Einfluss von Kohlenhydratstrukturen auf die allergische Reaktion am Beispiel der Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense* L.)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Daniel Wicklein
aus Hamburg

Hamburg 2003

UNIVERSITÄT HAMBURG

FACHBEREICH BIOLOGIE

Herrn Daniel WICKLEIN

Ich eröffne Ihnen hiermit, daß Sie die Doktorprüfung beim Fachbereich Biologie gemäß Promotionsordnung vom 05. Juli 1999 mit den folgenden Noten:

Dissertation: „sehr gut"
Gesamtnote: „sehr gut"

bestanden haben.

Nach Ablieferung der Pflichtexemplare der Dissertation wird Ihnen die Doktorwürde durch Aushändigung des vom Dekan unterschriebenen und gesiegelten Doktorbriefes verliehen.

Vorher sind Sie nicht berechtigt, den Doktortitel zu führen.

Hamburg, den 08. April 2003

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

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: 14. Februar 2003

Hamburg, den 31. Januar 2003

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Lebenslauf

Name:	Daniel Wicklein
geboren am:	18. 10. 1973
Geburtsort:	Bremen
Eltern:	Klaus Wicklein, Sieglinde Wicklein, geborene Brezak
Schule:	August 1980 bis Juni 1984 Grundschule Wahlstedt August 1984 bis Juni 1993 Dahlmannschule Bad Segeberg Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Dienste:	Juli 1993 bis September 1994 Zivildienst im Wohnheim für Behinderte Wahlstedt
Ausbildung:	April 1994 bis August 1999 Studium der Biologie an der Universität Hamburg mit Abschluß Diplom Hauptfach: Genetik / Molekularbiologie Nebenfächer: Mikrobiologie und Allgemeine Botanik Titel der Diplomarbeit: „Molekulare Charakterisierung eines β-Glucosidase-ähnlichen Gens der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)“ Januar 2000 bis Februar 2003 Promotion am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie (unter Leitung von Dr. W.-M. Becker). Thema der Dissertation: „Einfluss von Kohlenhydratstrukturen auf die allergische Reaktion am Beispiel der Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense* L.)“

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie 1

1.2 Glycosylierung von Proteinen 4

1.3 Kohlenhydrate als IgE-Epitope 6

1.4 Das Gruppe 1-Allergen aus Lieschgraspollen 8

1.5 Die Polysaccharide aus Lieschgraspollen 9

1.6 Zielsetzung der Arbeit 10

2 MATERIAL UND METHODEN 11

2.1 Material 11

2.1.1 Chemikalien 11

2.1.2 Antikörper 13

2.1.3 Enzyme und Lectine 13

2.1.3.1 Endonucleasen 14

2.1.4 Primer 14

2.1.5 Plasmide 14

2.1.6 Seren 15

2.1.7 Allergenmaterial 15

2.2 Proteinbiochemische, physikochemische und immunologische Methoden 16

2.2.1 Herstellung von Lieschgras-Pollenextrakt 16

2.2.2 Isolierung von Proteinen aus Tabakblättern 16

2.2.3 Aufreinigung des natürlichen Phl p 1 17

2.2.4 Bestimmung von Proteinkonzentration 17

2.2.5 Enzymatische Spaltungen ... 17
2.2.5.1 Tryptischer Verdau von natürlichem Phl p1 ... 17
2.2.5.2 Tryptischer Verdau von Lieschgras-Pollenextrakt ... 18
2.2.5.3 Spaltung mit N-Glycosidase A ... 18
2.2.6 Chromatographie ... 18
2.2.6.1 Gelfiltration ... 18
2.2.6.2 HPLC ... 19
2.2.7 Neutralzuckeranalyse ... 20
2.2.8 N-terminale Sequenzierung ... 21
2.2.9 Massenspektrometrie ... 21
2.2.9.1 MALDI-TOF Analysen ... 21
2.2.9.2 ESI-FT-ICR ... 22
2.2.10 Western Blots ... 23
2.2.10.1 SDS-PAGE ... 23
2.2.10.2 Semi-dry Elektroblotting ... 25
2.2.11 Immunologische Nachweise auf Membranen ... 27
2.2.12 Inhibitions-ELISA ... 28
2.2.13 ELISA-Untersuchungen mit Polysacchariden ... 29
2.2.14 IL-4 Freisetzung aus Basophilen ... 30

2.3 Molekularbiologische Methoden ... 32
2.3.1 Klonierungsstrategie ... 32
2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen ... 34
2.3.3 Transformation von *E. coli* XL1-Blue ... 35
2.3.4 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* XL1-Blue ... 36
2.3.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen ... 36
2.3.6 Restriktion von Plasmiden ... 36
2.3.7 DNA-Auftrennung und Elution von DNA aus Agarose Gelen ... 37
2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten ... 38
2.3.9 DNA-Isolierung aus Lieschgras-Blütenständen ... 38
2.3.10 PCR mit DNA aus Lieschgras-Blütenständen ... 38
2.3.11 TA-Cloning ... 39
2.3.12 Blau-Weiß-Screening ... 39
2.3.13 DNA-Sequenzierung ... 40
2.3.14 Transformation von Tabakblättern mittels Genegun ... 41

3 ERGEBNISSE 43

3.1 Struktur der Kohlenhydratbestandteile des Phl p 1 43

3.1.1 Isolierung von Glycopeptiden und Neutralzuckerbestimmung 43

3.1.2 Bestimmung der Glycopeptidsequenz 45

3.1.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Glycopeptids 46

3.2 Untersuchung der Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt 51

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Polysaccharide aus Pollenextrakt 51

3.2.2 Struktur der Polysaccharide 53

3.3 IgE-Bindung und Mediator-Freisetzung 55

3.3.1 Untersuchungen der immunologischen Reaktivität von Polysaccharidstrukturen des Pollenextrakts 55

3.3.2 Untersuchungen zur Reaktivität von Kohlenhydrat-bindenden Allergikerseren 56

3.3.3 Inhibitions-Untersuchungen 58

3.3.4 Immunoblots 59

3.4 Untersuchungen zur klinischen Relevanz der Kohlenhydratstrukturen . 60

3.4.1 Vergleich von IgE- und IgG4-Reaktivität gegen Kohlenhydratstrukturen 60

3.4.2 Einfluss der Kohlenhydratstrukturen auf die Mediator-Freisetzung..... 61

3.5 Transiente Expression von Phl p 1 im Tabaksystem..... 64

3.5.1 Herstellung des Transformations-Konstruktes für Tabak..... 64

3.5.2 Transiente Transformation von Tabakblättern 66

4 DISKUSSION 69

4.1 Kohlenhydrat- und Peptidepitope 69

4.2 Glycoformen des Phl p 1 69

4.3 Immunologische Aspekte 75

4.3.1 IgE-Reaktivität der N-Glycane 75

4.4 Hydroxyprolin-Arabinose: Ein wichtiger Anteil von IgE-Epitopen? 76

4.5 Antikörperreaktivität der Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt 77

4.6 Mediator-Freisetzung durch Kohlenhydrate 78

4.7 Bedeutung von Kohlenhydraten für Allergiediagnostik und Immuntherapie 81

4.8 Expression von Phl p 1 im Tabaksystem 84

5 AUSBLICK 86

6 ZUSAMMENFASSUNG 87

7 LITERATUR 89

DANKSAGUNG 104

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAA	*Aleuria aurantia* Agglutinin
amp	Ampicilin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	Arabinose
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaMV	Blumenkohl MosaikVirus
CCD	Kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten
ddNTP	didesoxy Nucleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCεR	FCε-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FT	Fourier Transformation
Fuc	Fucose
G	Guanin
Gal	Galactose
GFP	„Green-Fluorescent-Protein“
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
ICR	Ionen-Cyclotron-Resonanz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleucin

IPTG	Isopropyl β-thiogalactosid
lac	Lactose
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption / Ionisation
Man	Mannose
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Massenspektrometrie
nPhl p1	aus der natürlichen Quelle isoliertes Gruppe 1-Allergen
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
nos	Nopalin Synthase Gen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rPhl p 1	rekombinantes Gruppe 1-Allergen (*aus E. coli*)
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SORI-CID	„Sustained Off-Resonance Irradiation – Collision-Induced Dissociation“
T	Thymin
TAE	Tris-EDTA-Essigsäure Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	(N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin)
tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (von Teilchen im Massenspektrometer)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Xyl	Xylose

Aminosäuren (Ein- und Dreibuchstabencode)

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			

Maßeinheiten

bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo-
l	Liter
M	molar
m	Milli-
µ	Mikro-
min	Minute
mol	Mol
n	Nano-
% (m/v)	Gewichtsprozent
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Einheit (Unit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
% (v/v)	Volumenprozent

1 Einleitung

1.1 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Unter dem Begriff der Atopie wird ein Formenkreis an Erkrankungen wie allergisches Asthma, Rhinitis, Konjunktivitis, Urticaria oder Anaphylaxie zusammengefasst. Da Symptome der Atopie in bestimmten Familie gehäuft auftreten, geht man von einer genetischen Prädisposition zu atopischen Erkrankungen aus (Cookson, 1999).

Wenn im klinischen Sprachgebrauch von einer „Allergie“ gesprochen wird, so ist damit in der Regel eine Überempfindlichkeit vom Typ I oder Soforttyp gemeint (Cooms und Gell, 1963). Mehr als 20 % der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern leidet bereits unter einer Typ I-Allergie mit deutlich steigender Tendenz (Ring et al. 2001). Bei dieser Überempfindlichkeit handelt es sich um eine inadäquate Reaktion des erworbenen Immunsystems auf eine an sich harmlose Substanz (z.B. Proteine aus Pollen oder Nahrungsmitteln) unter Schädigung körpereigenen Gewebes. Die Schwere der Symptome reicht von leichtem Heuschnupfen über allergisches Asthma bis hin zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schockzuständen (Ring und Darsow, 2002). Die Erkrankung wird auch als Soforttyp bezeichnet, da die entsprechenden Symptome im Zeitraum weniger Minuten nach Kontakt mit dem verursachenden Antigen, dem Allergen, auftreten (Roitt et al., 1991). Solche Allergene sind zumeist gut wasserlösliche Proteine vielfältigster Herkunft (von Pflanzen über Pilze bis zu Arthropoden und Säugetieren). Der Eintritt der Allergene in den Körper erfolgt zumeist über die Atemwege (Aeroallergene z.B. aus Pollen), den Gastrointestinaltrakt (Nahrungsmittelallergene wie Erdnuss) oder durch Insektenstich (Bienengift).

Bei einer Typ I-Allergie lassen sich zwei Phasen unterscheiden, nämlich erstens die Sensibilisierungphase, in welcher die Allergie entsteht, und zweitens alle nachfolgenden Allergenexpositionen mit den klinischen Reaktionen (**Abbildung 1**).

Bei der Sensibilisierung gehen die Antigene zunächst an den Schleimhäuten ihrer Eintrittsorte in Lösung, wo es bereits durch örtliche Proteasen zu ersten Fragmentierungen der Allergene kommen kann. Anschließend werden sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und in Lysosomen mittels Proteasen fragmentiert. Auch haben die Art (z.B. Nasenschleimhaut oder Darm) und der Zustand des Epithels (intakt oder vorgeschädigt) einen Einfluss darauf, ob das Allergen bereits modifiziert oder vorfragmentiert ist, wenn es

die APC erreicht. Auch nimmt das Epithel Einfluss darauf, wie viel Allergen überhaupt in den Organismus gelangt. Die APC (B-Lymphozyten, Makrophagen und vor allem dendritische Zellen, die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen) präsentieren nach der Prozessierung an ihrer Oberfläche zusammen mit dem MHCII-Rezeptor Peptide aus den antigenen Proteinen als Peptid/MHCII-Komplex (Vercelli, 1995). Dieser wird von T-Helferzellen (CD4+-T-Zellen) über deren T-Zellrezeptor (TCR) als Antigen-spezifisches Signal erkannt. Diese noch undifferenzierten T-Helferzellen werden als naive T_H0-Zellen bezeichnet. Entscheidend für die Ausprägung einer allergischen Antwort ist nun die Ausdifferenzierung der T_H0-Zellen zu T_H2 T-Zellen. Hierzu ist das Cytokinmilieu ausschlaggebend, dem die T_H0-Zellen direkt vor und während ihrer Interaktion mit den APC ausgesetzt sind. Insbesondere frühes Interleukin 4 (IL-4), für welches T_H0-Zellen den entsprechenden Rezeptor (IL-4R) besitzen, scheint einen entscheidendem Einfluss auf die Entwicklung von T_H2-Zellen zu haben (Bacharier und Geha, 2000). Die Herkunft des frühen IL-4 beim Menschen und der genaue Einfluss der APC auf den Vorgang sind noch ungeklärt. Bei Mäusen ist wahrscheinlich eine Unterklasse der T-Zellen, die $NK1.1^+$ CD4 Zellen an der Produktion des frühen IL-4 beteiligt (Bendelac et al., 1997). Die ausdifferenzierten T_H2-Zellen wiederum stimulieren B-Zellen, den Klassenwechsel zu IgE-Antikörpern zu vollziehen und zu prolifierieren. An der Beeinflussung der B- durch die T-Zellen ist unter anderem die Costimulation von CD40 auf den B-Zellen durch CD40-Ligand auf den T-Zellen beteiligt (Faasen et al., 1995). Weiter produzieren die T_H2-Zellen IL-4, welches gezielt in die sogenannte „immunologische Synapse“ zwischen T-und B-Zelle abgegeben wird und in der B-Zelle über IL-4R den Klassenwechsel von IgM zu IgE induziert (Poo et al., 1988). Neben IL-4 kann auch das IL-13 in B-Zellen diesen Klassenwechsel auslösen (Punnonen et al., 1993). Die B-Zellen proliferieren nach der Interaktion mit den T_H2-Zellen und differenzieren zu Plasmazellen aus, welche in grossen Mengen Allergen-spezifisches IgE freisetzen. Auch hier wirkt ein bestimmtes Cytokinmilieu fördernd auf den Prozess (Hamaoka und Ono, 1986; Rousset et al., 1992 und Kishimoto et al., 1994). Die IgE-Antikörper binden über ihren (konstanten) Fc-Teil an die Fcε-Rezeptoren, die vor allem auf Mastzellen und basophilen Granulozyten vorkommen. Von diesen Fcε-Rezeptoren gibt es zwei Typen, wobei FcεRI eine 100fach gesteigerte Affinität zu IgE gegenüber FcεRII aufweist (Kinet, 1999). Neben den genannten Zelltypen kommen Fcε-Rezeptoren auch auf weiteren Zellen vor. Genannt seien hier vor allem die aktivierten eosinophilen Granulozyten (sowohl FcεRI als auch FcεRII), für die auch tatsächlich ein Einfluss auf die allergische Reaktion nachgewiesen werden konnte (Thomas, 1995).

Für die zweite Phase der Typ I-Allergie ist die Kreuzvernetzung von IgE-Antikörpern auf den FcεI-Rezeptoren der Basophilen und vor allem der deutlich häufigeren Mastzellen entscheidend. Letztere sind zudem in der Nähe der Epithelien lokalisiert, kommen also nach dem Eintreten der Allergen in den Organismus schnell mit diesen in Kontakt. Zur Kreuzvernetzung benötigt ein Allergen mindestens zwei Bindungsstellen (Epitope) für IgE-Antikörper. Es kann sich dabei um zwei verschiedene oder um strukturgleiche Epitope handeln, entscheidend ist nur, dass zwei IgE-Bindungsstellen auf dem Allergen vorhanden sind. Die Quervernetzung der IgE-Moleküle (und damit verbrückten FcεI-Rezeptoren) führt in den Mastzellen und Basophilen über eine Signalkaskade zur Freisetzung teils gespeicherter Mediatoren wie Histamin, teils *de novo* synthetisierter wie Proteoglycan und Leukotrien. Diese Mediatoren bedingen dann an den entsprechenden Erfolgsorganen das klinische Bild der Typ I-Allergie (Metcalfe et al., 1997). Neben den genannten Mediatoren setzen Mastzellen und Basophile nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren wiederum IL-4 frei, was weiter das bereits bestehende T_H2-Milieu verstärkt (Gauchat et al., 1993).

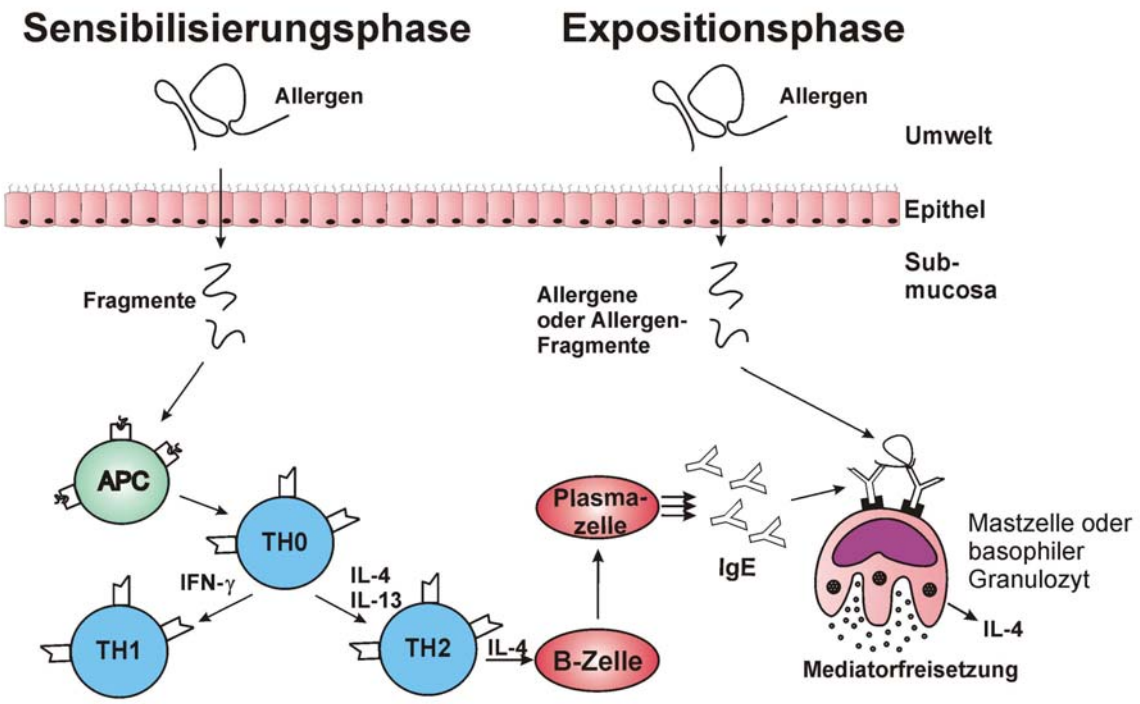


Abbildung 1: Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie
(nach Petersen et al. 1999)

1.2 Glycosylierung von Proteinen

Eine der häufigsten Formen der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen ist die Glycosylierung. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Formen: Die N- und die O-Glycosylierung. Bei der N-Glycosylierung wird im endoplasmatischen Reticulum (ER) über die sekundäre Aminogruppe eines Asparaginrestes ein stets gleich gebautes Oligosaccharid bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glucoseresten angefügt (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die Verbrückung des Oligosaccharids mit dem Aspargin über einen Stickstoffrest gab der N-Glycosylierung dabei ihren Namen. Das Oligosaccharid wird im Anschluss im ER und weiter im Golgiapparat durch An- und Abbau von Monosacchariden bis zu seiner endgültigen Form prozessiert. Gemeinsam ist allen N-Glycanen ein strukturell immer gleicher sogenannter Kernbereich aus zwei N-Acetylglucosamin- und einem Mannoserest, von dem aus über zusätzliche Mannosereste Seitenketten angelagert sein können (**Abbildung 2**). Das erste Kern-N-Acetylglucosamin und die Kernmannose können durch das Anfügen von weiteren Resten wie Fucose oder Xylose modifiziert sein. Bei den N-Glycanen unterscheidet man den High-Mannose Typ, der fast ausschließlich die Monosaccharide N-Acetylglucosamin und Mannose enthält, vom Komplex-Typ, bei welchem auch andere Bausteine wie Fucose, Xylose, Galactose oder Sialylsäure vorhanden sein können. Potentielle N-Glycosylierungsstellen in einem Protein sind aus der Aminosäuresequenz erkennbar, da eine Konsensussequenz bestehend aus Asparagin - X - Threonin / Serin existiert (X steht für jede Aminosäure außer Prolin, an der dritten Position der Konsensussequenz steht entweder Threonin oder Serin).

Schwieriger ist dagegen die Lage von O-Glycosylierungen zu erkennen, da keine allgemeine Konsensussequenz besteht. Bei der O-Glycosylierung ist der Zucker über einen Sauerstoffrest an das Protein gebunden. Prinzipiell kann also jede Aminosäure mit einer freien Hydroxy-Gruppe O-glycosyliert werden. Häufig kommt bei Säugerproteinen die Bindung eines Glycans über N-Acetylgalactosamin an Threonin oder Serin vor (Schachter & Brockhausen, 1992, van den Steen, 1998), während man bei Pflanzen häufig eine Bindung über Arabinose an Hydroxyprolin beobachtet (Clarke et al., 1979; Showalter, 2001). Für O-Glycane existiert im Gegensatz zu den N-Glycanen kein über alle Organismen konserviertes Schema der Prozessierung, ebenso wenig wie eine streng konservierte Kernstruktur.

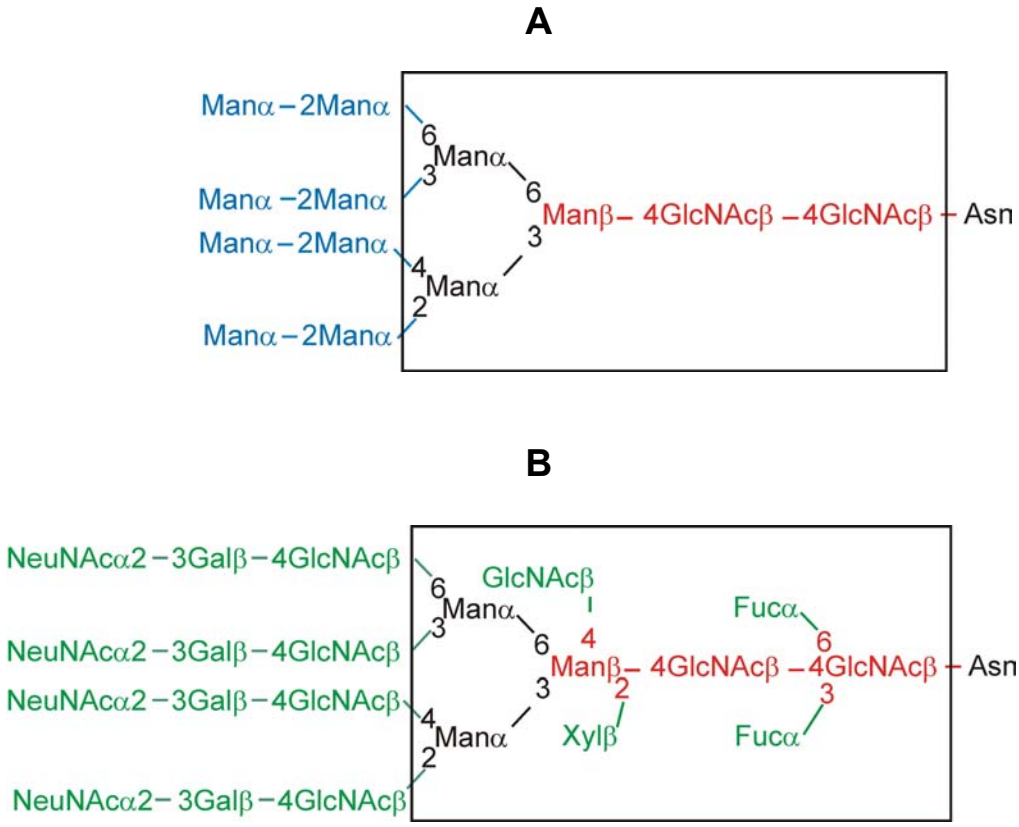


Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau der N-Glycane

A: High-Mannose N-Glycan

B: komplexes N-Glycan

Kasten: Kernbereich, rot: innerer Kernbereich, schwarz: Mannose-Verzweigungen zu den Seitenketten, grün: Beispiele für die Modifizierungen bei komplexen N-Glycanen, blau: Beispiel für eine High-Mannose Seitenkette

Eine einheitliche biologische Funktion lässt sich für die beschriebenen Glycane nicht angeben. Allgemein erhöht die Glycosylierung die Hydrophilie und unterstützen die korrekte Faltung des Proteins im ER. Eine Steigerung der Wasserlöslichkeit kann zu einer Erhöhung der Konzentration und somit zu einer erhöhten Aufnahme des Allerges durch das Epithel führen, was indirekt eine Steigerung der Allergenität des Glycoproteins zur Folge haben könnte. Auch können Glycane ein Protein gegen proteolytischen Abbau stabilisieren, was wiederum einen indirekten Effekt auf die Allergenität haben könnte, da dies die Expositionszeiten in der Phase zwei der Typ I-Allergie verlängert (**Abbildung 1 B**). Eine Abspaltung der Glycosylierung kann zur Aktivierung oder Inhibierung eines Enzyms führen oder dessen Halbwertszeit beeinflussen. Darüber hinaus sind Glycane an der intra- oder interzellulären Kommunikation (z. B. als Bindungsstellen für Rezeptoren) beteiligt (Elbein, 1991; Rasmussen, 1992; Lis und Sharon, 1993).

1.3 Kohlenhydrate als IgE-Epitope

Seit langem ist bekannt, dass auch Kohlenhydrat-haltige Strukturen als Epitope für IgE-Antikörper dienen können. Bei diesen Kohlenhydraten handelt es sich in erster Linie um komplexe N-Glycane aus Glycoproteinen und zwar meist um solche mit α1-3 gebundener Kern-Fucose und (weniger häufig) um solche mit β1-2 Kern-Xylose (Tretter et al., 1993; Wilson et al., 1998; Wilson und Altmann, 1998). Die Kernstruktur der N-Glycane ist äußerst konservativ, so dass sie sich zwischen nahe verwandten Spezies meist gar nicht und häufig auch zwischen weniger verwandten Arten kaum unterscheidet. Sogar wenn von zwei Arten die eine dem Pflanzen- und die andere dem Tierreich angehört, kann es immer noch zu frappierenden Ähnlichkeiten in ihren N-Glycanen kommen (**Abbildung 3**).

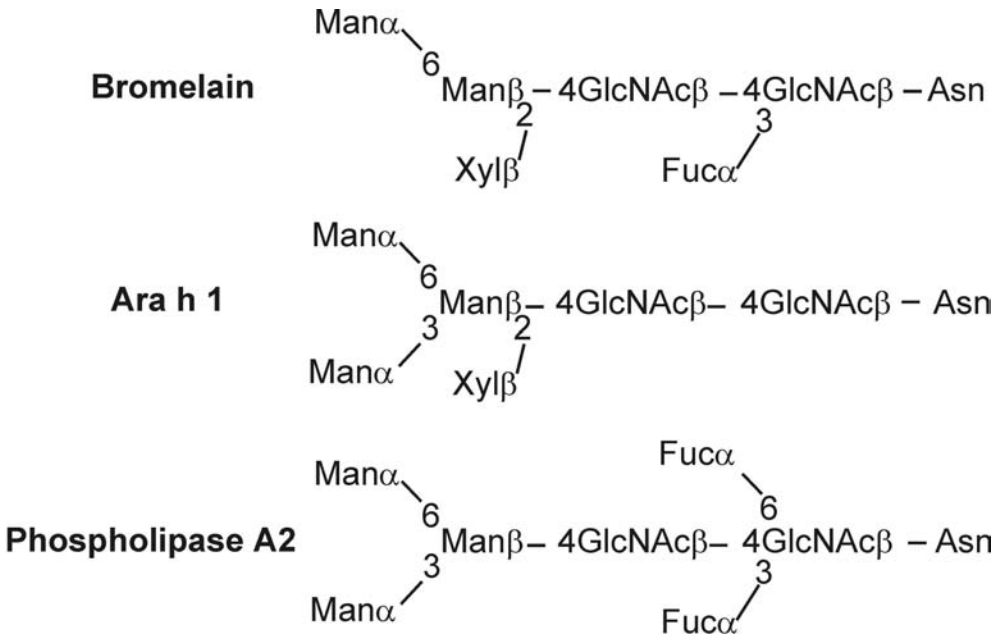


Abbildung 3: Vergleich von N-Glycanen aus Allergenen

Bromelain: Protease aus der Ananas (Ishiara et al., 1979; van Kuik et al., 1986); Ara h 1: Major-Allergen der Erdnuss (Kolarich und Altmann, 2000); Phospholipase A2: aus Bienengift (Tretter et al., 1993)

Diese Tatsache macht N-Glycane zu Verursachern von Kreuzreaktivtäten (Petersen et al., 1996). Darunter versteht man, dass die Reaktivität gegen ein Allergen zugleich zur Reaktivität gegen ein anderes Allergen (unter Umständen aus einer phylogenetisch weit entfernten Art) führt, da in beiden ähnliche Epitope vorhanden sind. Eine weit verbreitete Kreuzreaktivität gibt es z.B. zwischen Birkenpollen und Apfel (Son et al., 1999; Wensing et al., 2002). Ein N-

Glycan als Epitop kann demnach zu einer IgE-Kreuzreaktivität über ein weites Spektrum von Glycoproteinen führen.

Natürlich benötigt ein potentielles Allergen mindestens ein zweites IgE-Epitop, um über die Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren tatsächlich zu klinischen Symptomen zu führen. So wurde argumentiert, dass die IgE-Kreuzreaktivität über Kohlenhydrat-haltige Epitope klinisch ohne Bedeutung sei, da die meisten Allergene nur über ein einzelnes N-Glycan verfügten (Aalberse et al., 1997). Neben N-Glycanen könnten aber auch O-Glycane in den Proteinen vorhanden und IgE-reaktiv sein. Auch kommen durchaus Glycoproteine mit mehreren N-Glycosylierungsstellen vor (Kurosake et al., 1991, Suck et al., 2000). Damit könnte also ein Allergen über zwei verschiedene Kohlenhydratepitope zur Freisetzung von Mediatoren und damit zu den klinischen Symptomen der Typ I-Allergie führen (**Abbildung 4A**). Auch muss bedacht werden, dass die Glycane nicht isoliert wirken, sondern eben Teil eines Glycoproteins sind, so dass es durch das Vorhandensein von Kohlenhydrat- und Peptidepitop zu einer Reaktion auf das Allergen kommen könnte (**4B**). Eine weitere Möglichkeit ist, dass zwei monovalent glycosylierte Allergenmoleküle beispielsweise über eine Disulfidbrücke ein Dimer bilden könnten, welches dann in der Lage wäre, eine Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren zu bewirken (**4C**).

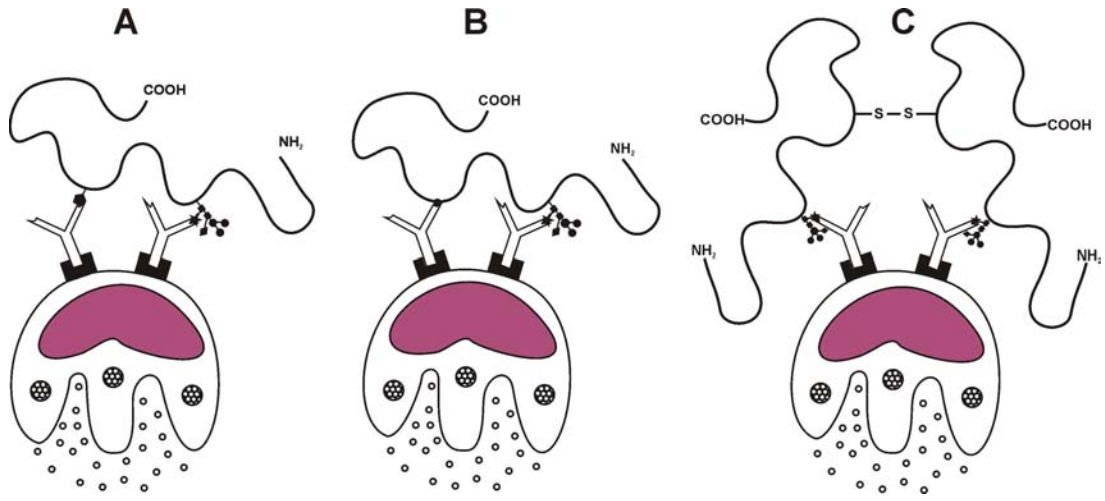


Abbildung 4: Möglichkeiten zur Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren unter Beteiligung von Kohlenhydraten

A: Zwei Kohlenhydratepitope; **B**: Ein Kohlenhydrat- und ein Peptidepitop; **C**: Dimerbildung aus zwei monovalent glycosylierten Proteinen (aus Petersen, 1999)

Bei allen oben gemachten Ausführungen muss bedacht werden, dass es sich bei den „Kohlenhydratepitopen" der N-Glycanen streng genommen um „Kohlenhydrat-haltige

Epitope“ handelt, da alle beschriebenen Strukturen Bestandteile von Glycoproteinen sind. Bei der Sensibilisierung gegen ein N-Glycan-haltiges Epitop wird vom MHCII ein Glycopeptid und eben kein reines Glycan präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass zur effektiven IgE-Bindung eines N-Glycans zumindest noch der Asparaginrest gebunden sein muss (Tretter et al., 1993). Ob das Asparagin an der IgE-Bindung direkt mit beteiligt ist oder der Aminosäurerest lediglich die β-Konfiguration des ersten N-Acetylglucosaminrestes festgelegen muss, ist nicht geklärt. Im Falle eines reinen Kohlenhydrats (eines Antigens aus Seescheiden) wurde allerdings eine Reaktion in Form eines positiven Hauttestes beschrieben (Ohta et al., 1991). Auch für ein Polysaccharid aus Gummin Arabicum konnte eine IgE-Reaktivität nachgewiesen werden, auch wenn der Proteinanteil durch basische Hydrolyse abgespalten wurde (Fötisch et al., 1998). Es ist jedoch nicht völlig ausgeschlossen, dass nach wie vor jeweils ein Aminosäurerest an die Kohlenhydratstrukturen gebunden war. Interessant ist auch, dass das Gummi Arabicum-Polysaccharid aufgrund der repetitiven Natur der Kohlenhydrat-IgE-Epitope offensichtlich zu den klinischen Symptomen einer Typ I-Allergie führt.

1.4 Das Gruppe 1-Allergen aus Lieschgraspollen

Von den mehr als 20 % der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern, die unter einer Typ I-Überempfindlichkeit leiden, zeigt ein großer Teil eine Allergie gegen Gräserpollen (Tamborini et al., 1995). Die in Gräserpollen enthaltenen Allergene sind gut wasserlösliche Proteine und Glycoproteine mit Größen zwischen 5 und 70 kDa (Haavik et al., 1985; Schou, 1995). Allergene werden nach der offiziellen Nomenklatur (WHO, IUIS) bezeichnet mit den ersten drei Buchstaben des wissenschaftlichen Gattungsnamens, dem ersten Buchstaben des Artnamens und einer laufenden, chronologisch vergebenen Nummer. Das Gruppe 1-Allergen aus den Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense* L.) wird demnach als Phl p 1 bezeichnet. Bei diesem Allergen handelt es sich um ein 31-36 kDa großes Glycoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 5 % (Petersen et al. 1995a). Mehr als 95 % aller Gräserpollenallergiker zeigen IgE gegen die Gruppe 1-Allergene, die homolog - mit Sequenzidentitäten von bis zu 95 % (Laffer et al., 1996) - in jeder bislang untersuchten Gräserspezies vorkommen. Man spricht daher von einem Majorallergen (d. h. mehr als 50 %

aller Gräserpollenallergiker reagieren mit Phl p 1). Neben der Gruppe 1 sind auch die Gruppe 5- und Gruppe 13-Allergene, das Phl p 5 und Phl p 13 aus Lieschgraspollen, Majorallergene (Matthiesen und Løwenstein., 1991; Suck et al., 2000).

Das Phl p 1, dessen cDNA-Sequenz bereits vor Beginn dieser Arbeit vorlag (Petersen et al., 1995b), besitzt ebenso wie alle anderen Gruppe 1-Allergene ein Glycosylierungsmotiv und für ca. 20 % aller Gräserpollenallergiker konnte eine IgE-Reaktivität gegen den Kohlenhydratanteil des Moleküls nachgewiesen werden (Petersen et al.,1995a). Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Kohlenhydratbestandteile ein möglicher Grund für Kreuzreaktivitäten zwischen Gräserpollen und z.B. Tomate sind (Petersen et al., 1996). Darüber hinaus wurde durch N-terminales Ansequenzieren eine weitere posttranslationale Modifizierung in Form von zwei Hydroxyprolinen nachgewiesen (Petersen et al., 1998).

Da im prokaryotischen Expressionssystem keine Glycosylierungen erfolgen, lag mit rekombinantem Phl p1 (rPhl p 1) aus *E. coli* bereits eine Kohlenhydrat-freie Form des Moleküls vor. Dies, zusammen mit den bereits vorhandenen Untersuchungen des natürlichen Phl p 1 (nPhl p 1), machte dieses aufgrund der 95 % Sensibilisierungsprävalenz wichtigste Gräserpollenallergen zu einem hervorragenden Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von Kohlenhydratstrukturen auf die allergische Typ 1-Reaktion.

1.5 Die Polysaccharide aus Lieschgraspollen

Neben den Proteinen und Glycoproteinen mit einem Anteil an der Trockenmasse von bis zu 95 % enthalten Pollenextrakte Arabinose- und Galactose-haltige Polysaccharide mit einem Anteil an der Trockenmasse von bis zu 20 %. Für Lieschgraspollen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Polysacchariden mit hoher Wahrscheinlichkeit um Arabinogalactane handelt (Haavik et al. 1982). Es war nicht möglich, diese Arabinogalactane mittels Gelfiltration frei von Proteinen zu erhalten, was gut zu den Befunden passt, die Arabinogalactane als Bestandteile von Glycoproteinen bzw. Proteoglycanen mit einem Kohlenhydratanteil von 70-95 % zeigen (Clarke et al., 1979, Showalter, 2001). Eine genaue strukturelle und immunologische Charakterisierung der Arabinogalactane aus Lieschgraspollen war bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht erfolgt, doch konnte für ein Arabinogalactan aus der Lärche eine T-Zell-Reaktivität gezeigt werden (Kelly, 1999). Für ein Polysaccharid aus *Acacia senegal* mit den Bausteinen Galactose, Arabinose, Rhamnose und

Galacturonsäure wurde wie bereits erwähnt (**1.3**) IgE-Reaktivität mit daraus folgenden klinischen Symptomen beschrieben (Fötisch et al., 1998).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Einfluss von Kohlenhydratstrukturen auf die Typ 1-Allergie sollte am Beispiel des Majorallergens Phl p 1 bestimmt werden. Dazu war eine exakte Charakterisierung notwendig, die über Techniken des enzymatischen Abbaus von Proteinen, HPLC sowie massenspektometrische Methoden erfolgen sollte.
Danach galt es, die Relevanz der gefundenen Kohlenhydratstrukturen für die IgE-Bindung zu bestimmen sowie der Frage nachzugehen, ob es sich bei ihnen um kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (CCD) handelt. Desweiteren sollte die klinische Relevanz des Kohlenhydrat-spezifischen IgE untersucht werden. Dazu musste ein Funktionstest etabliert werden anhand dessen die Fähigkeit der Kohlenhydrate zur Mediator-Freisetzung untersucht werden konnte. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Zuckerstrukturen einen direkten Einfluss auf die allergische Reaktion nehmen.

Für weitere strukturelle Untersuchungen des Allergens wurde angestrebt, das Phl p 1 mit seinen natürlichen Zuckerstrukturen rekombinant zu erhalten. Um dies zu erreichen, sollte Tabak als Expressionssystem eingesetzt werden. Bei Tabak war die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dieser als höhere Pflanze weitgehend die gleichen Glycosylierungen vornehmen würde wie das Lieschgras.
Als weitere, in hoher Konzentration in den Pollen vorhandene Kohlenhydratstruktur (mit bis zu 10 % des Trockengewichts) sollten die Polysaccharide, insbesondere die Arabinogalactane isoliert und strukturell charakterisiert werden. Ausserdem war deren IgE-Reaktivität als mögliche Allergieauslöser von Interesse.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Reinheit der verwendeten Chemikalien war Analysegrad oder HPLC-Grad.

Acetanhydrid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril, isocratic grade	Merck
Acrylamid	Biorad, Hercules, USA
6-Aminohexansäure	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ammoniumacetat	Merck
APS	BioRad
Aqua bidest.	Millipore Wasser
AuroDye	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
5-Bromo-4-chlor-3-indolyl phosphat Kaliumsalz	BioRad
Bromphenolblau	Merck
Bromelain N-Glycan	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. F. Altmann, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich
BSA	Pierce, Rockford, USA
BSA, Bromelain N-Glycan konjugiert	Prof. Dr. F. Altmann
Calciumcarbonat	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chemikalien für die Proteinsequenzierung	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Chloroform	Merck

Concert Rapid Plasmid Miniprep System	GIBCO Brl, Eggenstein, Deutschland
Coomassie Protein Reagenz	Pierce
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy Zimtsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker VII	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTPs	Amersham
DTT	Merck
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (absolut)	Merck
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin	Merck
Gold, Partikelgröße 0,8 – 1,5 µm	ChemPur, Karlsruhe, Deutschland
HBSS-Puffer	PAA, Linz, Österreich
IL-4 Eli-pair Kit	Diaclone, Besancon, Frankreich
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
MACS basophil isolation kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Milchsäure	Merck
Natriumborhydrid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
N-Glycosidase A	Roche
Nitro Blue Tetrazolium Chlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pGEM-T Kit	Promega
p-Nitrophenylphosphat	Merck
PCR-Puffer	Amersham Biosciences
Plant DNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyridin	Merck

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RPMI-Medium	Biochrom
Saccharose	Merck
Salzsäure, 1 M	Merck
SDS	BioRad
Spermidin	Merck
Taq-Polymerase	Amersham Biosciences
TEMED	BioRad
TFA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris	Serva
Tween 20	Merck

2.1.2 Antikörper

Maus anti-human IgE, markiert mit Alkalischer Phosphatase (AP)	Allergopharma, Reinbek, Deutschland
AP-markierte Ziege anti-human IgG (gesamt),	Pharmingen, San Jose, USA
AP-markierter Ziege anti-Maus IgG+M	Pharmingen
AP-markierte Ziege anti-human IgG4	Pharmingen
gegen Phl p 1 gerichtete monoklonale Antikörper Bo 14, HB 7, IG 12	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Arnd Petersen

2.1.3 Enzyme und Lectine

Aleuria aurantia Agglutinin (AAA)	Vector, Burlingame, USA
N-Glycosidase A	Roche
Trypsin, sequencing grade	Roche
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Roche

2.1.3.1 Endonucleasen

Hind III	Roche
Pst I	Roche
Sac I	Roche
Xba I	Roche

2.1.4 Primer

Aus der bekannten cDNA-Sequenz des Phl p 1 wurden zwei Primer abgeleitet, an die *Xba I* bzw. *Sac I* Schnittstellen (jeweils unterstrichen) angehängt wurden.

P1foXba:

5′ GCG CTC TAG AAT GGC TTC TTC CTC ATC G 3′

P1reSac:

5′ GCG CGA GCT CTG AAG GAT CCA TTG ATG G 3′

35s:

5′ CCA AGC TTG AAT TCC CAT GG 3′

2.1.5 Plasmide

Zur Erstellung eines Konstruktes für die transiente Transformation von Tabakblättern wurden zwei Ausgangsplasmide verwendet: 35s, ein Plasmid auf Basis von pBLUESCRIPT SK+, von welchem lediglich der dort einklonierte CaMV 35s-Promotor verwendet wurde, und pUbi.cas (pUC19-Basis) mit Ubiquitin-Promotor, nos-Terminator und Ampicilin-Resistenz. Als Kontrolle für die Transformationsexperimente diente das Plasmid pmon30049, ebenfalls mit dem 35s-Promotor und dem nos-Terminator und dem Gen für das Green-Fluorescent-Protein (GFP). Die drei Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Wienand, Dr. R.

Brettschneider und Dr. K. Frenzel (Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen II, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.
Für das durchgeführte TA-Cloning wurde das Plasmid pGEM-T aus dem pGEM-T Kit (Promega) verwendet.

2.1.6 Seren

Alle verwandten Seren stammten von Patienten, welche über die Art der anstehenden Versuche aufgeklärt worden waren und die ihre Zustimmung erteilt hatten.
Die Seren wurden freundlicherweise von Frau Dr. U. Lepp (Medizinische Klinik Borstel, Borstel), Herrn Dr. Grabbe (Hautklinik, Medizinische Universität Lübeck) oder Herrn Dr. H. Aulepp (Krankenhaus Borkum Kliff, Bundesversicherungsanstalt, Borkum) zur Verfügung gestellt.
UniCap-Klassen wurden mit dem entsprechenden Test (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Schweden) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Angegebene Allergien der Patienten waren zudem in jedem Fall durch Pricktest (Hauttest) und Anamnese bestätigt worden.

2.1.7 Allergenmaterial

Lieschgraspollen für die Extraktherstellung wurde von der Firma Artu Biologicals, Lelystad, Niederlande bezogen.

2.2 Proteinbiochemische, physikochemische und immunologische Methoden

2.2.1 Herstellung von Lieschgras-Pollenextrakt

Extraktionspuffer:
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,0

Lieschgraspollen wurde für 30 min bei 37 °C in Extraktionspuffer (30 ml / 1,2 g Pollen) auf einem Schüttler inkubiert und für 10 min bei 17000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend filtriert (0,45 µm Porengröße), über Nacht gegen Aqua bidest. dialysiert und in der Gefriertrocknungsanlage (LyoVac GT 2, Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland) getrocknet.

2.2.2 Isolierung von Proteinen aus Tabakblättern

Extraktionspuffer:
0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
10 mM Magnesiumchlorid
18 % (w/v) Saccharose
40 mM 2-Mercaptoethanol

Die Isolierung von Proteinen aus Blättern erfolgte modifiziert nach Nelson et al. (1984).
Junge Tabakblätter wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörser zu feinem Puder zermahlen. Anschließend wurde eine geeignete Menge Extraktionspuffer (1 ml pro Blatt) zugeben und das Gemisch nach dem Auftauen für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. 1 ml Aliquots wurden abgenommen und bei 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.3 Aufreinigung des natürlichen Phl p 1

Natürliches Phl p 1 wurde nach der Methode von Suck et al. (1999) aufgereinigt. Dabei wird der Gesamtextrakt (s. **2.2.1**) zunächst über Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) aufgetrennt. Das nPhl p 1 verbleibt dabei zusammen mit einigen weiteren Allergenen im Durchlauf. Dieser wird im Anschluss mittels Gelfiltration weiter aufgetrennt. Dabei wird das nPhl p 1, frei von weiteren Proteinen, erhalten.

2.2.4 Bestimmung von Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit Coomassie Reagenz mittels der Bestimmung der Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einer durch Referenzverdünnungen von BSA hergestellten Eichreihe.

2.2.5 Enzymatische Spaltungen

2.2.5.1 Tryptischer Verdau von natürlichem Phl p1

Inkubationspuffer:
50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
5 mM Calciumchlorid

0,5 mg natürliches Phl p 1 wurden in 100 µl Inkubationspuffer gelöst und mit 25 µg Trypsin (sequencing grade), also im Mengenverhältnis (Phl p 1 : Trypsin) 20:1, über Nacht zu tryptischen Peptiden abgebaut. Im Anschluss an den Verdau wurde noch vorhandenes Trypsin durch Erhitzen auf 97 °C für 5 min inaktiviert und der Ansatz in der SpeedVac SPD12P (Thermo-Savant, Holbrook, USA) vollständig getrocknet (ca. 2 h).

2.2.5.2 Tryptischer Verdau von Lieschgras-Pollenextrakt

Inkubationspuffer:
50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Ca. 350 mg Lieschgras-Pollenextrakt (Trockengewicht) wurden in 3 ml Inkubationspuffer gelöst und mit 1 mg Trypsin versetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Noch vorhandenes Trypsin wurde durch Erhitzen im kochenden Wasserbad für 5 min inaktiviert und der Ansatz gefriergetrocknet.

2.2.5.3 Spaltung mit N-Glycosidase A

Inkubationspuffer:
0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,6

Glycopeptid isoliert aus 0,5 mg natürlichem Phl p 1 wurde in 20 µl Inkubationspuffer mit 0,5 mU N-Glycosidase A bei 37 °C für 48 h gespalten und anschließend in der SpeedVac getrocknet.

2.2.6 Chromatographie

2.2.6.1 Gelfiltration

Laufpuffer:
50 mM Pyridin / Acetat, pH 5

Bei der Gelfiltration wird die Probe über ein Gelbett (z.B. aus Agarose vernetztem Dextran) aufgetrennt. Je kleiner und kompakter ein Molekül ist, desto tiefer kann es selbst in die feinsten Poren der Gelmatrix eindringen und desto länger dauert sein Lauf durch das Gel. D.h. die Gelfiltration trennt kleine und kompakte Moleküle von großen und sperrigen. Zwei globuläre Proteine von unterschiedlichem Molekulargewicht würden ebenso durch eine geeignete Gelmatrix voneinander getrennt wie ein langkettiges Polysaccharid von einem globulären Protein mit gleichem Molekulargewicht.

Zur Trennung der Fragmente nach Verdau von Lieschgras-Pollenextrakt (360 mg Trockenmasse) wurde eine 120 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 2,4 cm mit einem Sephadex G50-Superfine Gelbett (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Das Nachlaufen des Puffers erfolgte über Schwerkraft aus einem Puffertank. Der Lauf wurde über ein Differential-Refraktometer Typ 198 (Knauer, Bad Homburg, Deutschland) mit angeschlossenem Schreiber verfolgt. Fraktionen wurden im Abstand von 100 Tropfen gesammelt, nach Peaks gepoolt und gefriergetrocknet. Das Trockengewicht der Poolfraktionen wurde auf einer Feinwaage bestimmt.

2.2.6.2 HPLC

Alle HPLC-Trennungen wurden mit einem ÄktaPurifier 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

2.2.6.2.1 Reverse Phase Trennungen

Reverse Phase Medien gehen mit den Molekülen der aufzutrennenden Probe hydrophobe Wechselwirkungen ein, welche diese an die Matrix des Mediums binden. Typischerweise handelt es sich bei dieser Matrix um Alkylketten mit einer Länge von C4 bis C18. Wird nun der organische Anteil des Laufpuffers (meist eine Mischung von Acetonitril mit einem wässrigen Puffer) in einem Gradienten erhöht, so wird für jedes Molekül schließlich ein Punkt erreicht, an dem es nicht mehr erfolgreich mit dem nun hydrohoberen Puffer um die Bindungsstellen auf der Matrix konkurrieren kann und eluiert wird. Durch geeignete Wahl von Matrix (Säule), Lösungmittel / pH-Wert und Gradient kann so insbesondere für Peptide eine die meisten anderen chromatographischen Methoden weit übertreffende Auflösung erzielt werden.

Das tryptisch verdaute nPhl p 1 wurde auf einer HyPURITY C18 Elite Reverse Phase Säule (Thermo-Hypersil Keystone, Bellefonte, USA) aufgetrennt. Als Lösungsmittel A diente Millipore Wasser (0,22 µm gefiltert) mit 0,1 % (v/v) TFA, als Lösungsmittel B 80 % Acetonitril, isocratic grade in Millipore Wasser mit 0,08 % (v/v) TFA. Es wurde ein dreistufiger Gradient angelegt: 0 – 8,5 % B in 10 min; 8,5% - 42 % B in 142 min und 42 % - 60 % B in 40 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die UV-Absorption wurde bei 214, 254 und 280 nm gemessen, Fraktionen im zeitlichen Abstand von 1 min gesammelt. Für die Identifizierung von Glycopeptiden wurden alle Peptid-haltigen Fraktionen in der SpeedVac

getrocknet. Bei späteren Läufen wurden nur noch die Glycopeptid enthaltenden Fraktionen vereinigt und getrocknet.
Die Reinheit des isolierten Glycopeptids wurde auf einer Source 5 µ RPC Reverse Phase Säule (Amersahm Biosciences, Uppsala, Schweden) überprüft. Hierzu wurde ein linearer Gradient (0 – 100 % B in 120 min mit einer Flussrate von 1 ml/min) verwendet, mit 2 % Acetonitril in 20 mM Ammoniumacetat (pH 7) als Lösungsmittel A und 70 % Acetonitril in 20 mM Ammoniumacetat (pH 7) als Lösungsmittel B.
Der Ansatz der Spaltung mit N-Glycosidase A wurde wieder auf der HyPURITY C18 Säule aufgetrennt, mit einem linearen Gradienten von 0 – 100 % B in 100 min bei einer Flussrate von 1 ml/min, mit Millipore Wasser als Lösungsmittel A und 80 % Acetonitril als Lösungsmittel B. Peptid-haltige Fraktionen wurden in der SpeedVac getrocknet.

2.2.7 Neutralzuckeranalyse

Bei der für die vorliegenden Arbeit angewandten Form der Neutralzuckeranalyse wurden die zu bestimmenden Kohlenhydrate durch saure Hydrolyse mit TFA in Monosaccharide gespalten und danach durch Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließende Peracetylierung in gaschromatographisch trennbare Alditolacetate überführt. Die Alditolacetate der verschiedenen Monosaccharide wurden dann in einem Gaschromatographen mit angeschlossenem Massenspektrometer bestimmt (nach Kawahara et al., 2000).
Die mittels HPLC isolierten Peptide aus 0,5 mg natürlichem Phl p 1 wurden zunächst in 3 M TFA für 4 h bei 100 °C inkubiert und dann in der SpeedVac getrocknet. Die Proben wurden über Nacht mit 0,3 M Natriumborhydrid reduziert und anschließend mit 1 M Salzsäure angesäuert, getrocknet und dreimal mit 5 % Essigsäure in Methanol gewaschen und in der SpeedVac getrocknet. 50 µl Pyridin und 50 µl Acetanhydrid wurden zu den Proben gegeben und diese für 2 h bei 65 °C inkubiert und im Stickstoffstrom getrocknet. Abschließend wurden die Proben in Chloroform aufgenommen und die Zucker in einem Massenspektrometer (GC-MS HP 5989 A , Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland) bestimmt.

Die Fraktionen aus der Gelfiltration des tryptischen Verdaus von Gesamtextrakt wurden auf die gleiche Weise analysiert. Jeweils 1/100 der entsprechenden Fraktion wurde für die Neutralzuckerbestimmung eingesetzt.

2.2.8 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung beruht auf dem Edman Abbau. Dabei wird die jeweils N-terminale Aminosäure des zu analysierenden Proteins mit Phenylisothiocyanat (PITC) umgesetzt, so dass ein Phenylthiocarbamyl-derivatisiertes Protein entsteht. Die erste Aminosäure wird dann mit TFA als Anilinothialinon-Derivat (ATZ-Aminosäure) abgespalten, mit N-Butylchlorid extrahiert und mit 25 % TFA/Wasser in ein Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Aminosäure) überführt. Dieses wird über eine Reverse-Phase Säule (C18) getrennt und bei 270 nm detektiert. Über den Vergleich mit einem PTH-Aminosäure Standard kann dann die entsprechende Aminosäure bestimmt werden. Der Zyklus des Edman Abbaus wird immer mit dem jeweils um eine Aminosäure verkürzten N-Terminus des Proteins wiederholt und so die Sequenz bestimmt.
Die Proben wurden auf einem 467 A Protein Sequencer mit Online PTH Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben sequenziert.

2.2.9 Massenspektrometrie

2.2.9.1 MALDI-TOF Analysen

Bei der „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie werden die Probenmoleküle mit einem Laserimpuls im Vakuum verdampft (dabei zugleich ionisiert) und mittels einer angelegten Spannung beschleunigt. Nach einer genau definierten Flugstrecke wird ihr Auftreffen von einem Detektor registriert. Die für die Flugstrecke erforderliche Zeit ist dabei abhängig von der Masse und Ladung der entsprechenden Ionen. Durch Eichung des Gerätes mit Molekülen bekannter Masse kann die Masse der Probenmoleküle dann über ihre Flugzeit sehr genau bestimmt werden.

MALDI-TOF MS wurde auf einem Reflex III (Bruker-Daltonik, Bremen, Deutschland) in linearer- and reflector-TOF Konfiguration durchgeführt mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Die Proben wurden in einem 2 : 1 Gemisch aus 0,1 % TFA und Acetonitril gelöst und mit gesättigter Matrix-Lösung (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-Zimtsäure, SA, in 0,1 % TFA mit Acetonitril) kokristallisiert. 0,5 µl Aliquots der Proben wurden auf einem metallischen Probenträger im Luftstrom getrocknet und sofort nach Verdunstung des Lösungsmittels analysiert. Die Spektren sind das Resultat aus mindestens 50 einzelnen Laserpulsen mit anschließenden Messungen. Eine externe Massenskalenkalibrierung wurde mit einer Mischung aus Peptiden bekannter Massen vorgenommen.

2.2.9.2 ESI-FT-ICR

Bei der Elektrospray Ionisation (ESI) wird die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel bei möglichst niedrigen Flussraten durch eine geladene Kapillare gedrückt. An der Spitze erzeugt das hohe elektrische Feld aus dem Flüssigkeitsstrom einen Nebel von feinsten geladenen Tröpfchen. Diese werden in einem doppelten Gradienten von Spannung und abnehmendem Druck (bis zum Vakuum) beschleunigt. Dabei verringert sich das Volumen der Tröpchen durch Verdunstung des Lösungsmittel und „Coulomb Explosion“ beständig. (Unter letzterem versteht man ein Auseinanderplatzen, wenn die Ladungsdichte der sich verkleinernden Tröpchen die Kohäsion des Lösungmittels übersteigt.) Schlussendlich bleiben nur die ionisierten Probenmoleküle übrig, welche massenspektrometrisch bestimmt werden können.

Die Masse des N-Glycosidase gespaltenen Glycopeptids wurde unter Benutzung eines APEX II Elektrospray Fouriertransformations Ionen Cyclotron Resonanz (ESI-FT-ICR) Massenspektrometers (Bruker-Daltonik, Billerica, USA) ausgerüstet mit einem 7 Tesla aktiv abgeschirmten Magneten und einer Apollo Ionenquelle bestimmt. Dieses Gerät erlaubt es, die Probenionen in einer sog. „Ionenfalle“ zu halten und selektiv bestimmte Ionen für MS/MS Analysen zu entlassen. Die Proben wurden in einem 50 : 50 : 0,001 (v/v/v) Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure mit einer Flussrate von 2 µl/min eingesprüht. Die MS/MS Analysen wurden über ein doppelt protoniertes Ausgangsion und „sustained off-resonace irradiation - collision-induced dissociation (SORI-CID) mit Argon als Kollisionsgas durchgeführt. Bei Zusammenstößen des Ausgangsions mit dem Kollisionsgas kommt es zur Fragmentierung in Tochterionen, wobei N- oder C-terminal fragmentierte Ionen entstehen können. Diese Fragmente werden bezeichnet mit den Buchstaben **b** bzw. **y** für N- bzw. C-

terminale Abbrüche sowie einer laufenden Nummer, welche angibt, wie viele Aminosäuren im Fragment enthalten sind. Fragment **y12** ist also ein Fragment dem C-terminal 2 Aminosäuren (bei einem „parent-ion“ (Ausgangsion) von 14 Aminosäureresten) fehlen.

Zur leichteren Interpretation wurden die Spektren ladungsbereinigt, d.h. alle Peaks wurden auf eine einheitliche Ladung umgerechnet. Eine solche Umrechnung ist notwendig, da sich bei dieser Art der Massenspektrometrie unterschiedlich geladene Ionen des selben Moleküls bilden können, die jeweils unterschiedliche Flugzeiten haben. Der an das Massenspektrometer angeschlossene Rechner kann entscheiden, ob es sich bei zwei Peaks nur um unterschiedlich geladene Formen des gleichen Moleküls/Fragments handelt, da sich die zu analysierenden Ionen in ihrer Flugzeit proportional sowohl zu ihrer Masse als auch zu ihrer Ladung verhalten.

2.2.10 Western Blots

Unter dem Western Blot versteht man eine Kombination aus SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Übertragen der getrennten Proteine auf eine geeignete Membran (eigentlicher Blot).

2.2.10.1 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt das Auftrennen von Proteingemischen nach den Massen der einzelnen Komponenten. Dabei werden alle Proteine durch das ionische Detergenz SDS mit einer negativen Ladung versehen und wandern im elektrischen Feld durch eine Polyacrylamid-Matrix in die gleiche Richtung. Die Gel-Matrix wird durch eine TEMED- und APS-katalysierte Polymerisation einer Acrylamid-Bisacrylamid Lösung erzeugt. Für letztere wird der sog. T-Wert (Gesamtgehalt an Acrylamid und Bisacrylamid) und der C-Wert (Anteil von Bisacrylamid an der Gesamt-Acrylamidkonzentration) angegeben. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel ist proportional zum negativen dekadischen Logarithmus der Molekülmasse, d.h. kleine Proteine wandern schneller als große. Diese strikte Abhängigkeit von der Molekülmasse gilt allerdings nur, wenn die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine vorher durch reduzierende Agenzien wie DTT zerstört wird, um Einflüsse der Molekülfaltung auszuschließen.

Lieschgraspollenextrakt (6 µg pro cm Gel) wurde mittels SDS-PAGE in einem 15 %igen Polyacrylamidgel unter Benutzung des Laemmli-Puffersystems (Laemmli et al. 1970) aufgetrennt. Die Gelkassetten wurden zu ¾ mit Trenngellösung gefüllt und diese mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurden das Butanol abgegossen, die Gelkassette mit Sammelgel aufgefüllt und zur Erzeugung der Probentaschen ein Teflonkamm eingesetzt. Vor Auftrag der Proben auf das Gel wurden diese im Probenpuffer für 3 min auf 95 °C erhitzt (Denaturierung und Lösen der Disulfidbrücken). Die angelegte Spannung betrug 50 V bis die Proben die Taschen verlassen hatten, dann 100 V bis zum Verlassen des Sammelgels und schließlich 200 V bis zum Ende der Laufstrecke.

Natürliches und rekombinantes Phl p 1 (jeweils 3 µg pro cm Gel) wurden auf die gleiche Weise getrennt.

Für die Auftrennung von Proteinextrakt aus Tabakblättern wurden 100 µl Extrakt (eingesetzt worden waren 1 ml Extraktionspuffer pro Blatt) mit 100 µl Probenpuffer vermischt (bei einer Gel-Auftragslänge von 13 cm) und nach dem Erhitzen aufgetragen

Laemmli-Puffersystem für die SDS-PAGE

Probenpuffer (2X, reduzierend, pH 8,2):

20 mM Tris / HCl
2 mM EDTA
2 % (w/v) SDS
25 % (v/v) Glycerin
1 % (w/v) DTT
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (4X, pH 6,8):

0,5 M Tris / HCl

Trenngelpuffer (4X, pH 8,8):

1,5 M Tris / HCl

Elektrodenpuffer (pH 8,4):

50 mM Tris

384 mM Glycerin

0,1 % (w/v) SDS

Ansatz der Gellösung für ein 15 %iges Polyacrylamidgel:

	Trenngel	Sammelgel (4 %)
Aqua bidest.	4 ml	1,75 ml
Acrylamid (T = 40 %, C = 2,5 %)	3 ml	0,25 ml
Trenngelpuffer	1 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,5 ml
Pyronin	-	8 µl
SDS (10 %)	160 µl	50 µl
TEMED	16 µl	5 µl
APS 10 % (w/v)	100 µl	30 µl

2.2.10.2 Semi-dry Elektroblotting

Beim Semi-dry Elektroblot werden die vorher in der SDS-PAGE getrennten Proteine im elektrischen Feld auf eine Transfermembran (z.B. NC oder PVDF) übertragen. Semi-dry bedeutet dabei, dass dies nicht in einem Puffertank geschieht, sondern Membran und verwendetes Filterpapier lediglich mit den entsprechenden Puffern angefeuchtet werden.
Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porendurchmesser; Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) per Semi-dry Elektroblotting für 30 min bei 200 mA (nach Kyhse-Andersen, 1984) übertragen. Der Aufbau eines Elektroblots wird durch **Abbildung 5** veranschaulicht.

Kyhse-Andersen Puffersystem für den Semi-dry Elektroblot

Kathodenpuffer (pH 9,4):

25 mM Tris

10 % (v/v) Methanol

40 mM 6-Aminohexansäure

Anodenpuffer I (pH 10,4):

0,3 M Tris

20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

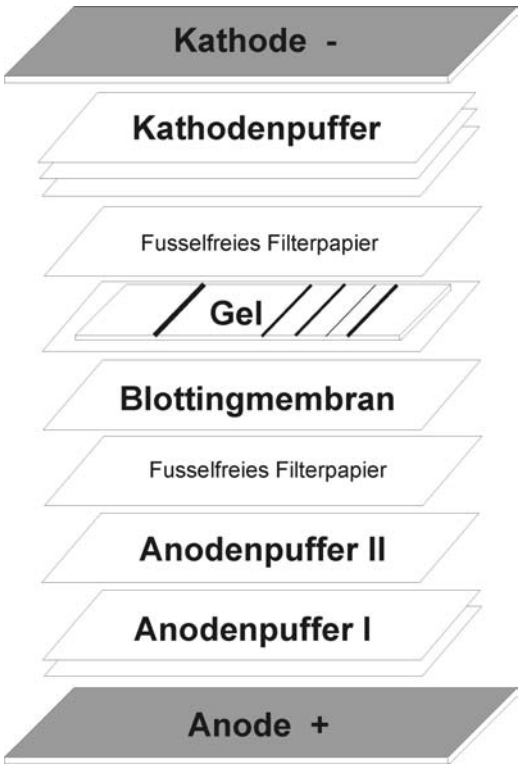


Abbildung 5: Aufbau eines Semi-Dry Elektroblots

Um die noch freien Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden die Membranen nach dem Blotting für 30 min in TBS / Tween (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 2,5 mM Magnesiumchlorid, 0,05% Tween 20, pH 7,4) inkubiert und getrocknet. Anschließend wurde die Membran für den Immunnachweis in ca. 3 mm breite Streifen geschnitten.

2.2.11 Immunologische Nachweise auf Membranen

Verwendete Puffer

TBS/Tween (pH 7,4):

0,1 M Tris
0,1 M NaCl
2,5 mM $MgCl_2$
0,05 % (v/v) Tween 20

TBS, pH 9,5:

0,1 M Tris
0,1 M NaCl
2,5 mM $MgCl_2$

Membranstreifen mit aufgetrenntem Lieschgras-Pollenextrakt, natürlichem oder rekombinantem Phl p 1 wurden über Nacht in Patientenserum (1 : 20 verdünnt in TBS/Tween) auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Streifen dreimal mit TBS/Tween gewaschen und für 2 h in Alkalische-Phosphatase konjugiertem Maus anti-human IgE (verdünnt 1 : 2000 in TBS/Tween) oder Ziege anti-human IgG4 (verdünnt 1 : 10000) inkubiert. Die Streifen wurden danach zweimal in TBS/Tween und einmal in TBS, pH 9,5 gewaschen.

Das Vorhandensein von gebundener Fucose wurde über das Alkaline-Phosphatase konjugierte Lectin *Aleuria aurantia* Agglutinin (AAA), welches spezifisch an α1-3 und α1-6 verknüpfte Fucosereste bindet, nachgewiesen. AAA wurde in einer Konzentration von 0,5 µg / ml in TBS/Tween eingesetzt, die Inkubationszeit betrug 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zweimal in TBS/Tween und einmal in TBS, pH 9,5 gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Bindungsmuster mit einer Substratlösung aus 0,033 % (w/v) Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) und 0,017 % (w/v) 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl Phosphat Kaliumsalz (BCIP) in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,5) visualisiert (Inkubationszeit ca. 5 min).

Für die Blot-Inhibitionsversuche wurden die verdünnten Seren vor der Inkubation auf der Blotting-Membran für 2 h bei 37 °C mit 5 µg / ml Bromelain N-Glycan (freundlicherweise von Prof. Dr. Friedrich Altmann, Wien zur Verfügung gestellt) versetzt und unter Schütteln inkubiert.

Die ebenfalls auf Nitrocellulose geblotteten Auftrennungen von Proteinextrakt aus Tabakblättern wurden mit den monoklonalen Antikörpern Bo 14 (gerichtet gegen den C-Terminus des Phl p 1, 1:20 verdünnt), IG 12 (bindet im mittleren Teil des Phl p 1-Moleküls, 1:200 verdünnt), HB 7 (bindet N-terminal an Phl p 1, 1:20 verdünnt) und Bo 1 (gerichtet gegen Phl p 5, 1:20 verdünnt) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti-Maus anti-IgG+M verwendet. Zum Nachweis wurde die Substratreaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.12 Inhibitions-ELISA

Beim Inhibitions-ELISA wird die Spezifität von Antikörpern in einem Patientenserum indirekt durch Präinkubation des Serums mit einer definierten Menge eines bestimmten Antigens nachgewiesen. Dazu wird zunächst das Antigen in den Vertiefungen der ELISA-Platte gebunden. Nach der Präinkubation wird die Restaktivität des Serums gegen das entsprechende Antigen bestimmt und mit der Gesamtaktivität verglichen, welche man mit nicht präinkubiertem Serum erhält. Stehen mit bestimmten Peptiden oder Glycanen definierte Epitope des Antigens zu Verfügung, so lässt sich (durch die Verwendung dieses Epitops für die Präinkubation) der Anteil des entsprechenden Epitops an der Gesamtaktivität bestimmen.

Verwendete Puffer und Lösungen

Coating-Puffer (pH 9,6):

0,1 M Natriumcarbonat

Substratlösung:

1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in TBS, pH 9,5

MaxiSorb-ELISA Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit natürlichem Phl p 1 beladen. Jede Vertiefung wurde mit 1 µg nPhl p 1 (gelöst in 150 µl Coating-Puffer) befüllt und für 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Patietenseren 1:20 in TBS/Tween verdünnt und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln mit 1 µg natürlichem Phl p 1 oder 1 µg Bromelain N-Glycan präinkubiert. Die Kontrollen wurden ohne Zugabe eines Inhibitors ebenfalls für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Coating-Lösung aus den Vertiefungen entfernt und überschüssige freie Proteinbindungsstellen durch Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit TBS/Tween mit 3 % Milchpulver (w/v) blockiert. Im Anschluss wurde der Blockierungspuffer entfernt und die Vertiefungen mit je 150 µl der vorbereiteten Patientenseren befüllt. Nach über Nacht Inkubation bei 4 °C wurden die Seren entfernt, die Vertiefungen viermal mit TBS/Tween gewaschen und mit 150 µl Alkalischer-Phosphatase gekoppeltem Maus anti-human IgE (1:2000) befüllt. Die Inkubationszeit betrug 2 h, es folgten weitere Waschschritte (3 x TBS/Tween, 1 x TBS, pH 9,5). Gebundenes IgE wurde nachgewiesen durch Farbreaktion mit 150 µl Substratlösung pro Vertiefung (bei 37 °C für 2 h inkubiert). Die Absorption wurde bei 405 nm in einem Dynatech MR-7000 ELISA-Reader (Acterna, Germantown, USA) gemessen.

2.2.13 ELISA-Untersuchungen mit Polysacchariden

Verwendete Puffer

PBS (pH 7):

0,1 M Natriumphosphat

MultiSorb ELISA-Platten (Nunc) können mit Polysacchariden gecoatet werden, da die Plattenoberfläche mit polaren Gruppen besetzt ist. Auf diese Weise ist es möglich, Seren mittels ELISA auf Antikörper gegen solche Kohlenhydrate zu untersuchen.
Die MultiSorb-Platten wurden pro Vertiefung mit je 2 µg Arabinogalactan in 100 µl PBS (pH 7) gecoatet (Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur). Überschüssige freie Bindungsstellen

wurden mit je 100 µl TBS/Tween für 1h bei Raumtemparatur blockiert. Die Vertiefungen wurden dann mit 100 µl Serum (1 : 10 in TBS/Tween verdünnt) gefüllt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen.
Im Anschluss wurde dreimal mit TBS/Tween gewaschen und für 2 h mit den jeweiligen Sekundär-Antikörpern in TBS/Tween inkubiert. Eingesetzt wurden anti-Human IgG (gesamt) und anti-human IgE (1 : 2000 verdünnt). Danach wurde dreimal mit TBS/Tween und einmal mit TBS, pH 9,5 gewaschen.
Die gebundenen Immunglobuline wurden nachgewiesen durch Farbreaktion mit 150 µl Substratlösung pro Vertiefung. Die Inkubation erfolgte über 2 h bei 37 °C und anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

2.2.14 IL-4 Freisetzung aus Basophilen

Der Versuch zur IL-4 Freisetzung aus Basophilen ist ein Funktionstest, bei dem die Fähigkeit eines potentiellen Allergens zur Quervernetzung von IgE auf den Fcε-Rezeptoren (und der damit verbundenen Freisetzung von Mediatoren) untersucht wird. Bei diesem Funktionstest werden die Möglichkeiten der passiven Resensibilisierung von Basophilen genutzt. Durch Erniedrigung des pH-Wertes werden die gebundenen Immunglobuline (z.B. IgE) von den Zellen abgelöst („strippen“). In der anschließenden Inkubation mit Patientenserum unter physiologischen Bedingungen können die Zellen dann wieder mit Antikörpern gewünschter Spezifität beladen werden. Das bedeutet, dass man nur das Serum eines Allergikers benötigt, um Versuche zur Freisetzung von Mediatoren mit den Zellen eines beliebigen, nicht allergischen Spenders durchzuführen.

Verwendete Puffer

Stripping-Puffer (pH 5):

10 mM Milchsäure
140 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumchlorid

Basophile eines nicht atopischen Donors wurden aus EDTA-Blut über Ficoll Dichtezentrifugation und anschließende Gegenstromelutriation isoliert, wie bereits beschrieben (Haisch et al., 1999). Weitere Aufreinigung der Zellen wurde erreicht durch das MACS basophil isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland), nach Anleitung des Herstellers, allerdings ohne Zugabe von EDTA zum mitgelieferten PBS-PSA Puffersystem. Die Wirkung des Kits basiert auf einer negativen Selektion der Basophilen: Durch eine Kombination von Antikörpern gegen auf den Basophilen nicht vorhandene Oberflächenfaktoren (z.B. CD3 und CD7) werden alle anderen Zelltypen an eine Säule gebunden, während sich die Basophilen im Durchlauf befinden. Zellzahl und Reinheit wurden durch Trypanblau-Färbung und Auszählung in einer Neubauer Kammer überprüft.

Das Strippen der Basophilen von IgE wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Pruzansky et al. (1983) durchgeführt: Die Zellen wurden in 200 µl kaltem Strpping-Puffer resuspendiert und 3 min auf Eis belassen, wobei jede Minute vorsichtig aufgeschüttelt wurde. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 4 ml HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 0,25 % BSA neutralisiert.

Die Basophilen wurden mit den Seren W, Bo220 oder PG jeweils 1 : 10 in RPMI-Medium (mit Penicilin-Natriumsalz 100 U / ml, Streptomycin-Sulfat 100 µg / ml und 10 % FCS) verdünnt, resensibilisiert und in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit durchstochenem Deckel für 1 h bei 37 °C in 6 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Nach abgeschlossener Resensibilisierung wurde jeweils ein Aliquot der Zellen erneut in der Neubauer Kammer ausgezählt, ebenso wie Aliquots nativer Donorzellen und nicht resensibilisierter Zellen. Je 2500 Zellen wurden in den Vertiefungen einer TC Microwell 96U Platte (Nunc, Roskilde, Dänemark) stimuliert durch Zugabe von je 14 nmol Bromelain N-Glycan konjugiertem BSA (5 – 6 Liganden pro Molekül, freundlicherweise von Prof. Dr. Friedrich Altmann zur Verfügung gestellt), natürlichem Phl p 1 (1 N-Glycan pro Molekül) oder rekombinantem Phl p 1 (keine Kohlenhydratbestandteile). Als Kontrollstimulantien (Positivkontrollen) dienten Maus anti-human IgE und *Schistosoma*-Ei-Antigen (SEA). Als weitere Kontrollen (Negativkontrollen) wurden auch native (nicht gestrippte) Donorzellen und gestrippte aber nicht resensibilisierte Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 6 % CO_2-Atmosphäre inkubiert.

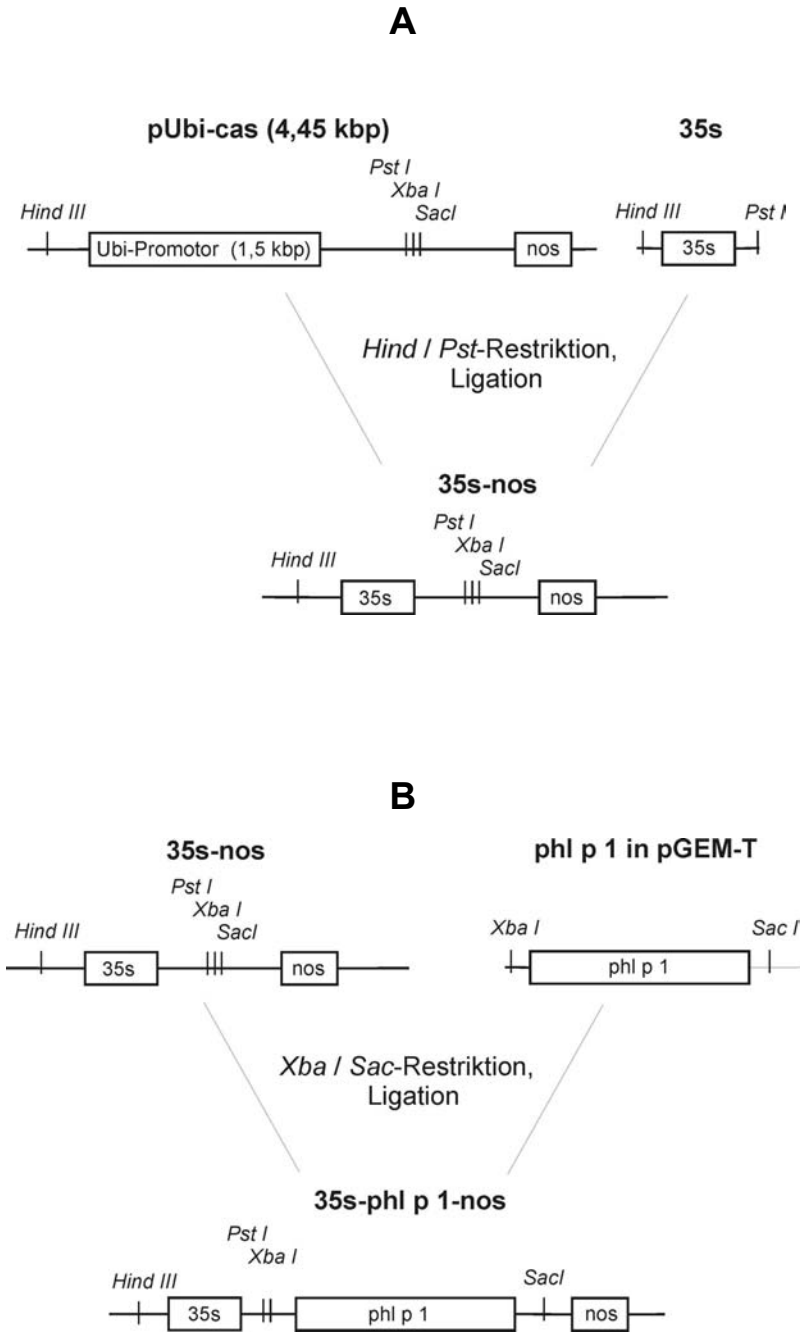
Die Auswertung der IL-4 Freisetzung erfolgte mit dem IL-4 Eli-pair Kit (welches über den Einsatz von Peroxidase-markierten anti-IL-4 Antikörpern wirkt) nach Herstellerangaben in einer MaxiSorb ELISA-Platte (Nunc) unter Verwendung eines MRX-ELISA Readers (Acterna, Germantown, USA).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Klonierungsstrategie

Um eine hohe, Gewebe-unspezifische Expression des Gens phl p 1 zu erreichen, wurde das Konstrukt zur transienten Transformation von Tabakblättern mit dem 35 s-Promotor des Blumenkohl Mosaic Virus (CaMV 35s-Promotor; Odell et al., 1985) sowie dem Terminator des Nopalin Synthase Gens (nos-Terminator, Severin und Schoffl, 1990; Depicker et al., 1982) ausgestattet.

Für das Erstellen des Konstruktes wurden zwei Plasmide verwendet. Aus dem einen (35s) wurde lediglich der dort einklonierte 35s-Promotor über Restriktion mit *Hind III* und *Pst I* herausgeschnitten, wohingegen das Restplasmid verworfen wurde. Aus dem anderen Plasmid (pUbi.cas) wurde der enthaltene Ubiquitin-Promotor ebenfalls über Restriktion mit *Hind III* und *Pst I* entfernt und durch den 35s-Promotor ersetzt. In das entstandene Plasmid, 35s-nos benannt, sollte anschließend das Gen phl p 1 einkloniert werden. Dieses wurde über PCR direkt aus dem Lieschgras-Genom erhalten, wobei zugleich Schnittstellen für *Xba I* und *Sac I* angefügt wurden. Dem phl p 1 wurde dabei seine natürliche Leader-Sequenz belassen, um eine Expression im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und damit über Prozessierung im ER und im Golgiapparat eine Glycosylierung zu erreichen. Um die Effizienz zu erhöhen, wurde phl p 1 nach der PCR-Reaktion zunächst über ein TA-Cloning in das Plasmid pGEM-T (Promega) eingefügt und dieses vermehrt. Anschließend wurde das phl p 1-Gen in den 35s-nos Vektor subkloniert. Die Klonierungsstrategie ist in **Abbildung 6** dargestellt.



<u>Abbildung 6:</u> Klonierungsstrategie zur Herstellung des Konstruktes für die transienten Transformation von Tabakblättern

A: Herstellung des Vektors 35s-nos

B: Subklonierung des Gens phl p 1 in den Vektor 35s-nos

Ubi-Promotor: Ubiquitin.Promotor; 35s: 35s-Promotor; nos: nos-Terminator

2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen

Bei dieser Methode wird die Zellmembran von *E. coli* Zellen durch Inkubation in eiskaltem destilliertem Wasser soweit durchlässig gemacht (wobei auch störende Ionen entfernt werden), so dass die Zellen durch Anlegen eines kurzen Spannungsimpulses dazu gebracht werden können, Plasmide aufzunehmen (Elektroporation).

Verwendete Lösungen und Medien

LB-Medium (tet):

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
(autoklaviert)
12,5 µg/ml Tetracyclin

Glycerinlösung:

10 % (v/v) Glycerin in Aqua bidest. (sterilfiltriert)

20 µl LB-Medium (tet) wurden von einer Platte mit *E. coli* XL1-Blue beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium (tet) gegeben und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer Zelldichte von 0,75 bei einer OD_{600} kultiviert. Die Kultur wurde unter ständigem Schwenken im Eisbad abgekühlt und bei 4000 x g für 10 min bei 0 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml eiskaltem Aqua bidest. (steril) resuspendiert und wie oben zentrifugiert, anschließend in 200 ml Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1 ml Glycerinlösung aufgenommen und die Zellen in 50 µl Aliquots bei –80 °C eingefroren.

2.3.3 Transformation von *E. coli* XL1-Blue

Verwendete Lösungen und Medien

LB-Medium (amp/tet):

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
für Platten 1,6 % (w/v) Agar
(autoklaviert)
100 µg/ml Ampicilin
12,5 µg/ml Tetracyclin

SOB Medium:

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
10 ml 250 mM KCl
mit HCl auf pH 7,0 eingestellt
ad 500 ml mit Aqua bidest.
(autoklaviert)

SOC Medium:

99 ml SOB Medium
1 ml 2 M Glucoselösung (sterilfiltriert)
2 µl 1 M $MgCl_2$ (sterilfiltriert)

Die Transformation der *E. coli* XL1-Blue Zellen erfolgte mittels Elektroporation in einem Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF mit 0,1 µg DNA. Verwendet wurden 50 µl elektrokompetente Zellen in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (Biorad). Die bei –80 °C gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mittels eines 4,5 msec (+/- 0,2 msec) Pulses transformiert. Sofort im Anschluss an den Puls wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler

inkubiert. Je 100 bzw. 900 µl der in SOC-Medium inkubierten Zellen wurden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.4 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* XL1-Blue

20 ml LB-Medium (amp/tet, s. **2.3.3**) wurden mit gewünschten Klonen von den Selektionsplatten beimpft und anschließend über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmide wurden mit dem Concert Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco BRL) nach Herstellerangaben isoliert.

Wurden grössere Mengen an DNA benötigt, wurde das entsprechende Plasmid mittels MIDI Kit (Qiagen) aus 25 ml Medium isoliert.

2.3.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die entsprechende Probe 1:100 mit Aqua bidest. verdünnt (Endvolumen 200 µl) und die Konzentration mit einem Genequant Photometer (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.3.6 Restriktion von Plasmiden

Alle Plasmid-Restriktionen wurden in einem Endvolumen von 20 µl mit vom Hersteller gelieferten Restriktionspuffern und jeweils 1 µl der entsprechenden Enzymlösung bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 90 min durchgeführt.

Hind III / *Pst I* Restriktion:	Puffer H (Roche)
Xba I / *Sac I* Restriktion:	Puffer A (Roche)

2.3.7 DNA-Auftrennung und Elution von DNA aus Agarose Gelen

Analog zur Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE wird bei dieser Methode die DNA über eine Agarose-Matrix getrennt. Da DNA als schwache Säure in einem basischen Puffer einheitlich negativ geladen vorliegt, kann auf die Zugabe von SDS-ähnlichen Substanzen verzichtet werden. Um die DNA nach Abschluss des Laufs sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugegeben, welches mit der DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

Verwendete Puffer und Lösungen

TAE (50X, pH 7,5):
484 g Tris
80 ml EDTA-Lösung
ad 1000ml

EDTA-Lösung (pH 8,0):
0,5 M EDTA

Ethidiumbromid-Lösung (10000 X):
10 mg Ethidiumbromid /ml Auqua bidest.

DNA-Auftrennungen erfolgten über 1 % Agarose Gele (in TAE Puffer 1X, 0,1 ‰ Ethidiumbromid-Lösung) bei einer Spannung von 90 V. Als Längenmarker wurde der DNA Molecular Weight Marker VII (Roche) verwendet. Die Bandenmuster wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.
Gewünschte Banden wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben eluiert.

2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligationsreaktion wurde das Insert, welches sich durch die Überhänge der entsprechenden Schnittstellen der Restriktiosenzyme bereits in den Vektor reversibel eingesetzt hatte, durch das Enzym T4-Ligase fest eingebaut.
Ligationen wurden mit dem Ligation Express Kit (Clontech) nach Herstellerangaben mit einem Verhältnis Vektor : Insert von 1 : 3 durchgeführt.

2.3.9 DNA-Isolierung aus Lieschgras-Blütenständen

Ausgangsmaterial für die DNA-Isolation waren bei –80 °C tiefgefrorene Lieschgras-Blütenstände. 100 mg Material wurden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen und nach vollständiger Verdunstung des Stickstoffs zu feinem Pulver zermahlen. Die Extraktion erfolgte mit dem Plant DNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.3.10 PCR mit DNA aus Lieschgras-Blütenständen

Um das Gen phl p 1 mit angefügten Xba I und Kpn I Schnittstellen zu erhalten, wurde eine PCR mit DNA aus dem Lieschgras-Blütenstand und den Primern P1foXba und P1reSac in einem 100 µl Ansatz durchgeführt. Die Primer waren so gewählt, dass die natürliche Leadersequenz des Gens erhalten blieb, um das ER als Expressionsort festzulegen.

Ansatz:

10 µl oder 2 µl DNA	(ca. 600 µg/ml)
10 µl Puffer (10X)	(Pharmacia)
2 µl DNTPs (100 µM)	(Pharmacia)
1 µl P1foXba	(100 pmol)
1 µl P1reSac	(100 pmol)
0,5 µl Taq-Polymerase	(Pharmacia)
ad 100 µl H_2O	(steril)

Programm:

1. Denaturierung:			
30 Zyklen:	95 °C	0,5	min
	60 °C	0,5	min
	72 °C	1	min
letzte Elongation:	72 °C	9	min

Im Anschluss an die Reaktion wurden die Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Kontrolle über 1 % Agarose aufgetrennt.

2.3.11 TA-Cloning

Das TA-Cloning erlaubt das Einklonieren von frischen PCR-Produkten direkt in einen entsprechenden Vektor. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass bei der PCR ein Überhang von einem ungepaarten Adenin an beiden Enden des Produktes erzeugt wird. Die kommerziell erhältlichen TA-Vektoren enthalten an der Klonierungsstelle dementsprechend ein einzelnes ungepaartes Thymin und gebundene Topoisomerase. Über die Basenpaarung zwischen Thymin und Adenin wird das PCR-Produkt in den Vektor eingefügt und die an den Vektor gebundene Topoisomerase ligiert Insert und Vektor.
Das TA-Cloning wurde mit dem pGEM-T Kit (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. XL1-Blue Zellen wurden mit den entstandenen Plasmiden transformiert und das Blau-Weiss-Screening erlaubte die Identifikation positiver (Insert enthaltender) Klone.

2.3.12 Blau-Weiß-Screening

Plasmide, die ein Blau-Weiss-Screening ermöglichen, enthalten das bakterielle lac-Operon, welches einer transformierten Zelle die Verstoffwechselung von Lactose über das Enzym β-Galactosidase erlaubt. Nimmt das entsprechende Plasmid ein Insert auf, so wird das lac-Operon zerstört und die transformierten Zellen verlieren die oben genannte Fähigkeit. Setzt

man dem Selektionsmedium einen Farbstoff zu, der sich nach Spaltung durch β-Galactose blau färbt, sind die Kolonien mit Plasmiden ohne Insert (intaktem lac-Operon) blau, solche mit Insert weiß. Das Blau-Weiss-Screening erlaubt so die Selektion Insert-positiver (weißer) Klone.

Verwendete Lösungen

IPTG-Lösung:

0,238 g IPTG / 10 ml Aqua bidest. (= 0,1 M)

X-Gal-Lösung:

2 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid

Beim Blau-Weiss-Screeing wurden vor dem Ausplattieren der transformierten Zellen je 1 ml IPTG-Lösung zusammen mit 1 ml X-Gal Lösung auf die LB-Platten (amp/tet) ausgestrichen.

2.3.13 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit einem AbiPrism 377 Automated Sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, USA) nach Herstellerangaben.
Das Sequenzierungsprinzip beruht darauf, dass eine PCR mit dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt als Template durchgeführt wird. Ein Anteil von jedem Desoxribonucleotid (dNTP) ist dabei als Di-Desoxyribonucleotid (ddNTP) vorhanden, was bei dem entsprechenden Einbau zum Kettenabruch führt. Zusätzlich ist jedes der vier ddNTPs (z.B. ddCTP) mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Trennt man die Probe nun durch ein hochauflösendes Gel, so kann man detektieren, welcher Farbstoff (an das Ende des DNA-Stranges gebunden) bei einer bestimmten Größe des über PCR synthetisierten Moleküls aus dem Gel austritt. Tritt bei Kettenabbruch nach 15 Nukleotiden beispielsweise der für das ddGTP spezifische Farbstoff aus, so befindet sich an Position 15 der Sequenz ein GTP. Auf diese Weise lässt sich sukzessive die Sequenz der DNA aus der Abfolge der Fluoreszenzsignale herauslesen.

Die PCR-Reaktion wurde mit 8 µl Sequenzierungspremix, ca. 1 µg Template-DNA und 5 pmol des entsprechenden Primers in einem 20 µl Ansatz durchgeführt.
Das Programm lautete dabei wie folgt:

Denaturierung:	96 °C	0,5 min
Annealing:	58 °C	0,5 min
Extension:	60 °C	4 min

Vor Auftrag auf das Sequenzierungsgel wurden die Proben über CentriSep Spin Säulen (Princeton Separations) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.3.14 Transformation von Tabakblättern mittels Genegun

Bei dieser Methode wird die DNA (das Plasmid) mit dem zu exprimierende Gen an feine Goldpartikel gebunden. Über Druckluft werden diese Goldpartikel anschließend in Zellen geschossen. Einige dieser Partikel gelangen in den Zellkern, wo das (mit einem entsprechenden Promotor versehene) Gen dann exprimiert wird. Dabei ist es wichtig, die entsprechenden Zellen nicht zu stark zu schädigen, da diese sonst nach dem Beschuss absterben.

Verwendete Lösungen und Medien

Nährmedium für Tabakpflanzen:

4,4 g Murashige-Skoog-Medium (siehe Dixon, 1985)
30 g Saccharose
ad 1 l mit Aqua bidest.
pH 6,0 mit KOH eingestellt

Goldsuspension:

40 mg Gold / ml in Aqua bidest.

Calciumchloridlösung:

2,5 M in Aqua bidest.

Spermidinlösung:

0,1 M in Aqua bidest

Für die transiente Transformation von Tabakblättern mit dem 35s-phl p 1-nos Konstrukt wurde zunächst Tabak steril angezogen. Nach ca. 3 Wochen in der Klimakammer bei 24 °C mit einer hell / dunkel Periodik von 16h / 8 h waren die Blätter bereit für den Versuch.
Die Beschichtung der Goldpartikel mit DNA und der nachfolgende Beschuss der Blätter wurden nach dem Protokoll der Firma Biorad (Hercules, USA), modifiziert nach Becker et al. (1994) durchgeführt. Zu 50 µl der Goldsuspension wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß 5 µg der DNA (in 5 µl H_2O) gegeben und gut gemischt. Dann wurden im Deckel des Reaktionsgefäßes 50 µl Calciumchlorid- und 20 µl Spermidinlösung durch Pipettieren gut durchmischt und durch kurzes Invertieren des Gefäßes und anschließendes Mischen auf dem Vortex mit dem DNA / Gold Gemisch vermengt. Der Ansatz wurde sofort für ca. 20 sec bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde einmal mit 250 µl Ethanol (absolut) gewaschen, gefolgt von erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes. Die nun mit DNA beschichteten Goldpartikel wurden in 120 µl Ethanol suspendiert und evtl. vorhandene Klümpchen von Goldpartikeln bei 30 sec im Ultraschallbad zerstört. Die Blätter wurden mit möglichst großflächigem Kontakt auf die Agar-Oberfläche (in einer Petrischale) gelegt und in einem Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System mit Hepta Adapter („Genegun“, Biorad, Hercules, USA) mit einem Druck von 650 PSI beschossen. Die Makro-Carrier wurden mit 2 X 5 µl Goldsuspension beschichtet, wobei Sedimentierung durch gelegentliches Mischen der Suspension auf dem Vortex unterbunden wurde. Als Kontrolle wurde neben dem 35s-phl p 1-nos Konstrukt ein Plasmid (pmon30049), ebenfalls mit 35s-Promotor und nos-Terminator und dem Gen für das „Green-Fluorescent Protein“ (GFP, zur Expression in Cytoplasma und Zellkern), verwendet.
Die Blätter wurden unter gleichen Bedingungen wie bei der Anzucht der Pflanzen für 48 h in der Klimakammer inkubiert. Anschließend wurden die GFP-Kontrollen unter UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop untersucht, wohingegen aus den mit 35s-phl p1-nos beschossenen Blättern die Proteine extrahiert und im Immunoblot charakterisiert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Struktur der Kohlenhydratbestandteile des Phl p 1

3.1.1 Isolierung von Glycopeptiden und Neutralzuckerbestimmung

Um die Struktur sämtlicher Glykane und deren Bindungsstellen an das Protein zu bestimmen, wurde nPhl p 1 zunächst mit Trypsin gespalten. Die Protease Trypsin spaltet Proteine an definierten Stellen, nämlich C-terminal von den Aminosäuren Lysin und Arginin, sofern die darauf folgende Aminosäure kein Prolin ist. Nach dem Identifizieren der Kohlenhydrate enthaltenden Peptide (Glycopeptide) mittels Neutralzuckeranalyse (s.u.) konnte die Abfolge der Aminosäuren durch Sequenzieren bestimmt werden.

Die aus der tryptischen Spaltung erhaltenen Peptide wurden zunächst über eine Reverse Phase Säule (C18) bei einem pH-Wert von 2 getrennt und der Lauf über die Absorption bei 214 nm, dem Absorptionsmaximum von Peptidbindungen, verfolgt (**Abbildung 7**). Der Lösungsmittelgradient wurde optimiert, bis eine Basislinien getrennte Separation erreicht war. Deutlich ist zu erkennen, dass Trypsin das nPhl p 1 in eine Vielzahl von Fragmenten spaltet.

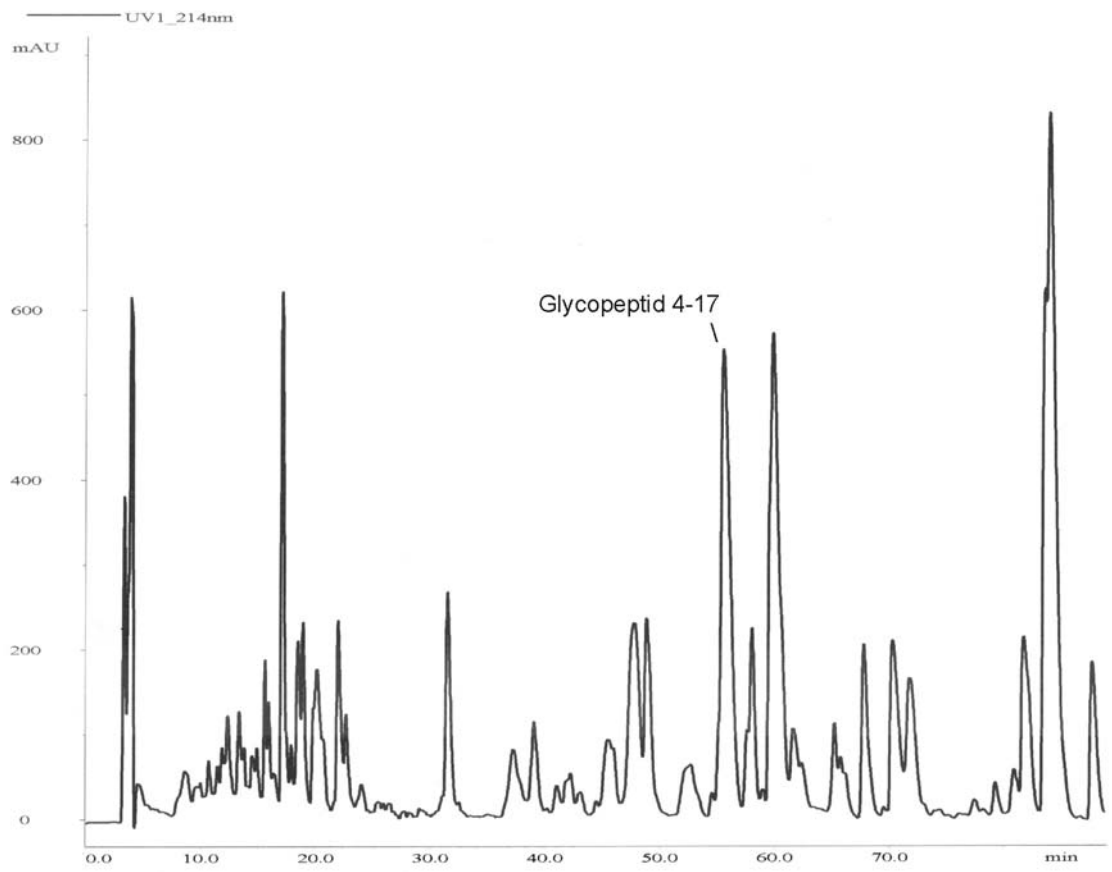


Abbildung 7: Reverse Phase Auftrennung von tryptisch gespaltenem nPhl p 1 (gezeigt sind nur die ersten 85 min des Gesamtchromatogramms). Medium: HyPURITY Elite C18 5µ; Lösungsmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser, Lösungsmittel B: 80 % (v/v) Acetonitril in Wasser mit 0,08 % (v/v) TFA; Glycopeptid 4-17: Glycopeptid mit den Aminosäuren 4-17.

Alle Peptide enthaltende Fraktionen, d. h. solche die einen Absorptionspeak bei 214 nm aufwiesen, wurden mittels Neutralzuckeranalyse auf Kohlenhydratbestandteile überprüft. Nur eines der tryptischen Peptide enthielt Zuckerreste, nämlich die Monosaccharide N-Acetylglucosamin, Mannose, Xylose, Fucose und Arabinose, im ungefähren Massenverhältnis 2 : 2,5 : 1 : 1 : 1 (**Abbildung 8**). Diese Zucker deuten auf das Vorhandensein eines komplexen N-Glycans hin, wobei Arabinose bisher nicht in N-Glycanen detektiert worden ist. Da das Phl p 1 Molekül über ein N-Glycosylierungsmotiv verfügt, war zu vermuten, dass es sich bei dem entsprechenden Peptid um die Aminosäuren 4-17 des Phl p 1 handelte, was durch die Sequenzierung verifiziert werden sollte (s.u.).

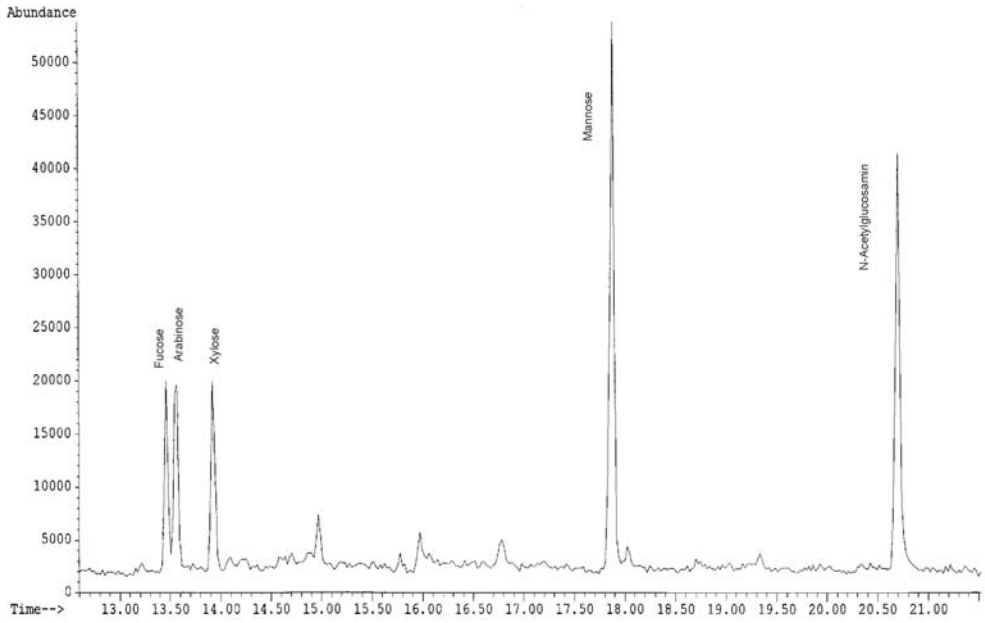


Abbildung 8: GC-MS Neutralzuckeranalyse des Kohlenhydrat-haltigen tryptischen Phl p 1-Fragments gPep4-17 zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.

Um zu prüfen, ob der betreffende Peak bereits ausschließlich das relevante Glycopeptid enthielt, wurde die entsprechende Fraktion noch einmal über eine zweite Reverse Phase Säule bei einem pH-Wert von 7 gegeben und wieder wurde nur ein grosser Peak erhalten. Bei diesem Lauf wurden geringe Restmengen zweier anderer Peptide abgetrennt, deren Peaks allerdings in ihrer Intensität weniger als 5 % des Hauptpeaks ausmachten.

3.1.2 Bestimmung der Glycopeptidsequenz

Zur Überprüfung, ob das Glycopeptid die von der Aminosäuresequenz her bekannte N-Glycosylierungsstelle enthielt, wurde die Probe ansequenziert. Unten dargestellt ist die Sequenz des Glycopeptids im Vergleich zu der N-terminalen Aminosäuresequenz des natürlichen Phl p 1 und des aus der cDNA abgeleiteten rPhl p 1.

```
1         10         20      Aminosäure Nr.
   VPPGP?ITATYGDK             Glycopeptid 4-17
IPKVPPGPNITATYGDKWLD...       nPhl p 1 (Petersen et al. 1993)
IPKVPPGPNITATYGDKWLD...       rPhl p 1 (Petersen et al., 1995b)
```

K: Trypsin Schnittstelle; N-Glycosylierungsmotiv in rot; P: Hydroxyprolin

Es handelte sich bei der Probe also um ein Phl p 1-Fragment aus den Aminosäureresten 4-17, welches zwei hydroxylierte Prolinreste enthält. Dies wird aus der cDNA-Sequenz nicht ersichtlich, da es sich um posttranslationale Modifizierungen handelt. Das Glycopeptid wurde gPep4-17 benannt. Die Aminosäure an Position 9 des nPhl p 1 konnte mittels Edman-Abbau nicht bestimmt werden, was eine posttranslationale Modifikation andeutete.

3.1.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Glycopeptids

Da zwei der Prolinreste im Glycopeptid 4-17 hydroxyliert sind, folgt daraus, dass die Masse des Peptids 4-17 ohne jegliche Glycosylierung bei 1462 Da liegt (Ableitung der Peptidmasse aus der cDNA-Sequenz und den Sequenzierungsdaten).

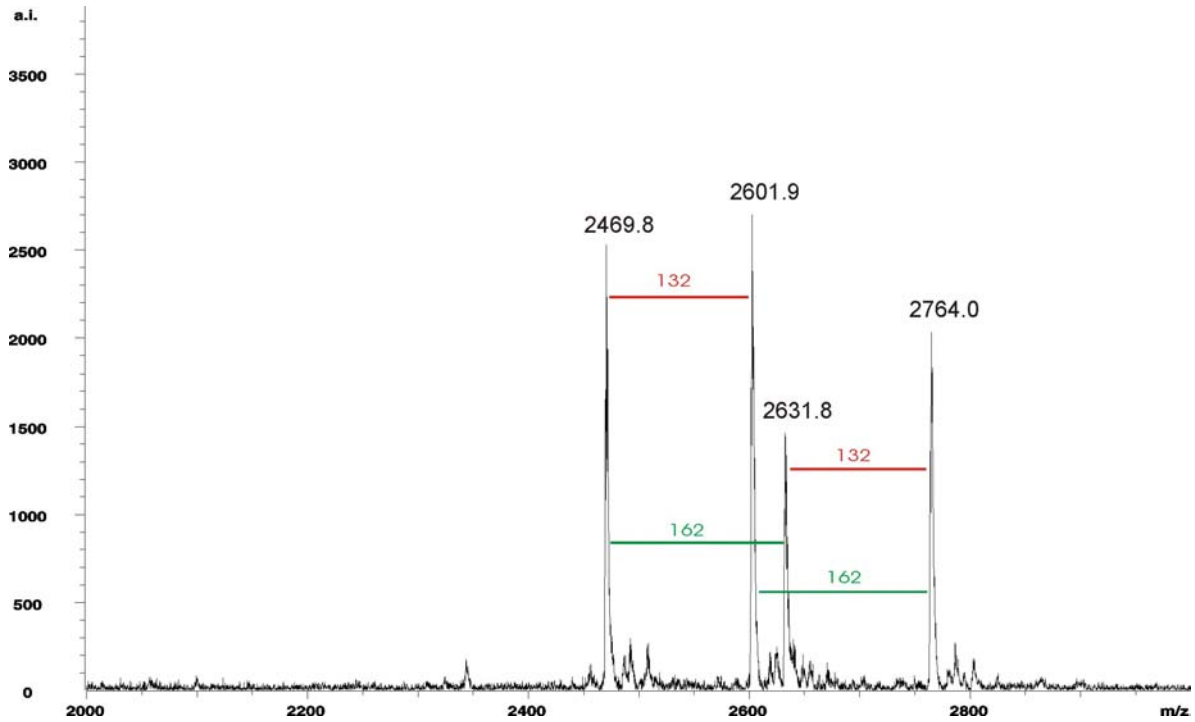


Abbildung 9: Positiv Ionen MALDI-TOF Massenspektrum von gPep4-17

Die massenspektrometrische Analyse von gPep4-17 mittels MALDI-TOF MS ergab vier Ionenpeaks bei *m/z* 2469,8; 2601,9; 2631,8 und 2763,9 (**Abbildung 9**), d. h. die Differenz zwischen zwei Massen beträgt jeweils entweder 132 Da, 162 Da oder die Summe aus beiden (294 Da). Dies deutet auf eine Heterogenität (4 Glycoformen) des Glycopeptids im Hinblick auf seinen Gehalt an Hexosen (162 Da) und Pentosen (132 Da) hin. Unter Berücksichtigung der errechneten Masse des Peptids 4-17 ohne jegliche Glycosylierung (1462 Da) hat das Glycan des Glycopeptids mit der geringsten molekularen Masse (2469,8 Da) eine theoretische Masse von *m/z* 1026 (2470 – 1462 + 18 (Masse des bei der Glycosylierung des Peptids abgespaltenen Wassers) = 1026). Mit den Daten aus der Neutralzuckeranalyse entspricht dies genau einem komplexen N-Glycan aus 2 N-Acetylglucosaminen, 2 Mannosen, 1 Fucose und 1 Xylose. Die höher molekularen Komponenten deuten dementsprechend auf einen zusätzlichen Arabinoserest (132 Da) und/oder Mannoserest (162 Da) am Peptid 4-17 hin.

Um diesen Sachverhalt zu verifizieren und die genaue Lokalisation der zusätzlichen Monosaccharide zu bestimmen, wurden Deglycosylierungsversuche mit N-Glycosidase F und A durchgeführt und die Spaltungsprodukte mittels MALDI-TOF MS und ESI FT-ICR MS/MS analysiert.

Während das Glycan mit N-Glycosidase F nicht vom Peptid abgespalten werden konnte (Daten nicht gezeigt), ließ sich mit N-Glycosidase A eine Spaltung erzielen. Gespaltenes und ungespaltenes gPep4-17 konnten mittels Reverse Phase HPLC voneinander getrennt werden (siehe Peaks 1 und 2 in **Abbildung 10**). Das MALDI-TOF Spektrum für Peak 1 entspricht **Abbildung 9**.

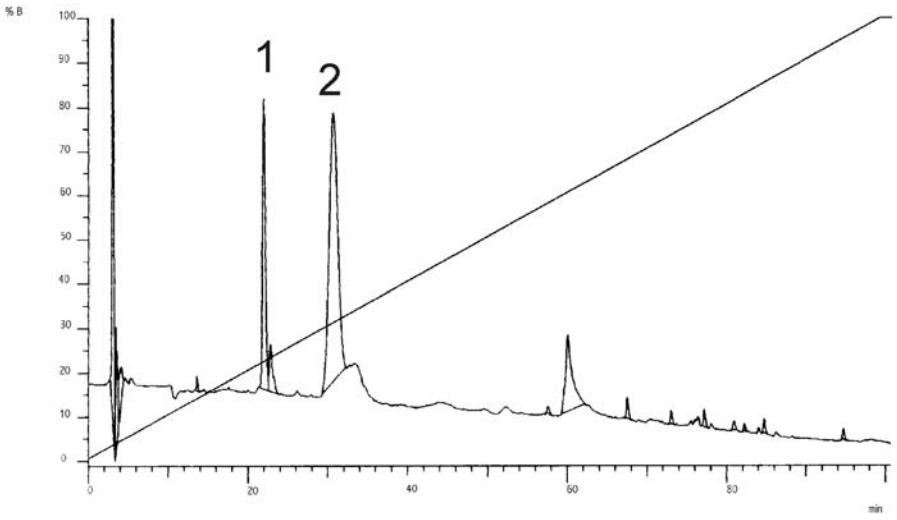


Abbildung 10: Reverse Phase Auftrennung von N-Glycosidase A behandeltem gPep4-17

Medium: HyPURITY Elite C18 5 µ; Lösungsmittel A: Wasser, Lösungsmittel B: 80 % Acetonitril in Wasser; **1** ungespaltenes gPep4-17; **2** gPep 4-17 ohne N-Glycan

Im Massenspektrum des gespaltenen Glycopeptids (Peak **2** in **Abbildung 10**) sind noch zwei Peaks (*m/z* 1462,5 und *m/z* 1594,5, **Abbildung 11**) vorhanden. Eine Masse von 1462 Da entspricht dem unglycosylierten Peptid 4-17 und der Massenunterschied zum zweiten Peak von 132 Da entspricht genau einem gebundenen Arabinoserest. Die Arabinose ist also direkt an das Protein gebunden und nicht Bestandteil des N-Glycans. Aus den Intensitäten der zwei Peaks in **Abbildung 11** ist über Integration abzuleiten, dass ca. 60 % der Moleküle einen solchen Arabinoserest besitzen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein gewisser Prozentsatz der relativ labilen Bindung von Hydroxyprolin an die furanosidische Arabinose bei der Verdampfung durch den Laserstrahl gespalten wurde.

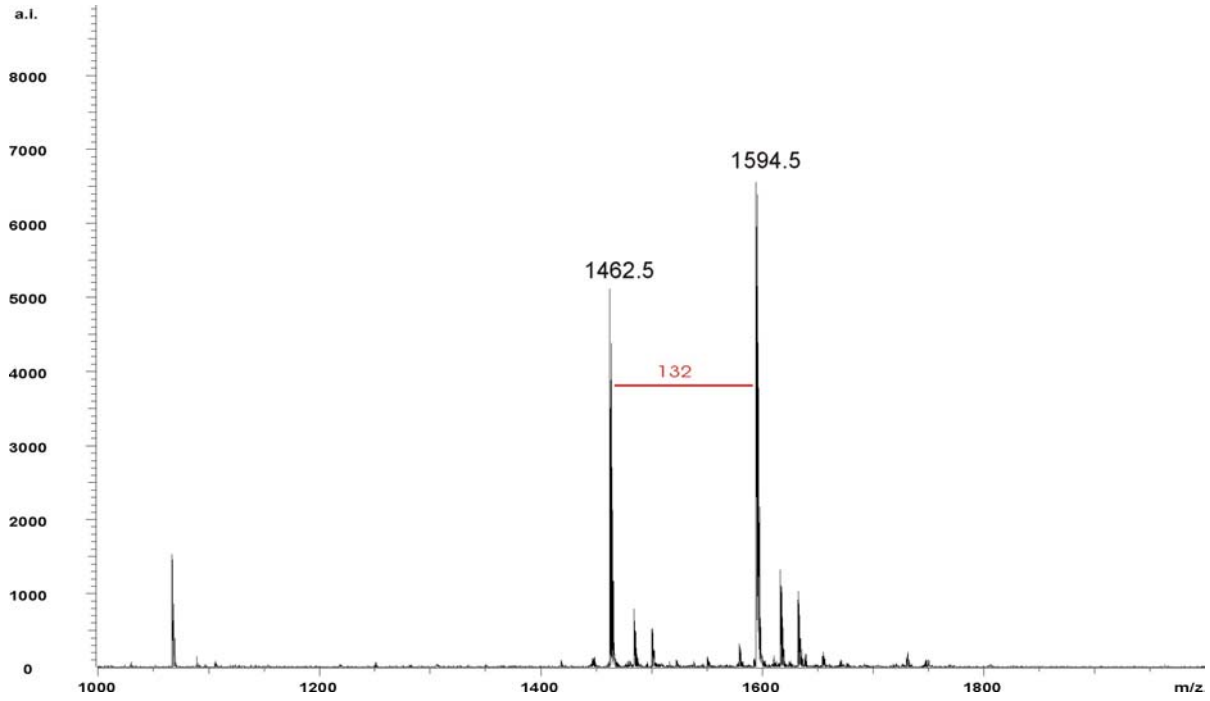


Abbildung 11: Positiv Ionen MALDI-TOF Massenspektrum von N-Glycosidase A verdautem gPep4-17 (Peak 2 in Abbildung 10)

Arabinose kommt im Pflanzenreich O-glycosidisch an Hydroxyprolin gebunden vor. Um zu klären, ob und wenn ja an welchen der beiden in Frage kommenden Hydroxyprolinreste die Arabinose gebunden ist, wurden Massenspektren von den fragmentierten Glycopeptiden (Tochter Ionenscans) von beiden molekularen Spezies aufgenommen, unter Einsatz von ESI-FT-ICR MS/MS mit sustained off-resonance irradiation (SORI) collision-induced dissociation (CID; **Abbildung 12**).

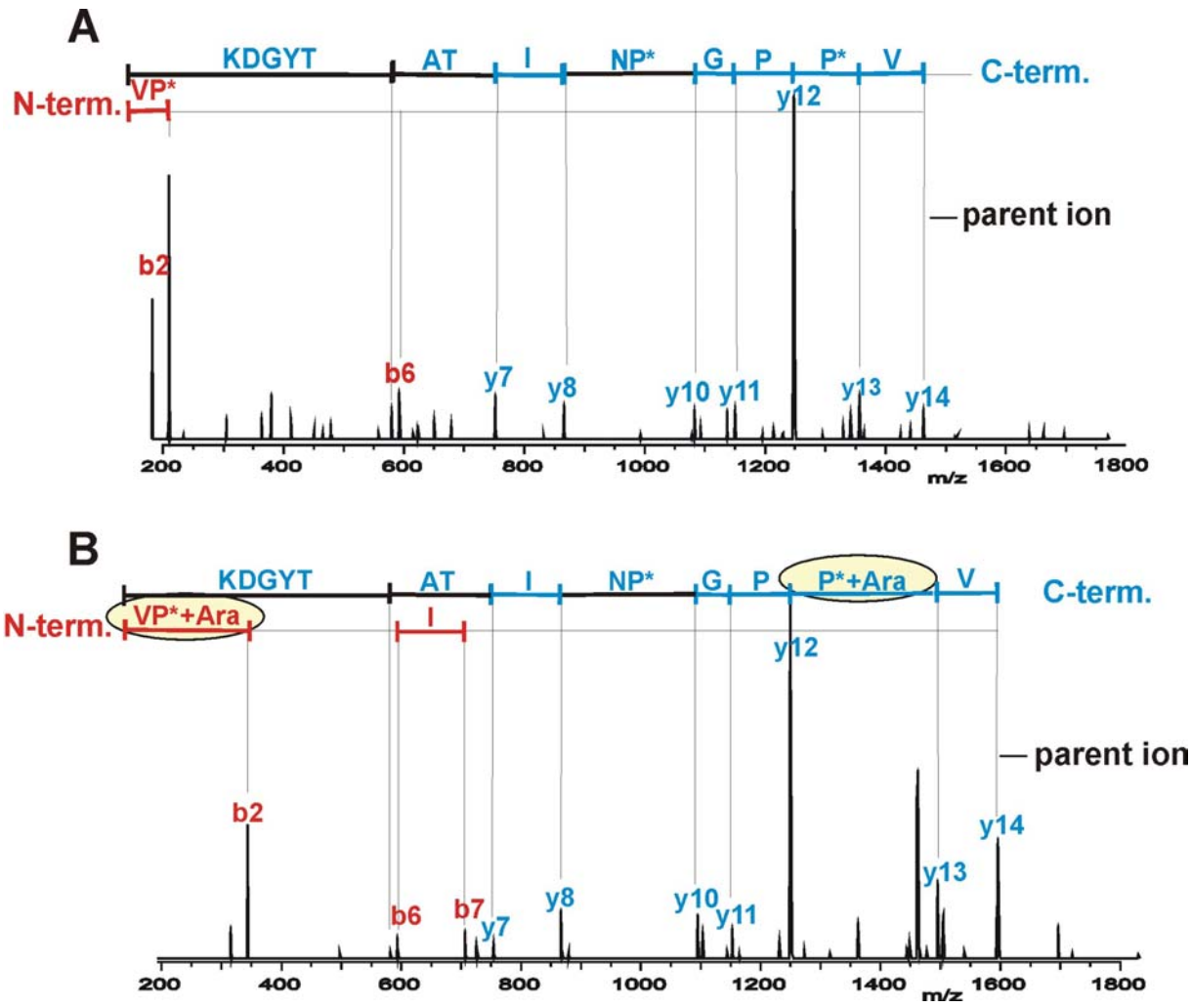


Abbildung 12: Ladungsbereinigte ESI FT-ICR MS / MS Spektren mit doppelt protonierten Ausgangsionen von N-Glycosidase A verdautem gPep4-17 ohne (**A**) und mit (**B**) gebundener Arabinose (siehe Abbildung 4B). SORI-CID wurde mit Argon als Kollisionsgas durchgeführt. **P***: Hydroxyprolin; **Ara**: Arabinose

In **Abbildung 12** sind die MS/MS Spektren der Ausgangsionen (parent ions) von N-Glycosidase A verdautem gPep4-17 (Peak **2** in **Abbildung 10**) ohne (**A**) und mit Arabinose (**B**) dargestellt. Es wurden verschiedene N- und C-terminale Fragment-Ionen (**b** bzw. **y**) gefunden. Die Massenunterschiede zwischen bestimmten Peaks entsprechen den Massen einer oder mehrerer Aminosäuren von gPep4-17. Beispielsweise entspricht die Differenz zwischen **y7** und **y8** einem Isoleucin (**I**) oder die Differenz zwischen **y8** und **y10** einem Fragment aus Asparagin (**N**) und Hydroxyprolin (**P***). Aus den **y**-Fragmenten lässt sich von rechts nach links gelesen, die gesamte Sequenz des gPep4-17 wiederfinden, wobei allerdings die Fragmentierung in einzelne oder doppelte Aminosäuren nur bis zum Alanin an Position 12 bestimmbar ist. Bei den b-Fragmenten hingegen gibt es nach **b2** bis **b6** eine Lücke und die

Fragmentierung reicht nur bis zum Isoleucin an Position 10. Bei beiden Spektren sind die Massenunterschiede zwischen benachbarten Fragmenten (wie z.B **y7** und **y8**) gleich bis auf eine Ausnahme: Bei Spektrum **B** (mit Arabinose) ist die Massen **b2** bzw. **y13** um 132 Da, der Masse der Arabinose, größer. Die Masse z.B. von **b2** entspricht in Spektrum **B** einem Fragment von Valin-Hydroxyprolin-Arabinose (**VP*****+Ara**). Ein Fragment, welches das Hydroxyprolin an Position 8 des nPhl p 1 und Arabinose enthielt, wurde demgegenüber nicht gefunden. Aus dem Vergleich mit den entsprechenden N- und C-terminalen Fragment-Ionen aus Spektrum **A** (ohne Arabinose) folgt eindeutig, dass die Arabinose ausschließlich an den ersten der beiden Hydroxyprolinreste (Position 5 im nPhl p 1) gebunden ist.

Das MALDI-TOF Spektrum der freigesetzten N-Glycane zeigte dementsprechend zwei Peaks (*m/z* 1008 und 1170, Daten nicht gezeigt), was noch einmal die Heterogenität des N-Glycans mit 2 bzw. 3 Mannoseresten verdeutlicht. Hier ließ sich eine mengenmässige Verteilung von etwa 60 % zu 40 % zugunsten der Glycoform mit 2 Mannoseresten ableiten.

Das Glycopeptid 4-17 enthält nach den oben genannten Untersuchungen die Monosaccharide N-Acetylglucosamin, Mannose, Xylose, Fucose, Arabinose, ein N-Glycosylierungsmotiv und zwei Hydroxyprolinreste. Die Arabinose ist nur in ca. 60 % der Phl p 1 Moleküle vorhanden und ist dann an den ersten der beiden Hydroxyprolinreste gebunden. Das N-Glycan kann durch N-Glycosidase A vom Peptid abgespalten werden und kommt in zwei Formen vor: mit 2 (60 %) oder 3 (40 %) Mannoseresten. Demnach liegt das nPhl p 1 in insgesamt 4 Glycoformen vor.

3.2 Untersuchung der Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Polysaccharide aus Pollenextrakt

Polysaccharide, die zum Großteil aus den Monosacchariden Arabinose und Galactose bestehen, machen bis zu 20 % des Trockengewichts des Lieschgras-Pollenextrakts aus. Bei diesen Kohlenhydratstrukturen handelt es sich jedoch ebenfalls nicht um reine Zucker, sondern um Peptidoglycane.

Um nun den Einfluss der Polysaccharide als weiterer potentiell immunogener Strukturen auf die allergische Reaktion zu untersuchen, mussten diese zunächst isoliert und strukturell charakterisiert werden. Um dies zu erreichen wurden die Proteine des Lieschgras-Pollenextrakts mit Trypsin verdaut, um anschließend die Polysaccharide mittels Gelfiltration abtrennen zu können.

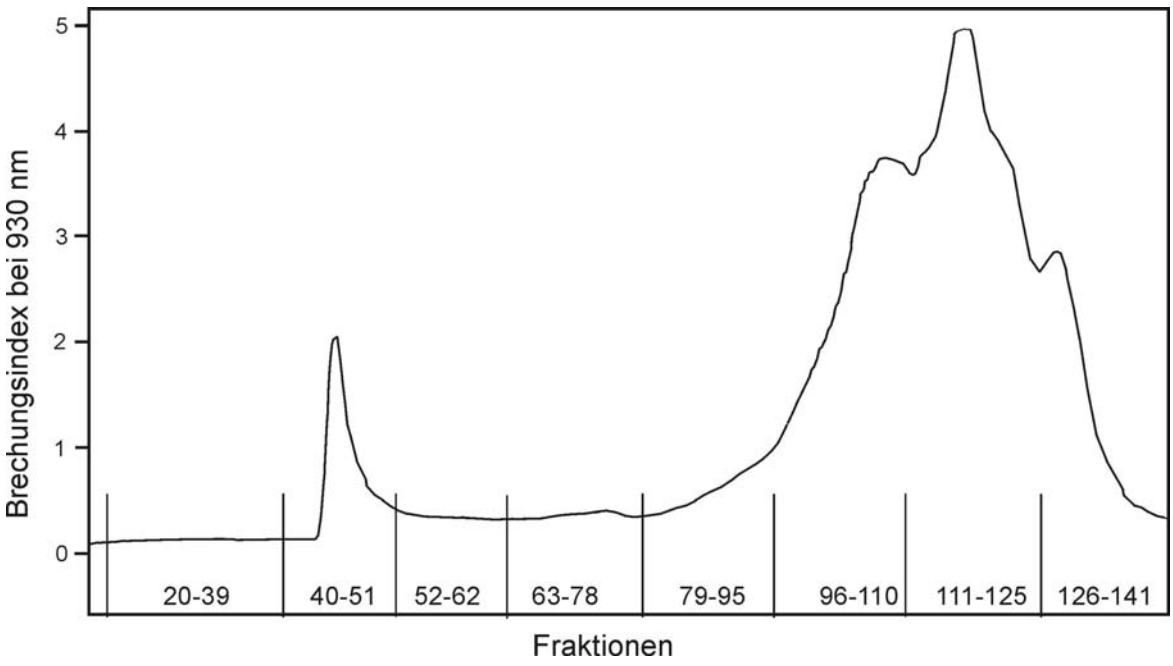


Abbildung 13: Gelfiltration von tryptisch gespaltenem Lieschgras-Pollenextrakt über Sephadex G-50

Laufpuffer: 50 mM Pyridin, mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt

Der tryptische Verdau von 360 mg Lieschgras-Pollenextrakt (Gesamttrockengewicht) wurde mittels Gelfiltration aufgetrennt (**Abbildung 13**). Die Fraktionen wurden nach Peaks gepoolt, die entsprechende Trockenmasse bestimmt (**Tabelle 1**) und von allen Poolfraktionen eine Neutralzuckeranalyse durchgeführt (bis Fraktion 95 in **Abbildung 14**).

Tabelle 1: Trockengewicht der Poolfraktionen aus der Gelfiltration von tryptisch verdautem Lieschgras-Pollenextrakt

Poolfraktion (aus den Fraktionen)	Trockenmasse (mg)
40 - 51	21,22
52 - 62	5,81
63 - 78	7,89
79 - 95	18,32
96 - 110	98,19
111 - 125	186,72
126 - 141	15,31

Σ = 353,46 mg

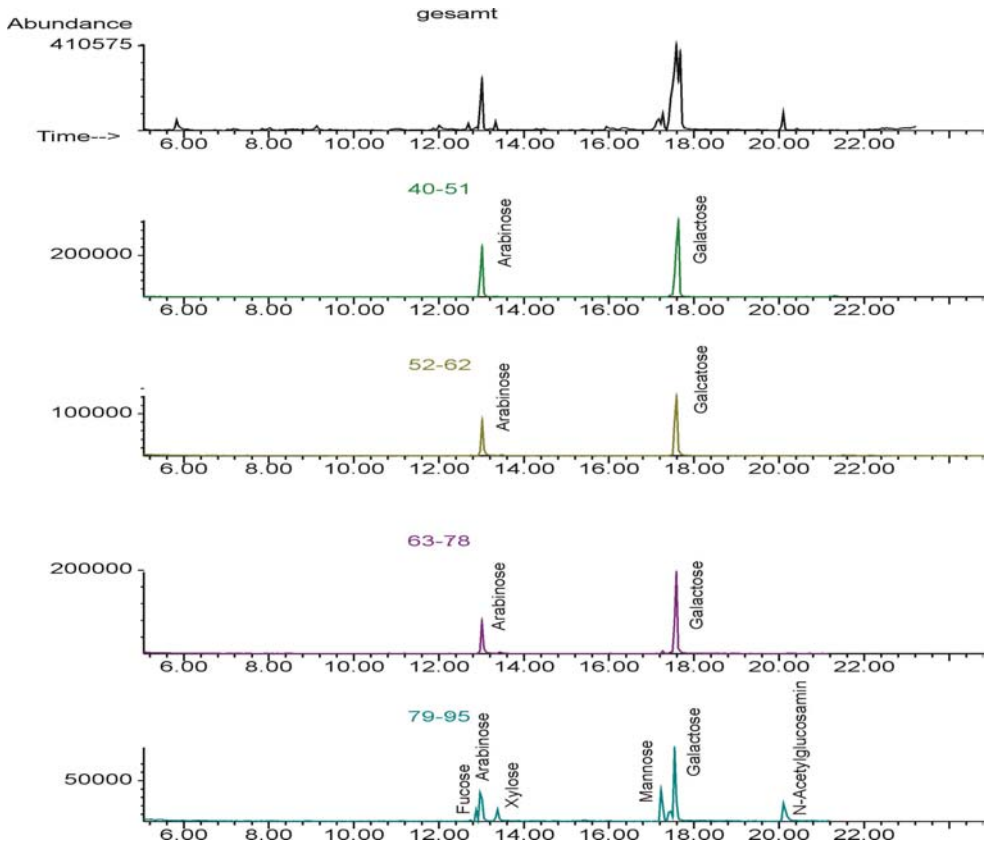


Abbildung 14: Neutralzuckeranalyse der Poolfraktionen aus der Gelfiltration von tryptisch gespaltenem Lieschgras-Pollenextrakt (bis Frakton 95)

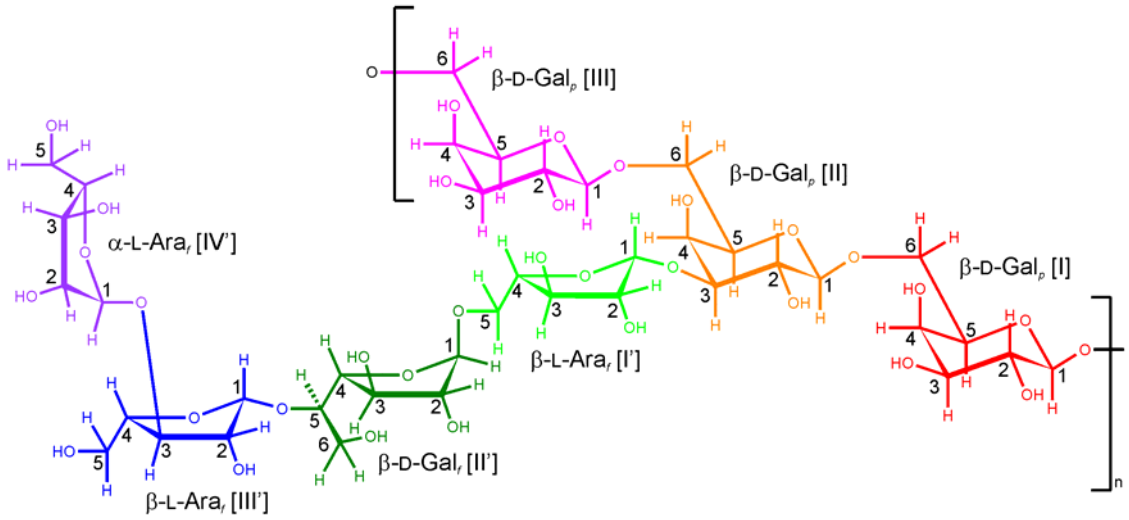
Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen großen Peak, dessen Maximum in den Fraktionen 40-51 liegt und der in die Fraktionen 52-62 hineinreicht. Dies ist zugleich der Bereich des Chromatogramms, der die größten Molekülmassen enthält (die größten Moleküle haben bei der Gelfiltration die geringste Retentionszeit). Aus der Neutralzuckeranalyse ist zu erkennen, dass die einzigen in diesem Peak enthaltenen Monosaccharide Arabinose und Galactose sind. Die Poolfraktion 63-78 bildet den Übergang zu den Bereichen mit kleineren Molekülmassen, in ihr sind bereits deutliche Spuren der in den späteren Fraktionen enthaltenen Zucker zu erkennen. In der Poolfraktion 79-95 treten dann bereits die für die N-Glycane typischen Monosaccharide N-Acetylglucosamin, Mannose, Fucose und Xylose in deutlicher Ausprägung auf. In dieser und den folgenden Poolfraktionen sind demnach die (Glyco-)Peptide enthalten, welche durch die tryptische Spaltung der Proteine des Gesamtextrakts entstanden sind. Setzt man die Trockenmassen der Poolfraktionen 40-51 und 52-62 zu der Gesamt-trockenmasse in Beziehung, so ergibt sich ein Gehalt an Arabinose und / oder Galactose enthaltenden Polysacchariden von 7,6 %, zählt man noch die Poolfraktion 63-78 hinzu von 9,9 %.

3.2.2 Struktur der Polysaccharide

Durch chromatographische Auftrennung der Poolfraktion 40-51 mittels HPLC und anschließende NMR-Messungen wurde in Kooperation mit Dr. Lothar Brecker (Laborgruppe Immunchemie, Forschungszentrum Borstel) gefunden, dass zwei verschiedene Polysaccharidstrukturen enthalten sind (**Abbildung 15**): Ein Arabinogalactan (**A**) und ein Galactan (**B**), wobei letzteres zugleich die Grundstruktur ist, aus der das Arabinogalactan durch Anfügen der Seitenketten entsteht. Die Struktur der Seitenkette wurde nach den gegenwärtigen Daten erstellt, da die Untersuchungen zur Zeit noch nicht abgeschlossen sind. So ist aller Wahrscheinlichkeit nach an der Position 2 der furanosidischen β-D-Galactose der Seitenkette eine zusätzliche saure Gruppe lokalisiert, die zur Zeit noch näher charakterisiert wird. Auch die Frage, ob jeder dritte oder doch eher jeder zweite Galactoserest der Haupkette mit einer Seitekette substituiert ist, muss noch genauer bestimmt werden.

A

3D-Struktur



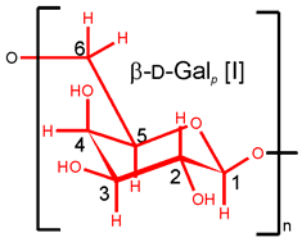
Struktur

α-L-Ara$_f$-(1→3)-β-L-Ara$_f$-(1→5)-β-D-Gal$_f$-(1→5)-β-L-Ara$_f$-(1→3)-┐

[→6)-β-D-Gal$_p$-(1→6)-β-D-Gal$_p$-(1→6)-β-D-Gal$_p$-(1→]$_n$

B

3D-Struktur



Struktur

[→6)-β-D-Gal$_p$-(1→]$_n$

Abbildung 15: Struktur der Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt

3.3 IgE-Bindung und Mediator-Freisetzung

Nach Bestimmung der Kohlenhydratstrukturen des nPhl p 1 sowie der Polysaccharide aus dem Gesamtextrakt, wurde deren Potential zur Bindung von IgE und deren Fähigkeit zur Mediatorfreisetzung untersucht.

3.3.1 Untersuchungen der immunologischen Reaktivität von Polysaccharidstrukturen des Pollenextrakts

Zu klären war zunächst die Frage, ob die Polysaccharide des Lieschgras-Pollenextrakts an der allergischen Reaktion beteiligt oder in einer anderen Form immunogen sind. Daher wurde zunächst ein ELISA mit den aus der Gelfiltration erhaltenen Polysacchariden, einem Gemisch aus Galactan und Arabinogalactan, durchgeführt.
Getestet wurden 11 Seren von Patienten mit Allergie gegen Lieschgraspollen sowie 11 weiteren Seren. Von dieser Gruppe waren 6 Personen Allergiker, aber ohne Gräserpollenallergie, während es sich bei 5 um Nicht-Atopiker handelte. Die Seren wurden auf IgE sowie auf IgG (gesamt) gegen die Polysaccharide getestet (**Tabelle 2**, **Abbildung 16**). Die Bestimmung des IgG wurde durchgeführt, um die immunogene Wirkung der Polysaccharide nachzuweisen.

Tabelle 2: ELISA mit den Polysacchariden aus Lieschgras-Pollenextrakt zur Bestimmung der IgE- und IgG-Reaktivität individueller Seren
G1-G11: Lieschgraspollen-Allergiker; A1-A6: Allergiker (keine Graspollenallergie); N1-N5: Nicht-Allergiker; NK: ohne Serum (Negativkontrolle); Messung erfolgte bei OD_{405}.

	NK	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
IgE	0,069	0,072	0,068	0,063	0,058	0,059	0,058	0,067	0,066	0,058	0,069	0,052
IgG	0,068	0,525	1,084	0,470	1,077	0,532	0,432	1,345	0,992	0,226	0,726	0,366

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	N1	N2	N3	N4	N5
IgE	0,067	0,063	0,065	0,062	0,053	0,072	0,063	0,061	0,057	0,068	0,055
IgG	1,047	0,473	0,756	0,453	0,747	0,432	0,920	0,624	0,492	1,259	0,767

Aus **Tabelle 2** geht hervor, dass keines der Testseren IgE-Reaktivität gegen das Polysaccharidgemisch zeigte. Alle Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle. Demgegenüber zeigten alle untersuchten Seren IgG-Reaktivität, deren Stärke von Serum zu Serum deutlich schwankte, jedoch die Negativkontrolle in allen Fällen um mehr als das Dreifache übertraf. Obwohl sich zwar zwischen einzelnen Individuen z. T. starke Unterschiede bezüglich der IgG-Reaktivität zeigten, konnte dies nicht für die Patientengruppen (Graspollen-Allergiker, Nicht-Graspollen-Allergiker, Nicht-Allergiker) festgestellt werden: Die durchschnittliche Reaktivität unterschied sich bei allen Gruppen nur unwesentlich (**Abbildung 16**).

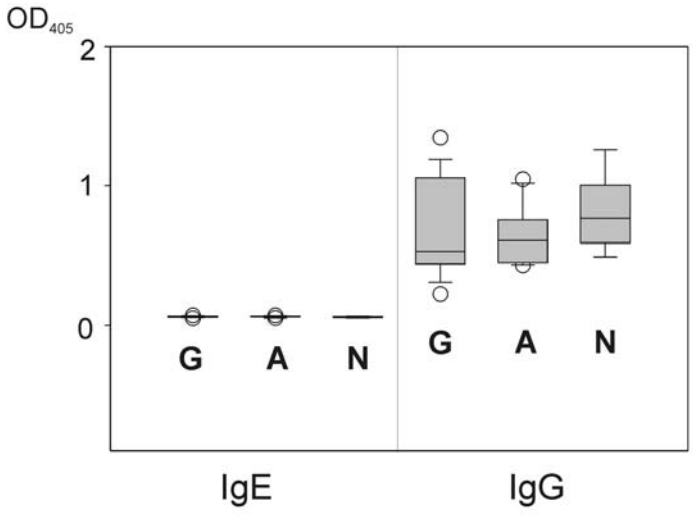


Abbildung 16: IgE- und IgG-Reaktivität gegen die Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt
in den Gruppen Gräserpollenallergiker (G); Allergiker ohne Reaktivität gegen Gräserpollen (A); Nicht-Allergiker (N)
mit Mittelwert, Standardabweichung (2s) und Extremwerten (bei n > 5)

3.3.2 Untersuchungen zur Reaktivität von Kohlenhydrat-bindenden Allergikerseren

Kreuzreaktives IgE ist - unter anderem - mit Kohlenhydratstrukturen in Verbindung gebracht worden. Ziel der nachfolgenden Versuche war es herauszufinden, ob Patienten kreuzreaktive IgE-Antikörper gegen die Kohlenhydratstrukturen des Phl p 1 besitzen.

Alle eingesetzten Seren wurden im UniCap Testverfahren auf spez. IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt (g6) untersucht.

Für Seren von Patienten mit Bienengiftallergie ist bereits früher IgE-Reaktivität gegen Kohlenhydratstrukturen beschrieben worden. Diese stellen damit einen guten Pool von potentiellen Kohlenhydrat-Allergikern dar. Für unsere Zwecke wurden die Seren von acht Patienten mit Bienengiftallergie zunächst auf IgE-Reaktivität gegen Lieschgraspollen untersucht (UniCAP-Test). Desweiteren wurden sie im Immunoblot auf ihre Reaktivität gegen nPhl p 1 und rPhl p 1 aus *E. coli* (letzteres enthält keine Zucker) getestet (**Tabelle 3**). Alle acht Seren waren zuvor noch nicht auf mögliche Kreuzreaktivitäten hin untersucht worden. Zusätzlich in die Untersuchungen einbezogen wurden zwei Seren von polysensibilisierten Patienten (Bo220 und PG) sowie Serum eines Gräserpollenallergikers (W, als Kontrolle) ohne Reaktivität gegen Kohlenhydratstrukturen.

Wie in Tabelle 3 dargestellt zeigten zwei der Seren (B1 und B3) keine Reaktivität, sechs (B2, B4, B6, B8, Bo220 und PG) wiesen IgE ausschließlich gegen nPhl p 1 auf und drei Seren (B5, B7 und W) reagierten sowohl mit rPhl p 1 wie auch mit nPhl p 1.

Tabelle 3: Ergebnisse des UniCap Tests mit Patientenseren und des Immunoblots von den entsprechenden Seren mit natürlichem und rekombinantem Phl p 1

B2-B8: Bienengiftallergiker; Bo220 und PG: Patienten mit IgE gegen viele verschiedene Allergenextrakte; W: Gräserpollenallergiker ohne Reaktivität gegen Kohlenhydrate; UniCap (g6): Messung des spez. IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt angegeben in der UniCap Klasse; nPhl p 1: IgE-Reaktivität gegen natürliches Phl p 1 im Immunoblot vorhanden (+); nicht nachweisbar (-); rPhl p 1: IgE-Reaktivität gegen rekombinantes Phl p 1 aus *E. coli* (ohne Kohlenhydratstrukturen, d.h. gegen Proteinstrukturen gerichtet).

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	Bo220	PG	W
UniCAP (g6)	1	3	2	3	4	4	4	2	5	6	6
nPhl p 1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
rPhl p 1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+

3.3.3 Inhibitions-Untersuchungen

Alle Seren, welche IgE gegen natürliches oder rekombinantes Phl p 1 aufwiesen, wurden im Inhibitions ELISA gegen nPhl p 1 getestet (**Tabelle 4**). Als Inhibitoren wurden nPhl p 1 (Positivkontrolle für erfolgreiche Inhibition) und das N-Glycan des Bromelains eingesetzt. Hierbei handelt es sich um das vollständige N-Glycan der Protease Bromelain mit noch 1-2 gebundenen Aminosäuren aus dem Proteinanteil. Es entspricht strukturell der 1008 Da Form des Phl p 1 N-Glycans (siehe 1.3), d.h. es besteht aus zwei N-Acetylglucosamin-, zwei Mannose-, einem Xylose- und einem Fucoserest. Als Negativkontrolle diente das Serum eines gesunden Spenders.

Tabelle 4: Inhibitions ELISA mit Patientenseren gegen nPhl p 1

B2-B8: Bienengiftallergiker; NK: Negativkontrolle; Bo220 und PG: Patienten mit IgE gegen ein große Anzahl von verschiedenen Allergenextrakten; W: Gräserpollenallergiker ohne Reaktivität gegen Kohlenhydrate; nPhl p 1: natürliches Phl p 1; Br.Glyc.: Bromelain N-Glycan; ohne Inhibitor (-); gemessen OD_{405}.

Inhibitor	NK	B2	B4	B5	B6	B7	B8	Bo220	PG	W
nPhl p 1	0,063	0,054	0,062	0,056	0,082	0,067	0,063	0,035	0,035	0,034
Br.Glyc.	0,066	0,056	0,055	0,226	0,071	0,075	0,063	0,037	0,034	0,254
-	0,054	0,077	0,123	0,229	0,204	0,076	0,072	0,233	0,421	0,259

Bei allen Seren (bis auf die Negativkontrolle) lässt sich die IgE-Reaktivität, gemessen bei 405 nm, durch Zugabe von nPhl p 1 hemmen. Eine gleich starke Inhibierung der IgE-Reaktivität (wie nach Inkubation mit nPhl p 1) konnte bei den Seren B2, B4, B6, B8, Bo220 und PG nach Präinkubation mit dem N-Glycan des Bromelain beobachtet werden. Bei den Seren B2, B7 und B8 war dieser Unterschied allerdings nur sehr gering, während bei allen anderen Seren der OD-Wert ohne Inhibition mindestens doppelt so hoch lag wie nach Inhibition. Alle diese Seren zeigen IgE-Reaktivität ausschließlich gegen natürliches Phl p 1, nicht aber gegen rekombinantes Phl p 1, welchem die Kohlenhydratstrukturen fehlen (**Tabelle 3**). Keine Inhibition nach Präinkubation mit Bromelain N-Glycan ließ sich bei den Seren B5, B7 und W feststellen, die ebenso stark mit rekombinantem Phl p 1 wie auch mit natürlichem reagierten. Somit kann für die Seren B2, B4, B6, B8, Bo220 und PG eine IgE-Reaktivität ausschließlich

gegen das N-Glycan des nPhl p 1 angenommen werden, wohingegen B5, B7 und W Reaktivität gegen Protein-Epitope zeigen.

3.3.4 Immunoblots

Um einen Überblick über die Häufigkeit IgE-reaktiver Kohlenhydratstrukturen im gesamten Lieschgraspollen zu erhalten und die Ergebnisse aus dem Inhibitons-ELISA (insbesondere für die schwächeren Seren) zu verifizieren, wurde Lieschgras-Pollenextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Im Anschluss wurden die oben genannten Seren im Immunoblot auf ihre IgE-Reaktivität gegen die einzelnen Komponenten des Extrakts getestet (**Abbildung 17**). Als Kontrolle diente das Fucose-bindenden Lectin AAA.

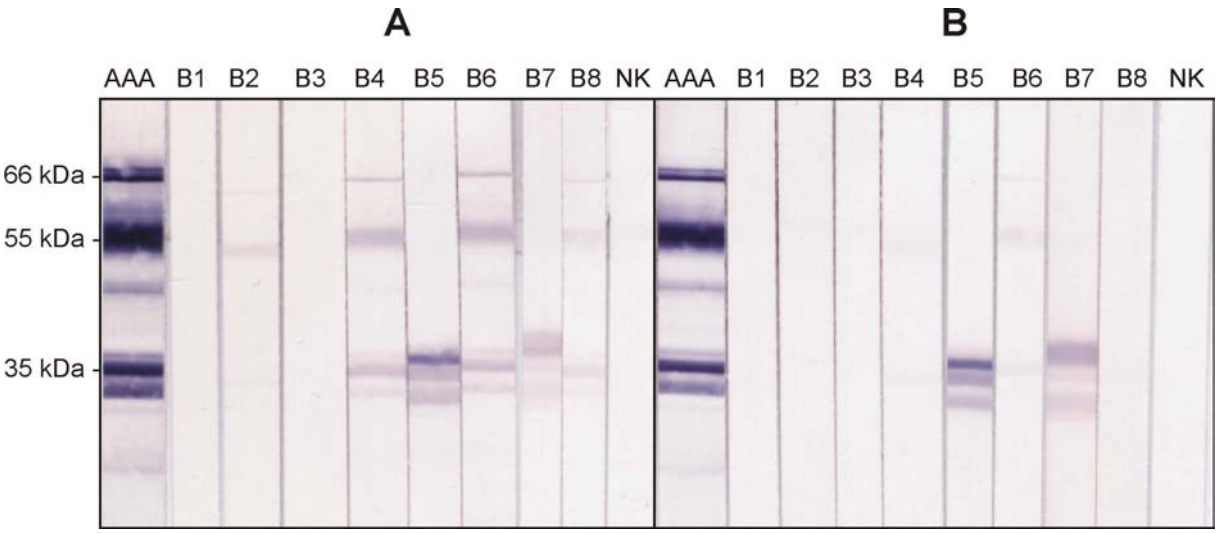


Abbildung 17: Immunoblot von Lieschgras-Pollenextrakt mit Patientenseren
A) ohne Inhibitor, B) inhibiert mit Bromelain N-Glycan; AAA: Lectin AAA; B1-B8: Seren von Bienengiftallergikern, NK: Negativkontrolle (Serum eines gesunden Spenders)

Durch das Lectin AAA konnte eine Vielzahl Fucose-haltiger Glycoproteine im Lieschgras-Pollenextrakt nachgewiesen werden, wobei die entsprechenden Banden hauptsächlich in den Bereichen um 66 kDa, 55 kDa und 35 kDa lagen, doch auch oberhalb und unterhalb dieser Bereiche waren weitere, aber schwächere Banden erkennbar. Die Seren B2, B4, B6 und B8,

welche ausschließlich mit nPhl p 1 nicht jedoch mit rPhl p 1 reagierten (**Tabelle 3**), zeigten das gleiche Bandenmuster wie AAA und die Reaktivität konnte deutlich mit Bromelain N-Glycan inhibiert werden. Die Seren B5 und B7 mit Reaktivität sowohl gegen rPhl p 1 wie auch nPhl p 1 zeigten dagegen jeweils individuelle und von AAA verschiedene Bandenmuster. B1 und B3 zeigten keine Aktivität gegen Lieschgras-Pollenextrakt und auch keine gegen nPhl p 1 oder rPhl p 1.

Die Seren lassen sich also in drei Gruppen einordnen:

I Reaktivität nur gegen nPhl p 1: Bandenmuster gegen Lieschgras-Pollenextrakt identisch mit AAA; deutliche Inhibition durch Bromelain N-Glycan (B2, B4, B6, B8)
→ Kohlenhydrat detektierende Seren

II Reaktivität gegen nPhl p 1 und rPhl p 1: von AAA verschiedenes Bandenmuster gegen Lieschgras-Pollenextrakt; keine Inhibition durch Bromelain N-Glycan (B5, B7)
→ Proteinepitope detektierende Seren, polysensibilisierte Patienten

III keine Reaktivität gegen Phl p 1 und Lieschgras-Pollenextrakt (B1, B3)
→ keine Gräserpollenallergiker

3.4 Untersuchungen zur klinischen Relevanz der Kohlenhydratstrukturen

3.4.1 Vergleich von IgE- und IgG4-Reaktivität gegen Kohlenhydratstrukturen

Um Aussagen zur klinischen Relevanz des Kohlenhydrat-spezifischen IgE zu erhalten, wurden die Seren von zwei Patienten, die IgE-Antikörper ausschließlich gegen das N-Glycan des nPhl p 1 zeigten (**Tabelle 3 und 4**) herangezogen. Ein Serum stammte von einem Patienten (Bo220), der unter einer Gräserpollenallergie litt, während und der andere Patient (PG) keine solchen Symptome zeigte. Da insbesondere die Konzentration von spezifischem IgG4 gegen das entsprechende Allergen im Serum von Allergikern deutlich niedriger sein soll als bei gesunden Kontrollpersonen, wurden zunächst beide Seren in Bezug auf ihre IgE- und

IgG4-Reaktivität gegen die Kohlenhydratstrukturen des Lieschgrases verglichen (**Abbildung 18**).

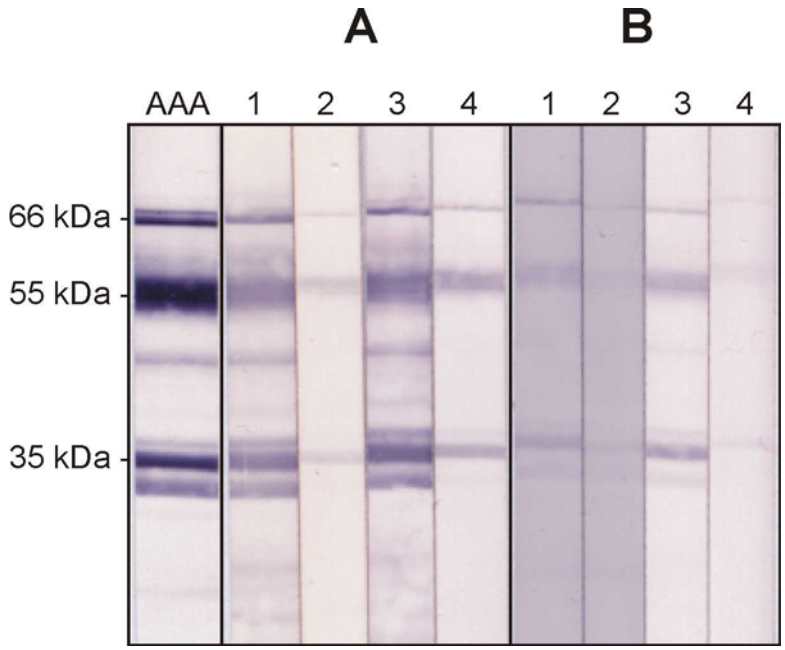


Abbildung 18: Bindung von IgE und IgG4 an die Glycane des Lieschgras-Pollenextrakts
Zwei Patientenseren wurden vergleichend auf IgE- und IgG4-Reaktivität gegen Fucose-haltige Glycane getestet. A) IgE, B) IgG4. 1: Serum Bo220; 2: Bo220 inhibiert mit Bromelain N-Glycan; 3: Serum PG; 4: PG inhibiert mit Bromelain N-Glycan.

Beide Seren zeigen deutlich IgE- und IgG4-Reaktivität gegen die Kohlenhydratstrukturen. Das Bandenmuster entspricht für beide Sekundärantikörper (anti-human IgE und anti-human IgG4) dem des Lectins AAA. Die Intensitäten der Banden sind bei Bo220 und PG sowohl für IgE als auch IgG4 vergleichbar, wobei Bo220 im IgG4-Nachweis eine starke Hintergrundfärbung zeigt. Sowohl die IgE- als auch IgG4-Reaktivität lassen sich durch Präinkubation des Serums mit Bromelain N-Glycan inhibieren, d. h. die Aktivität richtet sich bei beiden Seren gegen Fucose-haltige Kohlenhydratstrukturen.

3.4.2 Einfluss der Kohlenhydratstrukturen auf die Mediator-Freisetzung

Damit eine Substanz als Allergen wirken kann, ist es unabdingbar, das sie im Patienten zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin oder IL-4 führt. Dazu muss es zur Quervernetzung

der IgE-Rezeptoren auf den entsprechenden Zellen (vor allem Mastzellen und Basophile) kommen. Die Fähigkeit der N-Glycane Mediatoren freizusetzen wurde deshalb anhand der IL-4 Freisetzung aus basophilen Granulozyten untersucht. Die Basophilen eines gesunden Spenders wurden mit natürlichem Phl p 1, rekombinantem Phl p 1 bzw. Bromelain N-Glycan gekoppelt an BSA (mit 5-6 Liganden pro BSA-Molekül) stimuliert (**Abbildung 19**).

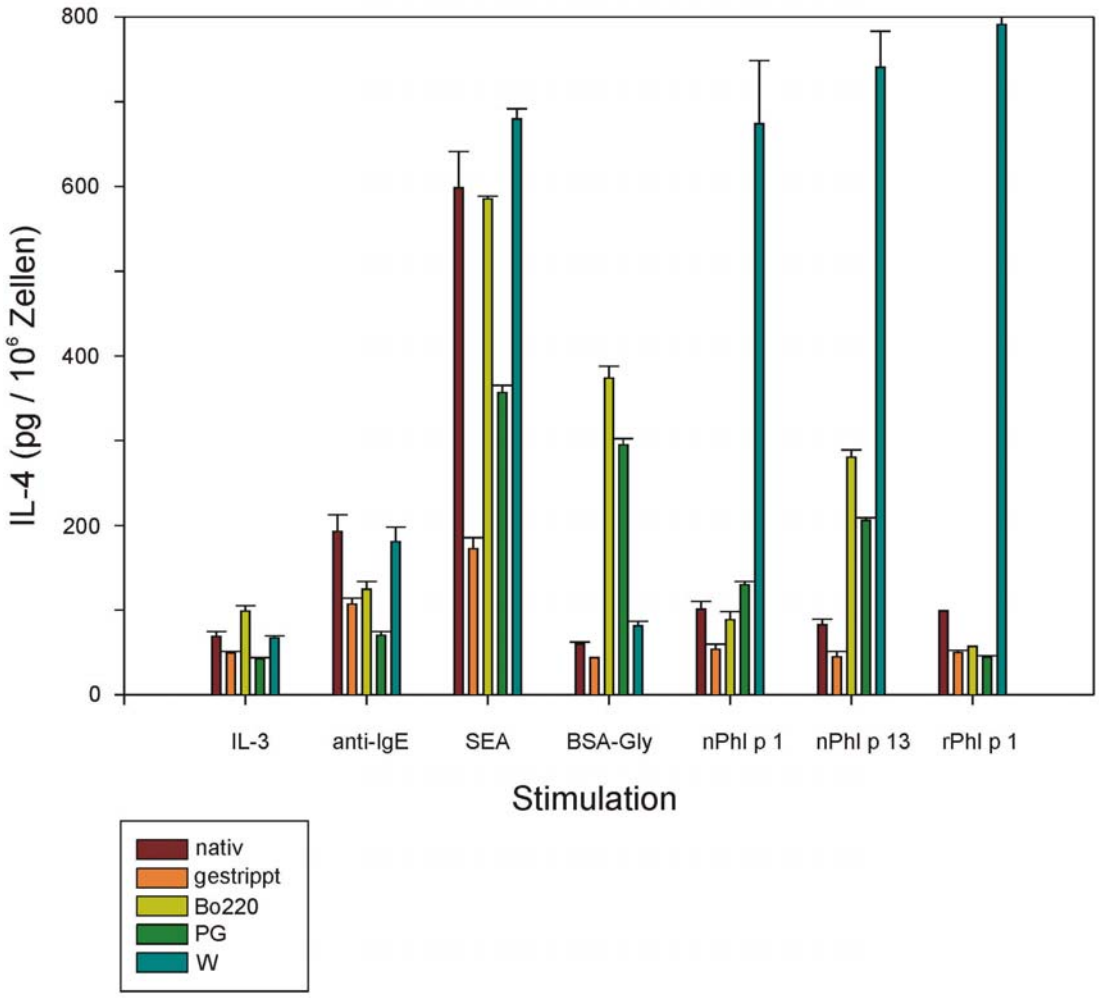


Abbildung 19: Mediator-Freisetzung aus Basophilen durch Phl p 1 N-Glycan

Basophile wurden mit IL-3 stimuliert (Negativkontrolle); anti IgE (Positivkontrolle); SEA (*Schistosoma*-Ei-Antigen); BSA-Gly (Bromelain N-Glycan konjugiertes BSA); nPhl p 1; nPhl p 13; rPhl p 1 (ohne Glycosylierung). Folgende Basophilen-Präparationen wurden getestet: nativ: native Spenderzellen; gestrippt: IgE durch Ansäuern entfernt; Bo220: mit Serum Bo220 resensibilisiert; PG: mit Serum PG resensibilisiert; W: mit Serum W resensibilisiert (Kontrollserum, detektiert nur Proteinepitope)

In allen Ansätzen (außer denen mit gestrippten und nicht resensibilisierten Basophilen) kam es zur Freisetzung von IL-4, wenn mit SEA und anti-IgE stimuliert wurde (Positivkontrollen). Natürliches und rekombinantes Phl p 1 mit einer bzw. keiner N-Glycan-Seitenkette führten nicht zu einer signifikanten IL-4 Ausschüttung, wenn die Zellen mit IgE aus den Seren Bo220 und PG resensibilisiert wurden. Im Gegensatz dazu war die Freisetzung deutlich erhöht, wenn sie mit dem Bromelain N-Glycan gekoppeltem BSA (BSA-Gly) stimuliert wurden. Als Kontrolle diente das Serum W, das ausschließlich IgE gegen Proteinepitope enthält. Hier zeigte sich eine IL-4 Freisetzung nur mit natürlichem oder rekombinantem Phl p 1, nicht jedoch mit dem BSA-Konjugat.

Aus dieser Freisetzung von Mediatoren (IL-4) folgt zwingend, dass es zur Quervernetzung von Kohlenhydrat-spezifischem IgE auf den Fcε-Rezeptoren der Basophilen gekommen sein muss. Zu einer Freisetzung von IL-4 kam es dabei sowohl nach der Resensibilisierung mit dem Serum Bo220 wie auch bei der Resensibilisierung mit PG. Dies zeigt, dass die Ausschüttung bei Basophilen unabhängig davon ist, ob der Spender des Serums tatsächlich Allergiker gegen Gräserpollen ist oder sein Serum lediglich Kohlenhydrat-spezifisches IgE enthält.

3.5 Transiente Expression von Phl p 1 im Tabaksystem

3.5.1 Herstellung des Transformations-Konstruktes für Tabak

Ausgangspunkt für die Herstellung eines Konstruktes zur transienten Transformation von Tabakblättern waren die Plasmide Ubi-cas, welches den nos-Terminator enthält, und 35s, welches den 35s-Promotor enthält. Das Phl p 1-Gen (phl p 1) sollte in einen Vektor mit dem nos-Terminator und dem 35s-Promotor eingebaut werden. Zunächst musste ein solches Plasmid hergestellt werden. Dazu wurden elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen mit den Ausgangsplasmiden transformiert, um diese in geeigneter Menge zu erhalten. Dann wurde über Restriktion mit den Nucleasen *Hind III* und Pst *I* (**Abbildung 20A**) und anschließende Ligation der entsprechenden Fragmente der ursprüngliche Promotor des Ubi-cas Plasmids durch den 35s-Promotor ersetzt. Das entstandene Plasmid (35s-nos) wurde wiederum in XL1-Blue eintransformiert und vermehrt (**Abbildung 20B**).

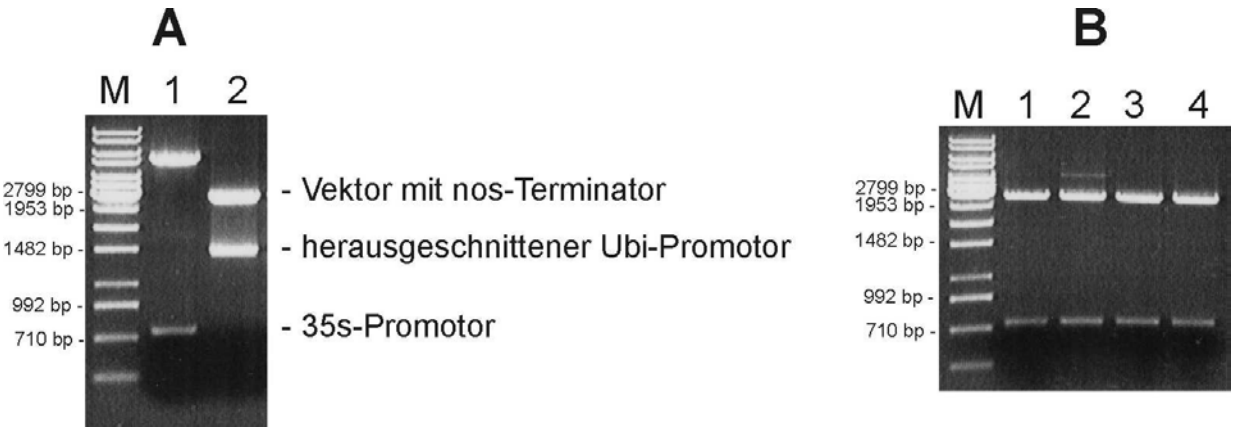


Abbildung 20: **A: Restriktion von 35s und Ubi-cas mit *Hind III* und *Pst I***
M: Marker; 1: 35s, *Hind* / *Pst* verdaut; 2: Ubi-cas, *Hind* / *Pst* verdaut; 1 % Agarosegel
B: Restriktion des neuen Vektors 35s-nos mit *Hind III* und *Pst I*
M: Marker; 1-4: 35s-nos, *Hind* / *Pst* verdaut; 1 % Agarosegel.

Die Restriktionsanalyse des neuen Vektors 35s-nos zeigte deutlich den Einbau des *Hind III* / *Pst I*-Inserts in den ursprünglichen Ubi-cas Vektor. Zusätzlich wurde die Anwesenheit des 35s-Promotors in 35-nos durch Ansequenzieren mit dem Primer 35s, welcher aus der Sequenz des 35s-Promotors abgeleitet worden war, bestätigt.

Das Gen phl p 1 musste nun in den 35s-nos Vektor einkloniert werden. Dazu wurde es zunächst aus Lieschgras Blütenstand-DNA über PCR amplifiziert mit den Primern P1foXba und P1reSac, durch welche zudem 5' eine *Xba I* und 3' eine *Sac I* Schnittstelle an das Gen angefügt wurde. Das PCR-Produkt war einheitlich und hatte die erwartete Grösse von ca. 800 bp.

Das PCR-Produkt wurde gereinigt und per TA-Cloning in das pGEM-T Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde in XL1-Blue Zellen transformiert, positive Klone über Blau-Weiß-Screening selektioniert (**Abbildung 21**), in Flüssigkultur vermehrt und die Plasmide isoliert.

Die Klone 5, 6 und 14 wurden aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der Restriktionsanalyse weiter verwendet.

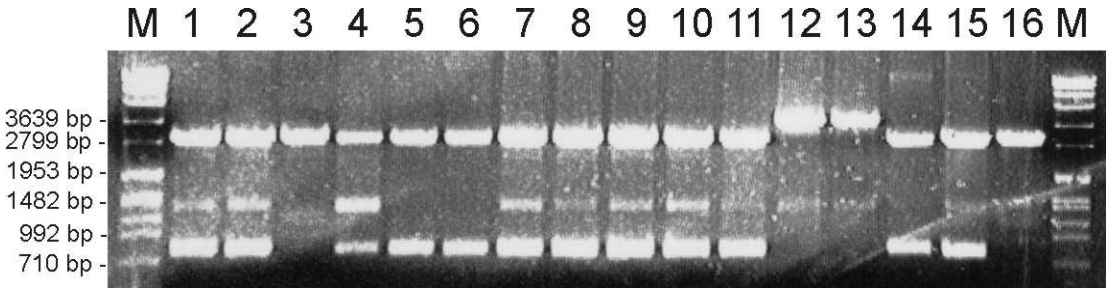


Abbildung 21: TA-Cloning mit dem P1foXba / P1reSac PCR-Produkt, erhaltene Plasmide *Xba I* / *Sac* restringiert

M: Marker; 1-15: weiße Kolonien; 16 blaue Kolonie; 1 % Agarosegel.

Anschließend konnte phl p 1 in den 35s-nos Vektor umkloniert werden. Dazu wurden die Plasmide 35s-nos und pGEM-T (mit dem enthaltenen phl p 1) mit *Xba I* und *Sac I* verdaut, die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, phl p 1 in 35s-nos einligiert und in XL1-Blue Zellen transformiert (**Abbildung 22**, Spur 1). 18 Kolonien wurden für eine weitere Bearbeitung ausgewählt und zunächst einer Restriktionsanalyse unterzogen (**Abbildung 22**, Spur 2). Dabei zeigte sich, dass die meisten Plasmide tatsächlich Inserts der gewünschten Größe enthielten.

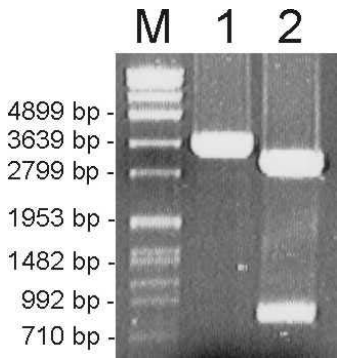


Abbildung 22: Restriktion von 35s-nos und pGEM-T-phl p 1 mit *Xba I* und *Sac I*
M: Marker; 1: 35s-nos, *Xba* / *Sac* geschnitten; 2: pGEM-T-phl p 1, *Xba* / *Sac* geschnitten, 1 % Agarosegel.

Nach Überprüfung von 3 Klonen mittels Sequenzierung mit den Primern P1foXba und P1reSac sowie 35s (Kontrolle des 35s Promotors) wurde einer der drei Klone (alle mit vollständigem phl p 1 und 35s Promotor) für die Transformation von Tabakblättern ausgewählt.

3.5.2 Transiente Transformation von Tabakblättern

Tabak wurde als System zur Expression von Phl p 1 gewählt, um das Allergen in möglichst natürlicher Form (N-Glycosylierung mit α1-3 Fucose, richtige Disulfidverbrückung und evtl. Arabinosylierung) zu erhalten.
Zur Expression von Phl p 1 im Tabaksystem wurde das 35s-phl p 1-nos Konstrukt an Goldpartikel gebunden, welche mit der Genegun in Tabakblätter geschossen wurden. Zur Kontrolle wurde auf die gleiche Weise ein Konstrukt verwendet, welches neben dem 35s-Promotor und nos-Terminator das Gen für das Green-Fluorescent-Protein (GFP) enthielt. Dieses Protein fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht leuchtend grün und findet so als Marker für erfolgreiche Transformationen Verwendung. In dem entsprechenden Konstrukt, war das GFP zur Expression im Cytoplasma und Zellkern bestimmt.
Nach Inkubation der beschossenen Blätter für 48 h zeigte sich, dass die Zellen im direkten Einschussbereich z.T. stark geschädigt waren. Nur in den Randbereichen des Schussfeldes konnten bei den GFP-Kontrollen unter UV-Licht deutlich die grün leuchtenden transformierten Zellen von den nicht transformierten, lediglich die rote Fluoreszenz des

Chlorophylls zeigenden Zellen unterschieden werden (**Abbildung 23**). Deutlich ließen sich in den transformierten Epidermiszellen die durch das GFP grün leuchtenden Kerne und das Cytoplasma erkennen.

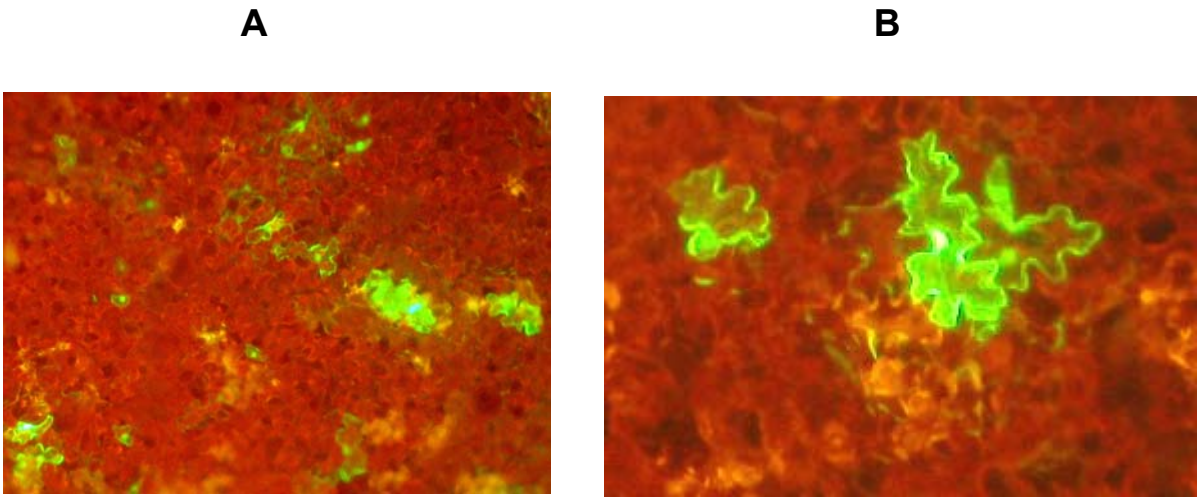


Abbildung 23: GFP-Kontrollen der transienten Transformation von Tabak mit der Genegun
A: Gewebeübersicht, Blattunterseite (unter UV-Licht) mit deutlich von der roten Chlorophyll-Fluoreszenz abgehobenen GFP-transformierten Epidermiszellen (grün)
B: weitere Vergrößerung (5fach), deutlich erkennbar das grün leuchtende Cytoplasma und der Zellkern

Aus den mit dem phl p 1-Konstrukt sowie mit dem Leervektor beschossenen Blättern wurden die enthaltenen Proteine extrahiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran geblottet. Anschließend wurde mit den Phl p 1-spezifischen monoklonalen Antikörpern Bo 14, IG 12 und HB 7 (binden C-terminal, im mittleren Bereich des Moleküls und N-terminal) sowie mit Bo 1 (spezifisch für das Majorallergen Phl p 5 aus Lieschgraspollen) auf das Vorhandensein von Phl p 1 getestet (**Abbildung 24**).

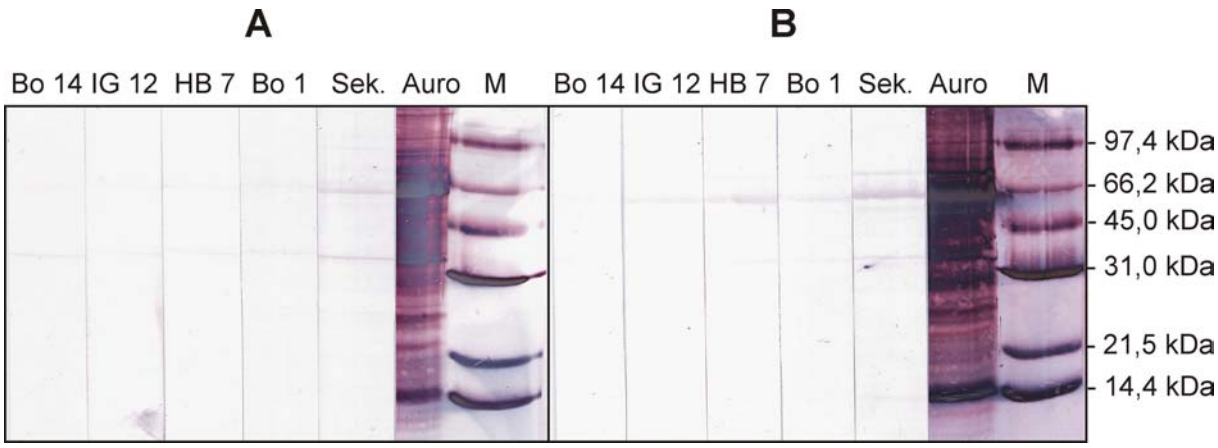


Abbildung 24: Blot von Proteinextrakt aus Tabakblättern, die mit dem phl p 1-transfiziert worden waren

A: 35s-phl p 1-nos Konstrukt; B: Leervektor

Detektiert mit 1: Bo 14 (gegen Phl p 1 gerichtet); 2: IG 12 (gegen Phl p 1 gerichtet); 3: HB 7 (gegen Phl p 1 gerichtet); 4: Bo 1 (gegen Phl p 5 gerichtet); 5: ausschließlich Sekundärantikörper (anti-IgG + M); 6: AuroDye; 7: Marker

Für alle monoklonalen Antikörper, einschließlich Bo 1, zeigten sich schwache Banden bei ca. 60 und 35 kDa. Letzteres könnte dem Phl p 1 entsprechen, doch die Reaktivität auch von Bo 1, die intensiven Banden in der Proteinfärbung mit Aurodye und vor allem das Auftreten der Banden auch bei den mit Leervektor tranfizierten Blättern zeigten, dass es sich nicht um eine spezifische Bindung handelte. Dies wird weiter durch die Tatsache verdeutlicht, dass auch nach Inkubation ausschließlich mit dem Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG und M) die entsprechenden Banden nicht nur auftraten, sondern im Vergleich sogar die deutlichsten waren.

4 Diskussion

4.1 Kohlenhydrat- und Peptidepitope

Der Einfluss von IgE-reaktiven Peptidepitopen auf die allergische Reaktion ist unbestritten. Wird bei *in vitro* Untersuchungen gegen ein Peptidepitop gerichtetes IgE nachgewiesen, so geht man davon aus, dass dieses Epitop an der Freisetzung der Mediatoren und damit an der Auslösung der allergischen Symptome beteiligt ist. Kohlenhydrat-haltigen Epitopen wird dagegen häufig eine solche Beteiligung abgesprochen (Aalberse et al., 1997; van der Veen, 1997), obwohl auch Befunde vorliegen, nach denen Kohlenhydrate durchaus an der Freisetzung von Mediatoren beteiligt sein sind (Batanero et al., 1999). Unstrittig ist, dass komplexe N-Glycane mit α1-3 Fucose und / oder β1-2 Xylose IgE-Epitope darstellen (van Ree et al., 2000). Aufgrund der Verbreitung solcher Strukturen kann es daher bei entsprechender Sensibilisierung zu IgE-Kreuzreaktivitäten über einen weiten Bereich von Glycoproteinen kommen (Wilson und Altmann, 1998; Tretter et al., 1993). Ob diese IgE-Reaktivität funktionell eine Rolle spielt, ist nach wie vor unklar (Fötisch und Vieths, 2001). Die vorliegende Arbeit sollte am Beispiel des Phl p 1 aus den Pollen des Lieschgrases (*Phleum pratense* L.) einen Beitrag zur Klärung dieses Sachverhaltes liefern. Ziel der Arbeit war es, die Kohlenhydratstrukturen des proteinchemisch bereits gut untersuchten Graspollen-Majorallergens Phl p 1 strukturell und immunologisch zu charakterisieren.

4.2 Glycoformen des Phl p 1

Die häufigsten IgE-reaktiven Kohlenhydratstrukturen gehören zu den komplexen N-Glycanen. Diese sind nicht artspezifisch und relativ invariabel, was besonders für pflanzliche N-Glycane gilt (Wilson und Altmann, 1998). Bedingt durch die geringe Variabilität der komplexen N-Glycane ist in der Regel eine Ableitung ihrer Struktur allein aus ihrer Masse möglich (Kolarich und Altmann, 2000). Zusätzlich lässt sich diese Struktur durch die Bestimmung der Monosaccharid-Bausteine absichern. Für das natürliche Phl p 1 konnte die

aus der cDNA-Sequenz abgeleitete N-Glycosylierungsstelle betätigt werden. Grobe Anhaltspunkte für die Monosaccharid-Zusammensetzung konnten exakter bestimmt und erhärtet werden. Zu diesem Zweck wurde das Phl p 1 tryptisch gespalten und alle Peptide auf Zuckerbestandteile untersucht. Durch die konsequente Prüfung aller Peptide war es möglich, auch andere Bindungsstellen von Glycanen an das Phl p 1 zu finden. Ausschlaggebend für den Erfolg der Versuche waren die Optimierung der Techniken des enzymatischen Abbaus von Allergenen und der Chromatographie (HPLC) von Peptiden, die erstmalig eine detaillierte Untersuchung des natürlichen Phl p 1 ermöglichten.

Die für das einzige Glycopeptid gefundenen Monosaccharide N-Acetylglucosamin, Mannose, Fucose, Xylose sind alle häufige Bestandteile pflanzlicher N-Glycane (Fötisch und Vieths, 2001). Der aufgrund der cDNA-Sequenz erwartete Asparaginrest an Position 9 der Aminosäurekette konnte bei der N-terminalen Sequenzierung nicht nachgewiesen werden, was zusammen mit der Monosaccharid-Zusammensetzung deutlich anzeigt, dass tatsächlich eine Glycosylierung vorliegt (**Abbildung 25**).

Abbildung 25: Der N-Terminus des natürlichen Phl p 1 mit seinen posttranslationalen Modifikationen

Nach tryptischem Verdau isoliertes Glycopeptid grün unterstrichen, Hydroxyprolin-Reste in blau, N-Glycosylierungsmotiv rot hervorgehoben; Ara: Arabinose.

Mit dem Enzym N-Glycosidase A gelang eine Abspaltung des N-Glycans vom Peptid 4-17, nicht aber mit N-Glycosidase F, was deutlich auf das Vorhandensein von α1-3 core-Fucose hindeutet, da nur N-Glycosidase A ein komplexes N-Glycan mit einer solchen Fucose vom Peptid abspalten kann (Tretter et al., 1991; Altmann et al., 1995). Die Monosaccharid-Zusammensetzung zeigte zusammen mit den aus der Massenspektrometrie erhaltenen Daten, dass zwei Varianten (Glycoformen) des Phl p 1 N-Glycans existieren. Eine dieser Glycoformen (1008 Da, **Abbildung 26 A**, **C**) entspricht exakt dem für die Protease Bromelain beschriebenen N-Glycan (Ishiara et al., 1979; van Kuik et al., 1986) und kommt in ca. 60 % der Phl p 1-Moleküle vor, wohingegen die andere Glycoform (1170 Da, **Abbildung 26 B**, **D**)

einen zusätzlichen, α1-3 gebundenen Mannoserest trägt, wie bereits für die Meerrettich Peroxidase beschrieben (Kurosaka et al., 1991). Die Bindung des Xyloserestes β1-2 an die Kernmannose konnte aufgrund der geringen Varianz der N-Glycane aus der Literatur (Fötisch und Vieths, 2001; Kolarich und Altmann, 2000) erschlossen werden, da ein einzelner Xyloserest in pflanzlichen N-Glycanen bislang nur in dieser Form beschrieben wurde.

Abbildung 26: Die Glycoformen des Phl p 1

Neben der Grundform des N-Glycans (A, C) kommt eine weitere Glycoform mit einem zusätzlichen α1-3 Mannoserest vor (B,D), zusammen mit dem Vorhandensein oder dem Fehlen des Arabinoserestes bedingt dies die 4 Glycoformen des natürlichen Phl p 1-Moleküls.

Ein Arabinoserest als Bestandteil eines freien pflanzlichen N-Glycans wurde einmal für Tomate beschrieben (Priem et al., 1993), die N-Glycane aus Lieschgraspollen enthalten

jedoch keine Arabinose (Altmann et al., unveröffentlicht). Beim natürlichen Phl p 1 blieb nach der Abspaltung des N-Glycans mittels N-Glycosidase A die Arabinose an das Peptid 4-17 gebunden, wie durch die MALDI bzw. ESI-Experimente bewiesen. Es ist eindeutig, dass die Arabinose beim Phl p 1 nicht Bestandteil des N-Glycans ist. Statt dessen konnte anhand der Fragmente der MALDI-TOF- und besonders der ESI-MS-MS-Analysen eindeutig die Bindung des Arabinoserestes ausschließlich an den ersten der beiden Hydroxyprolinreste (Aminosäure-Position 5 im natürlichen Phl p 1-Molekül) abgeleitet werden. Es handelt sich also um eine O-glycosidische Bindung der Arabinose direkt an das Protein (**Abbildung 26 C**, **D**). Allerdings sind nur etwa 60 %-der Phl p 1 Moleküle auf diese Weise O-glycosyliert, wie aus der Relation der Flächen der entsprechenden Massenpeaks bestimmt werden konnte. Die Verhältnisse der Zucker Fucose : Xylose : Arabinose (1 : 1 : 1, s. **Abildung 8**) aus der Neutralzuckeranalyse stützen dieses Ergebnis jedoch nicht. Aufgrund der MALDI-Daten wäre ein Verhältnis von 1 : 1 : 0,6 zu erwarten gewesen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Bindung der furanosidischen Arabinose an das Hydroxyprolin bei der Verdampfung der Probe durch den Laserbeschuss (bei der Massenbestimmung mittels MALDI) weniger stabil ist als die Bindungen im N-Glycan. Literaturdaten zur Stabilität von solcherart gebundener furanosidischer Arabinose in der Massenspektrometrie liegen nicht vor. Es wäre demnach möglich, dass der tatsächliche Anteil von arabinosyliertem Phl p 1 höher als 60 % liegt, ja sogar dass er wie bei der N-Glycosylierung bei 100 % liegt und es sich bei dem nicht O-glycosylierten Phl p 1 um ein Artefakt handelt.

Im Gegensatz zum N-Glycan verhindert eine O-glycosidisch gebundene Arabinose nicht die Bestimmung des gebundenen Aminosäurerestes durch N-terminale Sequenzierung, da die Bindung zwischen Arabinose und Hydroxyprolin unter stark sauren Bedingungen (wie die des Edman-Abbaus) instabil ist und der Zucker abgespalten wird (Clarke et al., 1979).

Ein einzelner Arabinoserest gebunden an Hydroxyprolin stellt eine für Allergene neuartige Struktur dar, wurde aber für Arabinose-reiche Proteine wie Extensine bereits beschrieben, wenn auch hier häufiger Ketten von drei bis vier Arabinosen gebunden sind (Clarke et al., 1979). O-Glycosylierung an Hydroxyprolinresten wie z.B. in den Prolin-reichen Proteinen (PRP) kommt im Pflanzenreich häufig vor (Showalter, 2001).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für Tabak, Mais und andere Pflanzen eine Konsensussequenz für die Arabinosylierung von Hydroxyprolinresten beschrieben worden ist. Diese Konsensussequenz lautet typischerweise Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys oder Varianten davon (Shpak et al., 1999). Alle diese Aminosäuren sind mit Ausnahme des Tyrosins auch im N-terminalen Bereich von nPhl p 1 vor der N-Glycosylierungsstelle vorhanden, es liegt also hier

mit Lys-Val-Hyp-Pro durchaus eine Variante der Konsensussequenz aus der Literatur vor. Diese Konsensussequenzen treten allerdings in der Regel repetitiv auf (Shpak et al., 2001), während beim Phl p 1 keine Wiederholung bestimmter Sequenzmotive aus diesem Proteinabschnitt zu finden ist. Falls, wie oben erwähnt, beim Phl p 1 tatsächlich nur rund 60 % der Moleküle arabinosyliert sind, wäre es möglich, dass die eventuell nicht in jedem Fall erfolgende O-Glycosylierung des Hydroxyprolinrestes 5 auf die fehlende Wiederholung des Motivs zurückzuführen ist. Aus den durchgeführten Versuchen kann dies jedoch aufgrund der oben genannten Unwägbarkeiten nicht abgeleitet werden.

Für die Gruppe 1-Allergene aus Honiggras (*Holcus lanatus*, Hol l 1) und Lolchgras (*Lolium perenne*, Lol p 1) konnte in Neutralzuckeranalysen das Vorhandensein von Arabinose nachgewiesen werden (Petersen, A., pers. Mitteilung). Es wäre hier sinnvoll, weitere Gräserallergene der Gruppe 1 auf Arabinosylierung in diesem Bereich des Moleküls zu untersuchen, um weitere Hinweise zu finden, ob es sich tatsächlich um eine Arabinosylierungssequenz bei Gräsern handelt. Vergleicht man die cDNA-Sequenzen einiger Gruppe 1-Allergene (**Abbildung 27**), so stellt man zunächst fest, dass die N-Glycosylierungsstelle bei allen konserviert ist. Die N-terminale Glycosylierung scheint also für die Funktion des Moleküls wichtig zu sein. Daneben ist auch die mögliche Arabinosylierungssequenz (neben einigen anderen Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung der N-Glycosylierungstelle) konserviert. Dabei ist davon auszugehen, dass auch die Hydroxylierung der Proline entsprechend dem Phl p 1 durchgeführt wird, was zumindest für Lol p 1 und Hol l 1 auch durch N-terminale Sequenzierung definitiv nachgewiesen werden konnte (Petersen et al., 1997). Möglicherweise wird bei einigen Gräsern der funktionelle Effekt der N-Glycosylierung durch eine zusätzliche Arabinosylierung verstärkt. Eine Folge der Glycosylierungen ist eine punktuellen Erhöhung der Hy-drophilie. Darüber hinaus könnten die Kohlenhydratstrukturen auch an der Funktion der Proteine in der Pflanze beteiligt sein: Bei den Gruppe 1-Allergenen der Gräser handelt es sich um β-Expansine, d.h. Proteine, die eine Relaxation von pflanzlichen Zellwänden herbeiführen können (Cosgrove et al. 1997). Möglicherweise sind die Gruppe 1-Allergene Cysteinproteasen (Grobe et al., 1999), die durch Abspaltung einer N-terminalen Prosequenz aktiviert werden (Pöppelmann, 2002). Da Glycosylierungen zu einer Stabilisierung von Proteinen gegenüber enzymatischen Spaltungen beitragen können (Rasmussen, 1992; Lis und Sharon, 1993), wäre es möglich, dass am N-Terminus des Phl p 1 gebundene Glycane die Aktivierung der Proteaseaktivität erschweren. Die Glycosylierungen könnten auf diese Weise an der Regulation der β-Expansin-Aktivität des Phl p 1 beteiligt sein.

Allgemein fällt auf, dass sich die N-Termini der Gruppe 1-Allergene stark ähneln. Auch dies deutet darauf hin, dass bestimmte Aminosäuremotive eine Bedeutung (z.B. als Erkennungsstellen für Proteasen) für die Funktion der Moleküle als β-Expansine haben könnten. Beispielsweise verringert die Hydroxylierung eines Prolinrestes, den scharfen Knick in der Aminosäurekette, der ansonsten durch diesen hervorgerufen wird, und nimmt so direkt Einfluss auf die räumliche Struktur des Proteins. Auch der Glycinrest an Position 7 sowie der zweite Hydroxyprolinrest sind u.U. Teil des Arabinosylierungsmotives, zumindest sind auch hier die Aminosäuren konserviert.

```
Phl p 1: IPKVPPGPNITATYGDKWLD...*
Lol p 1: IAKVPPGPNITAEYGDKWLD...*
Hol l 1: IAKVPPGPNITATYGDEWLD...*
Pha a 1: IAKVPPGPNITAEYGDKWLD...
Ory s 1: HPKVPPGPNITTSYGDKWLE...
Zea m 1: PPKVPPGPNITTNYNGKWLT...
Cyn d 1: IAKVPPGPNITAEYGDKWLD...
```

Abbildung 27: Der N-Terminus einiger Gruppe 1-Allergene nach der cDNA-Sequenz

Phl p 1: *Phleum pratense*; Lol p 1: *Lolium perenne*, Perez et al., 1999; Hol l 1: *Holcus lanatus*, Schramm et al., 1997; Pha a 1: *Phalaris aquatica*, Suphioglu et al., 1993; Ory s 1: *Oryza sativa*, Xu et al., 1993; Zea m 1: *Zea mays*, Wu et al., 2001; Cyn d 1: *Cynodon dactylon*, Singh et al., 2002; rot: N-Glycosylierungsmotiv; grün: vermutetes Arabinosylierungsmotiv; fett: konservierte Aminosäuren; *: Hydroxylierung der Proline an AS-Position 5 und 8 sowie Arabinosylierung nachgewiesen.

4.3 Immunologische Aspekte

4.3.1 IgE-Reaktivität der N-Glycane

Die Beteiligung von Kohlenhydraten an der Mediatorfreisetzung und den damit verbundenen allergischen Symptomen ist in der Vergangenheit kontrovers diskutiert worden (Aalberse et al., 1997; van der Veen, 1997; Batanero, 1999). Seit langem ist bekannt, dass IgE an N-Glycane binden kann und solche und ähnliche Glycane ein Grund für kreuzreaktives IgE sein können. Es handelte sich hier in erster Linie um α1-3 Fucose und β1-2 Xylose enthaltende komplexe N-Glycane, welche im Pflanzenreich und - im Falle der α1-3 Fucose - auch bei Arthropoden und Würmern weit verbreitet sind (Tretter et al. 1993; Wilson et al, 1998, siehe auch **Abbildung 3** in **1.3**). Beide dieser Strukturen sind im N-Glycan des Phl p 1 vorhanden. Entscheidend für die IgE-Reaktivität ist in den meisten Fällen die α1-3 Fucose, wie Fötisch et al. (1999) durch Defucosylierung zeigen konnten, weshalb auch in der vorliegenden Arbeit nach Fucose-haltigen Glycoproteinen im Lieschgras-Pollenextrakt gesucht wurde. Auch die β1-2 Xylose allein kann allerdings in einigen Fällen eine IgE-Reaktivität des N-Glycans bedingen (Garcia-Casado et al., 1996). Die weite Verbreitung von N-Glycanen mit solchen Strukturen kann zu unerwarteten Kreuzreaktivitäten führen, wie die vorliegende Arbeit am Beispiel Lieschgraspollen und Bienengift (mit der Phospholipase A2 als Hauptallergen) zeigt. So konnte bei Patienten mit Bienengiftallergie sowie für die zwei polysensibilisierten Patienten eindeutig nachgewiesen werden, dass sich deren IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt ausschließlich gegen Fucose-haltige N-Glycane richtet. Im Falle der Bienengiftallergiker muss die α1-3 Fucose ausschlaggebend für die Reaktivität gegen den Pollenextrakt sein, da β1-2 Xylose bei Insekten nicht vorkommt (Faye und Chrispeels, 1988). Dagegen kann bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten polysensibilisierten Patienten eine Beteiligung auch der Xylose an der Antikörperbindung nicht ausgeschlossen werden, da das als Inhibitor eingesetzte Bromelain N-Glycan diese ebenfalls enthält.

Dass zur gleichen Zeit ein Fucose- und ein Xylose-spezifischer Antikörper an das N-Glycan des Phl p 1 gebunden sein könnten, erscheint aufgrund der engen räumlichen Nähe beider Strukturen und der damit verbundenen sterischen Hinderung fraglich. Insbesondere für die größere Glycoform (1170 Da, **Abbildung 26 B** / **D**) ist zudem mit einer Blockierung der Xylose durch die zusätzliche α1-3 Mannose zu rechnen (van Ree et al. 2000). Auch ist zu bedenken, dass zwar ein einziges zusätzliches Monosaccharid in einem N-Glycan zu einer

IgE-Reaktivität führen kann (wie das Beispiel der α1-3 Fucose zeigt), dass aber dennoch nicht ein einzelnes Monosaccharid in einer bestimmten Bindung an den Rest des Moleküls ein IgE-Epitop darstellt. Es werden immer mehrere Zuckerbausteine zusammen von den Antikörpern gebunden (Kurosaka et al., 1991; van Ree et al., 2000). Auf die Bedeutung, die dem Aparaginrest dabei zukommt, wurde bereits hingewiesen (siehe **1.3**). Insofern kann man nicht von einem reinen Kohlenhydratepitop sprechen.

Bei der ersten Sensibilisierung gegen ein Glycan werden die Antigen-präsentierenden Zellen die Glycoproteine in Peptide zerlegen und diese über MHC II präsentieren, so dass eben eine Sensibilisierung gegen Glycopeptide und nicht gegen reine Glycane stattfindet.

Während also die IgE-Reaktivität gegen Kohlenhydrat-Seitenketten eines Proteins allgemein akzeptiert ist, wurde auf der anderen Seite argumentiert, dass die Kohlenhydrate keinen Einfluss auf die allergische Reaktion hätten. Das Hauptargument dafür war, dass die meisten beschriebenen allergenen Glycoproteine nur ein N-Glycosylierungsmotiv enthielten und ihnen damit die Fähigkeit zur Quervernetzung des IgE auf den Fcε-Rezeptoren und somit zur Mediator-Freisetzung fehle (Aalberse et al., 1997). Auch wurde die Frage aufgeworfen, ob nicht IgE gegen Kohlenhydratepitope eine zu niedrige Affinität aufweise, um effektiv zu einer Mediator-Freisetzung zu führen (van der Veen, 1997; van Ree und Aalberse 1999).

4.4 Hydroxyprolin-Arabinose: Ein wichtiger Anteil von IgE-Epitopen?

Wie nachgewiesen, besitzt das natürliche Phl p 1 eine O-Glycosylierung zusätzlich zum N-Glycan. Entsteht durch gebundene Arabinose eine weitere IgE-reaktive Struktur? Bislang gibt es dafür nach den vorliegenden Daten keine Hinweise. In den 6 ausschließlich gegen Kohlenhydrate gerichteten Patientenseren (B2, B4, B6, B8, Bo220 und PG) konnte die IgE-Reaktivität allein schon mit dem N-Glycan effektiv blockiert werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass der Abschnitt mit Hydroxyprolin-Arabinose, Teil eines IgE-Epitopes sein könnte. Meist stellt man in Hauttests eine verminderte Reaktivität von rekombinanten gegenüber natürlichen Allergenen fest. (Petersen et al., 1998), was - neben der veränderten räumlichen Struktur (Konformation) - zumindest zum Teil auf das Fehlen posttranslationaler Modifikationen zurückzuführen sein dürfte. Hydroxylierung von Prolin allein kann bereits für

eine erhöhte Affinität von IgE-Antikörpern ausreichen (Petersen et al., 1998). Somit ist es durchaus möglich, dass auch der Arabinoserest Teil von IgE-Epitopen ist. Arabinose kommt als Baustein von Glycanen im Tierreich nur bei Tunikaten vor (Baginski et al., 1999) und könnte demnach ein starkes Immunogen sein, so wie auch α1-3 Fucose-haltige N-Glycane als fremd erkannt werden und eine immunologische Signalwirkung haben können (Dudler et al., 1995). Die Arabinose enthaltenen Polysaccharide aus Lieschgraspollen sind beispielsweise immunogen (s.u.).

Eine Glycosylierung führt normalerweise in der unmittelbaren Umgebung zu einer Erhöhung der Hydrophilie, so dass dieser Bereich des Proteins zumeist nach außen gekehrt und somit für Antikörper zugänglich wäre. Andererseits könnte auch die enge räumlich Nähe der Arabinose zum N-Glycan zu einer sterischen Abschirmung führen: Das N-Glycan könnte in diesem Fall die Bindung von Antikörpern an das O-Glycan ganz oder teilweise behindern, so dass eine IgE-Reaktivität inhibiert würde.

4.5 Antikörperreaktivität der Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt

Für ein repetitives Polysaccharid aus Gummi arabicum (aus *Acacia senegal*) wurde IgE-Bindung beschrieben (ohne eine Beteiligung des daran gebundenen Proteinanteils), die auch zur Ausprägung von klinischen Symptomen führte (Fötisch et al., 1998).

Die ELISA-Untersuchungen zur Antikörperbindung an die Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt (**3.3.1**) zeigten allerdings eindeutig, dass keine der getesteten Gruppen spezifisches IgE gegen die Arabinogalactane besitzt. Somit scheiden sie (zumindest in dem untersuchten Patientenkollektiv) als Verursacher einer klassischen Typ I-Allergie aus.

Die Polysaccharide aus Lieschgraspollen sind aber immunogen: Alle untersuchten Gruppen zeigen deutlich IgG gegen das Gemisch aus Galactan und Arabinogalactan; ein Unterschied zwischen Gräserpollen-Allergikern, anderen Atopikern sowie Nicht-Allergikern konnte nicht festgestellt werden. Dieser Umstand spricht gegen eine Beteiligung der Polysaccharide an der Entstehung einer Gräserpollenallergie. Ansonsten wäre ein Unterschied in der Immunantwort zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern zu erwarten gewesen, der jedoch zumindest in den untersuchten Antikörpern nicht zu erkennen war. Auswirkungen und Funktion der IgG-

Antwort gegen die Polysaccharide waren mit den durchgeführten Versuche nicht bestimmbar, da lediglich Seren auf Antikörper hin untersucht und keine Experimente zur Bedeutung dieser Antikörper für bestimmte Populationen von Immunzellen durchgeführt wurden.
Für Kohlenhydrat-Partikel wurde in jüngster Zeit eine positive Wirkung (als Adiuvantien) auf die Hyposensibilisierungstherapie beschrieben (Gronlund et al. 2002). Da für die Hyposensibilisierung von Gräserpollen-Allergikern meist Pollengesamtextrakt eingesetzt wird, in dem die beschriebenen Polysaccharide enthalten sind, wäre auch hier ein positiver Einfluss des Arabinogalactans denkbar. Für das Arabinogalactan aus Lärche wurde jedenfalls eine immunmodulierende Wirkung über die T-Zellen und Nk-Zellen beschrieben (Kelly, 1999), wobei die Immunantwort mehr über angeborene Immunität bzw. über die Verschiebung in Richtung T_H1 erfolgte.

4.6 Mediator-Freisetzung durch Kohlenhydrate

Die Frage nach der klinischen Relevanz der Kohlenhydratstrukturen ist untrennbar mit ihrer Fähigkeit verbunden, Mediatoren wie Histamin und IL-4 freizusetzen. Nur wenn es zur Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen und damit zur Mediator-Freisetzung kommt, können tatsächlich allergische Symptome ausgelöst werden (Metcalfe et al., 1997). Zumeist scheinen mit kreuzreaktiven Kohlenhydrat-Determinanten (CCD) keine positiven Hauttests bzw. klinischen Symptome verbunden zu sein (van der Veen et al., 1997; van Ree, 2002).
In einigen Fällen hat die IgE-Reaktivität gegen Kohlenhydratstrukturen offensichtlich aber eine klinische Bedeutung: Der Patient Bo220 beispielsweise leidet unter einer Allergie gegen Graspollen (Anamnese und Hauttest) und das einzige nachweisbare IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt ist gegen Fucose-tragende Glycoproteine gerichtet. Dieses N-Glycan kann in der Tat die Freisetzung von Mediatoren (IL-4) auslösen, wenn mindestens zwei dieser Glycostrukturen auf dem entsprechenden Protein vorhanden sind. Offensichtlich kann diese Kohlenhydratstruktur eine Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren verursachen. Dies ist beim nPhl p 13 (vier potentielle N-Glycosylierungsstellen im Molekül) und dem Bromelain N-Glycan konjugierten BSA (5-6 Glycane), nicht aber beim Phl p 1 mit seinem einzelnen N-Glycan der Fall.

Der Patient PG leidet im Gegensatz zu Bo220 nicht unter einer Gräserpollenallergie und reagiert auch im Hauttest nicht mit Graspollenextrakt. Das Serum enthält aber dennoch IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt in hoher Konzentration (UniCap Klasse 6) und dieses IgE ist sowohl dem Immunoblot als auch dem Inhibitions-ELISA nach ausschließlich gegen Kohlenhydratstrukturen gerichtet. Obwohl der Patient keine klinischen Symptome zeigt, d.h es *in vivo* offensichtlich nicht zu einer nennenswerten Ausschüttung von Mediatoren nach einer Exposition kommt, lässt sich im durchgeführten Basophilen-Release-Test eindeutig eine Freisetzung von IL-4 beobachten, die in ihrer Stärke der für Bo220 beobachteten entspricht.
Für das Kontrollserum W (von einem Graspollenallergiker, der ausschließlich mit Proteinepitopen reagiert) lässt sich eine IL-4 Freisetzung dagegen erwartungsgemäß nur mit Graspollenallergenen und Glycan-freiem rekombinanten Phl p 1 auslösen, was die Zuverlässigkeit des Testsystems bestätigt.
In einer neuen Studie (Mari, 2002) reagierten 21 % der Patienten mit IgE ausschließlich gegen CCD im Hauttest positiv gegen Meerrettich-Peroxidase (HRP), wohingegen eine Hautreaktion bei 79 % unterblieb. Das HRP-Molekül enthält mehrere potentielle N-Glycosylierungsstellen (bis zu acht, je nach Isoform) und seine N-Glycane entsprechen der (1170 Da) Glycoform des Phl p 1 mit der zusätzlichen α1-3 Mannose (Kurosaka et al., 1991). Ob bei den 79 % negativ getesteten Patienten eine Freisetzung von Mediatoren unterblieb, geht aus der Studie nicht hervor. Bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Patienten Bo220 und PG kam es im beschriebenen Basophilen-Release-Test zur IL-4-Freisetzung, im Hauttest gegen Gräserpollenextrakt dagegen reagierte nur Bo220 positiv. Warum reagiert der Patient PG in den beiden Testsystemen scheinbar so widersprüchlich?
Wird bei einem Patienten erfolgreich eine Hyposensibilisierungstherapie durchgeführt, so lassen sich Veränderungen in der Konzentration verschiedener Mediatoren und Antikörperklassen im Serum feststellen, der Titer an Allergen-spezifischem IgE nimmt zwar häufig ab (Tsai et al., 1990), dies ist aber nicht unbedingt mit einem Nachlassen der Symptome verbunden (Ohashi et al., 1997). Ein Faktor, dessen Zunahme bei einer erfolgreichen Hyposensibilisierung in der Vergangenheit beobachtet wurde, ist (Allergen-spezifisches) IgG4. Bienengift-Exponierte wie Imker haben häufig einen relativ hohen IgG4-Spiegel verglichen mit IgE. Unter Hyposensibilisierung konnte beobachtet werden, wie sich bei Bienengift-Allergikern das Verhältnis IgG4 / IgE zugunsten des IgG4 verschob, sofern die Therapie erfolgreich verlief, wobei die Zunahme von IgG4 eventuell lediglich die Folge einer Induktion von T-Zell-Toleranz war (Akdis et al. 1996). Daher wurde für die Ausprägung der Symptome der Typ I Allergie eine inhibierende / blockierende Wirkung des IgG4 postuliert.

Nach meinen Ergebnissen von Immunoblot und Inhibitions-ELISA besitzen die Seren Bo220 und PG jedoch einem IgG4-Spiegel im gleichen Grössenbereich. Tendenziell fällt das Verhältnis bei Bo220, dem Serum des Allergikers, sogar stärker zugunsten von IgG4 aus als beim Serum PG, was wiederum nicht für eine entscheidende Bedeutung des IgG4 in diesem Fall spricht. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass für die durchgeführten Experimente passiv resensibilisierte Basophile eines nicht atopischen Spenders verwendet wurden. Sollte also zwischen Bo220 und PG ein Unterschied in der Dichte der Fcγ-Rezeptoren (IgG-Rezeptoren) auf den Basophilen bestehen, so würde dieser in dem angewendeten Testsystem nicht erfasst. Auf jeden Fall sprechen die erhaltenen Daten dafür, dass die Zunahme von IgG4 nicht primär die Ursache für die Abnahme allergischer Symptome ist, sondern die Folge anderer Prozesse, wie z.B. die oben erwähnte Induktion von T-Zell-Toleranz.

Das Vorhandensein von IgE gegen ein potentielles Allergen ist allein nicht ausreichend, um tatsächlich auch eine Allergie zu begründen. Vielmehr ist offensichtlich die An- oder Abwesenheit (im Fall von IgG4) weiterer Faktoren notwendig. Auch Patienten, die erfolgreich desensibilisiert wurden, behalten zeitlebens ihr IgE gegen die entsprechenden Allergene, auch wenn der entsprechende Titer sinkt (Tsai et al., 1990). Bedenkt man dies, so ist es vielleicht an der Zeit, den Kohlenhydratstrukturen in Bezug auf ihren Epitop-Charakter keinen Sonderstatus mehr einzuräumen. In den durchgeführten Versuchen verhielten sich die Kohlenhydrate jedenfalls wie jedes andere (Protein-)Epitop auch. Auch für das Panallergen Profilin, ein Protein, welches homolog in vielen Extrakten enthalten ist, wurde eine weit verbreitete IgE-Kreuzreaktivität beschrieben, die jedoch meist nicht mit einer klinischen Relevanz korreliert (Wensing et al., 2002). Dass es sich bei einem Epitop um ein Kohlenhydrat handelt, wäre demnach nicht primär für seine klinische Relevanz entscheidend. Dabei bleibt anzumerken, dass konkrete Studien zum Affinitätsvergleich von Kohlenhydrat- und Proteinepitopen bisher nicht durchgeführt bzw. publiziert wurden, obwohl in der Literatur über die Frage von Affinitätsunterschieden spekuliert wird (van Ree, 2002). Generell ist die Frage, warum ein beliebiges Epitop (sei es Glycan oder Protein) für den einen Patienten klinische Relevanz besitzt und für den anderen nicht, noch ungeklärt. Dass dies nach langen Jahren allergologischer Forschung noch immer so ist, hängt u.a. mit der Komplexizität des Immunsystems und des genetischen Backgrounds der Bevölkerung zusammen.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Protein- und den Kohlenhydrat-Epitopen besteht in der Regel in der geringeren Variabilität der letzteren. Eine Sensibilisierung gegen ein N-Glycan wie das des Phl p 1 führt so zu kreuzreaktivem IgE gegen ein großes Spektrum an Proteinen unterschiedlichster Herkunft. Am Beispiel des homolog in vielen Allergen-

Extrakten vorhandenen Profilins lässt sich zeigen, dass offensichtlich auch bei invariablen Proteinepitopen die IgE-Kreuzreaktivität nur in wenigen Fällen mit klinischen Symptomen verbunden ist (Wensing et al., 2002). Möglicherweise sind es solche Panepitope - egal ob Kohlenhydrat oder Protein - deren IgE-Reaktivität klinisch meist irrelevant ist. N-Glycane mit α1-3 Fucose beispielsweise sind so weit verbreitet, dass kaum pflanzliche Lebensmittel ohne sie vorkommen. Über die Nahrung wird also ein gegen diese N-Glycane sensibilisierter Patient - vollkommen unbewusst - quasi eine orale Hyposensibilisierung durchführen. Auch bei der gängigen Immuntherapie, die insbesondere bei Kindern auch sublingual also oral durchgeführt wird, handelt es sich ja im Grunde genommen lediglich um eine kontinuierliche Verabreichung der jeweiligen Allergene. Es wäre also möglich, dass die niedrige Rate von klinischen Symptomen bei Patienten mit IgE-Reaktivität gegen die oben genannten Panepitope auf eine „natürliche Hyposensibilisierung“ zurückzuführen ist.

4.7 Bedeutung von Kohlenhydraten für Allergiediagnostik und Immuntherapie

Bei ca. 20 % der Patienten mit Gräserpollenallergie kommt eine IgE-Reaktivität gegen kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (CCD) vor (Petersen et al. 1995a). Ein erstes Ziel musste daher der Nachweis einer solchen IgE-Reaktivität für das gefundene N-Glycan sein. Weitere Fragen waren die Verbreitung solcher und ähnlicher (Fucose-haltiger) Glycane im gesamten Lieschgras-Pollenextrakt sowie ein Nachweis der Kreuzreaktivität dieser Strukturen.

Die Inhibitionsblots und ELISAs haben gezeigt, dass es in der Tat Seren von Patienten mit UniCap-Klassen (Pharmacia) bis zu Stufe 6 (>100 kU/l) für Lieschgraspollen gibt, welche Lieschgras-detektierendes IgE enthalten, das ausschließlich gegen Fucose-haltige N-Glycane gerichtet ist. Es handelt sich bei diesen Strukturen also eindeutig um CCD. Da N-Glycane dieser Art für Glycoproteine von Pflanzen, Arthropoden und parasitären Würmern häufig sind (Tretter et al., 1993; Wilson et al., 1998), sind solche IgE-Antikörper über ein weites Spektrum von Proteinen aus verschiedensten Quellen kreuzreaktiv. Auf diese Weise wird ein Patient mit hohem IgE gegen diese Kohlenhydratstrukturen im UniCap-Test oder ähnlichen Verfahren für jeden Extrakt als positiv getestet, der solche Glycoproteine enthält (van Ree,

2002). Bei Patienten mit Pollen- und / oder Bienengiftallergie ist häufig Kohlenhydrat-spezifisches IgE nachzuweisen, selten jedoch bei Nahrungmittelallergikern (Aalberse und van Ree, 1997). Allergene, welche über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, sind meist äußerst resistent gegenüber proteolytischem Abbau (Astwood et al., 1996). Warum aber Nahrungmittelallergene wie das Glycoprotein Ara h 1 aus Erdnuss nicht zu einer Sensibilisierung gegen die Kohlenhydratstrukturen führen, ist nach wie vor unverstanden (van Ree, 2002). Die Kohlenhydratstrukturen könnten z.B. bereits sehr früh im Verdauungsprozess abgespalten werden.

Die Frage, ob diese Kreuzreaktivitäten bei den Patienten auch klinische Symptome bewirken, ist natürlich für Allergologen von großer Bedeutung, da der Test auf Allergen-spezifisches IgE einen bedeutenden Schritt bei der Bestimmung der die Krankheit auslösenden Allergene darstellt. Wenn solche von Kohlenhydraten bedingten Kreuzreaktivitäten keine klinische Relevanz haben, so würde ein Patient mit diesen Kreuzreaktivitäten falsch positiv für eine große Anzahl von Extrakten getestet werden, was den Test in diesem Fall praktisch wertlos machen würde. Eine Möglichkeit, um diese Kreuzreaktivitäten auszuschließen, wäre die Vorabsorption des Serums mit entsprechenden Zuckerstrukturen bzw. die Verwendung von rekombinanten Allergenen, die mittels prokaryriotischer Expressionssysteme hergestellten wurden (s.u.), so dass nur Reaktivitäten gegen die Proteinstruktur detektiert würden.

Mit dem gängigsten Expressionssystem *E. coli* können wie mit allen prokaryotischen Systemen nur unglycosylierte Proteine hergestellt werden. Auch mit Hefe als (eukaryotischem) Expressionssystem können keine fucosylierten N-Glycane dargestellt werden (Bretthauer und Castellino, 1999) und mit dem Baculovirus / Insektenzellen-System schließlich sind zwar α1-3 Fucose-haltige Glycoproteine, nicht aber solche mit β1-2 Xylose herstellbar (Altmann et al., 1993). Wenn nun die Glycane klinisch irrelevant sind, so wären die in derartigen Expressionssystemen rekombinant hergestellten Allergene gut für die Therapie einsetzbar, da sie zumindest alle linearen Epitope enthalten. Das Problem der konformationellen Epitope (Fehlen oder falsche Ausbildung der Disulfidbrücken, veränderte 3D-Struktur der rekombinanten Proteine) bliebe natürlich weiterhin bestehen. Für die Diagnostik wären solche rekombinanten Allergene sogar wünschenswert, da falsch positive Ergebnisse bei einer IgE-Reaktivität ausschließlich gegen irrelevante Kohlenhydratepitope ausgeschlossen wären. Besitzen die Glycane aber klinische Relevanz, so wäre der Einsatz rekombinanter Allergene sowohl bei der Diagnostik wie der Therapie unvorteilhaft, da nicht die ganze Bandbreite möglicher Epitope abgedeckt würde. Für die Immuntherapie würde in letzterem Fall u.U. schon der Einsatz eines einzigen Glycoproteins mit der relevanten

Kohlenhydratstruktur ausreichen, um eine erfolgreiche Hyposensibilisierung gegen CCD durchzuführen.

Die meisten Patienten mit IgE-Reaktivität gegen CCD leiden nicht unter einer Typ I-Allergie ausgelöst durch die Kohlenhydrate (van Ree, 2002). Häufig wird als Begründung dafür genannt, die kreuzreaktiven Glycoproteine seien nur einfach glycosyliert also monovalent und damit würde bei der Kreuzreaktivität die Vernetzung der Fcε-Rezeptoren unterbleiben (Aaleberse et al. 1997). Das Majorallergen Phl p 13 besitzt vier potentielle N-Glycosylierungsstellen (Suck et al., 2000) und in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Allergen über Kohlenhydrat-spezifisches IgE zu einer Mediatorfreisetzung führen kann. Auch konnte für Meerrettich-Peroxidase, die ebenfalls über mehrere N-Glycosylierungsstellen verfügt, eine positive Hautreaktion bei 21 % der Patienten mit ausschließlich CCD-spezifischem IgE gezeigt werden (Mari, 2002). Es gibt also sehr wohl polyvalente Glycoproteine, die auch zu einer Mediator-Freisetzung führen. Auch wenn der Prozentsatz an Patienten, bei denen das Kohlenhydrat-spezifische IgE klinisch eine Rolle spielt, gering sein sollte, kann man offensichtlich doch nicht in jedem Fall IgE gegen CCD als irrelevant einstufen.

In letzter Zeit wurde für regulatorische T-Zellen (Tr) eine bedeutende Rolle bei einer erfolgreichen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) vorgeschlagen (Akdis und Blaser, 2000). Die Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen sollen auf die Entwicklung von naiven T-Zellen zu T_H1, T_H2 oder Tr einen entscheidenden Einfluss haben (Shortman und Liu, 2002). Die Toll-like Rezeptoren, die auch auf den dendritischen Zellen vorkommen, sind ein entscheidendes Element bei der angeborenen Immunität und scheinen in gewissen Umfang die Natur des eindringenden Antigens / Pathogens erkennen zu können (Janeway und Medzhitov, 2002). Da bestimmte Toll-like Rezeptoren Kohlenhydrat-haltige Strukturen wie Lipopolysaccharide binden (Triantafilou und Triantafilou, 2002), wäre es durchaus möglich, dass es entsprechende Rezeptoren gibt, die N-Glycane binden können. Daher wird bereits spekuliert, ob die N-Glycosylierung von Proteinen einen Einfluss auf die Sensibilisierung gegen ein Allergen sowie auf den Verlauf der Hyposensibilisierung haben könnte (van Ree, 2002). Für die Kohlenhydratstrukturen von *Schistosoma mansoni*-Ei-Antigen (SEA) sowie die Glycane des Majorallergens Cry j 1 aus *Cryptomeria japonica* Pollen wurde die Förderung einer T_H2-Antwort beschrieben, wobei allerdings die Untersuchungen sich auf die T-Zellen beschränkten und der Anteil der dendritischen Zellen an dieser Reaktion nicht explizit untersucht wurde (Okano et al., 1999; Okano et al. 2001).

4.8 Expression von Phl p 1 im Tabaksystem

Um das Phl p 1 in möglichst natürlicher Form zu exprimieren, musste ein Expressionssystem gewählt werden, in dem die posttranslationalen Modifikationen des Moleküls dargestellt werden konnten. Ein prokaryotisches System hätte, wie bereits erwähnt, weder die Glycosylierungen noch die korrekten Disulfidbrücken geliefert. Hefe (z. B. *Pichia pastoris*) hätte wahrscheinlich zwar die Disulfidverbrückungen richtig durchgeführt, neigt jedoch zu Hyperglycosylierungen (van Oort et al., 2002) und besitzt zudem völlig andere N-Glycane als höhere Pflanzen (Bretthauer und Castellino, 1999). Außerdem waren bislang für das Phl p 1 in *Pichia pastoris* nur sehr geringe Expressionsraten zu erreichen (Pöppelmann, 2002). Insektenzellen können zwar α1-3 core-Fucose-haltige N-Glycane herstellen, nicht jedoch solche mit β1-2 Xylose (Altmann et al., 1999). Als Expressionssystem bot sich daher Tabak an, welcher (als höhere Pflanze) mit hoher Wahrscheinlichkeit die richtigen Disulfidbrücken und N-Glycane ausbilden würde und für den auch Arabinosylierungen beschrieben worden sind (Shpak et al., 2001). Zudem sind für die Herstellung rekombinanter Proteine in der Gattung *Nicotiniana* hohe Expressionsraten (Breiteneder et al., 2001) auch bei transienter Transformation (Vaquero et al., 1999) mit ca. 5 mg eines rekombinanten Antikörpers pro kg Frischgewicht der Blätter erzielt worden. Es sollte daher zunächst eine transiente Expression des Phl p 1 in Tabakblättern (*Nicotiniana tabacum*) versucht und das Produkt auf seine Glycosylierungen hin untersucht werden. Als Transformationsmethode wurde der Partikelbeschuss („Genegun“) gewählt.

Aus den Restriktionsanalysen und besonders der Sequenzierung des neu konstruierten Vektors mit dem 35s-Promotor, dem Gen phl p 1 und dem nos-Terminator (35s-phl p 1-nos), ging hervor, dass das Konstrukt vollständig war. Durch die Transformation mit einem entsprechenden Konstrukt (mit dem 35s-Promotor und dem Gen für GFP) konnte eindeutig gezeigt werden, dass es mit dem entsprechenden Promotor zur Expression eines in die Tabakblätter eingebrachten Gens unter den Versuchsbedingungen kam.

Eine Expression des Phl p 1 konnte nicht nachgewiesen werden, was die Reaktivität mit dem Antikörper Bo 1 (andere Spezifität) und insbesondere die Reaktivität des Sekundärantikörpers allein mit den 60 und 35 kDa Banden deutlich machte. Da der Tabakextrakt im Bereich von 35 kDa sehr stark Tabak-eigene Proteine aufweist, würde auch die Verwendung eines anderen Sekundärantikörpers nicht zu einem Nachweis des evtl. exprimierten Phl p 1 führen, dessen

schwache Bande von den bei längeren Inkubationszeiten in diesem Größenbereich auftretenden unspezifischen Banden überlagert würde.

Selbst wenn man aufgrund der GFP-Kontrolle davon ausgeht, dass tatsächlich Phl p 1 in den Blättern exprimiert wurde, so kann auf diese Weise offensichtlich nicht genug Protein für einen immunologischen Nachweis erzeugt werden. Die Konzentrationen an exprimiertem Protein, die für einen Nachweis im Westernblot nötig sind, liegen deutlich höher als der bloße Nachweis von GFP in den transformierten Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

Die Transformationsraten waren mit der Genegun unter den gewählten Bedingungen nur sehr gering und viele Zellen im Schussbereich waren abgestorben. Außerdem kann beim Partikelbeschuss nur die Epidermis effektiv transformiert werden. Wird diese von den Goldpartikeln durchschlagen, ist offensichtlich die einwirkende Kraft zu groß und das Blattgewebe wird einem Schrotschuss gleich so stark geschädigt, dass es zum großflächigen Absterben von Zellen kommt. Aus diesen Gründen stellt sich die Frage, ob die Genegun als Transformationsmethode zur transienten Expression von Proteinen überhaupt geeignet ist, da es immer schwer sein dürfte bei den geringen Mengen an rekombinantem Protein dieses gegen unspezifische Reaktivitäten mit Tabak-eigenen Proteinen abzugrenzen. Davon abgesehen wird ja ein eukaryotisches Expressionssystem gewählt, um das rekombinante Protein seiner natürliche Form so ähnlich wie möglich zu erhalten (Ausbildung der Disulfidbrücken, Glycosylierungen). Für die entsprechenden Untersuchungen, werden die erzeugten Proteinmengen aber bei diesem System aller Voraussicht nach immer zu gering bleiben. Daher müssen wohl andere Transformationssysteme wie z. B. Agrobakterium genutzt werden. Einmal in das Blatt eingebracht, können Agrobakterien selbsttätig Zellen transformieren, wobei diese kaum geschädigt werden. Neben der höheren Transformationsrate kann die Inkubationszeit deutlich länger sein, ohne dass die Blattzellen absterben. Das Maximum an rekombinantem Protein (ca. 5 mg/kg Frischgewicht der Blätter) lag nach Vaquero et al. (1999) bei einer Inkubationszeit von 60-72 h.

5 Ausblick

Kohlenhydratstrukturen können ohne jeden Zweifel IgE-Epitope darstellen und als solche wie jedes andere (Protein-)Epitop auch bei Quervernetzung der Fcε-Rezeptoren zur Freisetzung von Mediatoren führen. Unbeantwortet ist die Frage, warum trotzdem bei so vielen Patienten mit Kohlenhydrat-spezifischem IgE keine klinischen Symptome auftreten. Letztendlich steht die Antwort auf diese Frage wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit dem Grund für den Erfolg von Hyposensiblisierungstherapien. In beiden Fällen unterbleiben klinische Symptome, obwohl (weiterhin) Allergen-spezifisches IgE nachweisbar ist. Die Antwort dürfte nach dem jetzigen Stand der Forschung im Bereich der Toleranzinduktion über dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen zu suchen sein, so dass Methoden der Zellbiologie zur Beantwortung dieses Fragenkomplexes eingesetzt werden müssen. Die Untersuchung von Antikörpern in Patientenseren und die Charakterisierung von Allergenstrukturen hingegen kann hier - den Ergebnissen dieser Arbeit nach - nur unterstützende Informationen liefern.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Frage, ob die Kohlenhydratstrukturen eine besondere Rolle bei der Sensibilisierung haben. Neuere Forschungsarbeiten (Okano et al., 2001; Shortman und Liu, 2002) lassen vermuten, dass sie eine Signalwirkung auf die Dendritischen Zellen haben und auf diesem Weg über die T-Zellen (Tr, T_H1 oder T_H2) den Weg der Immunantwort beeinflussen. Hier könnten Untersuchungen zur Klärung beitragen, bei denen die Reaktion von dendritischen Zellen auf Allergene mit klar definierten Kohlenhydratstrukturen (wie beispielsweise das nPhl p 1) verglichen wird mit der Reaktion auf rekombinante, nicht glycosylierte Varianten dieser Allergene.

Für die rekombinante Herstellung des Gruppe 1-Allergens bleibt Tabak weiterhin ein interessantes Expressionssystem. Es muss allerdings noch ein geeignetes Transformationssystem etabliert werden, damit Expressionsraten erreicht werden, die eine immunologische Charakterisierung des rekombinanten Allergens erlauben.

6 Zusammenfassung

Der Einfluss der Kohlenhydratstrukturen aus Lieschgraspollen (*Phleum pratense*, L.) auf die allergische Reaktion sollte bestimmt werden. Zur strukturellen Charakterisierung der Kohlenhydratstukturen wurde das Majorallergen Phl p 1 mit Trypsin gespalten, die erhaltenen Peptide chromatographisch getrennt und einzeln mittels Neutralzuckeranalyse auf gebundene Glycane untersucht. Nachgewiesen wurden die Monosaccharide N-Acetylglcosamin, Mannose, Fucose, Xylose und Arabinose in nur einem Glycopeptid, welches durch N-terminale Ansequenzierung als das Peptid bestehend aus den Aminosäureresten 4 – 17 identifiziert wurde und welches die einzige N-Glycosylierungsstelle des Phl p 1 enthält. Durch massenspektrometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass dieses Glycopeptid 4-17 in vier Glycoformen vorliegt: Es trägt ein N-Glycan, das in zwei Glycoformen vorkommen kann und immer aus zwei N-Acetylglucosamin- und zwei Mannoseresten sowie je einem Xylose- und einem Fucoserest besteht; darüber hinaus ist in ca. 40 % der Moleküle ein dritter Mannoserest vorhanden. Desweiteren ist an ca. 60 % der Phl p 1 Moleküle ein einzelner Arabinoserest über ein Hydroxyprolin gebunden. Im N-Glycan konnte über Spaltungsversuche mit Glycosidasen sowie Vergleich mit Literaturdaten eine α1-3 Bindung der Fucose an das erste Kern-N-Actylglucosamin nachgewiesen, bzw. die Bindung der Xylose β1-2 an die Kern-Mannose erschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan des Phl p 1 eine IgE-Reaktivität besitzt. Eine IgE-Bindung spezifisch an die gebundene Arabinose konnte nicht nachgewiesen werden. Die Seren einiger Patienten enthalten IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt, das ausschließlich gegen Fucose-haltige Glycane gerichtet ist. Dies führt zu IgE-Kreuzreaktivitäten (wie die in dieser Arbeit gezeigte zwischen Bienengift und Lieschgras-Pollenextrakt), es handelt sich also bei dem N-Glycan des Phl p 1 um eine kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinante (CCD).

Es konnte gezeigt werden, dass das Phl p 1 zu keiner Mediator-Freisetzung (IL-4) aus humanen Basophilen führte, deren Fcε-Rezeptoren mit Kohlenhydrat-spezifischem IgE beladen worden waren. Im Lieschgras-Pollenextrakt ist jedoch auch das Majorallergen Phl p 13 enthalten, welches bis zu vier der beschriebenen N-Glycane enthält. Dieses sowie ein Neoglycoallergen aus BSA mit bis zu sechs N-Glycanen führte im beschriebenen Basophilentest zu einer IL-4 Freisetzung. Die mangelnde Fähigkeit der Glycane zur Mediator-

Freisetzung kann also nicht der Grund für das Fehlen von allergischen Symptomen bei den meisten Patienten mit IgE-Reaktivität gegen CCD sein.

Ein Faktor für den eine inhibierende Wirkung auf die Mediator-Freisetzung vermutet wird, ist Allergen-spezifisches IgG4. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Seren von zwei Patienten mit Lieschgras-spezifischem IgE ausschließlich gegen die N-Glycane verglichen. Ein Unterschied im Verhältnis IgG4 zu IgE gegen die CCD wurde nicht gefunden. Auch kam es in beiden Fällen im Basophilen-Test zu einer Mediator-Freisetzung, wenn die Rezeptoren der Zellen mit den Antikörpern aus den entsprechenden Seren beladen wurden. Es ist diesen Daten nach unwahrscheinlich, dass der Anstieg von spezifischem IgG4 primär die Ursache für das Ausbleiben von allergischen Symptomen darstellt.

Um zu klären, ob das Phl p 1 in Tabak rekombinant mit seinen natürlichen Glycosylierungen hergestellt werden kann, wurden junge Tabakblätter mittels Genegun mit einem Plasmid beschossen, welches das Gen für Phl p 1 unter Kontrolle des 35s-Promotors enthielt und zu einer transienten Expression des Proteins in den Blättern führen sollte. Obwohl das als Positivkontrolle gewählte GFP Fluoreszenz-mikroskopisch eindeutig nachgewiesen werden konnte, war ein immunologischer Nachweis von Phl p 1 im Extrakt aus den beschossenen Blättern nicht möglich. Die Transformationsrate mit der Genegun war offensichtlich zu niedrig.

Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt wurden mittels tryptischem Abbau der Proteine und anschließender chromatographischer Trennung isoliert. Die strukturelle Bestimmung ergab ein Gemisch aus Galactan und Arabinogalactan. Gräserpollen-Allergiker, Allergiker ohne Gräserpollen-Allergie und Nicht-Allergiker wurden auf Antikörper gegen die Polysaccharide untersucht. Obwohl alle Gruppen in gleichem Maße IgG gegen die Polyaccharide zeigten, konnte in keiner Gruppe spezifisches IgE gegen diese nachgewiesen werden. Als Beteiligte am klassischen Pathomechanismus der Typ I-Allergie können die Polysaccharide daher ausgeschlossen werden.

7 Literatur

Aalberse, R., Stapel, S. und van Ree, R. (1997). Food allergy. In *Progress in Allergy and Clinical Immunology Volume 4, Cancun* (Oeling A. & Huerta Lopez J. Hrsg.), s. 57-60. Hogrefe & Huber Publishers, Göttingen, Deutschland.

Aalberse, R. und van Ree, R. (1997). Crossreactive carbohydrate determinants. Clin. Rev. Allergy. Immunol. **15**, 375-387.

Afferni, C., Iacovacci, P., Barletta, B., Di Felice, G., Tinghino, R., Mari, A. und Pini, C. (1999). Role of carbohydrate moieties in IgE binding to allergenic components of *Cupressus arizonica* pollen extract. Clin. Exp. Allergy **29**, 1087-1094.

Akdis, C. und Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy **55**, 522-530.

Akdis, C., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S., Müller, U. und Blaser, K. (1996). Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. J. Clin. Invest. **98**, 1676-1683.

Altmann, F., Schweisser, S. und Weber, C. (1995). Kinetic comparison of peptide: N-glycosidases F and A reveals several differences in substrate specificity. Glycoconj. J. **12**, 84-93.

Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. und März, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. Glycoconj. J. **16**, 109-23.

Astwood, J., Leach, J. und Fuchs, R. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. Nat. Biotechnol. **26**, 1161-1170.

Bacharier, L. und Geha, R. (2000). Molecular mechanisms of IgE regulation. J. Allergy Clin. Immunol. **105**, 547-558.

Baginski, T., Hirohashi, N. und Hoshi, M. (1999). Sulfated O-linked glycans of the vitelline coat as ligands in gamete interaction in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Dev. Growth. Differ. **41**, 357-364.

Ball, T., Fuchs, T., Sperr, WR., Valent, P., Vangelista, L., Kraft, D. und Valenta, R. (1999). B cell epitopes of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 1, revealed by gene fragmentation as candidates for immunotherapy. FASEB J. **13**, 1277-1290.

Batanero, E., Crespo, JF., Monsalve, RI., Martin-Esteban, M., Villalba, M. und Rodriguez, R. (1999). IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen. Ole e 1. J. Allergy Clin. Immunol. **103**, 147-153.

Becker, D., Brettschneider, R. und Lörz, H. (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant J. **5**, 299-307.

Bendelac, A., Rivera, M., Park, S. und Roark, J. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T-cells: development, specificity and function. Ann. Rev. Immunol. **15**, 535-562.

Bradford, 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**, 248-54.

Breiteneder, H., Krebitz, M., Wiedermann, U., Wagner, B., Essl, D., Steinkellner, H., Turpen, T., Ebner, C., Buck, D., Niggemann, B. und Scheiner, O. (2001). Rapid production of recombinant allergens in Nicotiana benthamiana and their impact on diagnosis and therapy. Int. Arch. Allergy Immunol. **124**, 48-50.

Bretthauer, R. und Castellino, F. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. Biotchnol. Appl. Biochem. **30**, 193-200.

Chapman, M., Smith, A., Vailes, L., Arruda, L. Venugopal, D. und Pomes, A. (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. **108**, 409-418.

Clarke, A., Anderson, R. und Stone, B. (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry **18**, 521-540.

Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. Nature **402**, B5-B11.

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

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. und Goodman, H. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl. Genet. **1**, 561-573.

Dixon, R. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In *Plant cell culture, a practical approach* (Dixon, R. Hrsg.), s. 1-20. IRL Press Limited, Oxford, England.

Dudler, T., Altmann, F., Carballido, J. und Blaser, K. (1995). Carbohydrate-dependent, HLA class II-restricted, human T cell response to the bee venom allergen phospholipase A2 in allergic patients. Eur. J. Immunol. **25**, 538-542.

Elbein, A. (1991). The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function. Trends Biotechnol. **9**, 346-352.

Faasen, A., Dalke, D., Berton, M., Warren, W. und Pierce, S. (1995). CD40 – CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing. Eur. J. Immunol. **25**, 3249-3255.

Faye, L. und Christpeels, MJ. (1988). Common antigenic determinants in the glycoproteins of plants, molluscs and insects. Glycoconj. J. **5**, 245-256.

Faye, L., Johnson, KD, Sturm, A. und Chrispeels, MJ. (1989). Structure, biosynthesis and function of of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. Physiol. Plant **75**, 309-314.

Fötisch, K., Fäh, J., Wüthrich, B., Altmann, F., Haustein, D. und Vieths, S. (1998). IgE antibodoes specific for carbohydrates in a patient allergic to gum arabic (Acacia senegal). Allergy **53**, 1043-1051.

Fötisch, K., Altmann, F., Haustein, D. und Vieths, S. (1999). Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. Int. Arch. Allergy Immunol. **120**, 30-42.

Fötisch, K. und Vieths, S. (2001). N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. Glycoconj. J. **18**, 373-90.

Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M., Armentia, A., Salcedo, G. und Gomez, L. (1996). Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. Glycobiology. **6**, 471-477.

Gauchat, J., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores Romo, L. und Thompson, J. (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. Nature **365**, 340-343.

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

Gronlund, H., Vrtala, S., Wiedermann, U., Dekan, G., Kraft, D., Valenta, R. und Van Hage-Hamsten, M. (2002). Carbohydrate-based particles: a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy. Immunology **107**, 523-529.

Haavik, S., Smestad-Paulsen, B. und Wold, J. (1985). Glycoprotein allergens in pollen of timothy. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **78**, 197-205.

Haavik, S., Smestad-Paulsen, B., Wold, J. und Grimmer, O. (1982). Arabinogalactans in a purified allergen preparation from pollen of timothy (*Phleum pratense*). Phytochemistry **21**, 1913-1919.

Haisch, K., Gibbs, B., Körber, H., Ernst, M., Grage-Griebenow, E., Schlaak, M. und Haas, H. (1999). Purification of morphologically and functionally intact human basophils to near homogeneity. J. Immunol. Methods **226**, 129-137.

Hamaoka, T. und Ono, S. (1986). Regulation of B-cell differentiation: interaction of factors and corresponding receptors. Ann. Rev. Immunol. **4**, 167-204.

Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Wilson, I., Altmann, F., Wöhrl, S., Götz, M. und Jarisch, R. (2001). Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. J. Allergy Clin. Immunol. **108**, 1045-1052.

Iacovacci, P., Pini, C., Afferni, C., Barletta, R. Tinghino, R., Schinina, E., Federico, R., Mari, A. und Di Felice, G. (2001). A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. Clin. Exp. Allergy **31**, 458-465.

Ishiara, H., Takahashi, N., Oguri, S. und Tejima, S. (1979). Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. J. Biol. Chem. **254**, 10715-10719.

Janeway, C. und Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Ann. Rev. Immunol. **20**, 197-216.

Kalkhofen, P., Aalbers, M., Koshte, V., Pos, O., Oei, H. und Aalberse, R. (1987). Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at last three distinct cross-reactive structures. Allergy **42**, 382-390.

Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y., Seydel, U. und Zähringer, U. (2000). Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. Eur J Biochem. **267**, 1837-46.

Kelly, G. (1999). Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. Altern. Med. Rev. **4**, 96-103.

Kinet, J. (1999). The high-affinity receptor (FcεRI): from physiology to pathology. Annu. Rev. Immunol. **17**, 931-972.

Kishimoto, T., Taga, T. und Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. Cell **76**, 253-262.

Kolarich, D. und Altmann, F. (2000). N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: Application to peanut allergen Ara h 1 and olive allergen Ole e 1. Anal. Biochem. **285**, 64-75.

Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem. **54**, 631-664.

Koshte, V., Kagen, S. und Aalberse, R. (1989). Cross-reactivity of IgE antibodies to caddis fly with arthropoda and mollusca. J. Allergy Clin. Immunol. **84**, 174-183.

Kurosaka, A., Yano, A., Itoh, N., Kuroda, Y., Nakagawa, T. und Kawasaki, T. (1991). The structure of a neutral specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. J. Biol. Chem. **266**, 4168-4172.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting 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. (1970). Cleavage of struktural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.

Laffer, S., Duchene, M., Reinitzer, I., Susani, M., Mannhalter, C., Kraft, D. und Valenta, R. (1996). Common IgE-epitopes of recombinant Phl p 1, the major timothy grass pollen allergen and natural group I grass pollen isoallergens. Molec. Immun. **33**, 417-426.

Lis, H und Sharon, N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur. J. Biochem. **218**, 1-27.

Mari, A. (2002). IgE to cross-reactive carbohydrate ceterminants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. Int. Arch. Allergy Immunol. **129**, 286-295.

Matthiesen, F. und Løwenstein, H. (1991). Group V allergens in grass pollens. I. purification and characterization of group V allergen from *Phleum pratense* pollen, Phl p V. Clin. Exp. Allergy **21**, 297-307.

Metcalfe, D., Baram, D. und Mekori, Y. (1997). Mast Cells. Physiol. Rev. **77**, 1033-1079.

Movérare, R., Westritschnig, K., Svensson, M., Hayek, B., Bende, M., Pauli, G., sorva, R., Haahtela, T., Valenta, V. und Elfman, L. (2002). Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six european populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. Int. Arch. Allergy Immunol. **128**, 325-335.

Nelson, T., Harpster, M., Mayfield, S. und Taylor, W. (1984). Light regulated gene-expression during maize leaf development. J. Cell. Biol. **98**, 558-564.

Odell, J., Nagy, F. und Chua, N. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature **313**, 810-812.

Ohashi, Y., Nakai, Y., Okamoto, H., Ohno, Y., Sakamoto, H., Tanaka, A. und Kakinoki, Y. (1997). Significant correlation between symptom score and IgG4 antibody titer following long-term immunotherapy for perennial allergic rhinitis. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. **106**, 483-489.

Ohta, M., Matsuura, F., Kobayashi, Y., Shigeta, S. und Oka, S. (1991). Further characterization of allergenically active oligosaccharitols isolated from a sea squirt H-antigen. Arch. Biochem. Biophys. **290**, 474-483.

Okano, M., Kino, K., Takishita, T., Hattori, H., Ogawa, T., Yoshino, T., Yokoyama M. und Nishizaki, K. (2001). Roles of carbohydrates on Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, in specific T-cell responses. J. Allergy Clin. Immunol. **108**, 101-108.

Okano, M., Satoskar, A., Nishizaki, K., Abe, M. und Harn, D. Jr. (1999). Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. J. Immunol. **163**, 6712-6717.

Perez, M., Ishioka, G., Walker, L. und Chesnut, R. (1990). cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. J. Biol. Chem. **265**, 16210-16215.

Petersen, A. (1999). Von der Identifizierung von Gräserpollenallergenen zur Strukturaufklärung: Ansätze zur Verbesserung der Allergidiagnostik und Therapie. Habilitationsschrift, Medizinische Universität Lübeck.

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

Petersen, A., Becker, W-M. und Schlaak, M. (1993). Characterization of grass group I allergens in timothy grass pollen. J. Allergy Clin. Immunol. **92**, 789-796.

Petersen, A., Grobe, K., Lindner, B., Schlaak und M., Becker, W-M. (1997). Comparison of natural and recombinant isoforms of grass pollen allergens. Electrophoresis. **18**, 819-825.

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

Petersen, A., Schramm, G., Bufe, A., Schlaak, M. und Becker, W-M. (1995b). 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., Schramm, G., Schlaak, M. und Becker, W-M. (1998). Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. Clin. Exp. Allergy **28**, 15-21.

Petersen, A., Vieths, S., Aulepp, H., Schlaak, M. und Becker, W-M. (1996). Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. J. Allergy. Clin. Immunol. **98**, 805-815.

Poo, W., Conrad, L. und Janeway, C. (1988). Receptor-directed focussing of lymphokine by helper T cells. Nature **332**, 378-380.

Pöppelmann, M. (2002). Phl p 1: Klonierung und Expression des Majorallergnes aus dem Wiesenlieschgras Phleum pratense in der Hefe Pichia pastoris und anschließende funktionale und strukturelle Charakterisierung. Dissertationsschrift.

Priem, B., Gitti, R., Bush, A. und Gross, K. (1993). Structure of ten free N-glycans in ripening tomato fruit. Plant Physiol. **102**, 445-458.

Pruzansky, J., Grammer, L., Patterson, R. und Roberts, M. (1983). Dissociation of IgE from receptors on human basophils. I. Enhanced passive sensitization for histamine release. J. Immunol. **131**, 1949-1953.

Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B., McKenzie, A., Menon, S., Zurawski, G., De Waal Malefyt, R. und de Vries, J. (1993). Interleucin-13 induces interleucin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B-cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 3730-3734.

Rasmussen, J. (1992). Effect of glycosylation on protein function. Curr. Opin. Struct. Biol. **2**, 682-686.

Ring, J. und Darsow, U. (2002). Idiopathic anaphylaxis. Curr. Allergy. Asthma. Rep. **2**, 40-45.

Ring, J., Kramer, U., Schafer, T. und Behrendt, H. (2001). Why are allergies increasing? Curr. Opin. Immunol. **13**, 701-708.

Roitt, I., Brostoff, J. und Male, D. (1991). Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Rossi, RE., Monasterolo, G. und Monasterolo, S. (2001). Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. Allergy. **56**, 1180-1185.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D., Kastelain, R., Moore, K. und Banchreau, J. (1992). Interleucin-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B-lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 3086-3090.

Schachter, H. und Brockhausen, I. (1992). The biosynthesis of serine(threonine)-N-Acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In Allen, H. und Kisailus, E. (Hrsg.), Glycoconjugates. Composition, Structure and Function. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 163-198.

Schou, C. (1995). Allergens in rhinitis. B- and T-cell epitopes of allergen molecules. Clin. Exp. Allergy **25**, 10-14.

Schramm, G., Bufe, A., Petersen, A., Haas, H., Merget, R., Schlaak, M. und Becker, W-M. (2001). Discontinuous IgE-binding epitopes contain multiple continous epitope regions: results of an epitope mapping on recombinant Hol l 5, a major allergen from velvet grass pollen. Clin. Exp. Allergy **31**, 331-341.

Schramm, G., Bufe, A., Petersen, A., Haas, H., Schlaak, M. und Becker, WM. (1997). Mapping of IgE-binding epitopes on the recombinant major group I allergen of velvet grass pollen, rHol l 1. J. Allergy Clin. Immunol. **99**, 781-787.

Severin, K. und Schoffl, F. (1990). Heat-inducible hygromycin resistance in transgenic tobacco. Plant Mol. Biol. **15**, 827-833.

Shortman, K. und Liu, Y. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat. Rev. Immunol. **168**, 1704-1709.

Showalter, A. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cell. Mol. Life Sci. **58**, 1399-1417.

Shpak, E., Barbar, E., Leykam, F und Kieliszewski, M. (2001). Contiguous hydroxyproline residues direct hydroxyproline arabinosylation in *Nicotiana tabacum*. J. Biol. Chem. **276**, 11272-11278.

Shpak, E., Leykam, J. und Kieliszewski, M. (1999). Synthetic genes for glycoprotein design and the eludication of hydroxyproline-O-glycosylation codes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14736-14741.

Singh, M., Smith, P. und Knox, R. (2002). Nucleic acid sequences encoding protein allergens of the species *Cynodon dactylon*. US Patent 6441157-A 44.

Son, D., Scheurer, S., Hoffmann, A., Haustein, D. und Vieths, S. (1999). Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. Eur. J. Nutr. **38**, 201-215.

Suck, R., Hagen, S., Cromwell, O. und Fiebig, H. (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., Petersen, A., Hagen, S., Cromwell, O., Becker, W-M., und Fiebig, H., (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., Singh, M., Simpson, R., Ward, L. und Knox, R. (1993). Identification of canary grass (*Phalaris aquatica*) pollen allergens by immunoblotting: IgE and IgG antibody-binding studies. Allergy **48**, 273-281.

Swaerd-Normo, M., Smestad-Paulsen, B. und Wold, J. (1988). The glycoprotein allergen Ag-54 (Cla h II) from *Cladosporium herbarum*. Structural studies of the carbohydrate moiety. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **85**, 288-294.

Tamborini, E., Brandazza, A., De Lalla, C., Musco, G., Siccardi, A.G., Arosio, P. und Sidoli, A. (1995). Recombinant allergen Lol p II: exprssion, purification and characterization. Mol. Immunol. **32**, 505-513.

Thomas, L. (1995). Basophil and eosinophil interactions in health and disease. Chem. Immunol. **61**, 186-207.

Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., Leopold, M. und Becker, W-M. (1993). Fucose α1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope IgE from honeybee venom allergic individuals. Int. Arch. Allergy Immunol. **102**, 259-266.

Tretter, V., Altmann, F. und Marz, L. (1991). Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue Eur. J. Biochem. **199**, 647-652.

Triantafilou, M. und Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends Immunol. **23**, 301-304.

Tsai, L., Hung, M. und Tang, R. (1990). Changes of serum-specific IgE antibody titer during hyposensitization in mite-sensitive asthmatic children. J. Asthma **27**, 95-100.

van den Steen, P., Rudd, P., Dwek, R. und Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-Linked glycosylation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **33**, 151-208.

van der Veen, M., van Ree, R., Aalberse, R., Akkerdas, J., Koppelmann, S., Jansen, H. und van der Zee, J. (1997). Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J. Allergy Clin. Immunol. **100**, 327-334.

van Kuik, J., Hoffmann, R., Mutsaers, J., van Halbeck, H., Kamerling, J., Vliegenthart, J., Iwase, H., Li, S. und Li, Y. (1986). ^{1}H-NMR study on the N-linked carbohydrate chain of bromelain. Glycoconj. J. **3**, 27-34.

van Oort, E., de Heer, P., van Leeuwen, W., Derksen, N., Muller, M., Huveneers, S., Aalberse, R. und van Ree, R. (2002). Maturation of Pichia pastoris-derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural cysteine protease Der p 1 from house dust mite. Eur. J. Biochem. **269**, 671-679.

van Ree, R. (2002) Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnostics and treatment of allergic diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. **129**, 189-197.

van Ree, R. und Aalberse, R. (1999). Specific IgE without clinical allergy. J. Allergy Clin. Immunol. **103**, 1000-1001.

van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.-P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelmann, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L. und Lerouge, P. (2000). β(1,2)-xylose and α(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. J. Biol. Chem. **275**, 11451-11458.

Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S., Fischer, R. (1999).Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 11128-11133.

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

Wensing, M., Akkerdaas, J., van Leeuwen, W. Stapel, S., Bruijnzeel-Koomen, C., Aalberse, R., Bast, B., Knulst, A. und van Ree, R. (2002). IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. J. Allergy. Clin. Immunol. **110**, 435-442.

Wetterwald, A., Skvaril, F., Müller, U., und Blaser, K. (1985). Isotypic and idiotypic characterization of anti-bee venom phospholipase A2 antibodies. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **77**, 195-197.

Wilson, I. und Altmann, F. (1998). Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: Core α1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. Glycoconj. J. **15**, 1055-1070.

Wilson, I., Harthill, J., Mullin, N., Ashford, D. und Altmann, F. (1998). Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. Glycobiology **8**, 651-661.

Wu, Y., Meeley ,R. und Cosgrove, D. (2001). Analysis and expression of the alpha-expansin and beta-expansin gene families in maize. Plant Physiol. **126**, 222-232.

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

Danksagung

Dank sagen möchte ich:

Herrn Dr. rer. nat. A. Petersen für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die vielen wertvollen Ratschläge und die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie ganz besonders für die angenehme Atmosphäre bei der Zusammenarbeit,

Herrn Prof. Dr. U. Kristen für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie für das stete Interesse während der gesamten Arbeit,

Herrn Dr. rer. nat. W.-M. Becker für die viele Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen in der Laborgruppe,

Herrn Dr. rer. nat. B. Lindner für den Rat und die große Hilfe bei der Massenspektrometrie,

Herrn H. Moll für viele Ratschläge und die große Unterstützung bei der Zuckerbestimmung,

Prof. Dr. F. Altmann (Universität für Bodenklutur, Wien) für die Einführung in die Chemie der N-Glycane und für das Bromelain N-Glycan bzw. das BSA-Konjugat sowie Dipl. Ing. D. Kolarich (ebenfalls BOKU, Wien) für die Einführung in die MALDI-Untersuchungen der Glycane,

Frau Dipl. Ing. R. Engel für die erste Einführung in die Reverse-Phase-Chromatographie,

Herrn Dr. rer. nat. L. Brecker für das Kooperationsprojekt Arabinogalactane, besonders für die NMR-Bestimmungen,

Herrn Dr. rer. nat. K. Frenzel (AMP II, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg unter Leitung von Prof. Dr. Wienand) für die Hilfe bei der Transformation von Tabak,

Herrn Dr. med. H. Haas für viele anregende Diskussionen und wertvolle Hinweise sowie die Organisation des Lehrbetriebes im Graduiertenkolleg 288,

Frau Dipl. Pharm. E. Aumüller und Herrn A. Gronow für die große Hilfe beim Basophilentest,

Frau Dr. med. U. Lepp, Herrn Dr. med. Grabbe, Herrn Dr. H. Aulepp und Herrn Prof. Dr. S. Vieths für die Bereitstellung von Patientenseren,

Frau M. Böttger insbesondere für die Aufreinigung von nPhl p 1,

allen Mitarbeitern der Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie, Frau Dr. oec. troph. F. Schocker, Frau Dr. rer. nat. T. Kleber-Janke, Frau Dr. rer. nat. G. Schramm, Herrn Dr. rer. nat. M. Suhr, Herrn Dr. rer. nat. M. Pöppelmann, Frau Dipl. Biol. Y. Darcan, Frau D. Warneke, Frau E. Knaack, Frau S. Gebauer, Herrn J. Sarau und den Auszubildenden für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Laborgruppe,

Herrn Prof. Dr. med. W. Jelkmann für die interessante Gestaltung des Graduiertenkollegs 288,

allen Kollegiaten und Referenten des GRK 288 für viele anregende und informative Vorträge und Diskussionen, insbesondere Herrn Dipl. Chem. I. Fricke für gemeinsame Überlegungen und Versuche zu den dendritischen Zellen,

Herrn Dipl. Biol. Henrik Gabriel für die große Hilfe bei Computerproblemen,

meinen Eltern für Liebe und Unterstützung,

und ganz besonders Frau Miriam Weckenbrock.