichen Domäne des Papains vergleichbare Funktion zuzukommen.

Tab. 17 zeigt zusammenfassend den Sequenzvergleich zwischen Phl p 1, Papain, Der p 1 und Cathepsin B in der dritten Domäne.

Tab. 17: Vergleich der dritten funktionell wichtigen Domäne von Phl p 1 mit Papain und Der p 1. Die fettgedruckten Buchstaben markieren den bei allen drei Proteinen vorhandenen Konsensusbereich. Der an der Aktivität beteiligte aber nicht essentielle Asn-Rest ist mit einem fett gedruckten kursiven Buchstaben gekennzeichnet.

Protein	Aminosäuresequenz mit Position innerhalb der Sequenz			
Phl p 1	214	ESWGAIW		220
Papain	308	NSWGTGW		314
Cathepsin B	298	NSWNLDW		304
Der p 1 (320 AS)	288	NSWDTNW		294

In diesem Bereich zeigt sich eine Homologie von Phl p 1 in dem Bereich um die in der Literatur als an der Katalyse beteiligten Aminosäure Trp 177 (entspricht Trp 310 in Tab. 17) der Papainsequenz (Berti und Storer, 1995). Ebenso ist die essentielle Aminosäure Ser 176 (entspricht Ser 309 der in der Papainsequenz in Tab. 17) innerhalb der Phl p 1-Sequenz an der entsprechenden Position vorhanden (Menard et al., 1991 b). Allerdings fehlt in der Phl p 1-Sequenz die katalytisch aktive Aminosäure Asn 175 (Rawlings und Barret, 1994), die in der Tab. 17 Asn 308 entspricht (bezogen auf die Papainsequenz). An ihrer Stelle liegt die Aminosäure Glu.

Der Aminosäurerest Asn 175 spielt hinsichtlich der Aktivität eine untergeordnete Rolle wie im Folgenden deutlich gemacht wird. Im Falle der C1-Cysteinprotease Bromelain scheint der Austausch des Asn an dieser Position gegen Glu für die mangelnde Reaktivität gegenüber dem bekannten Cysteinproteaseinhibitor E64 verantwortlich zu sein (Ritonja et al., 1989). Phl p 1 wird ebenfalls nicht von E64 inhibiert (Grobe et al., 1999). Innerhalb der C10-Cysteinproteasen (mit Streptopain als bekanntestem Vertreter) ist die polare Aminosäure Asn 175 gegen Asp mit einer sauren Seitengruppe ausgetauscht. Die Spezifität der Protease ist mit Papain vergleichbar, wobei die Inhibition durch E64 wesentlich langsamer abläuft. In der

Familie der C3-Cysteinproteasen ist die polare Aminosäure Asn 175 durch die Aminosäuren Glu oder Asp, die jeweils eine saure Seitengruppe tragen, ersetzt worden (Rawlings und Barret, 1994). Nach Austausch von Asn 175 zu Gln mittels spezifischer Mutagenese besitzt das so veränderte Papainmolekül proteolytische Aktivität (Vernet et al., 1995). Strukturell scheint Asn 175 eine größere Bedeutung zu besitzen, da es an der Thermostabilität des aktiven Moleküls beteiligt ist. Diese Beispiele machen klar, dass Asn 175 nicht essentiell für die Aktivität ist und im Falle des Phl p 1 ein Fehlen dieser Aminosäure nicht gegen die Klassifizierung des Allergens als eine Cysteinprotease spricht.

Die für Cysteinproteasen funktionell wichtigen und hochkonservierten Trp 177- und Trp 181-Reste (Trp 310 und Trp 314 der Papainsequenz in Tab. 17) sind ebenfalls in der Phl p 1-Sequenz zu detektieren. Während Asn 175 im Papain mittels Wasserstoffbrückenbindung His 159 in seiner Lage stabilisiert, wird dieser Effekt durch Trp 177 aufgrund der Abschirmung der Asn-His-Verbindung gegenüber dem Lösungsmittel verursacht. Die gleiche Aufgabe besitzt Trp 181, so dass um die Asn-His-Verbindung ein hydrophober Bereich gebildet wird (Bromme et al., 1996). Die Bildung eines solchen hydrophoben Bereiches scheint auch im Phl p 1 über die entsprechenden Trp-Reste möglich zu sein, was eine weitere Grundvoraussetzung für die proteolytische Umsetzung eines Substrates darstellt.

Innerhalb der zweiten Domäne um die katalytisch wichtige Aminosäure His 159 (entspricht His 292 der Papaing Gesamtsequenz) konnte innerhalb der Phl p 1-Sequenz kein Histidinrest identifiziert werden. Somit ist nach wie vor unklar, welcher His-Rest im Phl p 1 die Aufgabe von His 159 im Papain übernommen haben könnte. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften des Imidazolrings dieser Aminosäure und der damit verbundenen funktionellen Relevanz kann sie sicherlich nicht durch eine andere ersetzt werden. Interessanterweise wurde innerhalb der Calpaine (C2-Cysteinproteasen) der mutmaßliche katalytische His-Rest biochemisch bislang noch nicht identifiziert (Rawlings und Barret, 1994). Die Calpaine sind Calcium-abhängige zytosolische Endopeptidasen, die aus zwei Peptidketten bestehen, wobei die eine Kette Ähnlichkeiten mit Papain aufweist. Demzufolge könnte beim Phl p 1 einer von drei möglichen His-Resten die Aufgabe übernommen haben und aufgrund einer durch die unterschiedliche Lage der Cysteinreste alternativen Faltung an dem

aktiven Zentrum beteiligt sein. Abb. 28 zeigt den Aminosäurevergleich zwischen sieben Gruppe I-Allergenen:

	114	127	173
	↓	↓	↓
Phl p 1	H ITDDNEEPIAPY H FDLSGIAFGSMAKKGDE-QKLR SAGEVEIQFRRVKCKYPEGTKVTF H		
Pha a 1	H ITDDNEEPIAPY H FDLSGHAFGSMAKKGEE-ENVRGAGELELQFRRVKCKYPDGTKPTF H		
Lol p 1	T ITDDNEEPIAPY H FDLSGHAFGSMAKKGEE-QNVR SAGELELQFRRVKCKYPDDTKPTF H		
Hol l 1	H ITDDNEEPIAPY H FDLSGHAFGSMAKKGEE-QKLR SAGELELKFRRVKCKYPDGTKPTF H		
Zea m 1.1	H ITDMNIEPIAAY H FDLAGTAFRRHGQKGLGGRSLRKAGIIDMQFRRVKCKY--GLQGHLP		
Ory s 1	H VTDMNDEPIAAY H FDLSGLAMAKDGKD---EELRKAGIIDTQFRRVKCKYPADTKITF H		
Zea m 1	F ITDMNIEPIAPY H FDLSGKAFGSLAKPGLN-DKLRHCGIMDVEFRRVRCKYPAGQKIVF H		
	** * ***** * *		* * ***** **

Abb. 28: Aminosäurevergleich der mittleren Sequenzbereiche von sieben verschiedenen Gruppe I-Allergenen. Die Nummerierung bezieht sich auf die Phl p 1-Sequenz. Mit Pfeilen und in fett gedruckten Buchstaben sind die His-Reste hervorgehoben, die beim Phl p 1 an der Aktivität beteiligt sein könnten, wobei der am wahrscheinlichsten an der Katalyse beteiligte His-Rest an Position 127 mit einem großen Pfeil gekennzeichnet ist.

Ein Vergleich der Allergen-Sequenzen macht deutlich, dass His 127 (Phl p 1-Nummerierung der Gesamtsequenz) bei allen Allergenen konserviert ist. Ebenfalls sind weitere Aminosäuren in diesem Bereich hochkonserviert (YHFDL). Möglicherweise ist der innerhalb dieses Sequenzbereiches vorhandene His-Rest an der Proteaseaktivität beteiligt und dementsprechend funktionell homolog zu dem His 159 innerhalb der Papainsequenz. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden im vrPhl p 1 His 114, His 127 sowie His 173 gegen Ala ausgetauscht und in *Pichia pastoris* kloniert und exprimiert. Dabei stellte sich heraus, dass nur sehr wenig Protein exprimiert wurde und nur nach langer Entwicklungszeit in einem Immunoblot je eine Bande bei 26 kDa mit Hilfe des mAk IG 12 detektiert werden konnte. Durch die Inkubation von vrPhl p 1 mit einem Inhibitorengemisch konnte in einem Silbergefärbten Gel ebenfalls eine Bande bei 26 kDa detektiert werden (s. 4.2.4), so dass das 26 kDa-Protein vrPhl p 1 bzw. das an den His-Resten mutierte vrPhl p 1 sein muss. Offensichtlich hat die Mutation der His-Reste zu einer Blockierung der proteolytischen Aktivität des vrPhl p 1 geführt, weil nach Durchführung eines Zymogramms mit den „Histidin-Mutanten“ keine Proteaseaktivität beobachtet werden konnte. Da die Funktion des Proteins bei Veränderung des His 114, 127 bzw. 173

inhibiert wurde, ist nach wie vor unklar, welcher His-Rest am aktiven Zentrum beteiligt ist. Vermutlich sind His 114 bzw. 173 für die dreidimensionale Struktur des jeweiligen Proteins mitverantwortlich, so dass die Mutation an diesen His-Resten zu einer strukturellen Veränderung führt und somit die Cysteinproteasewirkung blockiert wird. Der Austausch von His 127 gegen Ala wird nicht die dreidimensionale Struktur des Gesamtmoleküls beeinflussen, sondern die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum verhindern und dadurch die Katalyse unmöglich machen. Mit Hilfe eines Vergleiches der „Histidin-Mutanten“ mit nPhl p 1 und rPhl p 1 könnte die Veränderung der Proteinfaltung gezeigt werden. Da nicht genügend Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, konnte dieser Aspekt nicht weiter verfolgt werden.

Parallel zu der Untersuchung im Hefesystem wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit eine Phl p 1-Mutante im Baculovirus-Expressionssystem kloniert und exprimiert (Grobe et al., 2002). Wir konnten zeigen, dass der Austausch von His 127 zu Val 127 mittels PCR-Technik in diesem Expressionssystem zu einem stabilen und deutlich nachweisbaren Protein führte, während das nicht mutierte Molekül instabil und kaum exprimierbar war. Das deutet darauf hin, dass sich das unmutierte Molekül selbst degradiert hat, während das mutierte Protein aufgrund einer strukturellen oder funktionellen Veränderung keine proteolytische Aktivität besitzt. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass His 127 eine für die Aktivität essentielle Aminosäure innerhalb des aktiven Zentrums ist.

Eine in C1-Cysteinproteasen ebenfalls hochkonservierte Aminosäure ist Gln 19, wobei in der Phl p 1-Sequenz an entsprechender Stelle ein Ser zu finden ist (nicht gezeigte Alignments). Da die Seitenketten beider Aminosäuren über dissoziierbare Wasserstoffmoleküle verfügen, könnte das Ser ähnlich wie Gln in der Lage sein, über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Amidgruppe des Cys 25 zu interagieren (Menard et al., 1991 a). Die in allen C1-Cysteinproteasen konservierte Aminosäure Ser 176 (Ser 309 der Papainsequenz in Tab. 17) findet sich auch in Phl p 1 wieder. Sie geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gln 19 ein, scheint aber keine für die Aktivität essentielle Aminosäure zu sein (Menard et al., 1991 b).

Vielen C1-Cysteinproteasen ist das hochkonservierte sogenannte „ERFNIN“-Motiv innerhalb der Prosequenz gemeinsam (Karrer et al., 1993). Innerhalb dieses Bereiches sind variable Aminosäuren vorhanden. Möglicherweise spielt das

„ERFNIN“-Motiv bei der Inhibition der Protease eine Rolle. In der Phl p 1-Sequenz ist solch ein Motiv ebenso wenig zu erkennen wie in Cathepsin B. Das Propeptid von Cathepsin B ist ein sehr starker Inhibitor und der Grund für die Inaktivität des Gesamtmoleküls (Fox et al., 1992). Dies könnte beim Phl p 1 analog dazu auch der Fall sein. Phylogenetisch scheinen sich die den „ERFNIN“-Bereich enthaltenen Peptidasen schon früh von den Cathepsin B-ähnlichen Proteasen getrennt zu haben (Karrer et al., 1993), so dass das Phl p 1 den Cathepsin B-ähnlichen Peptidasen zugeordnet werden kann. Das Cathepsin B ist daher für Untersuchungen von Phl p 1 bezüglich der Proteaseaktivität eine geeignete Kontrolle.

Die bisherigen experimentellen Daten zeigten bislang keinen Beweis der Cysteinproteaseaktivität für das Phl p 1-Gesamtprotein, während die Sequenzanalyse sehr wohl solch eine Aktivität vermuten lässt. Anhand der Sequenzuntersuchungen gehört Phl p 1 zusammen mit den anderen Gruppe I-Allergenen zu den Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen und könnten aufgrund der sequentiellen Eigenarten wie z. B. die Position des mutmaßlich an der Aktivität beteiligten His 127 zu einer neuen Familie der Cysteinproteasen zählen.

4.4 Funktionelle Wirkung der Gruppe I-Gräserallergene

4.4.1 Phl p 1 gehört zu den β -Expansinen

Grobe et al. (1999) haben herausgefunden, dass Phl p 1 eine Cysteinprotease mit einer Trypsin-ähnlichen Spaltspezifität ist. Nach Abspaltung der mutmaßlichen Prosequenz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch das vrPhl p 1 proteolytisch aktiv ist. Bislang ist allerdings noch unklar, unter welchen Bedingungen die Prosequenz *in vivo* abgespalten wird und ob ein weiteres Enzym daran beteiligt ist.

Cosgrove et al. (1997 c) haben in einem Testsystem nachweisen können, dass das Phl p 1-Homologe aus dem Mais, Zea m 1, für eine Zellwandstreckung verantwortlich ist. Die Gruppe I-Gräserallergene wurden aufgrund ihrer Struktur und Funktion von Cosgrove et al. (1997 c) als β -Expansine von den α -Expansinen abgegrenzt worden.

Expansine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellwandstreckung bzw. beim Pollenschlauchwachstum. Die β -Expansine sind Zellwand-auflösende Proteine, die untereinander eine Homologie von 60 bis 87 % identischen und 75 bis 95 % biochemisch ähnlichen Aminosäuren aufweisen. Die Gruppe I-Gräserallergene besitzen etwa 25 % Sequenzidentität zu den Expansinen. Ferner enthalten die Expansine wie auch Phl p 1 ein Signalpeptid, das den Export in das endoplasmatische Reticulum vermittelt. Überdies haben die Proteine einen vergleichbaren isoelektrischen Punkt (Phl p 1: pI 7,9 bzw. Expansine zwischen pI 8,1 und 8,5) sowie nach Prozessierung eine ähnliche Sequenzlänge (Phl p 1: 240 AS; Konsensus der Expansine: 227 bis 242 AS) (Shcherban et al., 1995).

Phylogenetisch gesehen sind die Expansine vor der Divergenz von monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen entstanden. Aufgrund der sehr großen Homologie untereinander besitzen sie eine sehr spezifische Funktion, die nur eine geringe Variation in der Struktur erlaubt (Shcherban et al., 1995). Die Expansine weisen ein saures pH-Optimum auf, wobei die Zellwandstreckung unter sauren Bedingungen erfolgt („acid growth“) (Shcherban et al., 1995). Während nPhl p 1 und rPhl p 1 auch im sauren pH-Bereich keine proteolytischen Eigenschaften zeigen, weist vrPhl p 1 bemerkenswerter Weise bei einem pH-Wert von 3,6 eine im Zymogramm deutlich sichtbare proteolytische Aktivität auf. nPhl p 1 konnte nicht durch Inkubation mit anderen Proteasen aktiviert werden, sondern wurde nahezu vollständig (z. B. durch Papain) oder gar nicht (durch die *P. pastoris*-Protease) degradiert. Lediglich nach Inkubation des nPhl p 1 mit vrPhl p 1 zeigte eine Degradation, die von vrPhl p 1 verursacht wurde. Das bedeutet, dass das nPhl p 1 sehr gezielt, aber nicht vollständig, durch das vrPhl p 1 abgebaut wurde.

Nach Denaturierung von Zellwandproteinen geht die Fähigkeit der Extension von Zellwänden verloren, so dass eine Beteiligung von Zellwandproteinen an Wachstumsvorgängen als sehr wahrscheinlich gilt (Shcherban et al., 1995). Hitzeinaktivierte Zellwände aus Gurkenhypokotyl erlangen nach Zugabe von isolierten Zellwandproteinfraktionen ihre Sensibilität gegenüber dem „acid growth“ zurück. Dieser Befund wurde durch Untersuchungen an weiteren Pflanzen bestätigt. So zeigen auch Blätter von Tomaten sowie Haferkoleoptilen, Reisinternodien, Sojabohnenhypokotyle und Tabakzellkulturen einen direkten Zusammenhang von Zellwandproteinen auf Wachstumsvorgänge bei Pflanzen (Cosgrove, 2000). Allerdings sind Expansine nicht nur verantwortlich für Umstrukturierungen in

Wachstumsgeweben, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei Fruchtreifungsvorgängen. In Tomaten, Melonen und Erdbeeren ist gezeigt worden, dass die Expression von Expansinen mit Hilfe des pflanzlichen Hormons Ethylen gesteigert werden kann.

Ein ganz klarer Beweis, dass die Gruppe I-Gräserallergene eine den Expansinen entsprechende wachstumsvermittelnde Funktion besitzen, zeigten Cosgrove et al. (1997 c). Nach Inkubation von Maisstigmata mit Maispollenextrakt bei einem pH-Wert von 4,5 konnte eine deutliche und irreversible Streckung von Zellwänden mit einem Extensiometer gemessen werden. In diesem Test werden pflanzliche Gewebe unter konstantem Zug eingespannt. Die Streckung dieser Gewebe wird dann nach Zugabe von Expansinen in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Das Phl p 1-Homologe aus dem Mais, *Zea m 1*, wurde dabei von Cosgrove et al. (1997 c) als die für die Streckung verantwortliche Komponente identifiziert. Dieser β -Expansin-vermittelte Wirkmechanismus ist dabei im Wesentlichen auf monokotyle Pflanzen beschränkt, während die entsprechenden Mechanismen in dikotylen Pflanzen von den α -Expansinen verursacht wird. Diese Tatsache lässt auf eine entsprechend selektive Wirkung der Proteine auf die Zielstrukturen schließen. Das könnte ein Hauptgrund dafür sein, dass bislang noch nicht die Substratspezifität von *vrPhl p 1* ermittelt werden konnte.

Der genaue Mechanismus der Funktion von Expansinen ist noch unbekannt. Während Cosgrove et al. (1997 b) vermuten, dass dieser Mechanismus über das Lösen von Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polysacchariden bzw. über eine Glykosyltransferaseaktivität vermittelt wird (Cosgrove, 1997 b) gehen Grobe et al. (1999) davon aus, dass *Phl p 1* über eine proteolytische Aktivität auf Zellwandbestandteile einwirkt.

4.4.2 Wirkmechanismus des *Phl p 1* nach Cosgrove et al. (1997 b)

Das von Cosgrove et al. (1997 b) favorisierte Prinzip geht davon aus, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulosefibrillen gelöst werden und die Fibrillen der pflanzlichen Zelle mittels des hohen Turgordruckes von etwa 10 MPa aneinander entlang gleiten und damit Zellwandstreckung ermöglichen (McQueen-Mason und Cosgrove, 1994). Ferner wird eine Hydrolyse an den die Zellulosefibrillen

verknüpfenden Hemizellulosen diskutiert (Cosgrove, 1997 b). Gegen diese Theorie spricht jedoch der Befund, das in Kürbissen weder eine Exo- noch eine Endoglucanaseaktivität nachzuweisen ist (McQueen-Mason et al., 1992). Auch im Apizymtest, bei dem u. a. synthetische Glucane als Substrate dienten, konnte beim Phl p 1 keine Glucanaseaktivität detektiert werden.

Li und Cosgrove (2001) aus der Arbeitsgruppe von Cosgrove haben keine proteolytische Aktivität gefunden. Allerdings fehlte dem Aktivierungspuffer in deren Experimenten das Reduktionsmittel DTT, was zur Aktivierung von z. B. Cathepsin B vorhanden sein muss. Außerdem waren in aufgereinigten Gräserpollenextrakten, in denen Gruppe I-Gräserpollenallergene in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt wurden, Proteinbanden im niedermolekularen Bereich sichtbar, die auf Degradation von Proteinen hindeuten. Dieses Ergebnis blieb jedoch unkommentiert.

Die Gruppe I-Gräserallergene besitzen nur eine schwache Homologie zu Hydrolasen aus Pilzen (etwa 30 %) (Cosgrove, 2000 b), die ihrerseits aber keine Zellwandstreckung *in vitro* bewirken können (Cosgrove, 1997 b). Die von Saloheimo et al. (1994) aus dem Pilz *Trichoderma reesei* isolierte und von Cosgrove (2000 b) für Sequenzvergleiche eingesetzte Endo-1,4-Beta-Glucanase V (EGV) besteht aus 242 Aminosäuren (Phl p 1 aus 263 AS). Abb. 29 zeigt die Proteinsequenz der EGV.

▼

```

1      MKATLVLGSL IVGAVSAYKA TTTRYDGQE GACCGCGSSSG AFPWQLGIGN GVYTAAGSQA
61     LFDTAGASWC GAGCGKCYQL TSTGQAPCSS CGTGGAAGQS IIVMVTNLCP NNGNAQWCPV
121    VGGTNQYGYS YHFDIMAQNE IFGDNVVVDF EPIACPGQAA SDWGTCLCVG QQETDPTFVL
181    GNDTGSTPPG SSPPATSSSP PSGGGQQTLY GQCGGAGWTG PTTCQAPGTC KVQNQWYSQC
241    LP
  
```

Abb. 29: Aminosäuresequenz der Endo-1,4-Beta-Glucanase V aus *Trichoderma reesei*. ▼ = Spaltstelle der Signalsequenz; **D** = an der Aktivität beteiligte Asp-Reste; **C** = Cys-Reste; **HFD** = von Cosgrove (2000 b) postulierte an der Aktivität beteiligte Aminosäuren.

Das Protein besitzt 16 Cysteinreste. Die Glykosylierungsstelle N-D-T liegt an den Positionen 182 bis 184 im Gegensatz zu Phl p 1 im C-terminalen Bereich. Zwischen den Aminosäuren 206 bis 242 liegt die im Phl p 1 fehlende Cellulose-bindende Domäne. Das HFD-Motiv ist bei den meisten Expansinen wie auch beim Phl p 1 vorhanden. Cosgrove (2000 b) vermutet in diesem Bereich die für die Hydrolasen typische katalytische Aktivität. Wie oben schon näher ausgeführt, ist der in diesem

Motiv vorhandene His-Rest bei Phl p 1 möglicherweise an der Bildung des aktiven Zentrums einer Cysteinproteaseaktivität beteiligt. Anhand der EGV-Sequenz ist deutlich zu sehen, dass die innerhalb der Phl p 1-Sequenz identifizierten für Cysteinproteasen typischen Konsensus-Motive fehlen. Der Vergleich von Phl p 1 zu der EGV lässt dementsprechend nicht auf eine Verwandtschaft des Allergens zu bekannten Hydrolasen schließen. Außerdem wurden bislang keinerlei experimentelle Beweise erbracht, dass die Expansine, respektive das Phl p 1, eine Hydrolasefunktion besitzen. Dementsprechend muss ein anderer Mechanismus für die Zellwandstreckung verantwortlich sein.

4.4.3 Vermutete Wirkungsweise von Phl p 1 als Protease

Grobe et al. (1999) konnten eine Proteaseaktivität des in *P. pastoris* rekombinant hergestelltem Phl p 1 mit einer Trypsin-ähnlichen Spaltspezifität nachweisen. Trypsin spaltet C-terminal von Arginin- und Lysinresten. Der Vergleich von Phl p 1 mit den bekanntesten Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin ergab keine Homologie, so dass eine Zuordnung zu dieser Enzymklasse nicht möglich war. Allerdings zeigen die Sequenzuntersuchungen in dieser Arbeit deutliche Übereinstimmungen in den Konsensusbereichen und dadurch eine ganz klare Zuordnung von Phl p 1 zu den Cysteinproteasen.

Bei den Zielstrukturen der Expansine handelt es sich um strukturgebende Proteinbestandteile der primären Zellwand. Dazu zählen die bei den höheren Pflanzen bekannten Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (HRGP), die sogenannten Extensine (Shcherban, 1995). Die entsprechenden homologen Moleküle bei den Gräsern sind die Threonine-Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (THRGP) (Kieliszewski und Lamport, 1987). Diese Moleküle sind die pflanzlichen Äquivalente zu den in Tieren vorhandenen Kollagenen (Rubinstein et al., 1995). Im natürlichen Phl p 1 konnte keine proteolytische Aktivität in den bislang eingesetzten Testsystemen detektiert werden. Anders als z. B. bei Cathepsin B ist dieses Molekül nicht autokatalytisch aktivierbar. Die inhibierende Prosequenz von Cathepsin B wird durch intermolekulare Prozesse autokatalytisch abgespalten, so dass das Molekül in seine aktive Form überführt wird (Rowan et al., 1992). Nach Expression in *Pichia*

pastoris und Inkubation unter sauren Bedingungen wird ebenfalls mittels Autokatalyse die Cathepsin B-Prosequenz entfernt und das rekombinante Enzym aktiviert (Mach et al., 1994). Diese Form der Aktivierung ist bei vielen weiteren Proteasen beschrieben worden, z. B. beim Caricain, bei dem eine α -helikale Domäne der Prosequenz den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum verhindert und erst nach Abspaltung der Sequenz proteolytisch aktiv ist (Groves et al., 1996).

Nachdem durch Mutation die Prosequenz des Phl p 1 (vrPhl p 1) entfernt worden war, konnte eine starke proteolytische Aktivität detektiert werden, die von dem Allergen ausging. Das zeigt die essentielle Bedeutung der inhibierenden Prosequenz. Da Phl p 1 nicht in der Lage ist, diese Prosequenz autokatalytisch abzuspalten, ist unter *in vivo*-Bedingungen vermutlich eine Phl p 1-aktivierende Protease vorhanden, die das Allergen prozessiert und in seine aktive Form überführt. Solch eine kaskadenartige Aktivierung ist sehr wahrscheinlich, da Phl p 1 an einem für die Pflanze sehr empfindlichen Prozess aktiv ist. Die Aktivität des Moleküls muss sehr fein reguliert werden, da eine unkontrollierte Wirkung an den stabilisierenden Komponenten der Pflanzenzellwand aufgrund des hohen Turgordruckes in der Zelle zu einer irreversiblen Schädigung führen würde. Als Beispiel einer kaskadenartigen Aktivierung wird die Prosequenz von Aleurain durch eine andere Cysteinprotease abgespalten und dadurch in seine aktive Form überführt (Vernet et al., 1991).

Eine weitere Familie strukturbildender Proteine repräsentieren die löslichen, Plasmamembran-assoziierten Arabinogalaktan-Proteine (AGPs). Über Serinreste sind sie an HRGPs gebunden. Auch diese Proteinkomponenten könnten mögliche Substrate für das Phl p 1 darstellen. Da allerdings noch keine näheren Daten bezüglich der Spaltspezifität vorhanden sind, lassen sich die genauen Zielstrukturen nur schwer determinieren. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass nPhl p 1 nach Aufreinigung aus Gräserpollenextrakt aufgrund einer Co-Aufreinigung scheinbar eine hohe Affinität zu Arabinogalaktan zu besitzen scheint (D. Wicklein, unveröffentlichte Ergebnisse). Dementsprechend gilt eine Assoziation von Phl p 1 zu den AGPs als sehr wahrscheinlich. Mittels Bindung an Arabinogalaktan und Rhamnogalaktan bilden die AGPs ein dichtes Netzwerk mit der Pektinmatrix der Zellwand. Durch die Vermittlung über Xyloglukane ist dieses Netzwerk an Zellulosemikrofibrillen angelagert (Carpita und Gibeaut, 1993). Andererseits können Extensine auch direkt an die Pektinmatrix binden (Qi et al., 1993). Untereinander sind

die Extensine über repetitive prolinreiche Proteine miteinander verbunden (Chen und Varner, 1985).

Pflanzliche Pollen besitzen eine hohe Konzentration an Hydroxyprolin. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass Pollen ebenfalls HRGPs besitzen. Zum einen können sie eine strukturelle Funktion bei der schnellen Zellelongation spielen. Auf der anderen Seite sind sie geeignete Strukturen bei der Interaktion des Pollenschlauches mit dem Narben- und Griffelgewebe. In Maispollen ist ein pollenspezifisches Gen (*pex1*) identifiziert worden, das für ein Protein mit Extensin-ähnlicher Domäne kodiert (Rubinstein et al., 1995). Innerhalb dieser Domäne liegt das Sequenzmotiv Ser-(Hyp)₄ in repetitiver Folge. Diese Sequenzmotive bilden aufgrund von Glykosylierungen eine dreidimensionale Struktur einer Polyprolin II Helix (Carpita, 1996). Aufgrund der repetitiven Abfolge von 20 bis 40 Wiederholungen solcher Sequenzmotive, die sich mit Tyr-Lys-Tyr (Wycoff et al., 1995), Val-Lys-Ser oder Pro-Lys-Ser (Rubinstein et al., 1995) abwechseln, erreichen die Extensine ein Molekulargewicht von 63 bis 180 kDa. Dabei entfallen etwa 75 % der Masse auf Kohlenhydrate. Zum größten Teil bestehen die Kohlenhydrate aus an Hydroxyprolinreste gebundene Arabinosyltri- und -tetrasacchariden, die die langgestreckte Struktur der Proteinerückrats stabilisieren (Carpita und Gibeaut, 1993). Interessanterweise konnte schon eine Trypsin-vermittelte Degradation von Extensin in 7 bis 11 Aminosäuren große Peptide gezeigt werden (Qi et al., 1993). Aufgrund der Trypsin-ähnlichen Spaltspezifität von Phl p 1 wäre es denkbar, dass das Allergen auf das Gewebe und im Speziellen von Extensin im Pollenschlauch für das Auswachsen des Schlauches einwirkt. Im Tabak konnte gezeigt werden, dass eine spezielle Form der Extensine im transduzierenden Gewebe des Stigmas vorhanden ist (Goldmann et al., 1992). Somit wird Phl p 1 als Pollen-spezifisches Protein sehr wahrscheinlich ebenfalls auf das Gewebe des Stigmas wirken und aufgrund seiner Funktion den Vortrieb des Pollenschlauches von der Narbe durch das Griffelgewebe zum Fruchtknoten gewährleisten können.

Um die Funktion der proteolytischen Aktivität der Expansine bzw. des Phl p 1 zu überprüfen, wurde das Wachstum von *Phleum pratense*-Pollenschläuchen *in vitro* untersucht. Es sollte dabei geklärt werden, ob proteolytisch aktive bzw. inaktive Phl p 1-Moleküle einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Pollenkeimung und auf

das Längenwachstum der Pollenschläuche besitzen. Dabei stellte sich heraus, dass der Anteil keimungsfähiger Pollen nur sehr gering (2 %) war. Das lässt darauf schließen, dass die im allgemeinen als Windbestäuber bekannten Gräser Pollen besitzen, die nur eine geringe Lebenserwartung besitzen. Das bedeutet, dass die Pollen sehr schnell inert werden, sofern nicht innerhalb von einem sehr engen Zeitraum die Keimung induziert wurde. Die verwendeten Medien waren für die Kultivierung von Tabakpollen optimiert worden. Zur Induzierung des Pollenschlauchwachstums der Gräserpollen könnten durchaus weitere Zusätze in den Lösungen essentiell sein. Es wäre denkbar, dass die Pollen erst dann eine optimale Keimungsrate erzielen, wenn sie in Verbindung mit dem weiblichen Griffelgewebe gebracht werden. So ist beim Tabak ein AGP für die Stimulierung und das gerichtete Wachstum des Pollenschlauches verantwortlich (Wu et al., 2000). Aufgrund der geringen Größe des Griffelgewebes bei den Gräsern war eine gezielte Präparation nicht möglich. Deswegen wurde mit der Maispflanze ein anderer Modellorganismus für das Pollenschlauchwachstum ausgewählt.

Das Gruppe I-Allergen des Mais, Zea m 1, dem nach Alignment ein ca. 50 Aminosäuren langes N-terminales Stück fehlt, ist zu 74 % homolog zu Phl p 1. Die Wichtigkeit der Prosequenz wurde in dieser Arbeit bereits erläutert. Durch die Detektion des N-terminal bindenden mAk HB 7 von isoliertem Zea m 1 aus Maispollen konnte nachgewiesen werden, dass dieser Anteil vorhanden war. Deshalb wurde aus einer Mais-cDNA-Bank die DNA-Sequenz des vollständigen zea m 1-Gens (zea m 1.1) isoliert und mittels des Programms Translator in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt (Zea m 1.1). Dabei stellte sich heraus, dass der N-Terminus des Allergens eine Homologie von 84 % zu der Phl p 1-Prosequenz besitzt. Insgesamt besteht eine Homologie zwischen der gesamten Phl p 1- und der Zea m 1.1-Sequenz von 63 %. Vor allem in den Konsensusbereichen, die das katalytische Zentrum bilden (1. Konsensusbereich GCGSC; 3. Konsensusbereich SWGA), sind die Homologien zwischen den Proteinen stark ausgeprägt. Es fällt dabei auf, dass keines der Gruppe I-Allergene (s. Abb. 26) die bei der Funktion von Papain essentielle Aminosäure Asn (N) 175 besitzt. Bei den Gruppe I-Allergenen gibt es einen konservierten Austausch an dieser Stelle gegen Glu, wobei diese Aminosäure eine geladene Seitenkette besitzt. Bei den Mais-Gruppe I-Allergenen ist der Asn-Rest an dieser Stelle gegen His (in Zea m 1.1) bzw. Leu (Zea m 1) ausgetauscht. Dieser Aminosäurerest kann demnach keinen

essentiellen Anteil an der Enzymaktivität haben. Die Zea m 1.1-Sequenz zeigt eine Glykosylierungsstelle (NIT). Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den Gruppe I-Gräserallergenen aufgrund der Glykosylierung um sekretorische Proteine (Rawlings und Barret, 1994).

Die Identifizierung der vollständigen Zea m 1.1-Sequenz bildete die Grundvoraussetzung, um vergleichende Pollenschlauch-Wachstumstests an Maispollen durchzuführen. Es sollte dabei proteolytisch aktives, rekombinantes Zea m 1.1 zusammen mit auskeimenden Pollenkörnern inkubiert und der Einfluss der proteolytischen Aktivität des Proteins auf das Wachstum der Pollenschläuche untersucht werden. Der Mais besitzt schwerere Pollen und einen sehr viel höheren Kohlenhydratanteil als Lieschgraspollen. Dementsprechend wurden die Maispollen in einem stärker kohlenhydrathaltigen Medium inkubiert. Im Gegensatz zu den Lieschgraspollen bildeten bis zu 70 % der frischen und bis zwei Tage alten Maispollen Pollenschläuche aus. Die Mobilisierung der Nährstoffe und das Auswachsen des Schlauches begann innerhalb der ersten 30 min und konnte unter einem Mikroskop beobachtet werden. Allerdings stellte ein Problem der Kultivierung der Pollen die Blütezeit der Gräser und demnach auch des Mais von etwa vier Wochen dar. Nur innerhalb dieses zeitlich sehr begrenzten Zeitraumes konnten Untersuchungen durchgeführt werden, da die Pollen nach Lagerung über einen Zeitraum von mehr als zwei Tagen ihre Keimungsfähigkeit verloren hatten. Ebenso keimten die Pollen nicht mehr aus, wenn sie über mehr als zwei Tage unter 4 °C aufbewahrt wurden.

Um die Funktion des Phl p 1 im keimenden Pollenkorn näher zu beleuchten, sollten im weiteren Verlauf proteolytisch aktive und inaktive Phl p 1-Moleküle zusammen mit den Pollen inkubiert und die wachsenden Pollenschläuche histologisch untersucht werden. Dadurch würde der Wirkort des Allergens und dessen Funktion bei den Wachstumsvorgängen im Pollenkorn geklärt werden können.

4.5 Möglicher Einfluss von Phl p 1 auf den Pathomechanismus der Allergie

Im Allgemeinen sind Pollenkörner wasserarm. Nachdem sie in ein feuchtes Milieu gelangt sind, ist deren Membran für etwa 15 min permeabel. Dadurch gelangen Substanzen wie z. B. Proteine in die Umgebung des Pollens (U. Kristen, persönliche

Mitteilung). Demnach wird nach dem Auftreffen der Lieschgraspollen auf die Mundschleimhäute und die bronchialen Epithelien aufgrund des feuchten Milieus u. a. Phl p 1 freigesetzt. Es ist in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt worden, dass das Allergen einen N-terminalen Bereich besitzt, der möglicherweise die inhibierende Funktion einer Prosequenz besitzt. Erst nachdem dieser Bereich molekularbiologisch entfernt wurde, konnte ein proteolytisch aktives Phl p 1 detektiert werden. Für die Situation *in vivo* bedeutet das, dass im Gräserpollen ein spezifischer oder an den Schleimhautepithelien ein unspezifischer Faktor vorhanden sein muss, der die Prosequenz des Phl p 1 abspaltet und dadurch in seine aktive Form überführt. Aufgrund der damit generierten Proteaseeigenschaft wird analog zum Der p 1 angenommen, dass aktives Phl p 1 zu einer Störung der Integrität von Zellmembranen führen könnte (Abb. 30).

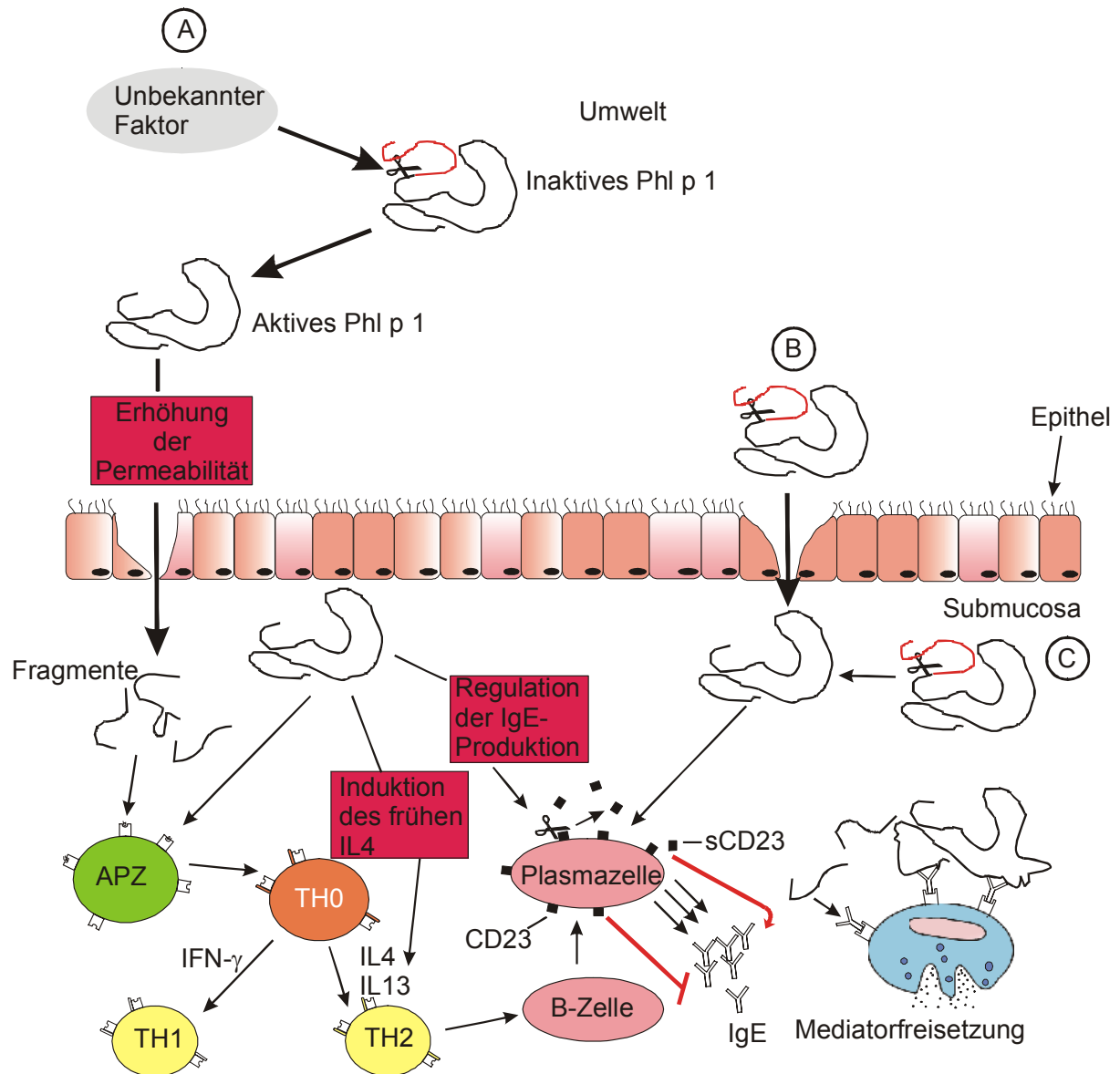


Abb. 30: Möglicher Einfluss des Phl p 1 auf den Pathomechanismus der Typ I-Allergie (modifiziert nach Petersen et al., 1999 b).

Ein bislang unbekannter Faktor (A in Abb. 30) z. B. eine in dem Gräserpollen bzw. auf den Schleimhäuten (B in Abb. 30) vorhandene Protease könnte die Prosequenz des Phl p 1 abspalten, so dass die proteolytische Aktivität des Phl p 1 die Epithelzellen schädigen (Herbert et al., 1995; Wan et al., 2000) und somit den Durchtritt für sich und andere Allergene in den Organismus fördern. Wenn das intakte Phl p 1 die Barriere der Epithelzellen überwindet, wäre es möglich, dass eine endogene Protease (C in Abb. 30) die Prosequenz des Allergens abtrennt und dadurch das Phl p 1 aktiviert. Das aktive Allergen kann die IL4-Induktion anregen

und dadurch das Gleichgewicht in Richtung der TH2-Zellen verschieben (Dudler et al., 1995). Die Proliferation von IFN- γ produzierenden Zellen wird analog zum Der p 1 durch die Abspaltung des IL2-Rezeptors von der T-Zell-Oberfläche verringert (Schulz et al., 1998 b). Eine mögliche Spaltung vom niedrigaffinen IgE-Rezeptor CD23 auf B-Lymphozyten, wie es an Hand von Der p 1 gezeigt wurde, führt als negatives Feedbacksignal zu einer Erhöhung von löslichem IgE (Hewitt et al., 1995; Schulz et al., 1995) und mündet schließlich in einer verstärkten Immunantwort auf in den Organismus gelangte Allergene. Die Bindung von löslichem sCD23 an CD21 steigert die IgE-Synthese noch weiter (Aubry et al., 1992). So könnte die Proteaseaktivität des Phl p 1 auf drei Ebenen für die Induktion der Allergie sorgen. Ob dieser Mechanismus tatsächlich auch *in vivo* und nicht nur *in vitro* nachweisbar ist, muss erst noch überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Das Majorallergen aus dem Wiesenlieschgras *Phleum pratense*, Phl p 1, sollte als Repräsentant der Gruppe I-Gräserallergene in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner Struktur und Funktion näher charakterisiert werden. Nach Klonierung des Allergens in das eukaryotische Expressionssystem der Hefe *Pichia pastoris* und nachfolgender Expression wurde ein instabiles Protein mit Proteaseaktivität erhalten. Dabei konnte eine Ähnlichkeit mit Cysteinproteasen gefunden werden. Ziel dieser Arbeit war es, das rekombinante Phl p 1 (rPhl p 1) zu isolieren und anschließend strukturelle und enzymatische Untersuchungen durchzuführen.

Die Expression des Gesamtproteins erbrachte zwei Moleküle mit unterschiedlichen Massen (30 und 45 kDa), die von der Masse des natürlichen Allergens (zwei Isoformen mit 35 und 37 kDa) abwichen. Die Massendifferenz der rekombinanten Moleküle lag höchstwahrscheinlich an einer Hyperglykosylierung des 45 kDa-Proteins, da die N-Termini beider Moleküle mit dem des natürlichen Allergens übereinstimmten und das 45 kDa-Protein in einem SDS-PAGE-Gel im Gegensatz zu dem 30 kDa-Protein als eine diffuse Bande zu erkennen war.

In enzymatischen Untersuchungen konnte auch nach Optimierung der Zymogramm-Technik weder bei den isolierten rekombinanten Molekülen noch bei dem natürlichen Allergen eine Proteaseaktivität gefunden werden. Allerdings wurde eine von der Hefe exprimierte Serinprotease im rPhl p 1-depletierten Kulturüberstand detektiert. Nach einer genaueren Untersuchung mittels Alignment-Programmen war zum einen die Verwandtschaft des Allergens zu den C1-Cysteinproteasen mit Papain als ihrem am besten untersuchten Vertreter untermauert und zum anderen eine inhibierende Prosequenz innerhalb des N-Terminus identifiziert worden. Durch die molekularbiologische Abspaltung dieser Prosequenz wurde ein um 47 Aminosäuren verkürztes Molekül (vrPhl p 1) hergestellt, das aus dem Hefeexpressionsüberstand affinitätschromatographisch zu reinigen war. Das war eine wesentliche Voraussetzung zur näheren Charakterisierung der Substratspezifität des isolierten vrPhl p 1. Als einziger Nachweis des vrPhl p 1 diente das Chromatogramm während der affinitätschromatographischen Reinigung, da die Protease sehr instabil ist und sich selber degradieren kann. Trotz Elution unter basischen Bedingungen und Zugabe eines Inhibitorgemisches konnte das Protein im Anschluss nur noch in Protease-Assays in einem sauren Puffersystem detektiert werden. Ein besonders

geeignetes Substrat für die Spaltung durch vrPhl p 1 war das Casein aus dem Milchpulver. Ferner wurde sicher festgestellt, dass die Protease an Argininresten spaltet, wobei auf der anderen Seite nicht ganz geklärt werden konnte, ob Substrate auch noch an anderen Aminosäuren hydrolysiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nPhl p 1 von vrPhl p 1 degradiert wird, während die aus der Hefe sekretierte Protease dazu nicht in der Lage war.

Damit könnte das Phl p 1 *in vivo* nach Aktivierung wegen der proteolytischen Funktion eine zentrale Rolle bei dem Pollenschlauchwachstum spielen. Die Zielstrukturen wären die Extensine als Gerüstproteine der Zellwand. Aufgrund der Proteaseaktivität des Phl p 1 ist es denkbar, dass die Struktur der Extensine gelöst wird, die pflanzliche Zellwand sich aufgrund des inneren Turgordruckes ausdehnt und dadurch an Volumen zunimmt.

Die proteolytische Aktivität von Phl p 1 könnte zudem einen Einfluss auf den Pathomechanismus der Allergie besitzen, wie es an Hand des Majorallergens der Hausstaubmilbe (Der p 1), die als Cysteinprotease klassifiziert wurde, schon erforscht werden konnte.

6. Ausblick

Mit Hilfe des Expressionssystems der Hefe *Pichia pastoris* konnte das Hauptallergen aus dem Lieschgras, *Phleum pratense*, rekombinant dargestellt und affinitätschromatographisch aufgereinigt werden.

Für weitere Untersuchungen muss eine höhere Ausbeute von rekombinantem Protein erreicht werden. Hierfür eignet sich die Fermentation, die bei sehr hoher Zelldichte die Produktion von höheren Konzentrationen an rekombinanten Proteinen erlaubt. Zu dem könnte der Nachteil der Hyperglykosylierung der Hefe durch den Einsatz des Baculovirus-Expressionssystems umgangen und durch eine Optimierung dieses Systems eine höhere Ausbeute an rekombinantem Protein erhalten werden.

Es ist klar gezeigt worden, dass das Phl p 1 nach Abspaltung der Prosequenz (vrPhl p 1) eine hohe proteolytische Aktivität besitzt, die jedoch eine exakte Charakterisierung nicht erlaubt. Um die Protease näher zu klassifizieren, müsste sie zunächst stabil exprimiert und anschließend weitere Inhibitionsstudien durchgeführt werden. Zusätzlich könnte die Spezifität anhand von synthetischen Substraten eingegrenzt werden. Für ein besseres Verständnis der an der Aktivität beteiligten Aminosäuren sind bereits Mutageneseexperimente und weiterführende Untersuchungen in der Vorbereitung. Die Mutation des Cysteinrestes innerhalb der ersten an der Aktivität beteiligten Domäne des vrPhl p 1 könnte große strukturelle Veränderungen bewirken, die nicht unbedingt auf die Cysteinproteasefunktion zurückzuführen wären. Die dritte Konsensussequenz scheint sehr variabel und somit kein geeignetes Ziel zu sein. Für die Aktivität einer Cysteinprotease ist der Histidinrest von essentieller Bedeutung. Innerhalb der Phl p 1-Sequenz ist bislang aber unbekannt, welcher von drei möglichen His-Resten für die Beteiligung am aktiven Zentrum in Frage kommt. Es sollen die Proteine, bei denen bereits die His-Reste gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurden, hinsichtlich der Struktur und Funktion weiter untersucht werden. Dabei wird eines der drei entstandenen Moleküle proteolytisch inaktiv sein und dennoch eine dem natürlichen Phl p 1 vergleichbare dreidimensionale Struktur besitzen.

Es müsste weiterhin die Relevanz des aktiven Phl p 1 für das Wachstum des Pollenschlauches geklärt werden. Durch die eindeutige Identifizierung von proteolytischer Aktivität während der Keimung des Pollenkorns kann ein

entscheidender Mechanismus bei Wachstumsvorgängen von Pflanzen entschlüsselt werden.

Wie bereits angedeutet muss der Einfluss eines proteolytisch aktiven Phl p 1 auf den Pathomechanismus der Allergie mit Hilfe von Zellkulturen gezeigt werden. Weiterhin müsste in einem Tiermodell überprüft werden, ob das aktive Phl p 1 tatsächlich aufgrund seiner Aktivität in den Organismus gelangt und in seiner aktiven Form die T-Lymphozyten und die Plasmazellen erreicht, um dadurch maßgeblichen Einfluss bei der Sensibilisierung zu haben.

7. Literaturverzeichnis

Aberg, N. (1993). Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. *Clin. Exp. Allergy* 23: 829-834.

Akdis, C. A., T. Blesken, D. Wymann, M. Akdis, and K. Blaser. (1998). Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants. *Eur. J. Immunol.* 28: 914-925.

Akdis, C. A. and K. Blaser. (2000). Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121: 261-269.

Alm, J. S., J. Swartz, G. Lilja, A. Scheynius, and G. Pershagen. (1999). Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 353: 1485-1488.

Armitage, R. J., B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and W. C. Fanslow. (1993). Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.* 150: 3671-3680.

Asero, R., G. Mistrello, D. Roncarolo, S. C. de Vries, M. F. Gautier, C. L. Ciurana, E. Verbeek, T. Mohammadi, V. Knul-Brettlova, J. H. Akkerdaas, I. Bulder, R. C. Aalberse, and R. van Ree. (2000). Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122: 20-32.

Aubry, J. P., S. Pochon, P. Graber, K. U. Jansen, and J. Y. Bonnefoy. (1992). CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 358: 505-507.

Bagarozzi, D. A., Jr., R. Pike, J. Potempa, and J. Travis. (1996). Purification and characterization of a novel endopeptidase in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Biol. Chem.* 271: 26227-26232.

Barber, D., R. Sanchez-Monge, L. Gomez, J. Carpizo, A. Armentia, C. Lopez-Otin, F. Juan, and G. Salcedo. (1989). A barley flour inhibitor of insect alpha-amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Lett.* 248: 119-122.

- Batanero, E., M. Villalba, and R. Rodriguez. (1994).** Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* 31: 31-37.
- Becker, D. M. and L. Guarente. (1991).** High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194: 182-187.
- Bendelac, A. and R. H. Schwartz. (1991).** Th0 cells in the thymus: the question of T-helper lineages. *Immunol. Rev.* 123: 169-188.
- Berti, P. J. and A. C. Storer. (1995).** Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 246: 273-283.
- Bhalla, P. L., I. Swoboda, and M. B. Singh. (2001).** Reduction in allergenicity of grass pollen by genetic engineering. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124: 51-54.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, and P. J. Barr. (1984).** Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4642-4646.
- Brierley, R. A., Davis, G. R., and Holtz, G. C. (1994).** Production of Insulin-Like Growth Factor-1 in Methylophilic Yeast Cells. United States Patent 5 (324), 639.
- Broadwater, A. H., A. L. Rubinstein, C. H. Chay, D. G. Klapper, and P. A. Bedinger. (1993).** Zea m1, the maize homolog of the allergen-encoding Lol p1 gene of rye grass. *Gene* 131: 227-230.
- Bromme, D., P. R. Bonneau, E. Purisima, P. Lachance, S. Hajnik, D. Y. Thomas, and A. C. Storer. (1996).** Contribution to activity of histidine-aromatic, amide-aromatic, and aromatic-aromatic interactions in the extended catalytic site of cysteine proteinases. *Biochemistry* 35: 3970-3979.

- Bufe, A. (1998).** The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117: 215-219.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short. (1987).** XL1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain. *Biotechniques* 5: 376-379.
- Burks, A. W., D. Shin, G. Cockrell, J. S. Stanley, R. M. Helm, and G. A. Bannon. (1997).** Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.* 245: 334-339.
- Cardaba, B., R. De Pablo, C. Vilches, E. Martin, C. Geller-Bernstein, B. De Andres, Y. Zaharan, P. Del, V, S. Gallardo, C. E. De Arruda, Y. Waisel, P. Palomino, M. Kreisler, and C. Lahoz. (1996).** Allergy to olive pollen: T-cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens. *Clin. Exp. Allergy* 26: 316-322.
- Carpita, N. and D. M. Gibeaut. (1993).** Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure with the Physical Properties of the Wall During Growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Carpita, N. (1996).** Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 445-476.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg. (2000).** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45-66.
- Chambers, L., A. Brown, D. I. Pritchard, S. Sreedharan, K. Brocklehurst, and N. A. Kalsheker. (1998).** Enzymatically active papain preferentially induces an allergic response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 837-840.
- Chan, S. J., B. San Segundo, M. B. McCormick, and D. F. Steiner. (1986).** Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7721-7725.
- Chand, N. and P. Eyre. (1975).** Classification and biological distribution of histamine receptor sub- types. *Agents Actions* 5: 277-295.

- Chapman, M. D. and R. A. Wood. (2001).** The role and remediation of animal allergens in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 414-421.
- Charpin, D., L. Pascal, J. Birnbaum, A. Armengaud, R. Sambuc, A. Lanteaume, and D. Vervloet. (1999).** Gaseous air pollution and atopy. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1474-1480.
- Chen, J. and J. E. Varner. (1985).** Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33 kDa protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4399-4403.
- Chen, K. S., K. H. Miller, and D. Hengehold. (1996).** Diminution of T cells with gamma delta receptor in the peripheral blood of allergic asthmatic individuals. *Clin. Exp. Allergy* 26: 295-302.
- Chen, Y., C. Plouffe, R. Menard, and A. C. Storer. (1996).** Delineating functionally important regions and residues in the cathepsin B propeptide for inhibitory activity. *FEBS Lett.* 393: 24-26.
- Choe und Choi, 1998, J. and Y. S. Choi. (1998).** IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 508-515.
- Chow, L. P., N. Y. Su, C. J. Yu, B. L. Chiang, and H. D. Shen. (1999).** Identification and expression of Pen c 2, a novel allergen from *Penicillium citrinum*. *Biochem. J.* 341 (Pt 1): 51-59.
- Chow, L. P., S. H. Chiou, M. C. Hsiao, C. J. Yu, and B. L. Chiang. (2000).** Characterization of Pen n 13, a major allergen from the mold *Penicillium notatum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 14-20.
- Chua, K. Y., G. A. Stewart, W. R. Thomas, R. J. Simpson, R. J. Dilworth, T. M. Plozza, and K. J. Turner. (1988).** Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med.* 167: 175-182.

Clare J.J., F. B. Rayment, S. P. Ballantine, K. Sreekrishna, and Romanos M.A. (1991a). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N.Y.)* 9: 455-460.

Clare, J. J., M. A. Romanos, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, M. A. Smith, M. M. Payne, K. Sreekrishna, and C. A. Henwood. (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205-212.

Cohen, L. W., V. M. Coghlan, and L. C. Dihel. (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene* 48: 219-227.

Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402: 5-11.

Cosgrove, D. J. (1997 a). Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5504-5505.

Cosgrove, D. J. (1997 b). Relaxation in a High-Stress Environment: The Molecular Bases for Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.

Cosgrove, D. J., P. Bedinger, and D. M. Durachko. (1997 c). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6559-6564.

Cosgrove, D. J. (2000 a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109-124.

Cosgrove, D. J. (2000 b). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.

Cottam, G. P., D. M. Moran, and R. Standring. (1986). Physicochemical and immunochemical characterization of allergenic proteins from rye-grass (*Lolium perenne*) pollen prepared by a rapid and efficient purification method. *Biochem. J.* 234: 305-310.

Coyle, A. J., C. Bertrand, S. Tsuyuki, H. Pircher, S. Walti, G. Le Gros, and F. Erard. (1996 a). IL-4 differentiates naive CD8⁺ T cells to a "Th2-like" phenotype: a link between viral infections and bronchial asthma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 796: 97-103.

Coyle, A. J., K. Wagner, C. Bertrand, S. Tsuyuki, J. Bews, and C. Heusser. (1996 b). Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J. Exp. Med.* 183: 1303-1310.

Cregg, J. M., T. S. Vedvick, and W. C. Raschke. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N.Y.)* 11: 905-910.

D'Aquila, R. T., L. J. Bechtel, J. A. Videler, J. J. Eron, P. Gorczyca, and J. C. Kaplan. (1991). Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.* 19: 3749.

Dahl S.W., Halkier T., Lauritzen C., I. Dolenc, Pedersen J., Turk V., and Turk B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40: 1671-1678.

Daul, C. B., M. Slattery, G. Reese, and S. B. Lehrer. (1994). Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 49-55.

Dudler, T., D. C. Machado, L. Kolbe, R. R. Annand, N. Rhodes, M. H. Gelb, K. Koelsch, M. Suter, and B. A. Helm. (1995). A link between catalytic activity, IgE-independent mast cell activation, and allergenicity of bee venom phospholipase A2. *J. Immunol.* 155: 2605-2613.

Evans, M. D. and W. A. Pryor. (1994). Cigarette smoking, emphysema, and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. *Am. J. Physiol.* 266: 593-611.

Fahlbusch, B., W. D. Muller, C. H. Diener, and L. Jager. (1993). Detection of crossreactive determinants in grass pollen extracts using monoclonal antibodies against group IV and group V allergens. *Clin. Exp. Allergy* 23: 51-60.

Focke, M., V. Mahler, T. Ball, W. R. Sperr, Y. Majlesi, P. Valent, D. Kraft, and R. Valenta. (2001). Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J.* 15: 2042-2044.

Fox, T., E. de Miguel, J. S. Mort, and A. C. Storer. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31: 12571-12576.

Freidhoff, L. R., E. Ehrlich-Kautzky, J. H. Grant, D. A. Meyers, and D. G. Marsh. (1986). A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 1190-1201.

Gibbon, B. C., D. R. Kovar, and Staiger C.J. (1999). Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11: 2349-2363.

Godbole S., Decker S.R., Nieves R.A., Adney W.S., Vinzant T.B., Baker J.O., Thomas S.R., and Himmel M.E. (1999). Cloning and expression of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 15: 828-833.

Goldman M.H., Pezzotti M., Seurinck J., and Mariani C. (1992). Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell* 4: 1041-1051.

Gough, L., O. Schulz, H. F. Sewell, and F. Shakib. (1999). The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J. Exp. Med.* 190: 1897-1902.

Grobe, K., W. M. Becker, M. Schlaak, and A. Petersen. (1999). Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur. J. Biochem.* 263: 33-40.

Grobe, K., M. Poppelmann, W. M. Becker, and A. Petersen. (2002). Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur. J. Biochem.* 269: 2083-2092.

Groves, M. R., M. A. Taylor, M. Scott, N. J. Cummings, R. W. Pickersgill, and J. A. Jenkins. (1996). The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure* 4: 1193-1203.

Hancock, K. and V. C. W. Tsang. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133: 157-162.

Herbert C.A., King C.M., Ring P.C., Holgate S.T., G. A. Stewart, P. J. Thompson, and Robinson C. (1995). Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12: 369-378.

Heukeshoven, J. and R. Dernick. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.

Hewitt, C. R., A. P. Brown, B. J. Hart, and D. I. Pritchard. (1995). A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med.* 182: 1537-1544.

Higgins, D.R. and J. M. Cregg (1998 a). *Pichia* protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey: pp. 1-284.

Higgins, D. R. and J. M. Cregg. (1998 b). Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol. Biol.* 103: 1-15.

Hochreiter, R., A. Hartl, J. Freund, R. Valenta, F. Ferreira, and J. Thalhamer. (2001). The influence of CpG motifs on a protein or DNA-based Th2-type immune response against major pollen allergens Bet v 1a, Phl p 2 and *Escherichia coli*-derived beta-galactosidase. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124: 406-410.

Holgate, S. T., M. K. Church, P. H. Howarth, E. N. Morton, A. J. Frew, and R. Djukanovic. (1995). Genetic and environmental influences on airway inflammation in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 29-33.

Holgate, S. T., M. K. Church, and A. Kapp. (1996). *Allergologie*. Ullstein Mosby, Wiesbaden, Deutschland: pp. 1-326.

Howarth, P. H. (1998). Is allergy increasing?--early life influences. *Clin. Exp. Allergy* 28 Suppl 6: 2-7.

Huecas, S., M. Villalba, E. Gonzalez, A. Martinez-Ruiz, and R. Rodriguez. (1999). Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 261: 539-546.

Huecas, S., M. Villalba, and R. Rodriguez. (2001). Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* 276: 27959-27966.

Ichikawa, K., L. D. Vailes, A. Pomes, and M. D. Chapman. (2001). Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1279-1286.

James M.N. and Sielecki A.R. (1986). Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 319: 33-38.

Janeway, C. A. and P. Travers. (1995). Immunreaktionen in Abwesenheit einer Infektion. In *Immunologie*. P. Travers, ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland: pp. 492-493.

Jarvis, D. and P. Burney. (1997). Epidemiology of atopy and atopic disease. In *Allergy and allergic diseases*. A. B. Kay, ed.: pp. 1208-1224.

Jeannin, P., Y. Delneste, P. Life, J. F. Gauchat, D. Kaiserlian, and J. Y. Bonnefoy. (1995). Interleukin-12 increases interleukin-4 production by established human Th0 and Th2-like T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 25: 2247-2252.

Jung, G., H. Ueno, and R. Hayashi. (1999). Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. *J. Biochem. (Tokyo)* 126: 1-6.

Kagey-Sobotka, A., D. W. MacGlashan, and L. M. Lichtenstein. (1982). Role of receptor aggregation in triggering IgE-mediated reactions. *Fed. Proc.* 41: 12-16.

Kaino, S., T. Furui, S. Hatano, M. Kaino, K. Okita, and K. Nakamura. (1998). Two-dimensional zymography for analysis of proteolytic enzymes in human pure pancreatic juice. *Electrophoresis* 19: 782-787.

Kamphuis, I. G., J. Drenth, and E. N. Baker. (1985). Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.* 182: 317-329.

- Kapsenberg, M. L., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and P. Kalinski. (1999).** The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin. Exp. Allergy* 29 Suppl 2: 33-36.
- Karrer, K. M., S. L. Peiffer, and M. E. DiTomas. (1993).** Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3063-3067.
- Kauffman, H. F., J. F. Tomee, M. A. van de Riet, A. J. Timmerman, and P. Borger. (2000).** Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 1185-1193.
- Khan A.R., Khazanovich-Bernstein N., Bergmann E.M., and James M.N. (1999).** Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10968-10975.
- Kieliszewski M. and Lamport D.T.A. (1987).** Purification and partial characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in a graminaceous monocot, *Zea mays*. *Plant Physiol.* 85: 823-827.
- King, T. P., D. Hoffman, H. Lowenstein, D. G. Marsh, T. A. Platts-Mills, and W. Thomas. (1994).** Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 224-233.
- Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, and A. M. Krieg. (1998).** Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 160: 2555-2559.
- Knox, R. B., C. Suphioglu, P. Taylor, R. Desai, H. C. Watson, J. L. Peng, and L. A. Bursill. (1997).** Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin. Exp. Allergy* 27: 246-251.
- Kristen, U. and R. Kappler. (1995).** The pollen tube growth test. *Methods Mol. Biol.* 43: 189-198.

Kwon, S. S., N. Kim, and T. J. Yoo. (2001). The effect of vaccination with DNA encoding murine T-cell epitopes on the Der p 1 and 2 induced immunoglobulin E synthesis. *Allergy* 56: 741-748.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.

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

Laffer, S., M. Duchene, I. Reimitzer, M. Susani, C. Mannhalter, D. Kraft, and R. Valenta. (1996). Common IgE-epitopes of recombinant Phl p I, the major timothy grass pollen allergen and natural group I grass pollen isoallergens. *Mol. Immunol.* 33: 417-426.

Leary, J. J., D. J. Brigati, and D. C. Ward. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4045-4049.

Leber, T. M. and F. R. Balkwill. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.* 249: 24-28.

Letourneur O., Gervasi G., Gaia S., Pages J., Watelet B., and Jolivet M. (2001). Characterization of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) secreted from *Pichia pastoris*: evidence of hyper O-glycosylation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33: 35-45.

Leung, P. S., K. H. Chu, W. K. Chow, A. Ansari, C. I. Bandea, H. S. Kwan, S. M. Nagy, and M. E. Gershwin. (1994). Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 882-890.

Leung, P. S., Y. C. Chen, D. L. Mykles, W. K. Chow, C. P. Li, and K. H. Chu. (1998). Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 12-20.

- Li, L. C. and D. J. Cosgrove. (2001).** Grass group I pollen allergens (beta-expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 268: 4217-4226.
- Lin, Z. W., A. K. Ekramoddoullah, F. T. Kisil, J. Hebert, and W. Mourad. (1988).** Isolation and characterization of Poa p I allergens of Kentucky bluegrass pollen with a murine monoclonal anti-Lol p I antibody. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 87: 294-300.
- Lopez, N., S. Barros-Mazon, M. M. Vilela, C. M. Silva, and J. D. Ribeiro. (1999).** Genetic and environmental influences on atopic immune response in early life. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 9: 392-398.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, and E. J. Mathur. (1991).** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6.
- Ma, L., X. Xu, S. Cui, and D. Sun. (1999).** The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11: 1351-1364.
- Mach, L., J. S. Mort, and J. Glossl. (1994).** Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J. Biol. Chem.* 269: 13030-13035.
- Maggi, E. (1998).** The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology.* 3: 233-244.
- Maleki, S. J., R. A. Kopper, D. S. Shin, C. W. Park, C. M. Compadre, H. Sampson, A. W. Burks, and G. A. Bannon. (2000).** Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.* 164: 5844-5849.
- Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani. (1993).** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177: 1199-1204.

- Manetti, R., F. Gerosa, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, P. Parronchi, M. P. Piccinni, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, G. Trinchieri, and . (1994).** Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.* 179: 1273-1283.
- Margolis, H. C., Y. Nakagawa, K. T. Douglas, and E. T. Kaiser. (1978).** Multiple forms of carboxypeptidase Y from *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetic demonstration of effects of carbohydrate residues on the catalytic mechanism of a glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* 253: 7891-7897.
- Martinez, F. D. (1997).** Complexities of the genetics of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 117-122.
- Maruo, K., T. Akaike, T. Ono, T. Okamoto, and H. Maeda. (1997).** Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 253-260.
- Massey, W. A. (1993).** Pathogenesis and pharmacologic modulation of the cutaneous late-phase reaction. *Ann. Allergy* 71: 578-584.
- Matheson, N. R. and J. Travis. (1998).** Purification and characterization of a novel peptidase (Ilmes) from mesquite (*Prosopis velutina*) pollen. *J. Biol. Chem.* 273: 16771-16777.
- Matsudaira, P. (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.
- Matsuoka, H., H. Uno, K. Kawano, K. Tsuda, and H. Tsubouchi. (1996).** MHC class II restriction for T cell proliferative response to mite antigen. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 77: 191-196.
- Matthiesen, F., M. J. Schumacher, and H. Lowenstein. (1991).** Characterization of the major allergen of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen, Cyn d I. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88: 763-774.
- McQueen-Mason S., Durachko D.M., and Cosgrove D.J. (1992).** Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.

McQueen-Mason, S. J. and D. J. Cosgrove. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6574-6578.

McQueen-Mason, S. J. and D. J. Cosgrove. (1995). Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107: 87-100.

Menard, R., J. Carriere, P. Laflamme, C. Plouffe, H. E. Khouri, T. Vernet, D. C. Tessier, D. Y. Thomas, and A. C. Storer. (1991 a). Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* 30: 8924-8928.

Menard, R., C. Plouffe, H. E. Khouri, R. Dupras, D. C. Tessier, T. Vernet, D. Y. Thomas, and A. C. Storer. (1991 b). Removal of an inter-domain hydrogen bond through site-directed mutagenesis: role of serine 176 in the mechanism of papain. *Protein Eng.* 4: 307-311.

Metzger, H., A. Goetze, J. Kanellopoulos, D. Holowka, and C. Fewtrell. (1982). Structure of the high-affinity mast cell receptor for IgE. *Fed. Proc.* 41: 8-11.

Miele, R. G., R. K. Bretthauer, and F. J. Castellino. (1997). Characterization of the glycoforms of recombinant proteins expressed in *Pichia pastoris*. In *Current topics in gene expression systems*. San Diego, CA, USA.

Morel, P. A. and T. B. Oriss. (1998). Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit. Rev. Immunol.* 18: 275-303.

Mori, A., M. Suko, N. Tsuruoka, O. Kaminuma, T. Ohmura, Y. Nishizaki, K. Ito, and H. Okudaira. (1995). Allergen-specific human T cell clones produce interleukin-5 upon stimulation with the Th1 cytokine interleukin-2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 220-222.

Nakamura, T., R. K. Lee, S. Y. Nam, E. R. Podack, K. Bottomly, and R. A. Flavell. (1997). Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J. Immunol.* 158: 2648-2653.

Ohi, H., W. Ohtani, N. Okazaki, N. Furuhashi, and T. Ohmura. (1996). Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* PRC1 gene encoding carboxypeptidase Y. *Yeast* 12: 31-40.

Ohnishi, T., H. Kita, D. Weiler, S. Sur, J. B. Sedgwick, W. J. Calhoun, W. W. Busse, J. S. Abrams, and G. J. Gleich. (1993). IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 901-907.

Perler, F. B., M.-Q. Xu, and H. Paulus. (1997). Protein splicing and autoproteolysis mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 292-299.

Petersen, A., W. M. Becker, Moll H., Blumke M., and Schlaak M. (1995 a). Studies on the carbohydrate moieties of the timothy grass pollen allergen Phl p I. *Electrophoresis* 16: 869-875.

Petersen, A., G. Schramm, A. Bufe, M. Schlaak, and W. M. Becker. (1995 b). Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary DNA and protein level. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95: 987-994.

Petersen, A., K. Grobe, G. Schramm, S. Vieths, F. Altmann, M. Schlaak, and W. M. Becker. (1999 a). Implications of the grass group I allergens on the sensitization and provocation process. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 411-413.

Petersen, A., K. Grobe, G. Schramm, K. Gehlhar, S. Vieths, F. Altmann, M. Schlaak, W.-M. Becker. (1999 b). Structure and function can determine important features in allergenicity: Investigations on the group I allergens of the grasses. Internet Symposium on Food Allergens 1: 95-101

Pike, R. N., D. J. Bagarozzi, and J. Travis. (1997). Immunological cross-reactivity of the major allergen from perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Lol p I, and the cysteine proteinase, bromelain. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112: 412-414.

Poppelmann, M., W. M. Becker, and A. Petersen. (2002). Combination of zymography and immunodetection to analyze proteins in complex culture supernatants. *Electrophoresis* 23: 993-997

- Portaro, F. C., A. B. Santos, M. H. Cezari, M. A. Juliano, L. Juliano, and E. Carmona. (2000).** Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. *Biochem. J.* 347 Pt 1: 123-129.
- Pratap, J., G. Rajamohan, and K. L. Dikshit. (2000).** Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 469-475.
- Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzaheh, T. Van Dyke, and J. Banchereau. (2001).** Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 167: 5067-5076.
- Qi, X., B. X. Behrens, P. R. West, and A. J. Mort. (1995).** Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiol.* 108: 1691-1701.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett. (1994).** Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:461-86: 461-486.
- Riffo-Vasquez, Y., D. Spina, M. Thomas, T. Gilbey, D. M. Kemeny, and C. P. Page. (2000).** The role of CD23 on allergen-induced IgE levels, pulmonary eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in mice. *Clin. Exp. Allergy* 30: 728-738.
- Ritonja, A., A. D. Rowan, D. J. Buttle, N. D. Rawlings, V. Turk, and A. J. Barrett. (1989).** Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* 247: 419-424.
- Robinson, B. W., T. J. Venaille, A. H. Mendis, and R. McAleer. (1990).** Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86: 726-731.
- Romagnani, S. (1998).** The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. *Allergy* 53: 12-15.

- Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare. (1992).** Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488.
- Rowan, A. D., P. Mason, L. Mach, and J. S. Mort. (1992).** Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J. Biol. Chem.* 267: 15993-15999.
- Rubinstein, A. L., A. H. Broadwater, K. B. Lowrey, and P. A. Bedinger. (1995).** Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3086-3090.
- Rumold, R., M. Jyrälä, and D. Diaz-Sanchez. (2001).** Secondhand smoke induces allergic sensitization in mice. *J. Immunol.* 167: 4765-4770.
- Rusznak, C., R. J. Sapsford, J. L. Devalia, S. S. Shah, E. L. Hewitt, A. G. Lamont, R. J. Davies, and S. Lozewicz. (2001).** Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* 31: 226-238.
- Sagerstrom, C. G., E. M. Kerr, J. P. Allison, and M. M. Davis. (1993).** Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8987-8991.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Salgame, P., J. S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, J. Convit, R. L. Modlin, and B. R. Bloom. (1991).** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254: 279-282.
- Saloheimo, A., B. Henrissat, A. M. Hoffren, O. Teleman, and M. Penttilä. (1994).** A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol. Microbiol.* 13: 219-228.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1982).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

Schleimer, R. P., C. C. Fox, R. M. Naclerio, M. Plaut, P. S. Creticos, A. G. Togias, J. A. Warner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein. (1985). Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76: 369-374.

Schmid-Grendelmeier, P. and R. Cramer. (2001). Recombinant allergens for skin testing. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125: 96-111.

Schramm, G., H. Kahlert, R. Suck, B. Weber, H. T. Stuwe, W. D. Muller, A. Bufe, W. M. Becker, M. W. Schlaak, L. Jager, O. Cromwell, and H. Fiebig. (1999). "Allergen engineering": variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J. Immunol.* 162: 2406-2414.

Schulz, O., P. Laing, H. F. Sewell, and F. Shakib. (1995). Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). *Eur. J. Immunol.* 25: 3191-3194.

Schulz, O., H. F. Sewell, and F. Shakib. (1998 a). A sensitive fluorescent assay for measuring the cysteine protease activity of Der p 1, a major allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Mol. Pathol.* 51: 222-224.

Schulz, O., H. F. Sewell, and F. Shakib. (1998 b). Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* 187: 271-275.

Schwarze, J., E. Hamelmann, K. L. Bradley, K. Takeda, and E. W. Gelfand. (1997). Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J. Clin. Invest.* 100: 226-233.

Scott, P., E. Pearce, A. W. Cheever, R. L. Coffman, and A. Sher. (1989). Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* 112: 161-182.

Seppala, U., H. Majamaa, K. Turjanmaa, J. Helin, T. Reunala, N. Kalkkinen, and T. Palosuo. (2001). Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors. *Allergy* 56: 619-626.

Serebrisky, D., A. A. Teper, C. K. Huang, S. Y. Lee, T. F. Zhang, B. H. Schofield, M. Kattan, H. A. Sampson, and X. M. Li. (2000). CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 165: 5906-5912.

Shcherban, T. Y., J. Shi, D. M. Durachko, M. J. Guiltinan, S. J. McQueen-Mason, M. Shieh, and D. J. Cosgrove. (1995). Molecular cloning and sequence analysis of expansins--a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9245-9249.

Shirakawa, T., A. Li, M. Dubowitz, J. W. Dekker, A. E. Shaw, J. A. Faux, C. Ra, W. O. Cookson, and J. M. Hopkin. (1994). Association between atopy and variants of the beta subunit of the high- affinity immunoglobulin E receptor. *Nat. Genet.* 7: 125-129.

Shutov, A. D., I. A. Kakhovskaya, A. S. Bastrygina, V. P. Bulmaga, C. Horstmann, and K. Muntz. (1996). Limited proteolysis of beta-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Structural and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* 241: 221-228.

Skadhauge, L. R., K. Christensen, K. O. Kyvik, and T. Sigsgaard. (1999). Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur. Respir. J.* 13: 8-14.

Smith, A. and K. Nicholson. (2001). Psychosocial factors, respiratory viruses and exacerbation of asthma. *Psychoneuroendocrinology* 26: 411-420.

Sonenthal, K. R. and M. A. Shaughnessy. (1993). An overview of allergens. *Allergy Proc.* 14: 106-107.

Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., and Van Wart H.E. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 364-368.

Sreekrishna, K. (1993). Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *Industrial microorganisms: Basic and*

applied molecular genetics. Baltz R.H., Hegeman G.D., and Skatrud P.L., eds. American Society for Microbiology, Washington: pp. 119-126.

Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam, and L. A. Birkenberger. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55-62.

Stevens, T. H., J. H. Rothman, G. S. Payne, and R. Schekman. (1986). Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y. *J. Cell Biol.* 102: 1551-1557.

Su, N. Y., C. J. Yu, H. D. Shen, F. M. Pan, and L. P. Chow. (1999). Pen c 1, a novel enzymic allergen protein from *Penicillium citrinum*. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur. J. Biochem.* 261: 115-123.

Suck, R., S. Hagen, O. Cromwell, and H. Fiebig. (1999). Rapid and efficient purification of *Phleum pratense* major allergens Phl p 1 and group Phl p 2/3 using a two-step procedure. *J. Immunol. Methods* 229: 73-80.

Suck, R., A. Petersen, S. Hagen, O. Cromwell, W. M. Becker, and H. Fiebig. (2000). Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen phl p 13 from timothy grass pollen (*Phleum pratense*). *Clin. Exp. Allergy* 30: 324-332.

Suphioglu, C. and M. B. Singh. (1995). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Pha a 1 and four isoforms of Pha a 5, the major allergens of canary grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* 25: 853-865.

Svanes, C., D. Jarvis, S. Chinn, and P. Burney. (1999). Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 415-420.

Takano, H., T. Yoshikawa, T. Ichinose, Y. Miyabara, K. Imaoka, and M. Sagai. (1997). Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 36-42.

Takio, K., T. Towatari, N. Katunuma, D. C. Teller, and K. Titani. (1983). Homology of amino acid sequences of rat liver cathepsins B and H with that of papain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3666-3670.

Tee, R. D., P. S. Cranston, M. Dewair, H. Prelicz, X. Baur, and A. B. Kay. (1985). Evidence for haemoglobins as common allergenic determinants in IgE- mediated hypersensitivity to chironomids (non-biting midges). *Clin. Allergy* 15: 335-343.

Tomee, J. F., R. van Weissenbruch, J. G. de Monchy, and H. F. Kauffman. (1998). Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 75-85.

Turk, B., I. Dolenc, E. Zerovnik, D. Turk, F. Gubensek, and V. Turk. (1994). Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry* 33: 14800-14806.

Turk, B., V. Turk, and D. Turk. (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378: 141-150.

Valenta, R., M. Duchene, K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft, and O. Scheiner. (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557-560.

Valenta, R., T. Ball, S. Vrtala, M. Duchene, D. Kraft, and O. Scheiner. (1994). cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 106-118.

Valls, L. A., C. P. Hunter, J. H. Rothman, and T. H. Stevens. (1987). Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* 48: 887-897.

van der, Stoep N., W. Korver, and T. Logtenberg. (1994). In vivo and in vitro IgE isotype switching in human B lymphocytes: evidence for a predominantly direct IgM to IgE class switch program. *Eur. J. Immunol.* 24: 1307-1311.

Vercelli, D. (1995). Molecular regulation of the IgE immune response. *Clin. Exp. Allergy* 25 Suppl 2: 43-45.

Vernet, T., H. E. Khouri, P. Laflamme, D. C. Tessier, R. Musil, B. J. Gour-Salin, A. C. Storer, and D. Y. Thomas. (1991). Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *J. Biol. Chem.* 266: 21451-21457.

Vernet, T., D. C. Tessier, J. Chatellier, C. Plouffe, T. S. Lee, D. Y. Thomas, A. C. Storer, and R. Menard. (1995). Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *J. Biol. Chem.* 270: 16645-16652.

Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otin, L. M. Sanchez, R. I. Monsalve, Gonzalez De La Pena MA, C. Lahoz, and R. Rodriguez. (1993). The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.* 216: 863-869.

von Mutius, E., C. Braun-Fahrlander, R. Schierl, J. Riedler, S. Ehlermann, S. Maisch, M. Waser, and D. Nowak. (2000). Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1230-1234.

Vrtala, S., C. A. Akdis, F. Budak, M. Akdis, K. Blaser, D. Kraft, and R. Valenta. (2000). T cell epitope-containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, induce blocking antibodies. *J. Immunol.* 165: 6653-6659.

Wan, H., H. L. Winton, C. Soeller, E. R. Tovey, D. C. Gruenert, P. J. Thompson, G. A. Stewart, G. W. Taylor, D. R. Garrod, M. B. Cannell, and C. Robinson. (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest.* 104: 123-133.

Wan, H., H. L. Winton, C. Soeller, D. C. Gruenert, P. J. Thompson, M. B. Cannell, G. A. Stewart, D. R. Garrod, and C. Robinson. (2000). Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin. Exp. Allergy* 30: 685-698.

Weiss, S. T. (2000). Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 205-210.

Wills-Karp, M. (2001). IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 9-18.

Wu, H. M., E. Wong, J. Ogdahl, and A. Y. Cheung. (2000). A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.* 22: 165-176.

Wycoff, K. L., P. A. Powell, R. A. Gonzales, D. R. Corbin, C. Lamb, and R. A. Dixon. (1995). Stress activation of a bean hydroxyproline-rich glycoprotein promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression. *Plant Physiol.* 109: 41-52.

Wymann, D., C. A. Akdis, T. Blesken, M. Akdis, R. Cramer, and K. Blaser. (1998). Enzymatic activity of soluble phospholipase A2 does not affect the specific IgE, IgG4 and cytokine responses in bee sting allergy. *Clin. Exp. Allergy* 28: 839-849.

Xu, H., P. Theerakulpisut, N. Goulding, C. Suphioglu, M. B. Singh, and P. L. Bhalla. (1995). Cloning, expression and immunological characterization of Ory s 1, the major allergen of rice pollen. *Gene* 164: 255-259.

Yamada, T., H. Ohta, A. Shinohara, A. Iwamatsu, H. Shimada, T. Tsuchiya, T. Masuda, and K. Takamiya. (2000). A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. *Plant Cell Physiol.* 41: 185-191.

Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde in der Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie am Forschungszentrum Borstel angefertigt.

Für die Betreuung meiner Arbeit und stete Bereitschaft zum wissenschaftlichen Gedankenaustausch danke ich recht herzlich Herrn PD Dr. A. Petersen. Seine vielen wertvollen Ratschläge und die enge Zusammenarbeit mit ihm waren mir eine große Unterstützung während meiner gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Kristen von der Universität Hamburg danke ich sehr für die Betreuung der Arbeit aus botanischer Sicht. Sein Interesse und sein Wissen haben mir sehr geholfen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. W.-M. Becker für die freundliche Aufnahme in seiner Laborgruppe bedanken. Ebenso unterstützte er mich während meiner Arbeit mit konstruktiver Kritik und wertvollen Anregungen in zahlreichen Diskussionen.

Herrn D. Wicklein danke ich für die Einführung in die Technik der HPLC.

Herrn PD Dr. B. Lindner möchte ich für die MALDI-TOF-Untersuchungen danken.

Herrn Dr. M. Suhr danke ich für die fachliche Unterstützung und das Korrekturlesen meines Manuskriptes.

Bei Frau Dr. F. Schocker bedanke ich mich sehr herzlich für die vielen aufmunternden Worte. Ihre stete Diskussionsbereitschaft und vielen Ratschläge haben mir immer wieder weitergeholfen.

Bei Herrn Dr. U. Mamat möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen und vor allem für die Bereitschaft bedanken, mich jederzeit mit Rat und Tat zu unterstützen.

Frau Dr. G. Schramm danke ich für viele Hilfestellungen und wertvollen Tipps im Umgang mit molekularbiologischen Methoden.

Frau Dr. med. U. Lepp danke ich für die Bereitstellung von Patientenseren.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich den Mitarbeitern der Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie aussprechen. Frau B. Gerckens, hat mir stets eine sehr angenehme Atmosphäre in „unserem“ Labor geschaffen. Frau D. Warnecke, Frau E. Knaack sowie Frau M. Böttger waren mir jederzeit eine große Hilfe bei der technischen Assistenz.

Meinen Kollegen Frau S. Gebauer, Frau Y. Darcan, der ich für viele konstruktive fachliche Diskussionen danken möchte, und ganz besonders Herrn J. Sarau, der mich stets motiviert und mir in jeder Lebenslage ein offenes Ohr geschenkt hat, danke ich an dieser Stelle.

Ich bedanke mich bei all denen, die mich während meiner Doktorarbeit mit ihren Anregungen und ihrer Hilfsbereitschaft begleitet haben.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Eltern, meiner Schwester sowie der Familie Horn für ihren Humor und ihre Zuversicht. Ein besonders großer Dank gebührt meiner Lebensgefährtin Frau S. Horn. Sie hat mir liebevoll zur Seite gestanden.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Marco Pöppelmann
geboren am 24.07.1971 in Troisdorf/Sieglar

SCHULBILDUNG:

1978 - 1982	Grundschule in Troisdorf
1982 - 1991	Bismarckgymnasium in Elmshorn
31.05.91	Abitur

HOCHSCHULSTUDIUM:

1992 – 1998	Studium an der Universität in Hamburg Fachrichtung Biologie: Hauptfach Zoologie; Nebenfächer Biochemie und Mikrobiologie
-------------	--

08/97 - 05/98	Diplomarbeit im Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe „Zelluläre Allergologie“ bei Herrn PD Dr. H. Haas mit dem Thema: „Deglykosylierung von humanem polyklonalem Immunglobulin E mit Hilfe von Endo- und Exoglykosidasen“
---------------	---

11.05.98	Abschluss Diplom-Biologe
----------	--------------------------

08/98 – 09/02	Promotion im Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie (Laborgruppenleiter Dr. W.-M. Becker) bei Herrn PD Dr. A. Petersen mit dem Thema: „Phl p 1: Klonierung und Expression des Majorallergens aus dem Wiesenlieschgras <i>Phleum pratense</i> in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> und anschließende funktionelle und strukturelle Charakterisierung“
---------------	---

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie Hamburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Phl p 1: Klonierung und Expression des Majorallergens aus dem Wiesenlieschgras *Phleum pratense* in der Hefe *Pichia pastoris* und anschließende funktionelle und strukturelle Charakterisierung“ im Forschungszentrum Borstel, Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie unter der Anleitung von Herrn PD Dr. A. Petersen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen biologischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den