

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 Hyperglykosilierung 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.