

**Gruppe I-Allergene aus Gräsern sind neuartige
Cysteinproteinasen: Implikationen für die Allergenität und
Bedeutung für die Pflanze**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kay Grobe
aus Kiel



Hamburg
1998

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie.....	1
1.2	Mögliche allergiebedingende Faktoren.....	5
1.3	Relevanz des Graspollenallergens Phl p 1 sowie dessen Modifikationen.....	7
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Materialien.....	11
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	11
2.1.2	Natürliches Allergen.....	14
2.1.3	Primäre und sekundäre Antikörper.....	14
2.1.4	Patientenseren.....	14
2.1.5	Bakterien- und Hefestämme, Insektenzelllinien.....	14
2.1.6	Plasmide.....	15
2.1.7	DNA- und Proteinmarker.....	15
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.1	Synthese von Oligonucleotidprimern.....	16
2.2.2	PCR-DNA-Amplifizierung.....	16
2.2.3	Subklonierung.....	17
2.2.4	Transformation der bakteriellen Zellen.....	18
2.2.5	Selektion positiver bakterieller Zellen und Isolierung der Inserts..	19
2.2.6	Klonierung der für rPhl p 1 N und Q codierenden Inserts in den <i>Pichia</i> -Vektor PIC9.....	20
2.2.7	Detektion positiver pPIC9 phl p 1 N und Q Transformanden.....	20
2.2.8	Transformation der <i>Pichia pastoris</i> -Stämme KM71, GS115 und SMD1168, sowie Expression des rPhl p 1.....	23
2.2.9	Bestimmung der rPhl p 1 exprimierenden Klone und deren Mut- Phänotypen.....	25

2.2.10	Anzucht und Induktion der rPhl p 1 exprimierenden <i>Pichia pastoris</i> -Zellen.....	26
2.2.11	Klonierung von phl p 1 cDNA in Baculovirusvektoren.....	27
2.2.12	Mutagenese des pAcMP3-GP67 phl p 1 N und Q PolyA-Konstruktes.....	28
2.2.13	Kultivierung der Insektenzelllinien.....	29
2.2.14	Generierung von rekombinantem Baculovirus durch Co-Transfection.....	29
2.3	Proteinchemische Methoden.....	30
2.3.1	Herstellung des Pollenextraktes.....	30
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
2.3.3	SDS-PAGE.....	31
2.3.4	Gelfärbungen mit Coomassie oder Silber.....	32
2.3.5	Dot-Blotting.....	33
2.3.6	Western Blot Analyse auf Nitrocellulose oder PVDF-Membranen.....	33
2.3.7	India-Ink-Färbung von geblotteten Proteinen.....	34
2.3.8	Coomassie-Färbung von geblotteten Proteinen auf PVDF-Membranen.....	34
2.3.9	Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine mittels monoklonaler Antikörper und Patientenserum.....	34
2.3.10	Präparative isoelektrische Fokussierung.....	35
2.3.11	Test der proteolytischen Aktivität von Phl p 1 mit dem synthetischen, universellen Cysteinproteinasesubstrat Pyr-Phe-Leu-pNA.....	36
2.3.12	Test der proteolytischen Aktivität von Phl p 1 mit dem synthetischen Substrat Chromozym®PL.....	36
2.3.13	Test der proteolytischen Aktivität von Phl p 1 mit modifiziertem Expressionsmedium.....	37
2.3.14	Zymogramme.....	37
2.3.15	Inhibitionstests mit verschiedenen Proteinaseinhibitoren.....	38
2.3.16	Affinitätschromatographie mittels FPLC.....	38
2.3.17	APIzym-Test.....	40
2.3.18	Deglykosylierung des rPhl p 1 N.....	40
2.3.19	Clostripainspaltung des nPhl p 1.....	41
2.3.20	Datenbankvergleich der Phl p 1 Sequenz und Auswertung der Ergebnisse.....	41

3.	Ergebnisse	42
3.1	Subklonierung der Phl p 1 DNA-Sequenz.....	42
3.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	43
3.3	Klonierung von rPhl p 1 DNA in Baculovirusvektoren und Transformation von Insektenzelllinien Sf9, Sf21 und Mb0503.....	45
3.4	Transformation in die <i>Pichia pastoris</i> -Stämme KM71, GS115 und SMD1168.....	46
3.5	Funktionelle Untersuchungen des rPhl p 1 aus Hefe, sowie des nPhl p 1.....	50
3.5.1	Detektion einer proteolytischen Aktivität im Expressionsüberstand von rPhl p 1 exprimierenden <i>Pichia</i> -Zellen, sowie Aufreinigung nach dem isoelektrischen Punkt des rPhl p 1.....	50
3.5.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von rPhl p 1 Q: Das rekombinante Protein ist sehr instabil.....	52
3.5.3	Affinitätschromatographie mit modifizierten Wasch- und Elutionspuffern zur Detektion Phl p 1-spezifischer Proteolyse: rPhl p 1 ist proteolytisch aktiv.....	53
3.5.4	Substratspektrum und Inhibitoren der Proteinase Phl p 1.....	55
3.5.5	Bestimmung der Spaltungsspezifität von Phl p 1 mit dem synthetischen Substrat N-Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid: Phl p 1 besitzt Clostripain-ähnliche Spaltungsspezifität.....	58
3.5.6	Funktionelle Bestimmung der N-terminalen Sequenz von Phl p 1: Das Allergen liegt primär als schwach aktives Proenzym vor.....	60
3.5.7	Vergleich der Spaltungsspezifität bei Selbsthydrolyse oder Clostripainspaltung von nPhl p 1: Beide Enzyme besitzen Spezifität für Argininreste.....	62
3.5.8	Nachweis der Spaltungsspezifität an Lysinresten mit synthetischem Substrat Chromozym®PL.....	63
3.5.9	Pyr-Phe-Leu-pNA-Spaltung durch nPhl p 1, abhängig vom pH-Wert des Reaktionspuffers.....	64
3.6	Ergebnisse der Sequenzuntersuchungen von Phl p 1 in den Datenbanken: Gruppe I-Allergene sind mit Expansinen homolog.....	65
3.7	Proteinaseklassifizierung von Phl p 1 durch Alignment der aktiven Zentren von Serin- und Cysteinproteinasen auf Aminosäurenebene: Phl p 1 besitzt C1-Cysteinproteinase-Sequenzmotive.....	67
3.8	Lectin- und IgE-Reaktivität der rPhl p 1 aus <i>Pichia pastoris</i>	70

4.	Diskussion	72
4.1	Klonierung und Expression der Phl p 1 cDNA in der methylo- trophen Hefe <i>Pichia pastoris</i> : Wahl des Expressionssystems und der Klonierungsstrategie.....	72
4.2	Detektion einer proteolytischen Aktivität in Expressionen von rPhl p 1.....	75
4.3	Nachweis von rPhl p 1 als einer Cysteinproteinase mit unge- wöhnlicher gemischter Hemmbarkeit durch Serin- und Cystein- proteinase-typische Inhibitoren.....	77
4.4	Bestimmung der Substratspezifität des Allergens Phl p 1.....	82
4.5	Phl p 1 liegt primär als schwach aktives Proenzym vor.....	85
4.6	Sequenzuntersuchungen an der Proteinase Phl p 1.....	88
4.7	Modellierung der Cysteinproteinase Phl p 1.....	96
4.8	Lectin- und IgE-Reaktivität der <i>Pichia pastoris</i> -exprimierten Protease Phl p 1.....	98
4.9	Detektion homologer Sequenzen zu Phl p 1: Expansine besitzen Proteasemotive auf Aminosäureebene.....	99
4.10	Modell der Expansinwirkung auf pflanzliche Zellwände: Mögliche <i>in vivo</i> -Funktion des Phl p 1.....	105
4.11	Mögliche Implikationen der C1 Cysteinproteinaseaktivität von Gruppe I-Allergenen für deren Allergenität.....	110
5.	Zusammenfassung	116
6.	Ausblick	119
7.	Literatur	120