

Isolierung und Charakterisierung allergener Proteine aus der Amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*)

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Beatrice Lafargue
geb. in Mainz

Mainz 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie von Allergien	1
1.2	Allergien.....	2
1.3	Typ I: Allergie vom Soforttyp.....	3
1.4	Allergene	5
1.5	Schabenallergie.....	6
1.6	Epidemiologie der Schabenallergie	7
1.7	Systematische Einordnung der Schaben.....	9
1.8	Allergenspektrum der Schaben	11
1.8.1	Gruppe 1	12
1.8.2	Gruppe 2: Aspartat-Protease.....	13
1.8.3	Gruppe 3: Hexamerin	14
1.8.4	Gruppe 4: Calycin.....	16
1.8.5	Gruppe 5: Glutathion S-Transferase.....	16
1.8.6	Gruppe 6: Troponin C	17
1.8.7	Gruppe 7: Tropomyosin	17
1.8.8	Gruppe 8: Myosin.....	18
1.8.9	Gruppe 9: Arginin-Kinase	18
1.9	Motivation und Ziele der Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Gebrauchsartikel.....	21
2.1.3	Chemikalien.....	22
2.1.4	Puffer und Lösungen	23
2.1.5	Software und Datenbanken.....	25
2.1.6	Sequenzen.....	26
2.2	Versuchstiere und Gewinnung der Extrakte.....	27
2.2.1	Hämolymph-Extrakt (HL)	27
2.2.2	Crude-Extrakt	27
2.2.3	Schabenchargen.....	28

2.3	Proteinaufreinigung und -konzentrierung	29
2.3.1	Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 1	30
2.3.2	Rechromatographie mittels Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 1	30
2.3.3	Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 2	30
2.3.4	Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 3	30
2.3.5	Größenausschlusschromatographie (SEC) für Protokoll 1 und 2	31
2.3.6	Größenausschlusschromatographie für Protokoll 3	31
2.3.7	Größenausschlusschromatographie für Dissoziate	31
2.3.8	Aufkonzentrierung	31
2.4	Bestimmung der Trockenmasse.....	32
2.5	Elektrophoresen und Proteindetektion.....	32
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.5.2	SDS-Gradienten-PAGE	32
2.5.3	Native PAGE	33
2.5.4	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	33
2.5.5	2D-Immungelelektrophorese	34
2.5.6	Silberfärbung	35
2.5.7	Coomassie-Färbung	36
2.5.8	Zinkfärbung	36
2.5.9	SERVA Violet 17-Färbung	36
2.5.10	Immuno-Coomassie-Färbung	36
2.5.11	Aktivitätsfärbung	36
2.5.12	Western-Blot	37
2.6	Spektroskopische Analysemethoden	38
2.6.1	Absorptionsspektroskopie und Proteinkonzentrationsbestimmung	38
2.6.2	Lowry-Assay	39
2.6.3	Bradford-Assay	39
2.6.4	Spezifischer Extinktionskoeffizient	40
2.6.5	Dynamische Lichtstreuung	40
2.7	Massenspektrometrie.....	41
2.7.1	Proteinseparation und tryptischer Verdau	41
2.7.2	Flüssigkeitschromatographie	41
2.7.3	ESI-Q-TOF	42
2.7.4	Auswertung der Spektren	42
2.8	Analytische Ultrazentrifugation	42
2.8.1	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf	43
2.8.2	Sedimentationsgleichgewichtslauf	44
2.9	Stabilität gegenüber chaotropen Reagenzien	45
2.10	Stabilität gegenüber unterschiedlichen pH-Werten	45
2.11	MBTH-Assay: Dot-Blot auf PVDF-Membran	46

2.12	Generierung von Antikörpern	48
2.13	Immunologische Methoden	48
2.13.1	Bestimmung der Proliferationsindices	48
2.13.2	Bestimmung der Leukotrienfreisetzung	49
2.14	Molekulare Proteinsequenzanalyse.....	49
2.14.1	Proteinsequenzen	49
2.14.2	Proteinsequenzanalyse.....	49
2.14.3	Sequenzalignments	49
2.14.4	Bestimmung antigener Epitope	49
2.15	Strukturanalyse am Proteinmodell	50
2.15.1	Homologie-Modellierung von Per a 3.0201	50
2.15.2	Analyse der Homologie-Modelle	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Charakterisierung der Zusammensetzung und Reproduzierbarkeit der Extrakte.....	52
3.1.1	Vergleichende Untersuchungen von Hämolymp- und Crude-Extrakt, sowie erste Proteinzuweisungen.....	52
3.1.1.1	Trockenmasse der Extrakte	52
3.1.1.2	Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten des Hämolymp- und Crude-Extraktes	53
3.1.1.3	Absorptionsspektren	55
3.1.1.4	Gelelektrophoretisches Verhalten.....	56
3.1.1.5	Größenausschlusschromatographie	60
3.1.1.6	Phenoloxidase-Aktivität	62
3.1.2	Reproduzierbarkeit der Extrakte.....	67
3.1.2.1	Vergleichende Untersuchungen der Hämolymphe aus zwei unterschiedlichen Schabenchargen	67
3.1.2.2	Aliquots des Crude-Extraktes	71
3.1.3	Fazit der Extraktvergleiche.....	72
3.2	Isolierung allergener Proteine aus <i>Periplaneta americana</i>	73
3.2.1	Aufreinigung der Hämolymphe nach Protokoll 1	73
3.2.1.1	Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)	74
3.2.1.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	80
3.2.1.3	Fazit der Reinigung nach Protokoll 1	86
3.2.2	Aufreinigung des Crude-Extraktes nach Protokoll 2.....	86
3.2.2.1	Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)	86
3.2.2.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	90
3.2.2.3	Fazit der Reinigung nach Protokoll 2	95
3.2.3	Aufreinigung des Crude-Extraktes nach Protokoll 3.....	96

3.2.3.1	Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)	96
3.2.3.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	99
3.2.3.3	Fazit der Reinigung nach Protokoll 3	104
3.2.4	Fazit der Reinigungsprotokolle	105
3.3	Charakterisierung von Per a 3 – den allergenen Hexamerinen aus	
	<i>Periplaneta americana</i>	106
3.3.1	Einfluss der Extraktgewinnung auf die Per a 3-Isoformen	106
3.3.1.1	Molekulargewichtsbestimmung	106
3.3.1.2	Molekülgestalt	110
3.3.1.3	Fazit des Extrakteinflusses	112
3.3.2	Biochemische und immunologische Charakterisierung der Per a 3-Isoformen	112
3.3.2.1	Massenspektrometrische Identifizierung der Per a 3-Isoformen	112
3.3.2.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	116
3.3.2.3	Disulfidverbrückung	118
3.3.2.4	Phenoloxidase-Aktivität	120
3.3.2.5	Absorptionsspektren	122
3.3.2.6	Kreuzreaktionen der Isoformen	123
3.3.2.7	Untersuchungen zur Stabilität von isoliertem P II und Hämolymphe aus <i>Periplaneta americana</i>	131
3.3.2.8	Immunologische Charakterisierung	159
3.3.2.9	Epitope in den Primär- und Quartärstrukturen der Per a 3-Isoformen	160
3.3.2.10	Fazit der Per a 3-Charakterisierung	170
3.4	Charakterisierung von Per a 9 – der allergenen Arginin-Kinase aus	
	<i>Periplaneta americana</i>	171
3.4.1	Reinigung Identifizierung und Sequenzanalyse	171
3.4.2	Proteinausbeute	174
3.4.3	Molekulargewichtsbestimmung	174
3.4.4	Proteingestalt	176
3.4.5	Disulfidbrücken	178
3.4.6	Absorptionsspektren	179
3.4.7	Vorkommen in der Hämolymphe	180
3.4.8	Ähnlichkeit zu Per a 3-Proteinen	183
3.4.9	Bestimmung der Leukotrienausschüttung durch Stimulation mit Per a 9	185
3.4.10	Fazit der Per a 9-Charakterisierung	186
4	DISKUSSION	187
4.1	Per a 3	187
4.1.1	Per a 3 in seiner Funktion als Allergen	188
4.1.1.1	Immunogenität und Allergenität der isolierten Per a 3-Isoformen	189

4.1.1.2	Einfluss der hexameren Oligomerisierung auf die Immunogenität und Allergenität der Per a 3-Isoformen	191
4.1.1.3	Bisherige Behandlungsmöglichkeiten	195
4.1.2	Per a 3 in seiner Funktion als Hexamerin	195
4.1.2.1	Die Familie der Hexamerine	197
4.1.2.2	Konservierte Merkmale der Hexamerine	198
4.1.2.3	Hexamerine in der Unterordnung der Schaben	201
4.1.2.4	Allergene Hexamerine als Speicherproteine?	203
4.1.2.5	Rolle als Transport- bzw. Ligandenbindungsprotein	205
4.1.2.6	Rolle bei der Immunabwehr	206
4.1.2.7	Rolle als Strukturproteine: Einbau in die Cuticula	207
4.1.3	Zusammensetzung von P II	210
4.1.4	Phenoloxidase-Aktivität	213
4.2	Per a 9	216
4.2.1	Reinigung und Proteinausbeute	216
4.2.2	Disulfidverbrückung und strukturelle Merkmale	217
4.2.3	Kreuzreaktionen innerhalb der Arginin-Kinasen	221
5	ZUSAMMENFASSUNG	222
6	LITERATUR	223
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	247
8	ANHANG	249
8.1	Referenzen zu Abb. 1-4 Schabenverbreitung und –Allergie	249
8.2	Sequenzierungsergebnisse	249
8.2.1	Per a 3.03 nach Protokoll 3	249
8.2.2	Per a 3.03 aus der Diplomarbeit	250
8.2.3	P II nach Protokoll 2	252
8.2.4	Per a 9 nach Protokoll 2	257
8.2.5	Per a 9 nach Protokoll 3	258
8.3	Korrektur der Per a 3.01-Sequenz: komplettes Alignment	259
8.4	Ergebnisse DLS von Per a 9	260
8.5	Verwendete Markerproteine/ Proteinstandards	262
8.5.1	SDS-PAGE	262
8.5.2	Native PAGE	262
8.5.3	IEF	263
8.6	Färbungen	264

8.6.1	Silberfärbung	264
8.6.2	Zinkfärbung	264
8.6.3	Coomassie-Färbung	264
8.6.4	SERVA Violet 17-Färbung	265
8.6.5	Aktivitätsfärbung	265
8.7	Antikörperchargen	265
8.8	Aufreinigungsprotokolle.....	266
8.8.1	Protokoll 1: Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)	266
8.8.2	Protokoll 1: Größenausschlusschromatographie (SEC)	266
8.8.3	Protokoll 2: IEX	267
8.8.4	Protokoll 2: SEC.....	267
8.8.5	Protokoll 3: IEX	268
8.8.6	Protokoll 3: SEC.....	268
8.8.7	Größenausschlusschromatographie der Extrakte.....	269
8.8.8	Größenausschlusschromatographie des P II-Dissoziats	269
8.9	Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen und Beiträge	270
8.9.1	Publikation.....	270
8.9.2	Kongressbeiträge	270

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit behandelt die Isolierung und Charakterisierung allergener Proteine aus der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana*. Hierfür wird einleitend auf die Epidemiologie von Allergien eingegangen und anschließend die bei der Allergie gegen Schaben relevante allergische Reaktion vom Typ I behandelt. Abschließend werden die bislang identifizierten Schabenallergene kurz vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf dem Forschungsstand des für diese Arbeit besonders relevanten Per a 3-Allergens liegt.

1.1 Epidemiologie von Allergien

Der Begriff Allergie wurde 1906 erstmals von Clemens von Pirquet als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“ definiert [1, 2]. Inzwischen wurde dieser Begriff spezifiziert und Allergie wird nun definiert als „eine krankmachende, spezifisch immunologisch vermittelte und gegen Fremdsubstanzen gerichtete Überempfindlichkeitsreaktion des Organismus“ [3].

Obwohl Allergien in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Öffentlichkeit geraten sind, ist das Auftreten von allergischen Krankheiten nichts Neues. Bereits in der antiken medizinischen Literatur wurden sie in China, Ägypten und Griechenland in ihrer Symptomatik beschrieben [4]. Dennoch besteht kein Zweifel daran, dass Allergien in den letzten Jahrzehnten dramatisch an Häufigkeit zugenommen haben und auch weiter zunehmen werden [4]. Insgesamt stellen sie weltweit eines der großen gesundheitlichen Probleme moderner Gesellschaften dar [4].

Bereits jetzt belegen zahlreiche epidemiologische Studien, dass 20% bis 50% der Bevölkerung Reaktionen auf Umweltantigene zeigen [1, 4, 5]. Alleine in den 80iger Jahren ist die Zahl der am allergischen *Asthma bronchiale* Erkrankten um das Doppelte gestiegen; insgesamt sind mehr als 85% aller Asthmaerkrankungen auf eine allergische Ursache zurückzuführen [6-8]. In Deutschland wird die Epidemiologie der Allergien ausführlich im „Spezialbericht Allergien“ des Statistischen Bundesamtes dargestellt [9]. Aus diesem im Jahr 2000 verfassten Bericht geht hervor, dass 10-20% der erwachsenen Bundesbürger angeben, unter einer Allergie zu leiden: bei 2-4% der Erwachsenen wurde von einem Arzt jemals die Diagnose *Asthma bronchiale* und bei 13-24% jemals die Diagnose Heuschnupfen gestellt. Gegen Inhalationsallergene sind 16-36% sensibilisiert, 24.5% sind sensibilisiert gegenüber Bienen oder Wespen und 1-8% gegenüber Milch oder Ei [9].

Diese große Verbreitung von Allergien belastet in hohem Maße das Gesundheitssystem und stellt u.a. durch Ausfallszeiten am Arbeitsplatz auch einen hohen ökonomischen Verlust dar. 1996 sind in Deutschland 624.6 Mio DM direkte Kosten für die stationäre Behandlung von allergischen Krankheiten und 2703.2 Mio DM als indirekte Kosten z.B. in Form von Produktivitätsverlusten angefallen, wobei zusätzlich von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist

[9]. Doch neben der finanziellen Belastung für den Staat stellen diese allergischen Erkrankungen einen hohen Leidensdruck für die Patienten und deren Familien dar. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet sterben noch immer 10% der mit einem anaphylaktischen Schock eingelieferten Patienten [10].

1.2 Allergien

Allergische Erkrankungen treten meist an den Grenzflächen wie Haut und Schleimhäuten auf, an denen der Organismus sich mit der Umwelt auseinander setzt [4]. Symptome äußern sich als z.B. allergische Rhinokonjunktivitis (saisonaler oder ganzjähriger Schnupfen, Heuschnupfen), allergisches *Asthma bronchiale*, Kontaktekzem, atopisches Ekzem (Neurodermitis), Urtikaria (Nesselsucht) und Nahrungsmittel- und Arzneimittelallergie. Das schlimmste Ausmaß einer allergischen Reaktion ist der anaphylaktische Schock.

Doch nicht jeder dieser Allergien liegt auch der gleiche Pathomechanismus zu Grunde. Coombs und Gell unterteilten allergische Reaktionen in vier pathologisch unterschiedliche Typen, die hier kurz tabellarisch aufgeführt werden (Tabelle 1-1) [1, 9, 11, 12]. In der Praxis treten diese Allergietypen allerdings nicht vollständig voneinander isoliert auf [13-15].

Typ	Auslöser	Krankheitsbilder
Typ I	Antigen, IgE	Allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma, Neurodermitis, anaphylaktischer Schock
Typ II	Antigen, Antikörper, Komplement	Chronische Urtikaria, Arzneimittelallergie
Typ III	antigenhaltige Immunkomplexe	Serumkrankheit, Arthus-Reaktion
Typ IV	Antigen und T-Lymphocyten	Tuberkulinreaktion, chronische Rhinokonjunktivitis, allergisches Kontaktekzem, chronisches Asthma

Tabelle 1-1: Einteilung der pathogenen Immunreaktionen nach Coombs und Gell [11].

Die häufigste Allergieform ist die des Typ I, die in der Literatur auch als Allergie, Hypersensibilisierungsreaktion oder IgE-vermittelte Überempfindlichkeit vom Soforttyp bezeichnet wird [16]. Sie manifestiert sich klinisch häufig in Form von allergischem *Asthma bronchiale* und allergischer Rhinokonjunktivitis (Tabelle 1-1) [4]. Einer Manifestation mit diesem klinischen Krankheitsbild (Phase II) geht eine für den Patienten symptomlose Sensibilisierungsphase voraus (Phase I). Der Ablauf der gegen Schaben relevanten allergischen Reaktion vom Typ I wird von der Sensibilisierung bis hin zur Manifestation im nächsten Abschnitt anhand der Abbildungen 1-1 und 1-2 erläutert.

1.3 Typ I: Allergie vom Soforttyp

In der **ersten Phase** (Phase I) findet die Sensibilisierung des Patienten durch einen ersten Allergenkontakt statt. Die Allergene dringen hierbei meist über die Schleimhäute z.B. des Nasenepithels oder Bronchialepithels über Diffusion ein (Abb. 1-1 [1]). Dort kommen sie in Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC, APZ) (Abb. 1-1 [2]). Zu diesen zählen die vor allem im Atmungsepithel vorhandenen myeloiden dendritischen Zellen, sowie Makrophagen und B-Lymphocyten (B-Zellen). Diese Zellen internalisieren das Allergen exogenen Ursprungs über (rezeptorvermittelte) Endozytose oder Makropinocytose. Sie bauen es in Lysosomen ab und präsentieren die Peptidfragmente zusammen mit dem MHC-II-Komplex (major histokompatibility complex-II) auf ihrer Oberfläche (Abb. 1-1[2]) [17-19]. Wird dieser Peptid-MHC-II-Komplex über den T-Zell-Rezeptor (TCR) von naiven T-Helferzellen (Th0-Zellen) erkannt, differenzieren die naiven T-Zellen zum Th2-Zelltyp mit anschließender Proliferation und leiten dadurch die humorale Immunantwort ein (Abb. 1-1 [3]) [20, 21].

Die Differenzierung zum Th2-Zelltyp ist ein essentieller Schritt bei der Typ I-Allergie, der bisher nicht gänzlich geklärt ist. Vermutlich hängt er vom Mikromilieu ab, in der sich die T-Zelle zu diesem Zeitpunkt befindet. Bekannt ist, dass Cytokine wie Interleukin 4 (IL-4) und IL-5 die Differenzierung zu Th2-Zellen positiv beeinflussen, wohingegen IL-12, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ auf diese Differenzierung inhibitorisch wirken [22, 23]. Wie diese Steuerung jedoch im Einzelnen funktioniert ist jedoch noch nicht vollständig verstanden [1].

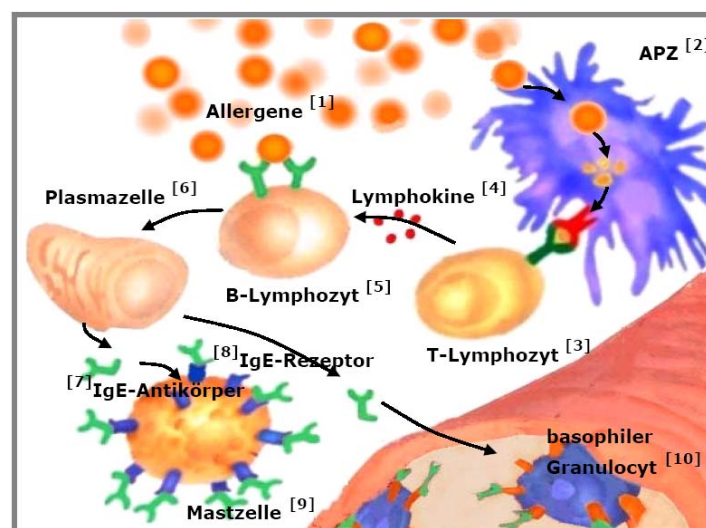


Abb. 1-1: Phase I: Ablauf der Sensibilisierungsphase der Typ-I Reaktion ohne klinische Symptome [15 nach 24]. Erläuterungen finden sich im Text.

Die aus der Differenzierung hervorgegangenen aktivierten Th2-Zellen exprimieren und sezernieren nun die Cytokine IL-4 und IL-13 und exprimieren zusätzlich den CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche (Abb. 1-1 [4]) [19, 25-27]. Dieser CD40-Ligand stellt das costimulierende Signal dar, welches zusammen mit den Interleukinen und dem Allergen für die Aktivierung und den Isotypwechsel von Immunglobulin M (IgM) produzierenden B-Zellen hin zu IgE-produzierenden Plasmazelle benötigt wird (Abb. 1-1 [5,6]) [22, 23, 28, 29]. Diese IgE-Antikörper sind allergenspezifisch und binden an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor von Mastzellen und basophilen Granulocyten (Basophile) (Abb. 1-1 [7, 8]).

Am Ende dieser Sensibilisierungsphase zirkulieren die mit IgE-bestückten Mastzellen und Basophilen im Körper (Abb. 1-1 [9, 10]) und das System ist sozusagen „scharf“ geschaltet. Diese Sensibilisierungsphase kann, ohne vom Patienten bemerkt zu werden, über Jahre hinweg andauern [15, 30].

Kommt der sensibilisierte Patient erneut mit dem Allergen in Kontakt wird die **zweite Phase** (Phase II), die akute Phase der Allergie eingeleitet (Abb. 1-2). Klinisch wird dabei zwischen der Sofort- und Spätreaktion unterschieden.

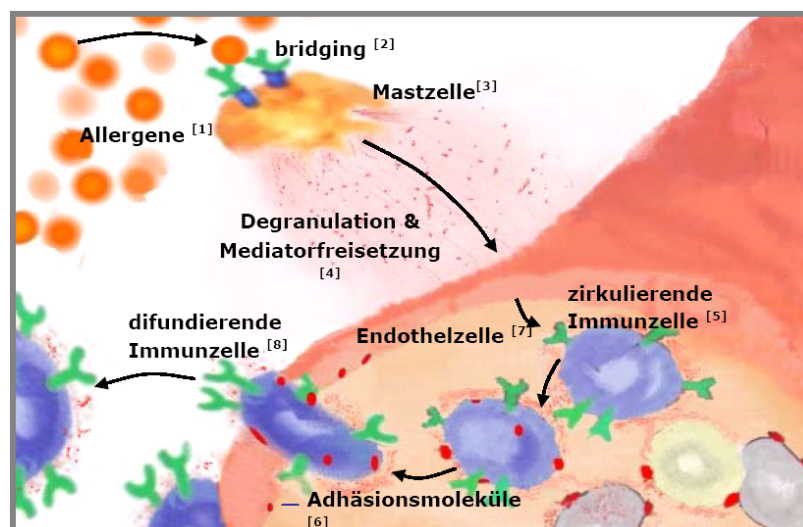


Abb. 1-2: Phase II: Ablauf der akuten Phase der Typ I-Allergie mit klinischen Symptomen [15 nach 24].
Erläuterungen finden sich im Text.

In dieser akuten Phase bindet das Allergen an die mastzellgebundenen IgE-Antikörper. Nur multivalente Allergene sind dabei in der Lage mindestens zwei rezeptorgebundene IgE-Antikörper miteinander kreuzzuvernetzen (Abb. 1-2 [1, 2]). Dadurch wird eine Konformationsänderung induziert, die bei der Mastzelle eine Degranulation präformierter Mediatoren aus den Granula bewirkt (Abb. 1-2 [3, 4]) [31-34]. Hierzu zählen z.B. Histamin, Leukotriene und Prostaglandine. Diese sind für die Symptome der Sofortreaktion verantwortlich, die

bereits innerhalb von Sekunden nach Allergenkontakt auftreten: Kontraktion der glatten Muskulatur, Verengung der Bronchien, Juckreiz und Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit (Vasodilatation) und der Permeabilität. Letzteres geschieht über die Bildung von Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen der Blutgefäße. Diese ermöglichen es zirkulierenden Immunzellen wie Eosinophilen, Th2-Zellen, Neutrophilen, Basophilen und mononukleären Zellen aus den Blutgefäßen in das Gewebe einzuwandern, wo sie über den Allergenkontakt ebenfalls zur Degranulation bzw. Aktivierung gebracht werden. Diese Reaktion hält die Entzündung aufrecht (Abb. 1-2 [5-8]).

Die Spätreaktion der akuten Phase ist durch die *de novo* Synthese und Freisetzung von Lipidmediatoren, Chemokinen und Cytokinen gekennzeichnet. Dadurch werden weitere Leukozyten wie z.B. aktivierte Eosinophile an den Entzündungsherd gelockt (zelluläre Infiltration), die reaktive Sauerstoffderivate sowie weitere toxische Produkte freisetzen und so zu Gewebeschädigungen führen [1, 31, 32, 35, 36]. Klinisch äußert sich diese Spätreaktion sechs bis 24 Stunden nach Allergenkontakt durch anhaltende Ödeme, Gewebeschwellungen, gesteigerte Schleimproduktion in den Bronchien und erhöhte Reaktivität der Bronchialmuskulatur. Dies kann im schlimmsten Fall zu einem anaphylaktischen Schock führen.

Nachdem der Mechanismus der allergischen Reaktion vorgestellt wurde, stellt sich nun die Frage, worin die Ursachen für den starken Anstieg der Allergien in den modernen Gesellschaften liegen könnten. Diese Frage wird vielfältig diskutiert. Hypothesen reichen von der Änderung des Ernährungsverhaltens über Umweltverschmutzung, Stress und genetische Prädisposition bis hin zur Urwald- und Hygienehypothese (mangelnde Stimulation des Immunsystems durch Parasiten bzw. mikrobielle Faktoren) [4, 37-40]. Schlüsselemente für die IgE-Produktion scheinen der Expositionsweg, die Allergendosis, die genetische Disposition des Patienten und das Patientenalter bei der Sensibilisierung zu sein, sowie die intrinsischen Eigenschaften des Allergens, die eine Th2-Antwort präferieren [41, 42]. Eine eindeutige Ursache konnte bisher jedoch noch nicht ausgemacht werden und ist auch weiterhin Gegenstand aktueller Diskussionen.

1.4 Allergene

Im Blickpunkt dieser Arbeit stehen vor allem die intrinsischen Eigenschaften von Allergenen. Diese werden auch in der Literatur unter der Frage, was ein Allergen tatsächlich zu einem Allergen werden lässt intensiv diskutiert [4, 34]. Diese Frage stellt sich vor allem deshalb, weil nicht jedes Protein in einem allergen-wirkenden Extrakt auch tatsächlich als Allergen agiert [34]. Wieso das so ist, konnte bis heute nicht befriedigend beantwortet werden; und das, obwohl inzwischen mehr als 586 verschiedene Allergene bekannt sind [Stand 09.01.2008, www.allergen.org]. Im Fokus stehen neben der Allergengröße die Funktion des

Allergens, vor allem im Hinblick auf die Fähigkeit physikalische Barrieren, wie z.B. Schleimhäute zu überwinden, die Stabilität des Allergens und die Fremdheit des Allergens gegenüber Proteinen aus Menschen. Auch wird verstärkt nach typischen Sequenzmotiven für lineare T-Zell- und/oder B-Zell-Epitope, nach allgemeingültigen strukturellen Merkmalen für Konformationsepitope oder auch nach Glykosylierungsmustern gesucht [34, 43, 44].

Per Definition versteht man unter einem Allergen einen an sich harmlosen Umweltstoff (Antigen), der als Ausdruck einer Fehlregulation des Immunsystems eine allergische Erkrankung induziert oder auslösen kann [1, 4]. Abhängig von der Sensibilisierungsrate innerhalb einer Population werden bei über 50% positiven Reaktionen Proteine als Hauptallergene („Major“) und bei unter 50% positiven Reaktionen als Nebenallergene („Minor“) klassifiziert [45]. Immunologisch wird nochmals zwischen einem immunogenen (=antigenen) und einem allergenen Protein unterschieden. Ersteres ist z.B. durch Induktion der Differenzierung und Proliferation von T-Zellen in der Lage das Immunsystem zu stimulieren, ruft aber keine IgE-Antikörperbildung hervor [43]. Diese Fähigkeit wird *in vitro* neben der Bestimmung der T-Zellproliferation z.B. durch Messen der T-zellspezifischen Cytokine bestimmt (Cytokinbestimmung). Im Unterschied dazu stimuliert ein allergen wirkendes Protein die IgE-Antikörperproduktion (Sensibilisierung) und kann auch durch Vernetzung rezeptorgebundener IgE-Antikörper die akute Phase der Typ-I Allergie induzieren [43]. *In vitro* wird dabei z.B. die Leukotrienfreisetzung in einem Basophilen-Aktivierungstest gemessen.

Physikochemische Eigenschaften, in denen Immunogene/Antigene von Allergenen unterschieden werden können sind bisher nicht bekannt [43]. In dieser Arbeit wird im Wesentlichen der Begriff „Allergen“ verwendet und lediglich bei der Fokussierung des einzelnen Aspektes zwischen „Immunogen/Antigen“ und „Allergen“ unterschieden.

In der Literatur werden Allergene meist zusätzlich über den Expositionsweg klassifiziert. Dabei wird zwischen Aeroallergenen, Nahrungsmittelallergenen und Kontaktallergenen unterschieden. Als Aeroallergene sind neben Pollenallergenen auch Milbenallergene sehr gut untersucht. Immer stärkere Beachtung finden in den letzten Jahren die Schabenallergene.

1.5 Schabenallergie

Die Allergie gegen Schaben wird über deren Allergene ausgelöst. Schabenallergene in Form von aerosolisierten Partikeln wurden in schabenbefallenen Domizilen detektiert [z.B. 46-50]. Die Allergene gelangen über Fäkalien und Speichel sowie über den Zerfall der Tiere in den Hausstaub und erreichen dadurch den Respirationstrakt des Menschen [50-53]. Schaben sind hemimetabole Insekten, d.h. sie machen eine unvollkommene Metamorphose durch. In ihrer Entwicklung vom Ei zum adulten Tier werden verschiedene Larvenstadien, jedoch kein Puppenstadium, durchschritten (Abb. 1-3). Die Metamorphose der Schaben ist dahingehend

von Interesse, da die einzelnen Stadien von verschiedenen Häutungszyklen begleitet werden, sodass über Zerfall der Exuvien ebenfalls Allergene in den Hausstaub gelangen könnten.

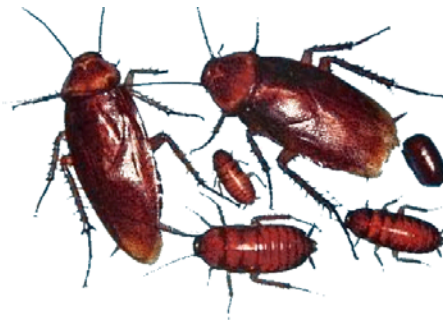


Abb. 1-3: Entwicklungsstadien von *Periplaneta americana*. Ootheken (Eipakete), Nymphen und adultes Weibchen und Männchen [www.doyourownpestcontrol.com/american.htm].

Die Allergie gegen Schaben manifestiert sich in der eingangs vorgestellten IgE-vermittelten Typ-I Allergie und löst beim Patienten respiratorische Beschwerden wie z.B. allergisches *Asthma bronchiale* und/oder Rhinokonjunktivitis aus [54-57].

Seit den Anfängen der Schabenallergie-Forschung von Bernton und Brown (1964) untermauern inzwischen weltweit zahlreiche Studien die Signifikanz von Schabenallergie sowie die Verbindung zwischen Schabenallergenen und Asthma. Insbesondere in den USA ist diese Problematik sehr gut untersucht [58-67].

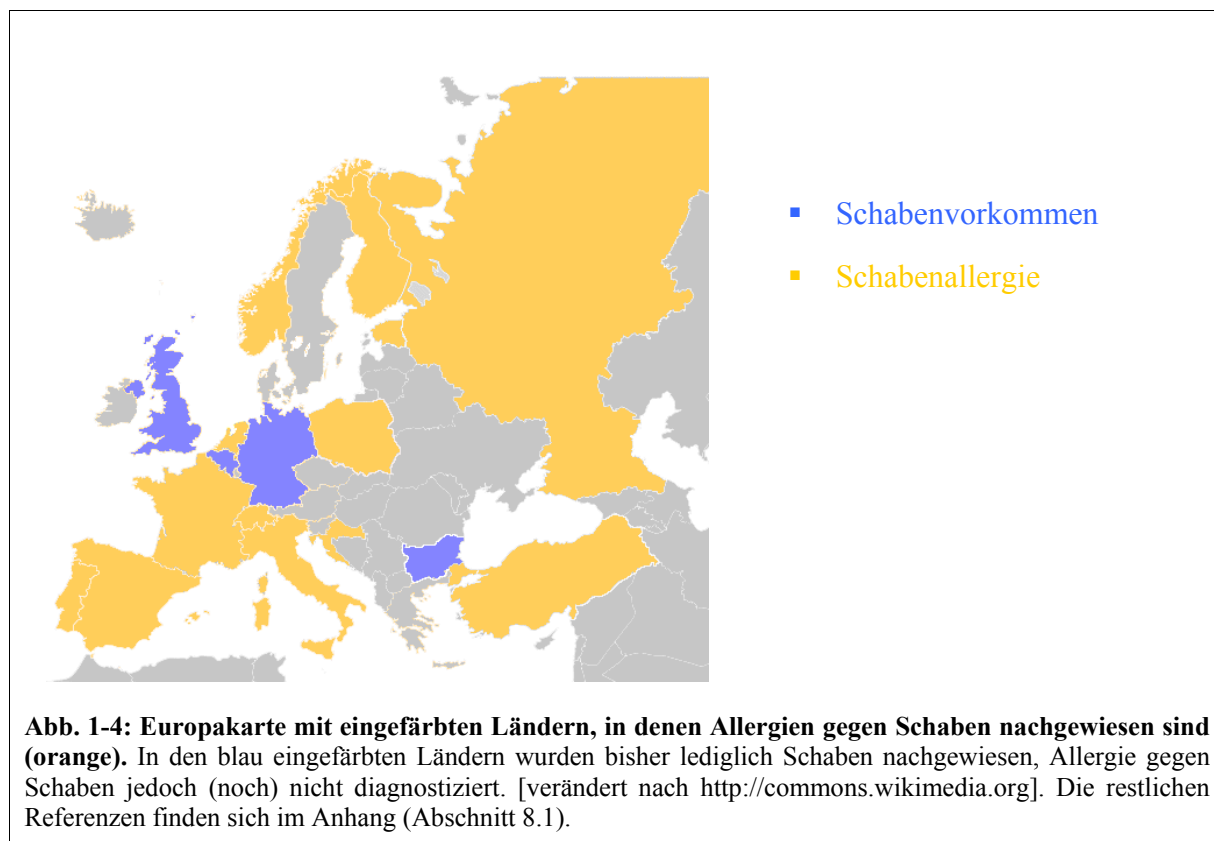
Die Sensibilisierung gegen Schaben findet überall dort statt, wo die gegebenen Lebensumstände das Vorhandensein von Schaben fördern [64, 68, 69]. In einer sehr bekannten Studie von Rosenstreich et al. (1997) aus den USA wurde nachgewiesen, dass bei Kindern die Kombination aus Sensibilisierung gegen Schaben und der Exposition an hohen Dosen von Schabenallergenen mit einer erhöhten Krankheitsrate, aufgrund von Asthma einhergeht und somit eine ernstzunehmende Bedrohung darstellt [70].

Aus diesem Grund wird nachfolgend auf die Epidemiologie der Schaben in Europa, insbesondere in Deutschland eingegangen, die systematische Einordnung der Schaben in Zusammenhang mit deren Lebensräumen kurz erläutert und anschließend die bisher bei Schaben identifizierten Allergene vorgestellt.

1.6 Epidemiologie der Schabenallergie

Die Problematik der Schabenallergie ist nicht nur in Amerika und Asien gut untersucht. Auch in zahlreichen europäischen Ländern wurden inzwischen nicht nur Schaben nachgewiesen, sondern auch von Allergien gegen diese Tiere berichtet. Hierbei wurden insbesondere *Blattella germanica* sowie die etwas enger verwandten Arten *Periplaneta americana* und *Blatta orientalis* in menschlichen Behausungen gefunden und auch die Sensibilisierungen gegen diese Spezies getestet. In Abb. 1-4 sind diese Ergebnisse zusammengefasst: Ländern,

in denen lediglich Schaben gefunden wurden, jedoch keine oder nur geringe Sensibilisierungsraten festgestellt wurden sind in blau eingefärbt und Ländern mit einer nachweislich hohen Sensibilisierungsrate in orange. Die zahlreichen Referenzen zu den einzelnen Studien sind im Anhang (Abschnitt 8.1) aufgeführt.



Lediglich in Deutschland scheint diese Problematik nur sporadisch Beachtung zu finden. Publikationen von Schabenbefall gab es insbesondere gehäuft in den 70iger Jahren [71-79]. Dann erst 2005 haben in Deutschland unabhängig voneinander zwei große Schabenplagen in der Bevölkerung für Aufsehen gesorgt: in Damme (Niedersachsen) hatte sich *Blatta orientalis* offensichtlich in den landwirtschaftlichen Betrieben vermehrt und in Bernau (Brandenburg) ging die Plage mit *Blattella germanica* von einem Recyclingwerk aus, von dem aus die Tieren durch Löscharbeiten von der Feuerwehr sogar bis nach Berlin verschleppt wurden [80-89].

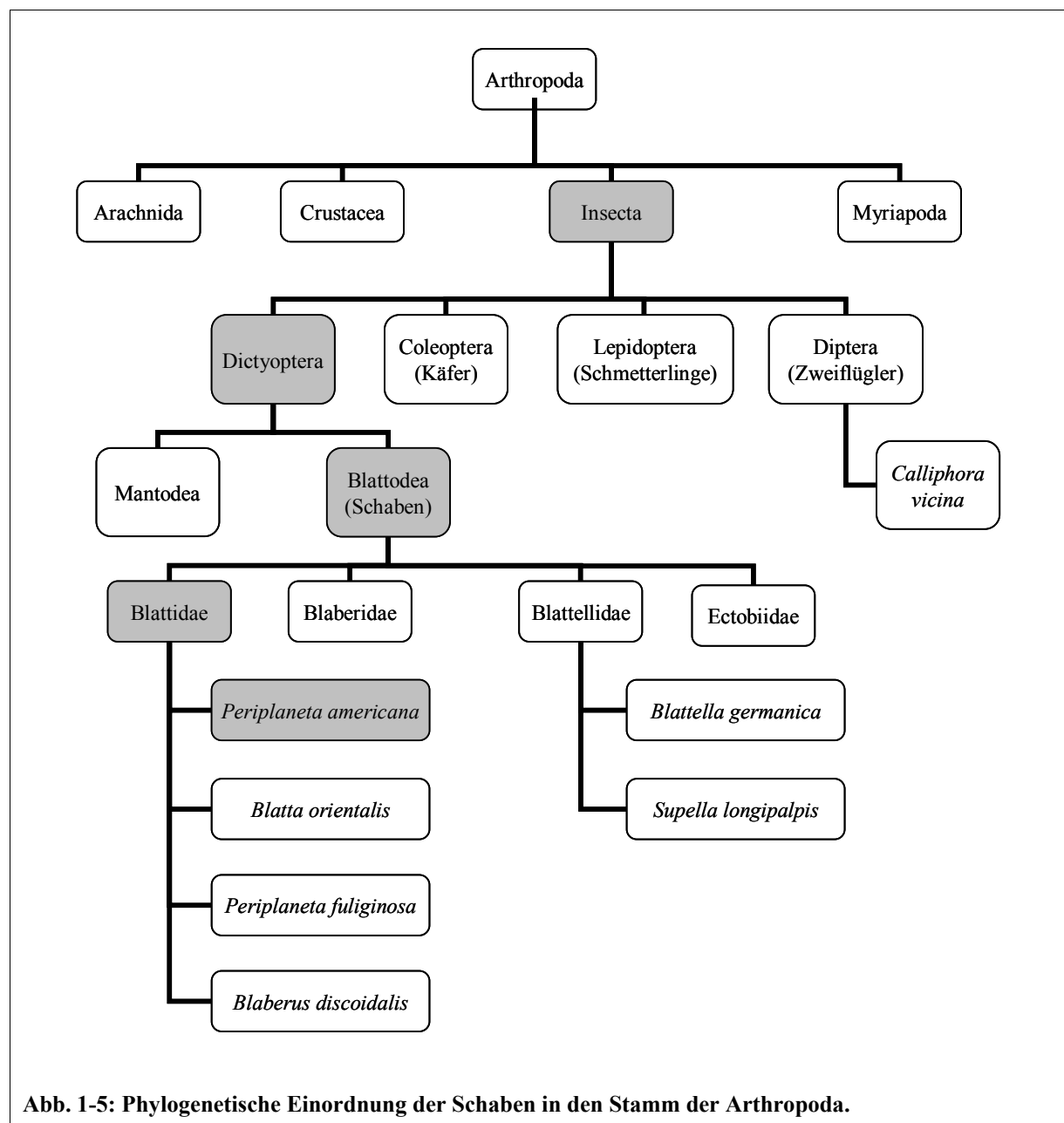
Nichts desto trotz widmeten sich bis jetzt in Deutschland erst zwei Studien dem Vorkommen von Schabenallergenen im Hausstaub bzw. der Sensibilisierung gegen Schaben. Die Hausstaubanalysen wurden 1999 wurde von Fahlbusch et al. in Hamburg und Erfurt mit negativem Ergebnis durchgeführt: bei 93% der Proben lag die Schabenallergenkonzentration (Bla g 2) unter der Nachweisgrenze [89]. Die Sensibilisierung von Kindern mit Asthma gegen die Deutsche Schabe (*Blattella germanica*) wurde 2000 getestet. Dabei lag in Relation zu anderen Ländern die Prävalenz gegen diese Schabe mit 6.1% deutlich unter den

Ergebnissen von 49-60% anderer Studien, sodass Hirsch et al. vor acht Jahren dieses Problem bei Kindern in Dresden als nicht-relevant einstufen [90, 91].

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den anderen Ländern sowie der aufgetretenen Schabenplagen in Damme und Bernau, wäre es angebracht in Deutschland mit größeren Stichproben die Prävalenzen auf Schabenallergie erneut zu testen.

1.7 Systematische Einordnung der Schaben

Weltweit sind über 3500 Schabenspezies bekannt, die im Tierreich in den Stamm der Arthropoden, der Klasse der Insekten und der Unterordnung der Blattodea systematisch eingeordnet werden (Abb. 1-6) [92, 93].



Die meisten Schabenspezies stammen ursprünglich aus den Tropen und Subtropen, wo sie einen wichtigen Bestandteil des Ökosystems darstellen [94]. In Deutschland bzw. Mitteleuropa sind je nach Literatur zwischen 12 und 15 Schabenarten aufgeführt, von denen einige Arten heimisch sind. Bei den übrigen handelt es sich um eingeschleppte Arten (Neozoen), die in Folge der Globalisierung inzwischen auch weltweit verbreitet sind [92, 94, www.faunistik.net]. Je nach Habitat werden die Schaben unterteilt u.a. in freilebend, wie z.B. die Waldschabe (*Ectobius sylvestris*) und in synanthrop, zu denen die Deutsche Schabe zählt [95]. Ein 1995 von Mielke gestartetes Vorhaben zum Erfassen synanthroper Schaben in Deutschland scheiterte an der Interessenlosigkeit der Mehrzahl der befragten Schädlingsbekämpfungsbetriebe [96].

Synanthrope Arten werden in der Literatur auch häufig als „domestic“ bezeichnet. Sie sind aufgrund ihrer Lebensweise eng mit dem Menschen assoziiert und in Deutschland im Infektionsschutzgesetz sogar als Schädlinge ausgewiesen [97]. Dort werden in §2, Absatz 12, sieben Schabenarten als tierische Schädlinge eingestuft, die in Tabelle 1-2 aufgeführt sind. Insgesamt gelten im wissenschaftlichen Sinne etwa 25 bis 30 Schabenspezies als Schädlinge.

Spezies	Wissenschaftlicher Name
Deutsche Schabe	<i>Blattella germanica</i> (Linné, 1767)
Braunbandschabe	<i>Supella longipalpa</i> (Fabricius, 1798)
Orientalische Schabe/ Küchenschabe	<i>Blatta orientalis</i> (Linné, 1758)
Amerikanische Schabe	<i>Periplaneta americana</i> (Linné, 1758)
Australische Schabe	<i>Periplaneta australasiae</i> (Fabricius, 1775)
Braune Großschabe	<i>Periplaneta brunnea</i> (Burmeister, 1838)
Rauchbraune Großschabe	<i>Periplaneta fuliginosa</i> (Serville, 1839)

Tabelle 1-2: Im Infektionsschutzgesetz in Deutschland als Schädlinge verankerte Schabenarten [97]. In älteren Publikationen, gelten lediglich die ersten fünf Arten auch als synanthrop [98-100].

In Deutschland treten diese Schädlinge im Allgemeinen nur in beheizten Innenräumen auf und können mit wenigen Ausnahmen (z.B. auf Mülldeponien) unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas nicht im Freiland überwintern. Dominierende Arten hierzulande sind die Deutsche und die Orientalische Schabe [101], doch auch die Amerikanische Schabe ist in Deutschland auf dem Vormarsch [persönliche Mitteilung 102]. Sie wurde bereits 1938 in Gewächshäusern in Magdeburg nachgewiesen [96, 103]. Synanthrope Schaben sind aufgrund ihrer eng mit dem Menschen verbundenen Lebensweise von Besonderen Interesse. Sie können die Gesundheit des Menschen auf unterschiedliche Art und Weise nachteilig

beeinflussen: mit ihrem Speichel und Kot kontaminieren sie Essen und Geschirr, sie können unangenehm riechende Sekrete ausscheiden, rufen psychologischen Stress hervor und können als Wirte Bakterien und virale Pathogene übertragen [94, 104-106]. Von besonderem Interesse sind insbesondere deren Allergene, die zu respiratorischen Allergien führen [104, 105].

1.8 Allergenspektrum der Schaben

Bei den ersten Untersuchungen der allergenen Potenz von Schaben wurden Ganzkörperextrakte, sogenannte Crude-Extrakte oder auch Mazerate genannt, verwendet und mit Seren von Patienten untersucht [z.B. 95, 107-111]. In Abhängigkeit von dem Patientenkollektiv und der Untersuchungsmethode wurden hierbei bis zu 45 antigene und 9 allergene Komponenten in *Periplaneta americana* mit einem Molekulargewicht von 26 kDa bis 120 kDa auf der SDS-PAGE identifiziert, die von spezifischen IgE-Antikörper erkannt wurden [107, 108, 112]. Bei *Blattella germanica* finden sich in der Literatur Angaben von bis zu 29 antigenen und 8 allergenen Proteinen, in einem Molekulargewichtsbereich von 25 kDa bis 200 kDa [105, 112, 113]. Ausgehend von solchen Crude-Extrakten und auch cDNA-Bibliotheken konnten bei drei Schabenspezies (*Blattella germanica*, *Periplaneta americana* und *Periplaneta fuliginosa*) Allergene identifiziert und zum Teil isoliert werden [95, 105, 114, 115]. Diese können in neun Proteingruppen eingeteilt werden, die in Abb. 1-6 (nächste Seite) zusammen mit weiteren Allergenen dargestellt sind.

Insgesamt sind zur Zeit (Stand Januar 2008) ohne Berücksichtigung allergener Isoformen mindestens 586 Allergene identifiziert, doch lediglich von ca. 5% der identifizierten Allergene existiert auch eine Röntgenkristallstruktur, darunter eine von dem Schabenallergen Bla g 2, welches in Abb. 1-6 rosa eingefärbt ist [z.B. 116-120, www.allergen.org]. In gelb dargestellt sind die Allergene Per a 3 und Per a 9 aus der Amerikanischen Schabe, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden (Abb. 1-6). Von den in grau dargestellten Allergenen ist lediglich die cDNA bekannt und ein Nachweis der Allergenität steht noch aus. Insbesondere bei Per a 3 ist auffällig, dass -obwohl es sich ebenso wie bei den meisten anderen Schabenallergenen um ein sehr potentes Allergen handelt- in anderen Spezies bisher kein homologes Allergen beschrieben ist.

	<i>Periplaneta americana</i>	<i>Blattella germanica</i>	<i>Periplaneta fuliginosa</i>	<i>Dermatophagoides</i>
unbekannt	Per a 1	Bla g 1		
Aspartat-Protease	Per a 2	Bla g 2		
Hexamerin	Per a 3			
Calycin	Per a 4	Bla g 4		Der f 13
Glutathion S-Transferase	Per a 5	Bla g 5		Der p 8
Troponin-C	Per a 6	Bla g 6		
Tropomyosin	Per a 7	Bla g 7	Per f 7	Der p 10
Myosin		Bla g 8		
Arginin-Kinase	Per a 9			Der p 20

Abb. 1-6: Übersicht über die bisher identifizierten Schabenallergene mit Bezug zu ihrer jeweiligen Proteingruppe. Zusätzlich zu den bekannten Schabenallergenen sind weitere bekannte Allergene der jeweiligen Gruppe aufgeführt. Allergene mit „Der p“ bzw. „Der f“ stammen aus der Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus* bzw. *D. farinae*. Zahlreiche dieser hier aufgeführten Allergene sind in der offiziellen Allergendatenbank der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammen mit den jeweiligen Referenzen gelistet [www.allergen.org]. Von denen in grau dargestellten Allergenen ist lediglich die cDNA bekannt und ein Nachweis der Allergenität steht noch aus. Bla g 2 ist farblich hervorgehoben, da dieses Allergen das einzige Schabenallergen ist, von dem eine Röntgenkristallstruktur existiert. In gelb dargestellt sind die Allergene aus der Amerikanischen Schabe, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Nachfolgend werden die bisher identifizierten Schabenallergene in Zusammenhang zur zu homologen Allergenen und der Sensibilisierungsrate am Beispiel ihrer Proteinklassen vorgestellt.

1.8.1 Gruppe 1

Proteine, die zur Gruppe 1 der Schabenallergene gezählt werden, sind im Tierreich bisher nur in den beiden Schabenspezies *Blattella germanica* und *Periplaneta americana* als Allergene (Bla g 1 und Per a 1) identifiziert, wobei es Indizien gibt, dass homologe Proteine wahr-

scheinlich auch in *Blatta orientalis* und *Supella supellectilium* zu finden sind [112, 121, 122]. Bla g 1 wurde in älteren Veröffentlichungen zumeist als Bla g Bd90K und Per a 1 als Cr-PII bezeichnet [108, 123, 124]. Die Gruppe 1 besteht aus zahlreichen allergenen Isoformen, die ein charakteristisches repetitives konserviertes Sequenzmotiv aus ca. 100 Aminosäuren (AS) gemeinsam haben [123, 125]. Die Anzahl dieser Wiederholungssequenzen kann je nach Isoform variieren und wird inzwischen als „Gruppe 1-Motiv“ bezeichnet. Interessanterweise liegen die für Per a 1 bestimmten linearen B-Zell-Epitope innerhalb dieses Motivs [126, 127]. Auch ist in Betracht zu ziehen, dass die Anzahl der Wiederholungen des Gruppe 1-Motivs für das von 14 kDa bis 90 kDa gestreute Molekulargewicht der Isoformen verantwortlich ist [123-125]. Trotz intensiver Forschung konnten dieser Proteinklasse weder eine genaue Funktion im Organismus zugeordnet noch deren Struktur geklärt werden. Bekannt ist, dass sowohl Bla g 1 als auch Per a 1 in den Fäkalien der Schabe auftreten [112, 128-130]. Die allergene Potenz dieser Gruppe ist so enorm hoch, dass bereits eine einzige weibliche Schabe in der Lage ist, innerhalb von 24 h soviel Bla g 1 auszuschcheiden, dass die Allergenkonzentration die Sensibilisierungsgrenze überschreitet [128]. Die Per a 1-Proteine lösen bei 54-77% der atopischen Patienten Hautreaktionen aus und sind somit eindeutig Majorallergene der Amerikanischen Schabe [114].

1.8.2 Gruppe 2: Aspartat-Protease

Aspartat-Proteasen wurden bisher in drei Schabenspezies identifiziert: *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* und *Leucophaea maderae*, wobei lediglich die beiden erstgenannten auch als Allergene unter der Bezeichnung Bla g 2 und Per a 2 bekannt sind [131-133]. Insbesondere Bla g 2 ist hierbei sowohl immunologisch als auch biochemisch sehr gut untersucht [z.B. 42, 134, 135]. Dieses Protein ist außerdem das einzige Schabenallergen von dem bisher die Röntgenkristallstruktur gelöst wurde (Abb. 1-6, in rosa eingefärbt) [136]. Aufgrund von Substitutionen an den katalytischen Triaden liegt Bla g 2 als inaktive Aspartat-Protease vor [134, 136]. Ebenso wie Bla g 1, ist auch Bla g 2 in den Fäkalien der Deutschen Schabe nachweisbar, wo dessen Konzentration interessanter Weise mit der Verwendung von Pestiziden korreliert [130]. Bla g 2 kann sowohl als Monomer mit 36 kDa als auch als Dimer mit ca. 70 kDa auftreten [133]. Für Per a 2 kann aus der Sequenz ein ähnliches Molekulargewicht von 38 kDa errechnet werden, wobei über dessen Oligomerisierung noch nichts bekannt ist. Zwischen den beiden Schabenspezies ist diese Allergengruppe nur schwach kreuzreaktiv, muss jedoch zu den Majorschabenallergenen gezählt werden: schabenallergische Patienten zeigen eine 60-80%ige IgE-Prävalenz gegenüber Bla g 2 [42, 50, 114, 137] und Per a 2 wurde von IgE-Antikörper aus 53% der getesteten Seren von Schabenallergikern gebunden [131].

1.8.3 Gruppe 3: Hexamerin

Hexamerine wurden bisher in zahlreichen Insekten identifiziert, so auch in *Periplaneta americana*. Doch ist mit Per a 3 diese Stoffgruppe nur in der Amerikanischen Schabe auch als Allergen bekannt. Auch finden sich keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen zu anderen bekannten Allergenen [5, 138]. Aus diesem Grund wird Per a 3 auch weiterhin als Spezies-spezifisches Allergen bezeichnet [138-143]. Bei *Periplaneta americana* wurden diese Allergene bereits in der Schleimhaut des Mitteldarms, dem Darminhalt und auch in den Fäkalien lokalisiert [53].

In ersten Untersuchungen von Wu *et al.* (1988) wurde Per a 3 partiell aus einem Ganzkörper-extrakt gereinigt. Diese Per a 3-haltige Fraktion wurde als Cr-PI bezeichnet und erwies sich als außerordentlich potent [108]. Die Hauptproteine dieser Cr-PI-Fraktion wiesen auf der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 78 kDa und 72 kDa und einen isoelektrischen Punkt (pHi) von 6.2 auf [108]. Diese Fraktion löste im Hauttest 73% positive Reaktionen aus und konnte *in vitro* IgE von 100% der getesteten Seren binden [108]. Zusätzlich war es in der Lage, eine T-Zellproliferation von PBMC („peripheral blood mononuclear cells“) schaben-allergischer Patienten zu induzieren [108, 144]. Somit handelt es sich bei den Per a 3-Proteinen eindeutig um Majorallergene der Amerikanischen Schabe.

Wu und Mitarbeitern gelang es, von Per a 3 Isoallergene zu identifizieren, vier davon zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren (Tabelle 1-3). Diese unterscheiden sich teilweise signifikant in ihren biochemischen Eigenschaften sowie in ihrer Allergenität [138, 143].

Offizielle Bezeichnung	veraltete Bezeichnung (Klon)	AS-Anzahl	Mr [kDa]	pHi	Reaktivität	Referenz
Per a 3.01	C12	685	81.2 (78)	6.26	(47.4%)	138
Per a 3.0201	C20	631	75.5 (72)	6.63	(47.4%)	138
Per a 3.0202	C13	470	56.2 (54)	7.06	(26.3%)	143
Per a 3.0203	C28	393	46.7 (46)	6.54	(94.7%)	143

Tabelle 1-3: Bisher bekannte Isoformen von Per a 3. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die rekombinant exprimierten Formen. Die Reaktivitäten wurden im Hauttest an 19 schabensensitiven Patienten mit Asthma ermittelt. Diese vier Klone entsprechen zwei Per a 3-Isformen. Per a 3.01 ist vollständig sequenziell bekannt und besitzt in reifer Form ein Molekulargewicht von 79.4 kDa. Per a 3.0202 und Per a 3.0203 stellen offenbar Teilsequenzen von Per a 3.0201 dar. Alle Isoformen besitzen zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen bis auf Per a 3.0203, das keine solche potentielle N-Glykosylierungsstelle aufweist.

Diese Klone (Per a 3.01, Per a 3.0201, Per a 3.0202, Per a 3.0203) sind zwei Isoformen zuzuordnen, wobei lediglich die Sequenz von Per a 3.01 komplett ist. Dieses Protein besitzt in reifer Form (abzüglich der 16 AS des Signalpeptids) ein Molekulargewicht von 79.4 kDa.

Bei Per a 3.0201 fehlt das Signalpeptid und Per a 3.0202 und Per a 3.0203 sind offenbar Teilsequenzen von Per a 3.0201 [145]. Eine Übersicht über die vier Allergene ist in Tabelle 1-3 zu finden, wobei nochmals zwischen den Klonen und den rekombinanten Proteinen -Angabe in Klammern- unterschieden wird. Untereinander sind die Per a 3-Isoformen auf AS-Sequenzebene zu 69-95% identisch [143]. Sie besitzen eine auffällige Sequenzhomologie (20-36%) zu Insekten-Hämolymp- Proteinen (Arylphorinen), wie Wu und Mitarbeiter anhand zahlreicher Beispiele belegten [5, 138-143]. Arylphorine sind per Definition Proteine, deren Anteil an aromatischen Aminosäuren über 15% liegt [146]. Im Allgemeinen beinhaltet diese Bezeichnung weder eine Aussage über die Struktur des Proteins noch über dessen Funktion oder (familiäre) Zuordnung, da sich Arylphorine aus verschiedenen Insektenordnungen einander nicht sonderlich ähnlich sind [147].

In meiner Diplomarbeit gelang es mir zu zeigen, dass diese Klassifizierung weiter spezifiziert werden kann und es sich bei den Per a 3-Proteinen eindeutig um Hexamerine handelt [148]. Hexamerine sind eine Familie von Hämocyanin-verwandten Insekten-Hämolymp- Proteinen, die nach ihrer nativen Zusammensetzung von sechs homologen oder in manchen Fällen auch heterologen Untereinheiten benannt sind. Diese besitzen ein Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 85 kDa und haben die Fähigkeit verloren, Kupfer am aktiven Zentrum einzubauen und somit Sauerstoff zu binden [147, 149-153]. Sie werden auch als hexamere Insektenspeicherproteine bezeichnet, jedoch werden lediglich miteinander verwandte Speicherproteine in dieser distinkten Gruppe zusammengefasst [153, 154]. In dieser Arbeit werden für Per a 3 die Begriffe Hexamerin und Arylphorin verwendet, je nachdem, welcher Proteinaspekt beleuchtet werden soll.

Aus der Hämolymphe der Amerikanischen Schabe konnte ich in meiner Diplomarbeit zwei Per a 3-Isoformen isolieren und partiell charakterisieren [148]. Diese sind in nativer Form Hexamere mit einem Molekulargewicht von 512 kDa bzw. 465 kDa; die denaturierten Untereinheiten weisen ein Molekulargewicht von 80 kDa bzw. 73 kDa auf. Die Per a 3-Isoformen besitzen außerdem mit den spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von 1.65 [l/(g*cm)] bzw. 1.44 [l/(g*cm)] etwas unterschiedliche Aminosäure (AS)-Zusammensetzungen [148]. Weiterhin können sie aufgrund ihrer Oberflächenladungen sowie ihren Sekundärstrukturanteilen differenziert werden. Da die Strukturverwandtschaft sowie eine 51%ige Homologie zum Arthropoden-Hämocyaninen aus *Panulirus interruptus* gegeben war, konnten wir ein Homologie-Modell von hexamerem Per a 3.01 erstellen.

Dieses Modell ermöglichte die Lokalisierung der bereits identifizierten linearen B-Zell-Epitope: ⁴⁰⁰TVLRDPVIFYQ⁴⁰⁹, ⁴⁶⁶NNVDQI⁴⁷¹, ⁵⁸⁰VDKGHNYCGYPENLLI⁵⁹⁵, ⁵⁹⁵IPKGKKGGQAY⁶⁰⁵ [140]. Diese Epitope sind in der Quartärstruktur hauptsächlich an der Proteinoberfläche lokalisiert, sodass IgE-Antikörper das native Protein potentiell erkennen können. Eine Analyse für Per a 3.0201 wird in dieser Arbeit vorgenommen. Jedoch ist

weiterhin unklar, wieso dieses Protein als einziger Vertreter seiner Proteinklasse ein so potentes Allergen ist.

1.8.4 Gruppe 4: Calycin

Die Gruppe der Calycine umfasst die folgenden drei Untergruppen, die in der Literatur häufig auch als Synonyme verwendet werden: Calycin, Lipocalin und Liganden-Bindungsproteine. Dieser Gruppe 4 gehören zahlreiche wichtige Allergene an, die in der Lage sind, IgE-Antworten durch Inhalation (Aeroallergene) oder Verdau (Nahrungsmittelallergene) zu induzieren. Sie lösen im Patienten allergisches *Asthma bronchiale* bzw. Nahrungsmittelallergie aus [23, 155]. Aus der Deutschen Schabe wurde bisher Bla g 4 als Allergen isoliert, teilweise charakterisiert und als Calycin klassifiziert [45, 155, 156]. Dessen Expression ist im Hinblick auf Entwicklung, Gewebe sowie Regulation sehr gut untersucht [45]. In rekombinanter Form besitzt es in Abhängigkeit vom Expressionssystem ein Molekulargewicht von 18-23 kDa [156]. Bei *Periplaneta americana* ist Per a 4 -ausgehend von einer cDNA-Bank- kürzlich kloniert worden [157]. Weitere Charakterisierungen sowie ein Expressionsnachweis stehen allerdings noch aus.

Kreuzreaktionen zwischen diesen Schabenallergenen oder auch mit anderen Allergenen der Calycin-Familie sind bis jetzt nicht bekannt, wären jedoch basierend auf einer Calycin-typischen 3D-Struktur mit gleichen Faltungsmotiven denkbar [50, 155, 158]. In serologischen Studien weisen schabenallergische Patienten, in Abhängigkeit von der Testmethode, eine IgE-Prävalenz von 40-60% gegenüber rekombinantem Bla g 4 auf [50, 114, 155]. Somit steht Bla g 4 an der Grenze zum Majorallergen.

1.8.5 Gruppe 5: Glutathion S-Transferase

Bei Glutathion S-Transferasen (GST) handelt es sich um eine weit verbreitete Superfamilie multifunktionaler Enzyme (EC 2.5.1.18), die in die Detoxifizierung endogener und xenobiotischer Komponenten involviert sind [50, 159-166]. Innerhalb der Insekten wird aufgrund des katalytischen Zentrums zwischen delta- und sigma-GST differenziert [164, 165, 167-176]. In der Deutschen Schabe gibt es nachweislich zwei unterschiedliche GST-Allergene mit lediglich 14% AS-Sequenzidentität [166, 177]: Bla g 5 ist vom sigma Typ und BgGSTD1 vom delta Typ. Beide Allergene sind Homodimere mit etwas unterschiedlichem Verhalten in der native PAGE und einem Molekulargewicht der Untereinheiten von 23-25.5 kDa [166, 177, 178]. Weiterführende Experimente lassen den Rückschluss zu, dass noch mindestens eine weitere GST in *Blattella germanica* vorhanden sein muss [166, 178]. IgE Antikörper von schabenallergischen Patienten erkennen sowohl Bla g 5 als auch BgGSTD1 [177]. 70% der Schabenallergiker und 40% der Atopiker sind gegen Bla g 5 sensibilisiert [50, 166]. In *Periplaneta americana* ist mit Per a 5 auf Sequenzebene eine GST vom delta-Typ bekannt, deren Sensibilisierungsnachweis allerdings noch aussteht [179]. Unabhängig von dieser Studie wurde aus *Periplaneta americana* eine GST (nicht näher bestimmten Typs)

isoliert, die von IgE aus 68% der getesteten Seren erkannt wurde [180]. Ob es sich hierbei um Per a 5 handelt ist nicht geklärt. In einer interessanten Studie von Arruda *et al.* (1997) konnte paradoxerweise nachgewiesen werden, dass ausgerechnet die zur Schabenbekämpfung empfohlenen Insektizide in *Blattella germanica* eine gesteigerte GST-Expression zum Schutz gegen diese Insektizide auslöst [166]. Dadurch muss durch die Insektizidanwendung beim Patienten mit einer gesteigerten Allergen-Exposition sowie dem damit assoziierten allergischen Asthma gerechnet werden. Trotz noch stark limitierten experimentellen Nachweisen von Kreuzreaktionen mit anderen GST wird diese Familie u.a. aufgrund ihrer weiten Verbreitung bereits als Pan-Allergen diskutiert [180, 181].

1.8.6 Gruppe 6: Troponin C

Bei Troponin C-Proteinen handelt es sich um eine konservierte Proteinfamilie mit essentieller Funktion bei der Muskelkontraktion, sodass von einem ubiquitären Vorkommen auszugehen ist. Das allergene Potential dieser Gruppe wurde bisher lediglich anhand von Bla g 6 aus *Blattella germanica* nachgewiesen [182]. Ein weiteres Troponin C ist bei *Periplaneta americana* sequenziell bekannt. Dieses wird trotz fehlendem Nachweis der Allergenität, basierend auf der Allergennomenklatur, als Per a 6 bezeichnet [182-185]. Diese Proteine beider Spezies, inklusive der jeweiligen Isoformen, haben ein errechnetes Molekulargewicht von 17 kDa und in das saure Milieu verschobene isoelektrische Punkte von pHi 3.6 bis 3.9 [182, 183]. Per a 6 weist zu den drei bisher identifizierten Bla g 6-Isoformen (Bla g 6.0101, Bla g 6.0201 und Bla g 6.0203) eine 69-91%ige AS-Sequenzidentität auf [182]. In Abhängigkeit zur Studie finden sich in der Literatur mit 14% bzw. 50% sehr stark abweichende Sensibilisierungsraten gegenüber Bla g 6 [114, 182]. Somit ist Troponin C aus Schaben eher nicht als Majorallergen anzusehen.

1.8.7 Gruppe 7: Tropomyosin

Bei den Tropomyosinen handelt es sich um eine stark konservierte Proteinfamilie mit diversen Funktionen. Die bekannteste ist die Beteiligung an der Muskelkontraktion. Allergene Tropomyosine wurden bisher in 21 Spezies aus drei Stämmen als Allergene identifiziert. Davon stammen alleine 18 aus dem Stamm der Arthropoden. [115, 186, 187, www.allergen.org]. Bei Schaben sind drei allergene Tropomyosine aus zwei Familien (Blattidae und Blattellidae) identifiziert: Per a 7 aus *Periplaneta americana*, Per f 7 aus *Periplaneta fuliginosa* sowie Bla g 7 aus *Blattella germanica* [115, 188-190]. Per a 7 gilt als ein Majorallergen der Amerikanischen Schabe, da es mit 50% der Seren von schaben-allergischen, asthmatischen Kindern reagiert [189], wohingegen Per f 7 und Bla g 7 eher als Minorallergene ihrer Spezies gelten [115, 188]. Diese stark konservierte Proteinfamilie wirkt sowohl als Nahrungsmittelallergen als auch als Aeroallergen sensibilisierend [188]. Zahlreiche Studien demonstrierten, dass diese Allergengruppe für die ausgeprägten Kreuzreaktionen zwischen Insekten, Arachnida (insbes. Milben), Crustaceen, Mollusken und

Parasiten mit verantwortlich ist [95, 188, 191-196]. Aus diesem Grund wird es auch Invertebraten-Pan-Allergen bezeichnet [194].

1.8.8 Gruppe 8: Myosin

In der Allergendatenbank findet sich zusätzlich zu den beiden vorangegangenen Proteinklassen ein weiteres Muskelprotein, welches mit Bla g 8 bisher lediglich in *Blattella germanica* als Allergen klassifiziert wurde [197]. Auch über Bla g 8 selbst ist nicht viel bekannt. Bislang existiert lediglich die Sequenz, aus der hervorgeht, dass es sich um die leichte Kette des Myosins handelt. Die Sequenz umfasst 195 Aminosäuren, die ein errechnetes Molekulargewicht von 21.2 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 4.22 aufweist. Ein Nachweis über die allergene Aktivität von Bla g 8 fehlt bislang, sodass die Einordnung dieses Proteins zu den Allergenen ohne weitere Experimente als äußerst fraglich angesehen werden sollte und dieses Protein an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber aufgeführt wird.

1.8.9 Gruppe 9: Arginin-Kinase

Arginin-Kinasen sind Enzyme, die bei Invertebraten den reversiblen Transfer von energiereichem Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) auf L-Arginin katalysieren [198, 199]. Auf diese Weise kann in Form von Arginin-Phosphat in zahlreichen Invertebraten-Spezies Energie gespeichert werden [200, 201]. Eine solche Speicherung ist vor allem bei Insekten mit einem generell hohen metabolischen Umsatz sehr wichtig [202]. Die Arginin-Kinase-Aktivität ist nicht nur für die Muskelkontraktion wichtig, sondern kann auch ganz allgemein direkt oder indirekt die Verfügbarkeit von ATP regulieren [203, 204]. Funktionell ist diese Proteinklasse analog zu den gut untersuchten Keratin-Kinasen aus Vertebraten [205]. Aufgrund ihrer Schlüsselfunktion ist es auch nicht erstaunlich, dass Arginin-Kinasen bei Invertebraten weit verbreitet sind. Sie sind inzwischen in zahlreichen Spezies u.a. in den zwei Schabenspezies *Periplaneta americana* und *Blattella germanica* identifiziert [201, 202, 206-214]. Weitere bekannte allergene Arginin-Kinasen sind u.a. Plo i 1 aus der Motte *Plodia interpunctella*, Lit v 2 (*Litopenaeus vannemei*), Pen m 2 (*Penaeus monodon*) sowie aus der Milbe Der p 20 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [199, 215-217]. Beide Arginin-Kinasen aus den Schaben sind sequenziell bekannt [212, 213], wobei bei der Arginin-Kinase aus *Periplaneta americana* auch zusätzlich das allergene Potential bestimmt wurde. Diese Kinase wird inzwischen als Per a 9 bezeichnet [218]. Für *Blattella germanica* steht ein Nachweis der Allergenität dieses Proteins noch aus.

Nativ gereinigtes Per a 9 reagierte mit IgE bei 80% (20/25) und 100% (25/25) der schabenallergischen Patienten in Thailand. Diese Ergebnisse basieren auf ELISA und Western-Blot Experimenten, Haut-Prick-Testungen fehlen bislang [218]. Wie für respiratorische Allergene typisch, lösen auch die Arginin-Kinasen bei Atopikern allergisches Asthma aus [199].

1.9 Motivation und Ziele der Arbeit

Für eine bessere Diagnostik und Therapie der Schabenallergie ist die Identifizierung und die molekulare Charakterisierung der relevanten Allergene eine Grundvoraussetzung [15, 219]. Den Anstoß für eine bessere Allergencharakterisierung wurde u.a. von Patterson und Slater (2001) gelegt, die zeigten, dass die für eine Allergiediagnostik verfügbaren Schabenextrakte sehr unterschiedliches allergenes Potential aufwiesen [95, 220].

Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist es daher Hämolymp- und Crude-Extrakte zu vergleichen sowie allergene Proteine aus der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* zu isolieren und zu charakterisieren. Hierfür werden unterschiedlich effektive chromatographische Reinigungsprotokolle vorgestellt und zwei Allergengruppen identifiziert und charakterisiert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt sowohl bei der biochemisch-biophysikalischen als auch bei der immunologischen Charakterisierung auf den Per a 3-Allergenen, Per a 9 wird zusätzlich betrachtet.

Die Besonderheit der Per a 3-Allergene liegt darin, dass obwohl bisher (Teil-)Sequenzen von über 742 Allergenen bekannt sind [www.allergen.org], außer Per a 3 kein weiteres Allergen zur Proteinklasse der Hexamerine gehört. Um mögliche Gründe hierfür zu finden, werden die biochemischen und strukturellen Untersuchungen in Zusammenhang zur Hexamerin-Familie bzw. Superfamilie der Hämocyanine gebracht.

Alle bisherigen Untersuchungen beruhten auf der Analyse der Primärsequenz sowie rekombinant exprimierten Proteinen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Isolierung der Per a 3-Proteine in nativer Form aus Hämolymphe und Crude-Extrakten. Um den Zusammenhang zwischen Struktur und der Induktion einer Immunantwort (Allergenität) der Per a 3-Proteine verstehen zu können, wird untersucht in wie weit die allergene Potenz dieser Proteine auf deren Oligomerisierung zurückzuführen ist.

Da eine intakte dreidimensionale Proteinstruktur und somit die Stabilität der Proteine für die Immunantwort von enormer Bedeutung sind, wird ebenfalls die Stabilität der Per a 3-Allergene gegenüber chaotropen Reagenzien untersucht. In weiteren Experimenten wird die Stabilität der Allergene im Hinblick auf die Antigenpräsentation verfolgt; hierfür wird in einem Modellsystem die Proteinstabilität gegenüber dem pH-Bereich der endosomal/lysosomalen Kompartimenten untersucht.

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit ist die Betrachtung der Arginin-Kinase Per a 9 aus *Periplaneta americana*. Aufgrund der essentieller Funktion und allergener Potenz dieses Allergens wurde Per a 9 aus einem *Periplaneta americana* Extrakt heraus isoliert und anschließend punktuell charakterisiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Gerät-Spezifikation	Firma	Ort
Analytische Ultrazentrifuge	Optima XL-I Analytical Ultrazentrifuge, Rotor: AN 50 Ti	Beckman Coulter	Krefeld
Autosampler		Waters GmbH	Eschborn
Blot-Apparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad	München
Densitometer	GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad	München
Dynamisches Lichtstreuungsspektrometer	Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments GmbH	Herrenberg
Flachbettgelkammer	Multiphor 2117	GE-Healthcare (ehemals LKB)	München
FPLC	Biologic HR mit Fraktionssammler Modell 2128	BioRad	München
	BioLogic Duo Flow mit BioLogic BioFrac Fraktionssammler	BioRad	München
Gefriertrocknung	ALPHA 1-4 LSC inkl. Vakuumpumpe RZ-2	Martin CHRIST Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode
Gradientengel-Mischkammer	Gradienten-Mischkammer	Knick	Reiskirchen
Gradientengel-Laufkammer		H. Hölzel	Dorfen
Heizblock	TCR	Roth	Karlsruhe
Kühlzentrifugen	Z233MK-2; Rotor 220.87 V05/6	Hermle	Wehingen
	Universal 16 R; Rotor 1614, Rotor 1624	Hettich	Tuttlingen
	Universal 32 R; Rotor 1617	Hettich	Tuttlingen
Massenspektrometer	nanoACQUITY UPLC System™	Waters GmbH	Eschborn
Minigel-Kammer		Von Keutz Labortechnik	Reiskirchen
Membran-Vakuumpumpe	MZ 2C	Vacuubrand GmbH + CO	Wertheim
Mixer	MX 32	Braun GmbH	Kronberg im Taunus
pH-Meter	766 Calimatic	Knick	Berlin

Gerät	Gerät-Spezifikation	Firma	Ort
Pumpe Gradientengel	Minipuls 2	ABIMED, Gilson	Langenfeld
Reinstwasseranlage	Milli-Q-Plus PF	Millipore	Eschborn
Schüttler	Mini Rocking Platform	Biometra GmbH	Göttingen
	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG	Schwabach
Spannungsquellen	Power-Pac-3000	BioRad	München
	Blue Power 3000 (BP-3000)	SERVA	Heidelberg
	Model 200/2.0 Power Supply	BioRad	München
Wasserbad	WK 100	Colora	Lurch
Waagen	Analytic A 200 S	Sartorius GmbH	Göttingen
	MJ 3000	YMC Co. Ltd.	Kyoto, Japan
Zweistrahl-Absorptions-photometer	U-3000	Hitachi	Tokio, Japan
	Cary 1E	Varian	Darmstadt
	Cary-300 Bio	Varian	Darmstadt

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte.

2.1.2 Gebrauchsartikel

Material	Spezifikation	Firma	Ort
Anionenaustauscher-Säule	Bio-Scale Q2 Column; 2 ml Säulenvolumen	BioRad	München
	Uno Q12, 12 ml Säulenvolumen	BioRad	München
Applikatorstreifen	3.5 mm x 2 mm x 1 mm Probestasche	SERVA	Heidelberg
Blotting-Filterpapier	Blotting Papers BG002	Schleicher und Schuell	Dassel
CAST-2000 ELISA		Bühlmann	Schoenenbuch, Schweiz
Einmalküvetten	1.5 ml Volumen, Schichtdicke 1 cm	Roth	Karlsruhe
Elektrodenstreifen	Filter Cardboard 120 mm x 6 mm x 1 mm	SERVA	Heidelberg
Gelbond®film		Cambrex Bio Science Rockland, Inc	Rockland, Maine, USA
Größenausschlusssäule	S-300 16/60	Pharmacia	Erlangen
	S-300 26/60	Pharmacia	Erlangen
	S-200 16/60	Pharmacia	Erlangen
IEF-Gele	SERVALYT PRECOTES-Gel SERVALYT PreNets-Gel	SERVA	Heidelberg
Küvette für dynamische Lichtstreuung	DTS 2145 "Niedrig-Volumen Glasküvette", 75µl	Hellma	Müllheim

Material	Spezifikation	Firma	Ort
Membran Filter	Supor®-200, 0.2 µm	Pall GmbH	Dreieich
Nitrocellulose-Membran	Protan ® BA83, 0.2µm Pore Size	Schleicher und Schuell	Dassel
PVDF-Membran	Sequi-Blot™PVDF-Membran für Proteinsequenzierung, 0.2 µm	BioRad	München
Quarzküvette	Suprasil®	Hellma	Müllheim
Spritzenfilter	Acrodisc ® 13 mm Syringe Filter, Supor® Membran	Pall GmbH	Dreieich
Umkehrphasensäule	nanoACQUITY UPLC™ Symmetry C18 (C18, 100 µm x 10 cm)	Waters GmbH	Eschborn
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 20 30000 MWCO	OMNILAB	Bremen

Tabelle 2-2: Verwendete Materialien.

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von *pro analysis* Qualität und wurden, wenn nicht anders angegeben von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalien	Firma	Ort
2D-Immungelelektrophorese		
Agarose M	Amersham Pharmacia Biotech AB	Uppsala, Schweden
Barbital-Natrium	Merck	Darmstadt
Barbital	Merck	Darmstadt
Gelelektrophorese		
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka	Neu-Ulm
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck	Darmstadt
β-Mercaptoethanol	SERVA	Heidelberg
Bromphenolblau	SERVA	Heidelberg
Kaleidoskop-Standard	BioRad	München
Precision Plus Protein TM unstained Standard	BioRad	München
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs GmbH	Frankfurt a.M.
IEF		
Trichloressigsäure	SERVA	Heidelberg
SERVA Violet 17	SERVA	Heidelberg
Kerosin	SERVA	Heidelberg
Kathodenlösung pH 10	SERVA	Heidelberg
Anodenlösung pH 3	SERVA	Heidelberg
SERVA Liquid Mix IEF-Proteinstandard 3-10	SERVA	Heidelberg
Massenspektrometrie		
Dithiothreitol	Sigma	Steinheim
[Glu1]Fibrinopeptid-Lösung	Sigma	Steinheim
Trypsin	Promega GmbH	Mannheim

Chemikalien	Firma	Ort
Phenoloxidaseaktivität		
3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon (MBTH)	Sigma	Steinheim
Tyramin Hydrochlorid	Sigma	Steinheim
Dopamin Hydrochlorid	Sigma	Steinheim
Tyrosinase (<i>Agaricus bisporus</i>)	Sigma	Steinheim
Proteinkonzentrationsbestimmung		
Modified Lowry ProteinReagent	Pierce	Rockford, Illinois, USA
Folin-Ciocalteu Reagenz	Sigma	Steinheim
BioRad Protein Assay	BioRad	München
Puffer		
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma	Steinheim
Western-Blot		
Magermilchpulver	Saliter und TSI	Obergrünzburg und Zeven
Dimethylformamid (DMF)	Sigma	Steinheim
anti-rabbit-IgG konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, A3687	Sigma	Steinheim
Sulfosalicylsäure	Merck	Darmstadt
Sonstige		
Kohlenstoffdioxid	Linde	Frankfurt
Flüssiger Stickstoff	Linde	Frankfurt
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma	Steinheim

Tabelle 2-3: Verwendete Puffer und Lösungen, die nicht von Roth bezogen wurden.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage angesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Reinstwasser als Wasser (H₂O) bezeichnet.

Der pH-Wert sämtlicher Puffer wurde mit dem pH-Meter bei Raumtemperatur (RT) mit konzentrierter Salzsäure (HCl) oder mit Natronlauge (NaOH) titriert. Das pH-Meter wurde abhängig vom Messbereich mit den Eichlösungen (pH ±0.02) pH 4.0 und pH 7.0 bzw. pH 7.0 und pH 10.0 geeicht. Alle säulenchromatographisch verwendeten Puffer wurden durch 0.2 µm Membran-Filter steriltfiltriert und für mindestens 30 Min. mit der Membran-Vakuum-pumpe entgast.

Puffername	Verwendung	Zusammensetzung
Citratpuffer	pH-Stabilität	0.1 M Citronensäure, 10 mM Tri-Natrium-Citrat Dihydrat, pH 3.5
Crude-Extrakt-Puffer	Extrakt-Gewinnung	100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , 0.01% (w/v) PTU, Protease-Inhibitor Cocktail, pH 7.8
Dissoziationspuffer A	Dissoziation	50 mM Glycin, 5 mM EDTA, pH 9.6
Dissoziationspuffer B	Dissoziation	50 mM Glycin, 5 mM EDTA, 2.5 M Harnstoff, pH 9.6
Dissoziationspuffer C	Dissoziation	50 mM Glycin, 20 mM EDTA, 2 M GdnHCl, pH 10.5
Dissoziationspuffer D	Dissoziation	50 mM Glycin, 20 mM EDTA, 2.5 M Harnstoff, pH 10.5
Elutionsschabepuffer A	IEX	20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5 (4°C)
Elutionsschabepuffer B	IEX	20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5 (20°C)
Hämolympfpuffer	Extrakt-Gewinnung	100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , 0.01% (w/v) PTU, pH 7.8
PBS 10fach („phosphate buffered saline“)	Immunologische Versuche	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, pH 6.6
PBS	Immunologische Versuche	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 14 mM NaCl, pH 7.2
Phosphatpuffer A	Phenoloxidase-Aktivität	28.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 21.7 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7.0
Phosphatpuffer B	Lowry-Assay	61.5 mM Na ₂ HPO ₄ , 38.5 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.0
Phosphatpuffer C	pH-Stabilität	33 mM Na ₂ HPO ₄ , 67 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 6.5
Phosphatpuffer D	pH-Stabilität	13 mM Na ₂ HPO ₄ , 87 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 6.0
Schabepuffer A	IEX	20 mM TRIS/HCl, pH 7.5 (4°C)
Schabepuffer B	IEX	20 mM TRIS/HCl, pH 7.5 (20°C)
Schabepuffer C	S-300	100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , pH 7.8 (4°C)
Schabepuffer D	S-300, Stabilisierungspuffer, pH-Stabilität	100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂ , pH 7.8 (20°C)
Agaroselösung	2D-Immungel-elektrophorese	1% (w/v) Agarose M, 20% (v/v) Veronalstammlösung, bei 200°C lösen, bis die Lösung klar ist.
Laufpuffer	2D-Immungel-elektrophorese	Veronalstammlösung 1:5 mit H ₂ O verdünnen
Veronalstammlösung	2D-Immungel-elektrophorese	103 g Barbitol-Natrium in 2 l H ₂ O, 20 g Barbitol in 2 l H ₂ O unter Erhitzen lösen. Beide Lösungen zusammengeben und auf 5 l mit H ₂ O auffüllen
Waschlösung	2D-Immungel-elektrophorese	0.6% (w/v) NaCl
APS	Gelelektrophorese	2 % (w/v) APS
Denaturierungspuffer (DP)	Gelelektrophorese	25% (v/v) Sammelgelpuffer, 20% (v/v) Glycerin, 40% (v/v) SDS-Lösung, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 5% (v/v) H ₂ O, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Puffername	Verwendung	Zusammensetzung
Laufpuffer für native Gele	Gelelektrophorese	25 mM TRIS, 150 mM Glycin
Laufpuffer für SDS-Gele	Gelelektrophorese	25 mM TRIS, 188 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS
Nativer Probenpuffer (BPB)	Gelelektrophorese	50% (v/v) Glycin, 0.1% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	Gelelektrophorese	0.5 M TRIS /HCl, pH 6.5 (22°C)
Trenngelpuffer	Gelelektrophorese	1.5 M TRIS/HCl, pH 8.8 oder pH 7.5 (22°C)
BCIP-Lösung	Western-Blot	50 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP) in DMF
Blocklösung	Western-Blot	5% (w/v) Magermilchpulver in TBST
Entwicklungslösung	Western-Blot	1 ml Entwicklungspuffer, 33 µl BCIP, 66 µl NBT, 9 ml Wasser
Entwicklungspuffer	Western-Blot	100 mM TRIS/HCl, 1.0 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9.5
NBT-Lösung	Western-Blot	50 mg/ml p-Nitroblutetrazolium (NBT) in 70% (v/v) Dimethylformamid (DMF)
„Ponceau-S“-Lösung	Western-Blot	3% (w/v) Trichloressigsäure, 3% (w/v) Sulfosalicylsäure, 0,2% (w/v) Ponceau-S in Blocklösung, Verhältnis wird für jeden Western-Blot spezifisch angegeben
Primärantikörper in Blocklösung	Western-Blot	0.01% (v/v) anti-rabbit-IgG mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase in Blocklösung
Sekundärantikörper in Blocklösung	Western-Blot	0.01% (v/v) anti-rabbit-IgG mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase in Blocklösung
TBS (“TRIS buffered saline”)	Western-Blot	100 mM TRIS/HCl, pH 7.4 (20°C), 1.4 M NaCl
TBST (“TRIS buffered saline with Tween”)	Western-Blot	0.3% (v/v) Tween 20 in TBS
Transferpuffer	Western-Blot	39 mM Glycin, 48 mM TRIS/HCl, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Tabelle 2-4: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.

2.1.5 Software und Datenbanken

Programm	Anwendung	Versionen, Firma	Ort/ Referenz
Allergenliste	Offizielle Allergenliste	International Union of Immunological Societies	http://www.allergen.org
Antheptot2000	Sequenzanalyse	v5.2 release 1.1.6	http://antheptot-pbil.ibcp.fr
ClustalX	Sequenzalignment	1.83	
DTS-Nano: Dispersion Technology Software	Aufnahme und Verarbeitung von dynamischen Lichtstreuendaten	4.0, Malvern Instruments GmbH	Herrenberg
GeneDoc	Analyse Sequenzalignment	2.6.002	
NCBI	Proteinsequenzen		http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Programm	Anwendung	Versionen, Firma	Ort/ Referenz
Quantity One	Bildverarbeitung und -analyse	4.5.2, 4.5.0, BioRad	München
POVRAY	Erstellen von Modell-Abbildungen	3.6	www.povray.org
PROTEINLYNX Global Server	Massenspektrometrie	2.2, Waters GmbH	Eschborn
RasMol	Auswertung und Anfärben von Homologie-Modellen	v2.7.2.1	http://www.umass.edu/microbio/rasmol/
SDAP-Datenbank	Structural Database of allergenic Proteins		http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html
UltraScan	Auswertung Analytische Ultrazentrifugation	6.0 (Linux), 7.2 (Linux), 8.0 (Windows), B. Demeler	http://www.ultrascan.uthscsa.edu
YASARA	Auswertung und Anfärben von Homologie-Modellen	Twinset 7.1.18	221

Tabelle 2-5: Verwendete Software und Datenbanken.

2.1.6 Sequenzen

Accession-Name	Accession-Number	Bezeichnung/Protein	Spezies	Referenz
AAA74579	951139	Hx Subunit precursor	<i>Blaberus discoidalis</i>	222
Q17127	2495187	Hexamerin precursor	<i>Blaberus discoidalis</i>	223
ABD47458	88657350	Bla g 8	<i>Blattella germanica</i>	197
ABC86902	86160922	Arginine Kinase	<i>Blattella germanica</i>	213
AAP57094	37785884	Der p 20, Arginine Kinase	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	224
CAA48654	311350	Arginine Kinase	<i>Homarus gammarus</i>	201
1M15	27065506	Arginine Kinase	<i>Limulus polyphemus</i>	225
ABI98020	115492980	Lit v 2, Arginine Kinase	<i>Litopenaeus vannamei</i>	215
1HCY	494086	Arthropodan Hemocyanin (Deoxygenated) Refined Using Constrained 32 Point Group Symmetry	<i>Panulirus interruptus</i>	226
Q25641; AAB09629	2833325; 1580792	Allergen Cr-PI precursor; Per a 3.01 (C12)	<i>Periplaneta americana</i>	138
AAB09632	1531589	Per a 3.0201 (C20)	<i>Periplaneta americana</i>	138
AAB63595	1580797	Per a 3.0203 (C28)	<i>Periplaneta americana</i>	143
AAB62731	1580794	Per a 3.0202 (C13)	<i>Periplaneta americana</i>	143
AAX33727	0678785	Per a 2	<i>Periplaneta americana</i>	132
AAX33730	60678791	Per a 6	<i>Periplaneta americana</i>	183
AAT77152	50428904	Per a 9, Arginine Kinase	<i>Periplaneta americana</i>	212
BAA86656	6361629	Vitellogenin	<i>Periplaneta americana</i>	227
BAB32673	12964612	Vitellogenin-2	<i>Periplaneta americana</i>	228
Q95PM9	25453077	Arginine Kinase	<i>Plodia interpunctella</i>	199

Tabelle 2-6: Verwendete Sequenzen.

2.2 Versuchstiere und Gewinnung der Extrakte

Die Amerikanische Schabe (*Periplaneta americana*) wurde freundlicherweise von Bayer CropScience (Monheim) in Form einer Schenkung zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden zwei Schabenchargen (aus 2003 und 2005 stammend) verwendet. Bei den Tierchargen handelte es sich um eine Mischung aus Ootheken, verschiedenen Larvenstadien, Nymphen und adulten Tieren beider Geschlechter. Für die Extrakterstellung wurden zwei Methoden gewählt: zum einen die schonende Entnahme der Hämolymphe (HL) aus den Schaben sowie die Herstellung eines Ganzkörperextraktes, der in der Literatur hauptsächlich unter dem Begriff Crude-Extrakt (CE) oder auch Mazerat bekannt ist.

2.2.1 Hämolymp-Extrakt (HL)

Die Schaben wurden durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid narkotisiert, anschließend dekapitiert und die austretende Hämolymphe mit einer Eppendorfpipette aufgenommen. Im Durchschnitt wurden auf diese Weise ca. 25 µl pro Schabe erhalten. Die ausgetretene Hämolymphe wurde 9:10 mit Hämolymp-Puffer versetzt, der Phenylthioharnstoff (PTU) als Inhibitor für Phenoloxidasen enthielt [229-231]. Während der Extraktgewinnung wurde die HL stets auf Eis gelagert. Die zellulären Bestandteile der Hämolymphe sowie andere Verschmutzungen wurden durch eine anschließende 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 17380g–22000g in der Kühlzentrifuge pelletiert. Der gelblich-trübe Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -32°C gelagert. Aus 400 Schaben konnten auf diese Weise ca. 10 ml gelblich-ocker-gefärbter Hämolymp-Extrakt gewonnen werden (Abb. 3-2).

2.2.2 Crude-Extrakt

200 unversehrte Schaben wurden durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid narkotisiert und anschließend zusammen mit den 400 dekapitierten und HL-reduzierten Schaben mit flüssigem Stickstoff übergossen. Die gefrorenen Schaben wurden mit einem Mixer auf Stufe 3 bis zur Feinpulvrigkeit homogenisiert. Zur Hemmung der Proteasen wurde der Crude-Extrakt mit 200 ml Crude-Extrakt-Puffer versetzt. Um eine breiartige Konsistenz zu erreichen wurden zusätzlich ca. 300 ml Hämolymp-Puffer zugesetzt. Durch eine anschließende 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 4100g in der Kühlzentrifuge oder eine 30 minütige Zentrifugation bei 4°C und 1640g wurden die wasserlöslichen Substanzen, Lipide und zelluläre Bestandteile in vier deutlich unterscheidbare Schichten separiert (Abb. 2-1).

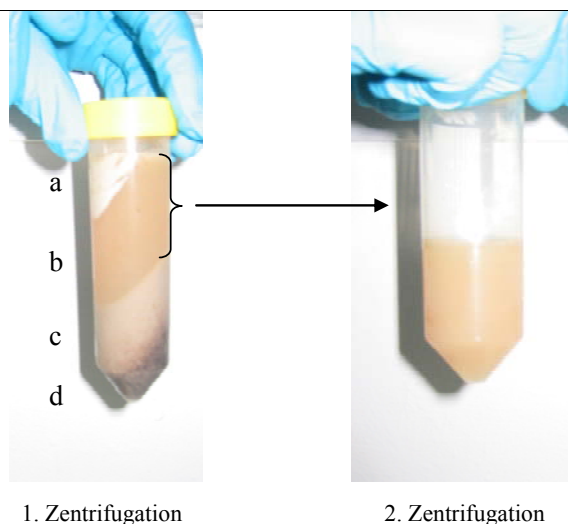


Abb. 2-1: Crude-Extrakt von *Periplaneta americana*, nach der ersten und zweiten Zentrifugation. Nach der ersten Zentrifugation (links) hatten sich im Crude-Extrakt vier Fraktionen (a bis d) voneinander separiert. Dabei handelte es sich um eine Lipidschicht (a), im Extraktpuffer gelöste Schabenbestandteile (b), ein unbekanntes, sandartiges Pellet (c), sowie Bestandteile der Cuticula (d). Für die zweite Zentrifugation (rechts) wurden mittels einer Pasteur-Pipette die gelösten Schabenbestandteile (b) entnommen und erneut zentrifugiert.

Die gelblich-braun-trübe Mittelschicht (b) wurde abgenommen und für eine bessere Reinheit erneut für 30 Min. in der Kälzentrifuge bei 4° und 4100g zentrifugiert (Abb. 2-1). Der Überstand (ca. 310 ml) wurde abgenommen, aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei mindestens -23°C gelagert.

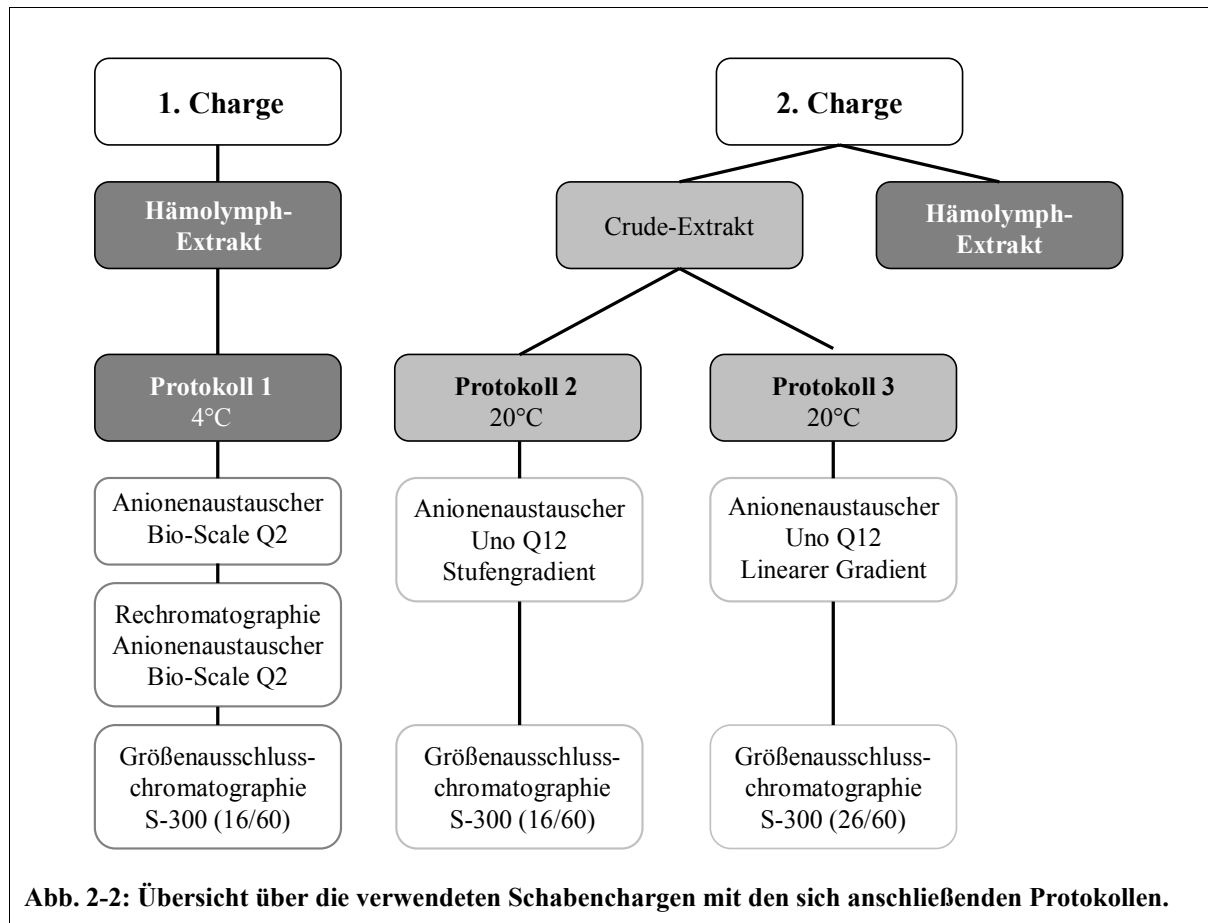
2.2.3 Schabenchargen

In dieser Arbeit wurde mit zwei Chargen an Schaben gearbeitet, von denen zum Teil unterschiedliche Extrakte gewonnen und anschließend aufbereitet wurden. Die nachfolgende Abbildung 2-2 gibt eine Übersicht über die einzelnen Chargen mit der sich anschließenden Reinigungsprozedur.

Bei der ersten Charge handelte es sich um Restbestände (ca. 5 ml) an unverdünnter Hämolymphe die wie in Abschnitt 2.2.1 erläutert durch Dekapitation erhalten wurden und seit 2003 bei mindestens -24°C gelagert wurden [148]. Diese Hämolymphe-Proteine wurden nach „Protokoll 1“ gereinigt.

Die zweite Charge stammte aus 2005 und bestand aus 600 Individuen an *Periplaneta americana*. Diese wurden für die Extraktpräparation in zwei Gruppen unterteilt: Von 400 Tieren wurde die Hämolymphe durch Dekapitation und von 200 Tieren (+ 400 dekapitierte, HL-reduzierte Tiere) ein Granzkörperextrakt (Crude-Extrakt) gewonnen (s. Abschnitt 2.2.2). Die Granzkörperextrakte wurden nach „Protokoll 2“ und „Protokoll 3“ weiterverarbeitet. Die einzelnen Reinigungsprozeduren sind nachfolgend im Abschnitt 2.3 kurz erläutert. Die Hämolymphe (HL) der zweiten Charge wurde ungereinigt für Stabilitäts

und immunologische Untersuchungen verwendet. In den nachfolgenden Abschnitten sind die einzelnen Reinigungsschritte der Protokolle kurz erläutert.



2.3 Proteinaufreinigung und -konzentrierung

Da die Entwicklung der Reinigungsprotokolle ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war, ist die detaillierte Aufreinigung im Ergebnisteil beschrieben und hier ist lediglich das generelle Vorgehen kurz dargelegt.

Die gelagerten Proben wurden unmittelbar vor der Aufreinigung bei 1738g für die Hämolymphe und für den Crude-Extrakt bei 22000g für 10 Min. bei 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Auf diese Weise wurde insbesondere bei den Crude-Extrakt-Proben ein sandartiges ockerfarbiges Pellet erhalten. Um bei der sich anschließenden Säulenaufreinigung einen zu großen Druck in der Säule zu vermeiden, wurden die Proben unmittelbar vor jedem säulenchromatographischen Schritt durch einen Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von 0.2 µm filtriert.

Für alle Aufreinigungen wurde ein Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-System (BioRad, München) verwendet, bei dem die Absorption in einem Durchflussphotometer mit einer optischen Weglänge von 5 mm bei 280 nm detektiert wurde. Der Fortschritt der Proteinaufreinigung, insbesondere im Hinblick auf die Trennung der Per a 3-Isoformen,

wurde nach der Säulenchromatographie mittels Gelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.5). Die detaillierten Aufreinigungsprotokolle befinden sich im Anhang (Abschnitt 8.8).

2.3.1 Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 1

Im ersten Reinigungsschritt wurde die Schabenhämolymphe mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (Bio-Scale Q2 Column; 7 x 52 mm, 2 ml Säulenvolumen; BioRad, München) bei 4°C nach ihrer Ladung aufgetrennt. Eine Überladung der Säule wurde verhindert, indem die Schabenhämolymphe je nach Bedarf (ca. 1:3) mit Schabepuffer A verdünnt wurde. Typischerweise wurde 1 ml des Hämolymp-Überstandes über eine Proben-schleife bei einer Flussrate von 1 ml/Min. mit Schabepuffer A auf die Säule aufgetragen. Die an die Matrix gebundenen Proteine wurden durch einen linear ansteigenden Salzgradienten (0-450 mM NaCl) mit Elutionspuffer A von der Matrix verdrängt. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fractionen aufgefangen.

2.3.2 Rechromatographie mittels Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 1

Die Reinheit der Isoformen sollte durch eine erneute Chromatographie der voneinander getrennten Per a 3-Isoformen über den Anionenaustauscher verbessert werden. Es wurde das gleiche Reinigungsprotokoll und die gleichen Puffer wie zuvor bei der Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 1 verwendet.

2.3.3 Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 2

Für diese Auftrennung wurde im Unterschied zu „Protokoll 1“, eine neue Anionenaustauscher-Säule mit 12 ml Matrix-Volumen verwendet (Uno Q12; BioRad, München). Durch die achtfach höhere Kapazität (insgesamt 160 mg) der Säule konnte deutlich mehr Protein aufgetragen werden. Der Betrieb erfolgte bei Raumtemperatur über das oben beschriebene FPLC-System. In diesem Protokoll wurden die Proteine über einen Stufengradienten von dem Anionenaustauscher eluiert. Üblicherweise wurden 2 ml Crude-Extrakt bei einer Flussrate von 1 ml/Min. mit Schabepuffer B aufgetragen. Vorausgegangene Reinigungsprotokolle hatten ergeben, dass die Per a 3-Isoformen durch 80 mM NaCl (8% Elutionsschabepuffer B) bzw. 150 mM NaCl (15% Elutionsschabepuffer B) voneinander getrennt eluierten. Die Proteine wurden in 3 ml-Fractionen gesammelt.

Der Stufengradient ermöglicht es, die Per a 3-Isoformen optimal voneinander zu trennen, sodass eine erneute Rechromatographie wie in „Protokoll 1“ entfallen konnte.

2.3.4 Ionenaustauscher-Chromatographie für Protokoll 3

Gegenüber „Protokoll 2“ wurde bei diesem Reinigungsprotokoll auf den Stufengradienten verzichtet und stattdessen die Proteine mit einem linear ansteigenden Salzgradienten von 0-200 mM NaCl (0-20% Elutionsschabepuffer B) von der Anionenaustauscher-Säule (Uno Q12) eluiert. Typischerweise wurde 2 ml unverdünnter Crude-Extrakt bei einer Flussrate von

1 ml/Min. auf die Säule mit Schabenpuffer B aufgetragen und mit einem steigenden Anteil an Elutionspuffer B von der Säule eluiert. Die Proteine wurden in 5 ml-Fractionen gesammelt.

Dieses Protokoll ermöglichte eine erfolgreiche Trennung der Per a 3-Isoformen, sodass auf eine Rechromatographie verzichtet werden konnte.

2.3.5 Größenausschlusschromatographie (SEC) für Protokoll 1 und 2

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine Sephacryl S-300 Säule 16/60 (Pharmacia, Erlangen) verwendet. Sie eignete sich für die Trennung von Proteinen in der Größenordnung von 10 kDa-1.5 MDa. Typischerweise wurden 2 ml Probenvolumen mit Schabenpuffer C bzw. D bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. auf die Säule aufgetragen und in 3 ml-Fractionen gesammelt.

2.3.6 Größenausschlusschromatographie für Protokoll 3

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine Sephacryl S-300 Säule 26/60 (Pharmacia, Erlangen) verwendet. Der Unterschied zur S-300 (16/60) aus „Protokoll 1“ bestand bei gleichbleibender Trennstrecke in einem um 200 ml größeren Säulenvolumen. Typischerweise wurden 2 ml Probenvolumen mit Schabenpuffer D bei einer Flussrate von 1.3 ml/Min. auf der Säule aufgetrennt und in 4 ml-Fractionen gesammelt.

2.3.7 Größenausschlusschromatographie für Dissoziate

Für die Trennung dissoziierter Proben nach ihrer Größe, wurde eine Sephacryl S-200 Säule 16/60 (Pharmacia, Erlangen) verwendet. Sie eignet sich für die Trennung von Proteinen in der Größenordnung von 5 kDa bis 250 kDa. Es wurden 5 ml Probenvolumen mit Dissoziationspuffer A bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. auf die Säule aufgetragen. Zur vollständigen Elution der Proben wurde die Säule insgesamt mit einem Puffervolumen von 252 ml gespült. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt.

2.3.8 Aufkonzentrierung

Nach jedem chromatographischen Schritt wurden die relevanten Fractionen vereinigt und in Zentrifugalkonzentratoren mit einem Größenausschluss von 30 kDa bei 4°C und mit 1640g bzw. 4100g in der Kühlzentrifuge aufkonzentriert. Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 30 kDa konnten dadurch die Membran ungehindert passieren.

Zum Umpuffern der Proben wurden die Proteine in den Zentrifugalkonzentratoren außerdem mit dem mindestens zehnfachen Volumen des neuen Puffers gewaschen und erneut auf das benötigte Volumen eingeeengt. Zum Umpuffern von Proteinproben mit PBS wurde die Temperatur in der Kühlzentrifuge auf 20°C eingestellt.

2.4 Bestimmung der Trockenmasse

Für die Bestimmung der Trockenmasse der Extrakte wurden diese einer Gefriertrocknung unterzogen. Hierfür wurden die Proben zunächst bei - 32°C eingefroren, und anschließend im gefrorenen Zustand für mindestens 18 h an eine Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Die verbleibende Trockenmasse wurde auf der analytischen Waage bestimmt.

2.5 Elektrophoresen und Proteindetektion

In dieser Arbeit wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit und ohne SDS (SDS-PAGE und native PAGE) zur Probenanalyse verwendet. Die gefärbten Gele wurden mit dem Densitometer dokumentiert und mit der Software Quantity One verarbeitet und ausgewertet.

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE beruhte auf dem System von Laemmli modifiziert nach See und Jackowski in einem diskontinuierlichen Puffersystem [232, 233]. Typischerweise, wurden 7.5%ige Trenngele (mit 0.2% Bisacrylamid) und 3.0%ige Sammelgele (0.08% Bisacrylamid) verwendet. Die Prozentigkeit entspricht der Gesamtmenge an Acrylamid, und charakterisiert somit den Vernetzungsgrad der Gelmatrix. Änderungen zu der hier angegebenen Prozentigkeit sind in den jeweiligen Bildunterschriften explizit angeführt.

Die Proteinlösungen wurden 1:2 mit Denaturierungspuffer verdünnt, gevortext und für mindestens 10 Min. bei 95°C denaturiert. Als Referenz wurde mindestens in einer Spur ein Proteinstandard entsprechend den Herstellerempfehlungen aufgetragen (s. Anhang 8.5). Die Elektrophorese wurde in einer Minigel-Kammer bei Raumtemperatur und einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Typischerweise wurde der Lauf beendet, sobald die Laufront 0.5 cm vom unteren Gelrand entfernt war.

2.5.2 SDS-Gradienten-PAGE

Die SDS-Gradienten-PAGE beruhte auf dem System nach Laemmli modifiziert nach Hames [233, 234]. Im Gegensatz zur SDS-PAGE bestand das Trenngel nicht aus einer homogenen sondern einer diskontinuierlichen Matrix mit einem linearen Polyacrylamid-Gradienten. Dieser wurde in einer Gradientengel-Mischkammer mit einem Zwei-Kammer-System hergestellt und in die Gradientengel-Laufkammer gepumpt. Hierzu wurde in die vordere Kammer der Gradientengel-Mischkammer das Niederprozentige Trenngel eingefüllt und in die hintere Kammer das Hochprozentige. Durch Öffnen der Ventile wurde zunächst wird die Niederprozentige Lösung in die Gradientengel-Laufkammer eingefüllt und im Anschluss daran das Ventil zwischen den einzelnen Kammern geöffnet. Nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren konnte somit ein linear ansteigender Gradient in der Gradientengel-Laufkammer hergestellt werden. Es wurde ein 5-15%iger Gradient verwendet. Für das Sammelgel wurde wie bei der SDS-PAGE eine 3.0%ige Polyacrylamid-Matrix verwendet. Es wurden Gradientengele der Größe 13.5 x 15 x 0.2 cm (Breite x Höhe x Dicke)

verwendet. Als Referenz wurde mindestens in einer Spur ein Proteinstandard entsprechend den Herstellerempfehlungen aufgetragen (s. Anhang 8.5). Die Elektrophorese wurde in der Laufkammer bei einer Spannung von 180 V und für eine bessere Wärmeableitung bei 4°C durchgeführt. Der Lauf wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.5.3 Native PAGE

Die native PAGE beruhte auf dem System von Laemmli modifiziert nach See und Jackowski in einem diskontinuierlichen Puffersystem [232, 233]. Im Unterschied zur denaturierenden PAGE wurden bei der nativen PAGE die Proben 3:4 oder auch 2:3 mit Probenpuffer (BPB) versetzt und die Auftrennung bei 4°C und einer Spannung von 80 V durchgeführt. Minigel-Kammer und Spannungsquelle entsprachen denen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen. Als Referenz wurden unterschiedliche andissoziierte Hämocyane aus unserem Institut verwendet. „*Eurypelma*-Marker“ bestehend aus andissoziierter Hämolymphe aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, andissoziiertes 6-meres Hämocyanin aus der gewöhnlichen Languste *Palinurus elephas* (*Palinurus*-Marker, Hc *P.e.*), sowie eine Mischung aus andissoziiertem 12-meren und 6-meren Hämocyanin aus dem europäischen Flusskrebs *Astacus astacus* (*Astacus*-Marker, Hc *A.a.*). Die jeweiligen Laufprofile sind im Anhang dargestellt (s. Abschnitt 8.5).

2.5.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Es wurde eine horizontale isoelektrische Fokussierung mit 5%igen SERVLYT PRECOTES-Gelen durchgeführt. Die Durchführung fand in Anlehnung an die SERVA-Bedienungsanleitung für isoelektrische Fokussierung statt [235]. Als Laufkammer kam eine modifizierte horizontale Flachbettgelkammer zum Einsatz. Zur Einstellung des pH-Gradienten wurden die Gele mit Anodenlösung (pH 3) und Kathodenlösung (pH 10) für 50 Min. vorfokussiert, wobei die Leistung der Spannungsquelle schrittweise von 1 auf 5 Watt in 10 Minuten-Abständen erhöht wurde. Bei den Elektrodenlösungen handelt es sich an der Anode um die Ampholyte Aspartat und Glutamat und an der Kathode um Arginin, Lysin und Ethylen-Diamin. Nach der Vorfokussierung wurden die zuvor mit Wasser verdünnten Proben mit Hilfe eines Applikatorstreifens (3.5 mm x 2 mm Taschenvolumen) auf das Gel aufgetragen. Pro erwartete Bande wurden als Richtwert 5 µg Protein oder 5 µl Probenvolumen appliziert. Als Markerproteine wurde der SERVA Liquid Mix IEF Proteinstandard 3-10 (s. Anhang Abb. 8-9) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für den eigentlichen Lauf wurde die Leistung auf 5 W, die Spannung auf 2000 V und die Stromstärke auf 15 mA limitiert. Nach mindestens 2400 Vh wurde der Lauf für SERVLYT PRECOTES-Gele beendet und die Proteine nach dem Protokoll der „SERVA Violet 17“-Färbung im Gel sichtbar gemacht (s. Anhang 8.6.4). Mit Hilfe des Densitometers wurden die Gele dokumentiert und mit der Software Quantity One bearbeitet.

2.5.5 2D-Immungelelektrophorese

Die 2D-Immungelelektrophorese wurde verwendet, um Bindungseigenschaften von Antikörpern an unterschiedliche Antigene im nativen Zustand zu charakterisieren und Probenzusammensetzungen zu analysieren.

Bei der 2D-Immungelelektrophorese wurden in der ersten Dimension die Proteine in einer großmaschigen Agarosematrix elektrophoretisch nach ihrer Nettoladung aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden sie im 90°-Winkel zur ersten Dimension in ein zweites antiserumhaltiges Gel elektrophoretisiert und dort einer Elektrodifffusion unterworfen. Dabei bildeten sich im Äquivalenzbereich von Antigenen und Antikörpern große Immunkomplexe, die präzipitierten und angefärbt werden konnten. [236, 237].

Die 2D-Immungelelektrophorese wurde in Anlehnung an Laurell und Weeke durchgeführt [238, 239]: für die erste Dimension wurde eine 1% (w/v) Agaroselösung auf eine Glasplatte aufgegeben. Abhängig vom Probenvolumen wurden für jedes Probendepot größenangepasste Löcher gestanzt. Jeweils am oberen und unteren Ende der Glasplatte wurde nativer Probenpuffer aufgegeben.

Für die Elektrophorese wurden diese Agaroseplatten in einer Flachbettgelkammer so ausgerichtet, dass das Probendepot bei der Kathode zu liegen kam und die Proben durch die Agarosematrix Richtung Anode wandern konnten. Als Pufferbrücke wurden größenangepasste Blotting-Filterpapiere verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 600 V und 15°C durchgeführt, bis der Probenpuffer in das gegenüberliegende Filterpapier eingewandert war (ca. 30 Min.).

Für die zweite Dimension wurde als Trägermaterial auf die Maße 4 cm x 5 cm (Breite x Höhe) zugeschnittener Gelbond®film verwendet. Ausgeschnittene Agarosestreifen der ersten Dimension (Maße 1 cm x 4 cm) wurden auf die Gelbond®filmbreite aufgebracht. Direkt an diesen Agarosestreifen anschließend wurde die zweite Dimension mit antiserumhaltiger Agarosematrix gegossen. Hierzu wurden kurz vor Aufgabe 2 ml (ca. 45°C warme) Agaroselösung mit spezifischem Antikörperserum vermischt. Spezifische Angaben zum Antikörperserum sind separat in den jeweiligen Versuchen angegeben. Der Gelbond®film mit der erstarrten Argarose wurde für die Elektrophorese in der Flachbettgelkammer erneut so ausgerichtet, dass die Proteine von der ersten Dimension (Kathode) in Richtung Anode in die zweite Dimension einwandern konnten (Abb. 2-3).

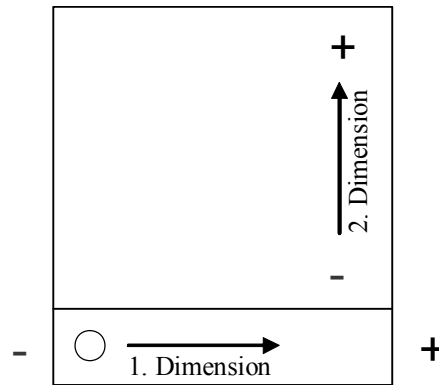


Abb. 2-3: Laufrichtungen der Proben in der 2D-Immunelektrophorese.

Für den Lauf bei 15°C wurden als Pufferbrücke erneut größenangepasste Blotting-Filterpapiere verwendet und über Nacht eine Spannung von 300 V angelegt. Unter diesen Bedingungen konnten die Proteine elektrophoretisch wandern und bildeten im Äquivalenzbereich von Antigenen und Antikörpern Präzipitate [106]. Nicht präzipitierte Antikörper und Antigene wurden durch in Tabelle 2-7 aufgeführten Wasch- und Trockenschritte aus den Gelen ausgewaschen.

Zeit	Schritt	Lösung
5 Min.	Trocknen	
10 Min.	Waschen	0.6% (w/v) NaCl
5 Min.	Trocknen	
10 Min.	Waschen	0.6% (w/v) NaCl
5 Min.	Trocknen	
10 Min.	Wässern	Wasser
5 Min.	Trocknen	
15-20 Min.	vollständiges Trocknen	Unter warmen Luftstrom

Tabelle 2-7: Wasch- und Trockenprotokoll der 2D-Immunelektrophorese.

Die präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels Immuno-Coomassie-Färbung in den Agarosegelen sichtbar gemacht, anschließend mit dem Densitometer dokumentiert und bei Bedarf mit Quantity One bearbeitet.

2.5.6 Silberfärbung

Der Proteinnachweis auf der PAGE erfolgte unter Modifikation einiger Inkubationsschritte mit der Silberfärbung nach Nesterenko in Anlehnung an Blum (s. Anhang 8.6.1). Die Nachweisgrenze dieser Färbung lag bei ca. 10 ng pro Proteinbande [240]. Bei dieser Färbung war ein quantitativer Nachweis nicht möglich, da gleiche Mengen verschiedener Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben und die Färbung auch nur schwer zu reproduzierbar war [241].

2.5.7 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung erfolgte nach der Methode von See und Jackowski mit Coomassie-Brilliant Blue R 250 [232] (s. Anhang 8.6.3). Die Nachweisgrenze bei dieser Färbung lag im Bereich oberhalb von 0.2 µg pro Proteinbande [242].

2.5.8 Zinkfärbung

Die Zinkfärbung erfolgte nach Fernandez-Patron et al. (s. Anhang 8.6.2) [243]. Die Sensitivität dieser Färbung war höher als die der Coomassie-Färbung jedoch niedriger als die der Silberfärbung [242].

2.5.9 SERVA Violet 17-Färbung

Die SERVA Violet 17-Färbung wurde zum Proteinnachweis der isoelektrisch fokussierten Gele nach Herstellerangaben verwendet (s. Anhang 8.6.4) [235].

2.5.10 Immuno-Coomassie-Färbung

Diese Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tabelle 2-8). Im Unterschied zu den übrigen Färbungen erfolgte sie nicht auf dem Schüttler.

Zeit	Schritt	Lösung	Zusammensetzung
5-10 Min.	Färbung	Färbelösung	5 g Coomassie G 250, 400 ml Methanol, 500 ml H ₂ O, 100 ml Essigsäure
kurz schwenken	Waschen	Wasser	
Immungel beobachten	Entfärben	Entfärbelösung	1 l Isopropanol, 418 ml Essigsäure, 1082 ml H ₂ O
kurz schwenken	Waschen	Wasser	
Immungel beobachten	Trocknen	Im warmen Luftstrom trocknen	

Tabelle 2-8: Durchführung der Immuno-Coomassie-Färbung.

2.5.11 Aktivitätsfärbung

Die Aktivitätsfärbung wurde zum Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität von Proteinen im nativen Gel in Anlehnung an Nellaiappan and Vinayakam durchgeführt [244]. Hierzu wurde 3-Methyl-2-Benzothiazoslin-Hydrazon (MBTH) in Wasser an Stelle von Ethanol gelöst und eine MBTH-Konzentration von 0.3 mM verwendet. Um die Autooxidation des Substrates (z.B. Dopamin) herabzusetzen, wurde direkt im Anschluss an die Elektrophorese der alkalische Elektrophoresepuffer durch eine mindestens 15 minütige Inkubation in Phosphatpuffer A ausgetauscht. Anschließend wurde das Gel in der Färbelösung für mindestens 30 Min. inkubiert und mit dem Densitometer die Färbung dokumentiert (s. Anhang 8.6.5). Die Farbreaktion ist im Abschnitt 2.11 genauer erläutert. Eine Zuordnung der enzymatischen Aktivität zu definierten Proteinbanden erfolgte durch eine anschließende Coomassie-Färbung.

2.5.12 Western-Blot

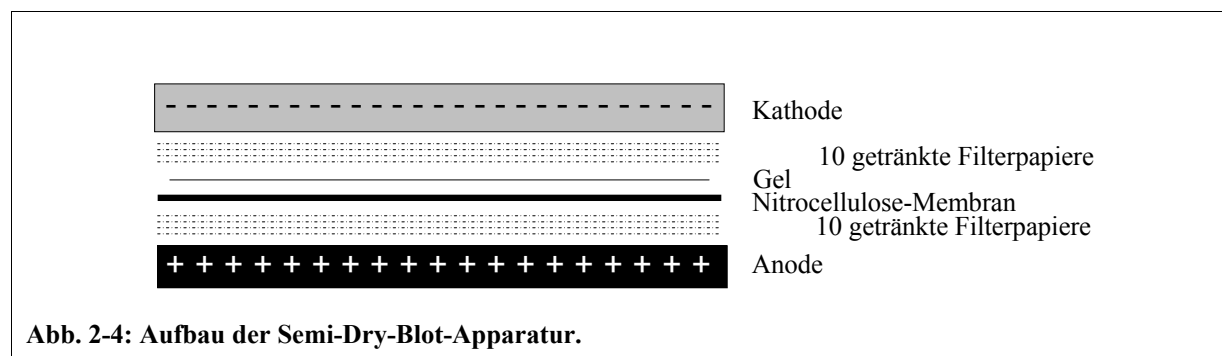
Das Western-Blotting wurde verwendet, um Bindungseigenschaften von Antikörpern an unterschiedliche Antigene im nativen und denaturierten Zustand zu charakterisieren und Probenzusammensetzungen zu analysieren.

Dazu wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend nach der Methode des „Semi-Dry“-Blottens von Kyhse-Andersen über Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran überführt [245]. Die Immundetektion erfolgte über indirekte Antikörpermarkierung in Anlehnung an Towbin et al. [246]. Das komplette Blot-Protokoll ist in Tabelle 2-9 zusammengefasst wird nachfolgend ausführlicher beschrieben.

Schritt	Inkubationsdauer	Lösung
Inkubation des Gels und der Nitrocellulose-Membran	30 Min. (RT)	Transferpuffer
Blotting	2 h (RT), $0.8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$	2x10 mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere
Anfärben der geblotteten Proteine auf der Membran	1 Min. (RT)	„Ponceau-S“-Lösung
Waschen	bis Proteinbanden entfärbt (RT)	TBST
Absättigung freier Bindungsstellen	1-2 h (4°C)	Blocklösung
Primärantikörper	über Nacht (4°C)	Primärantikörper in Blocklösung
Waschen	4 x 10 Min. (4°C)	TBST
Sekundärantikörper	1-2 h (4°C)	Sekundärantikörper in Blocklösung
Waschen	4 x 10 Min. (4°C)	TBST
Entwickeln	bis Banden sichtbar (RT)	Entwicklungslösung
Waschen	2x kurz (RT)	Wasser

Tabelle 2-9: Protokoll für Western-Blotting.

Für das Blotten wurden das Gel direkt im Anschluss an die Elektrophorese und die Nitrocellulose-Membran für maximal 30 Min. in Transferpuffer inkubiert und wie in Abb. 2-4 schematisch dargestellt, in der horizontalen Blot-Apparatur mit in Transferpuffer getränkten Blotting-Filterpapieren geschichtet.



Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte bei einer Stromstärke, die sich mit $0.8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ nach der Gelgröße richtete und

während des zweistündigen Transfers konstant gehalten wurde. Mittels der reversiblen Ponceau-S-Färbung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Blot-Membran überprüft. (Tabelle 2-9). Freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Inkubation in Blocklösung abgesättigt, wodurch bei der Antikörpermarkierung die Hintergrundfärbung der Immundetektion herabgesetzt werden konnte. Die Verdünnung des Primärantikörpers in der Blocklösung war abhängig von der Art des Antiserums und wird für jeden Western-Blot separat in der Bildunterschrift angegeben. Die Primärantikörper dienten dem spezifischen Nachweis des zu untersuchenden Proteins, bzw. dem Nachweis von Proteinähnlichkeiten (Kreuzreaktivitäten). Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen in TBST von der Membran entfernt. Zum Nachweis der Primärantikörper wurde ein anti-rabbit-IgG- Sekundärantikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase verwendet. Dieser Sekundärantikörper erkannte die artspezifischen Fc-Fragmente der Primärantikörper. Freie Sekundärantikörper wurden durch erneutes mehrmaliges Waschen der Membran in TBST entfernt. Die Visualisierung der Antikörpermarkierung fand durch den enzymatischen Umsatz der Substrate BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat-p-toluidinsalz) und NBT (p-Nitrobluetetrazolium) statt [247]. Hierbei wurde von der alkalischen Phosphatase das BCIP zu einem blauen Produkt dephosphoryliert und gleichzeitig das NBT zu einem violetten schwerlöslichen Niederschlag reduziert. Die getrocknete Membran wurde mit dem Densitometer dokumentiert und bei Bedarf mit der Scan-Software Quantity One bearbeitet. Generell wurden bei jedem Western-Blot Positiv- und Negativ-Kontrollen eingesetzt.

2.6 Spektroskopische Analysemethoden

2.6.1 Absorptionsspektroskopie und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Absorptionsmessungen erfolgten an einem Zweistrahl-Absorptionsphotometer, welches mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet war, der durch ein Wasserbad reguliert werden konnte. Alle Messungen wurden bei 20°C und in Quarzküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm durchgeführt. Für UV/Vis-Spektren wurde in 1 nm-Schritten mit 600 nm/Min. die Absorption detektiert und bei Bedarf die Probe mit dem jeweiligen Puffer verdünnt. Konzentrationsbestimmungen wurden über Absorptionsmessungen bei 280 nm nach Lambert-Beer vorgenommen. Als spezifischer Extinktionskoeffizient wurde bei 280 nm 1.65 [l/(g*cm)] für Per a 3.03 und 1.44 [l/(g*cm)] für P II verwendet [148]. Der spezifische Extinktionskoeffizient bei 280 nm wurde für die Hämolympe der zweiten Charge in dieser Arbeit mit 1.4 [l/(g*cm)] und für den Crude-Extrakt mit 2.0 [l/(g*cm)] wie im Abschnitt 2.6.4 erläutert bestimmt (Abschnitt 3.1.1.2). Der spezifische Extinktionskoeffizient bei 280 nm wurde für die Hämolympe der ersten Charge mit 1.5 [l/(g*cm)] angenommen (Abschnitt 3.1.1.2). Für Per a 9 wurde der spezifische Extinktionskoeffizient bei 280 nm mit 0.92 [l/(g*cm)] aus der Sequenz bestimmt (Abschnitt 3.4.1). Alle Messungen wurden gegen die Absorption der Küvette mit dem entsprechenden Lösungsmittel korrigiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden außerdem zwei kalorimetrische Methoden verwendet: der Lowry-Assay und der Bradford-Assay. Die Proben beider Methoden wurden in Einmalküvetten im Zweistrahl-Absorptionsphotometer vermessen.

2.6.2 Lowry-Assay

Es wurde der modifizierte Lowry-Assay nach Pierce verwendet, der auf einer veränderten Biuret-Reaktion mit einem Folin-Ciocalteu Reagenz basierte [98, 248]. Bei dieser Reaktion komplexieren in alkalischer Lösung Cu^{2+} Ionen mit der Peptidbindung oder auch Tyrosin-Resten zu einem farbigen (blau-violetten) Kupfer-Protein-Komplex [249]. Die Sensitivität der Biuret-Reaktion ist durch Zugabe des gelben Folin-Ciocalteu Reagenz, welches Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren enthält, deutlich erhöht. Die detaillierte Reaktion ist jedoch nicht bekannt; wahrscheinlich werden die Cu^{2+} -Ionen des Kupfer-Protein-Komplexes zu Cu^+ reduziert, die ihrerseits mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz zu einem Farbkomplex reagieren. Dieser Farbkomplex, bestehend aus einem Mischoxid aus sechswertigem und fünfwertigem Molybdän, wurde bei 750 nm detektiert [236, 249-251].

In dieser Arbeit wurden für einen besseren Vergleich zwei Proteinstandards verwendet: lyophilisiertes Rinderserumalbumin (BSA) und gereinigtes Hämocyanin von *Palinurus elephas* aus unseren Institutsbeständen. Als Punkte für die Eichgerade wurden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen verwendet, die mit jeweils 0, 5, 50, 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinstandard erhalten wurden. Die Proteinbestimmungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 200 μl Probe bzw. Standard mit 1 ml modifiziertem Lowry-Protein-Reagenz mischen und für exakt 10 Min. bei Raumtemperatur inkubierten
- Zugabe von 100 μl Folin-Ciocalteu Reagenz (2X Folin-Ciocalteu Reagenz zuvor 1:2 mit Phosphatpuffer B verdünnt) und Invertieren der Proben
- 30 Min. Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Messung der Absorption bei 750 nm

2.6.3 Bradford-Assay

Für die quantitative Proteinbestimmung wurde der Bio-Rad Protein Assay mit der Microassay Methode entsprechend den Herstellerangaben verwendet [252]. Dieser basierte auf der Methode nach Bradford [253]. Der in diesem Assay enthaltene Coomassie®Brilliant Blue G-250-Farbstoff absorbierte im sauren Milieu frei gelöst maximal bei 465 nm. An Proteine gebunden trat eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes zu 595 nm auf [100, 254]. Die Bindung an Protein erfolgte bevorzugt an Arginin sowie an weitere basische und auch aromatische Aminosäuren [99]. Dadurch konnte die Wahl der Eichproteine für die Genauigkeit der Probenkonzentrationsbestimmung entscheidend sein. In dieser Arbeit wurden als Eichproteine lyophilisiertes Rinderserum-

albumin (BSA) bzw. Hämocyanin von *Palinurus elephas* in den Konzentrationen 1.2, 3.0, 5.0, 7.5 und 10.0 µg/ml verwendet. Für alle Standards wurden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen verwendet. Als Leerwert diente Phosphatpuffer B mit Bradford-Reagenz. Bei den Proteinbestimmungen wurde darauf geachtet, dass alle Proben einer Versuchsreihe über einen identischen Zeitrahmen, der mindestens 10 Min. betrug, mit dem Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt.

2.6.4 Spezifischer Extinktionskoeffizient

Die Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten unterschiedlicher Proben und Extrakte fand über eine photometrische und/oder mathematische Methode statt.

Die mathematische Methode basierte auf der Proteinsequenz bzw. der Aminosäurezusammensetzung des Proteins und war in dem Programm-Paket „Antheprot“ implementiert, welches ebenfalls für Sequenzanalysen verwendet wurde (s. Abschnitt 2.14.2).

Für die photometrische Methode wurden die Proben zuvor in Phosphatpuffer B umgepuffert und anschließend deren Absorption bei 280 nm detektiert. Von der selben Probe wurde mittels Bradford- und Lowry-Assay die Konzentration bestimmt, sodass über das Lambert-Beersche Gesetz der spezifische Extinktionskoeffizient errechnet werden konnte.

2.6.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung wurde verwendet, um die Moleküldimensionen von Per a 9 zu bestimmen.

Hierfür wurde die Streulichtintensität im 173°-Winkel zum einfallenden Laserlicht (633 nm) im dynamischen Lichtstreuспекrometer gemessen. Dieses Gerät konnte einen Partikelgrößenbereich von 0.6 nm bis 6 µm erfassen. Für die Messung wurde die Niedrig-Volumen-Glasküvette mit 75 µl Probenvolumen gefüllt und als Messparameter die Partikelgröße (Messtyp „Size“) gewählt. In diesem Messmodus wurde die Brownsche Molekularbewegung über die Streulichtintensität als primäres Messsignal gemessen. Dafür wurden zwei Messungen im Abstand von 100 µsec bei 20°C durchgeführt und korreliert [255]. Basierend auf den unterschiedlich schnellen Bewegungen von kleineren und größeren Molekülen wurden in eine automatisierten Prozess eine Korrelationsfunktion definiert, aus der über Kurvenanpassung der Diffusionskoeffizient der Moleküle bestimmt wurde. Aus diesem Diffusionskoeffizienten konnte nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2-1) der hydrodynamische Radius der diffundierenden Proben errechnet werden [256].

$$D = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta_0 * R_h}$$

D= Diffusionskoeffizient [m²/s]

k= Boltzmann-Konstante [J/K]

T= Temperatur [K]

η_0 = Viskosität des Lösungsmittels [N*s/m²]

R_h = hydrodynamischer Radius des diffundierenden Teilchens [m]

Gleichung 2-1: Zusammenhang von Diffusionskoeffizient und hydrodynamischem Radius. Für die Viskosität des Lösungsmittels wurde die des Wassers bei 20°C verwendet.

Diese Auswertung war in der verwendeten DTS-Nano Software „Dispersion Technology Software, Version 4.0“ des Herstellers implementiert.

2.7 Massenspektrometrie

Für die Zuordnung einzelner isolierter Proteinproben zu bekannten Sequenzen wurden die Proteine nach tryptischem Verdau und anschließender Flüssigkeitschromatographie mittels ESI-Q-TOF (electrospray ionization-quadrupole time-of-flight) massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse wurde freundlicherweise von [REDACTED] ([REDACTED], Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

2.7.1 Proteinseparation und tryptischer Verdau

Hierzu wurden die zum Teil gereinigten Proteinproben zunächst auf einer 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie R-250- oder Zink angefärbt (Abschnitt 8.6.2). Proteinbanden von Interesse wurden ausgeschnitten, Coomassie-gefärbte Proben entfärbt, die Polyacrylamid-Matrix zerkleinert und anschließend getrocknet. In Gegenwart von 2 mM Dithiothreitol wurden die Proben reduziert und anschließend bei 55°C für 1 h mit 20 mM Iodacetamid alkylt. Die Proben wurden gewaschen und getrocknet und im Anschluss daran mit 1 g Trypsin pro Gelstück bei 37°C über Nacht verdaut. Die entstandenen Peptide wurden in einen Autosampler (Waters GmbH, Eschborn) für die Peptidanalyse mittels Flüssigkeitschromatographie transferiert.

2.7.2 Flüssigkeitschromatographie

Für die kapillare Flüssigkeitschromatographie wurde das nanoACQUITY UPLC System™ (Waters GmbH, Eschborn) mit einer nanoACQUITY UPLC™ Symmetry C18 Umkehrphasensäule (C18, 100 µm x 10 cm) verwendet. Es wurden 2 µl Probe in 3% mobile Phase B (100% Acetonitril in 0.1% Ameisensäure) auf die Säule aufgetragen und mit einem linear ansteigenden Gradienten von 3-40% der mobile Phase B über 100 Min. bei einer Flussrate von 300 nL/Min. eluiert. Die wässrige mobile Phase (mobile Phase A) enthielt 0.1% Ameisensäure in Wasser. Die Säule wurde anschließend 10 Min. mit 90% an mobiler Phase B gespült und abschließend wieder mit 3% an mobiler Phase B für 20 Min. äquilibriert. Die

auf diese Weise chromatographierten Proben konnten anschließend massenspektrometrisch untersucht werden.

2.7.3 ESI-Q-TOF

Die massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide wurde mittels Waters Q-TOF Premier System (Waters GmbH, Eschborn) nach der Elektrospray-Ionisierungsmethode (ESI) durchgeführt. Für sämtliche Messungen wurde das Massenspektrometer im V-Modus mit einem typischen Auflösungsvermögen von mindestens 10 000 FWHM (Halbwertsbreite) betrieben. Das Massenspektrometer wurde mit einer [Glu1]Fibrinopeptid-Lösung (500 fmol/ μ l) kalibriert, die durch den Referenzsprayer der NanoLockSpray Quelle geliefert wurde. Die Beladung des Lock-Massen-Kanals fand alle 30 sek statt. Zur Identifizierung der Fragmente wurde das Gerät im „data-directed acquisition mode“ betrieben und es wurden die drei stärksten Peaks für die Fragmentierung ausgewählt. Es konnten jederzeit bis zu drei Vorläuferionen für die Analyse ausgewählt werden. Während der Probenanalyse wurden vier Tandem-Massenspektrometrie-Spektren von jedem ausgewählten Ion aufgenommen. Die Fragmentierung der ausgewählten Ionen wurde über eine Kollision mit Argon-Atomen erreicht. Die Kollidierungsenergie variierte von 15 bis 35 eV, abhängig von der Masse und Ladung der Vorläufer-Ionen. Die Integrationszeit für die TOF-Analyse war 1 sek.

2.7.4 Auswertung der Spektren

Die Daten der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Spektren (LCMSMS) wurden verarbeitet und mittels PROTEINLYNX GLOBAL SERVER (Ver 2.2, Waters GmbH, Eschborn) durchsucht.

Die Proteinidentifikation geschah über eine Datenbanksuche, die alle bekannten Sequenzen der Unterordnung Blattodea enthielt. Es wurde sowohl nach den Vorläufer- als auch nach den fragmentierten Daten aus der Massenspektrometrie gesucht. Die Massen-Fehler-Toleranz-Werte waren dabei typischerweise kleiner als 5 ppm.

Die Peptid-Identifizierung war auf tryptische Peptide mit nicht mehr als einer verfehlten Schnittstelle eingeschränkt. Zur Identifizierung der homologen Peptide wurde eine automatische Anfrage (Automod-Query) verwendet, die bis zu zwei Aminosäure-Austausche pro Peptid erlaubte. Alle identifizierten Peptid-Sequenzen wurden über manuelle Überprüfung der Fragmentspektren verifiziert.

2.8 Analytische Ultrazentrifugation

Die Analytische Ultrazentrifuge wurde mit dem An50 Ti-Rotor für Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe zur Bestimmung der Proteingestalt und Homogenität der Probe sowie für Sedimentationsgleichgewichtsläufe zur Bestimmung des Molekulargewichts betrieben. Vor jedem Lauf wurde von den Proben ein Absorptionsspektrum zur Probenkontrolle bzw. zur Ermittlung der optimalen Messwellenlänge für Absorptionsmessungen aufgenommen.

Als Richtwert wurde bei der Messwellenlänge eine Absorption von 1 angestrebt. Absorptionsmessungen zeichneten sich durch eine hohe Sensitivität aus, da die Möglichkeit bestand die Detektionswellenlänge so zu variieren, dass eine Detektion im UV-Bereich erfolgte und somit eine Verwendung von relativ geringen Proteinkonzentrationen möglich war.

2.8.1 Sedimentationsgeschwindigkeitslauf

Ziel der Sedimentationsgeschwindigkeitsversuche war zum einen die Homogenität isolierter Proteine und zum anderen deren Gestalt im Hinblick auf Oligomerisierung bzw. Dissoziation zu bestimmen.

Hierzu wurde im Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (Sedimentationslauf) die Geschwindigkeit eines unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft sedimentierenden Teilchens zeit- und orts aufgelöst gemessen [257]. Das Fortschreiten der Sedimentation (Sedimentationsfront) wurde mittels Absorptionsmessungen bei einer oder mehreren Wellenlängen verfolgt. Die Rotorgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass die Proteinproben ausreichend schnell im Schwerfeld sedimentieren konnten. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Rückdiffusion möglichst gering gehalten wurde und vor dem Pelletieren der Proteine mindestens 15 Messungen der Sedimentationsfront möglich waren. Die Sedimentation der Proben ist durch die Svedberg-Gleichung beschrieben (Gleichung 2-2) [258].

$$S = \frac{v}{\omega^2 * r} = \frac{M(1 - \nu_p * \rho_L)}{N_A * f}$$

S = Sedimentationskoeffizient [$10^{-13}\text{s} = 1\text{S}$]
 v = Teilchengeschwindigkeit [m/s]
 Ω = Winkelgeschwindigkeit [1/s]
 r = Radius [m]
 M = Molmasse [g/mol]
 ν_p = partielles spezifisches Volumen Protein [cm^3/g]
 ρ_L = Lösungsmitteldichte [g/cm^3]
 N_A = Avogadro-Zahl = $6,022 \cdot 10^{23}$ [1/mol]
 f = Reibungskoeffizient [kg/s]

Gleichung 2-2: Svedberg-Gleichung. Als partielles spezifisches Volumen wurde für der für Proteine übliche Standardwert von $0.72 \text{ [cm}^3/\text{g}]$ verwendet [259]. Die Lösungsmitteldichte wurde von UltraScan unter Angabe der Zusammensetzung des Lösungsmittels errechnet.

Für einen solchen Sedimentationslauf wurden die Doppelsektorzellen nach Herstellerangaben entweder mit Saphir- oder Quarzgläsern zusammengesetzt und befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass generell ein größeres Puffervolumen in den Referenzsektor eingefüllt wurde als Probenvolumen (Richtwerte: $420 \mu\text{l}$ Puffer, $400 \mu\text{l}$ Probe). Einzelne Parameter wie z.B. Rotorgeschwindigkeit, Temperatur und optisches System wurden dem jeweiligen Versuchsaufbau angepasst und sind daher in den jeweiligen Ergebnissen separat aufgeführt. Die Auswertung der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgte nach der „(enhanced) van Holde Weisheit“ Methode [260] und wurde mit der Finite-Elemente-Methode nach Demeler

und Saber analysiert [261, 262]. Beide Methoden waren in die Software UltraScan (Linux-Plattform: Version 6.0 oder Version 7.2; Windows-Plattform Version 8.0) implementiert.

Die „(enhanced) van Holde-Weischet“ Methode basierte auf der Tatsache, dass die Sedimentation proportional zur Zeit und die Diffusion jedoch proportional zur Quadratwurzel der Zeit ist. Daher konnte bei einer Extrapolation auf unendliche Zeit der Anteil der Diffusion aus der Sedimentationsfront herausgerechnet werden [263]. Hierzu wurde jede einzelne Sedimentationsfront in horizontale „Divisions“ unterteilt (auch als „boundary fractions“ bezeichnet) und für jeden dieser Punkte wurde ein apparenter Sedimentationskoeffizient errechnet. Diese apparenten Sedimentationskoeffizienten sind beim „Extrapolation-Plot“ gegen den Kehrwert der Quadratwurzel der Zeit für jeden einzelnen Scan aufgetragen. Die Extrapolation der apparenten Sedimentationskoeffizienten einer „boundary fraction“ lieferte am Schnittpunkt mit der y-Achse (unendliche Zeit) einen auf die Diffusion korrigierten Sedimentationskoeffizienten. Die Einbeziehung mehrerer Scans ergab somit eine Verteilung an korrigierten Sedimentationskoeffizienten, die manuell zu Gruppen zusammengefasst werden konnten. Im „Distribution-Plot“ sind diese Ergebnisse als korrigierte S-Werte gegen die „boundary fractions“ aufgetragen. Unter Einbeziehung der Temperatur und der Lösungsmitteldichte konnte ein korrigierter Sedimentationskoeffizienten ($S_{20,w}$) erhalten werden.

Die „(enhanced) van Holde-Weischet“ Methode ist bisher die einzige Methode, mit der es bei einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf polydispenser Lösungen möglich ist korrigierte Sedimentationskoeffizienten zu erhalten [263, www.ultrascan.uthscsa.edu].

2.8.2 Sedimentationsgleichgewichtslauf

Der Sedimentationsgleichgewichtslauf wurde zur Bestimmung des Molekulargewichts isolierter Proteine in Lösung verwendet.

Hierzu wurde die Sechsersektorzelle nach Herstellerangaben zusammengesetzt und befüllt. Der Lauf wurde im Absorptionsmodus bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten für je 24 h durchgeführt, wodurch in Abhängigkeit zur Geschwindigkeit unterschiedliche Konzentrationsverteilungen in der Zelle eingestellt werden konnten. Voraussetzung dieser Methode war, dass in einem niedrigen Sedimentationsfeld nach 24 h ein stationärer Zustand erreicht war, bei dem sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentationskraft und Diffusion eingestellt hat. Der stationäre Zustand wurde als bestätigt angesehen, wenn das exponentielle Konzentrationsprofil der Proben sowohl nach 23 h als auch nach 24 h übereinstimmte. Dieses entsprach bei idealen Lösungen mit einer Proteinspezies einer Boltzmann-Verteilung. Die Auswertung der Messungen erfolgte in UltraScan Version 7.2 (Linux-Plattform) mit dem Global Fit-Algorithmus, mit dem eine nicht-lineare Datenanpassung mehrerer Einzelmessungen basierend auf Gleichung 2-3 durchgeführt wurde [264, www.ultrascan.uthscsa.edu]:

$$C(x) = 10^{\frac{\ln(A) + \frac{M \cdot \omega^2 \cdot (1 - \nu_p \cdot D) \cdot (X^2 - X_r^2)}{2 \cdot R \cdot T}}{1}} + B$$

X = Radius [m]	M = Molekulargewicht [g/mol]
X _r = Referenzradius [m]	ν _p = partielles spezifisches Volumen [g/cm ³]
A = Amplitude	ω = Winkel- geschwindigkeit [m]
D = Dichte [cm ³ /g]	R = Gaskonstante = 8.314 [J/(mol*K)]
B = Baseline	
T = Temperatur [K]	

Gleichung 2-3: Gleichung für den Global Fit-Algorithmus für ein ideales Einkomponentensystem.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden bei der Datenanpassung sowohl die Baseline als auch das partielle spezifische Volumen des Proteins fixiert, eine Korrektur hinsichtlich Lösungsmitteldichte durchgeführt und ein ideales Einkomponentensystem angenommen. Als partielles spezifisches Volumen wurde der für Proteine übliche Standardwert von 0.72 [cm³/g] verwendet [263].

2.9 Stabilität gegenüber chaotropen Reagenzien

Die Herstellung von Monomeren war sowohl für die Fragestellung, ob sich die Per a 3-Hexamere aus immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten zusammensetzten, als auch für den Vergleich der immunologischen Potenz von hexameren Per a 3-Proteinen gegenüber monomeren Per a 3-Proteinen von großem Interesse.

Da die Austestungen der optimalen Dissoziationsbedingungen einen wesentlichen Bestandteil dieser Arbeit darstellten, sind die Dissoziationsbedingungen in den Ergebnissen (Abschnitt 3.3.2.7) detailliert dargelegt. Die prinzipielle Methodik ist hier kurz erläutert

Die Proben wurden mit Dissoziationspuffer versetzt und für mindestens fünf Tage bei 20°C inkubiert. Um den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Reassoziations beurteilen zu können wurden dabei verschiedene Proteinkonzentrationen von 0.15 bis 0.71 mg/ml eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei Bedarf in Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert und umgepuffert (s. Abschnitt 2.3.8).

2.10 Stabilität gegenüber unterschiedlichen pH-Werten

Die Stabilität der Per a 3-Isoformen gegenüber ausgewählten pH-Werten war von besonderem Interesse im Hinblick auf den lysosomalen Abbauweg, den Allergene für die Antigenpräsentation u.a. in dendritischen Zellen durchlaufen.

Für diese Untersuchungen wurden die Proben 1:66 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt und für sieben Wochen bei 37°C inkubiert. Die Stabilität wurde nach 24 h, einer Woche und nach sieben Wochen mittels nativer PAGE, Western-Blot sowie mittels Sedimentationsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge überprüft. Es wurden folgende Puffersysteme und pH-Werte verwendet: 0.1 M Citratpuffer (pH 3.5), 0.1 M Phosphatpuffer D (pH 6.0), 0.1 M Phosphatpuffer C (pH 6.5) und Schabenpuffer D (pH 7.8 bei 20°C). Mit Schabenpuffer D wurden

zwei Proben versetzt: eine wurde als Kontrolle bei 4°C gelagert, die andere bei 37°C. Da der pH-Wert von TRIS-Puffer mit -0.028 pH/K eine starke Temperaturabhängigkeit aufwies wurde die in Schabenpuffer D bei 37°C gelagerte Probe bei pH 7.3 und die bei 4°C gelagerte Probe bei pH 8.2 inkubiert.

2.11 MBTH-Assay: Dot-Blot auf PVDF-Membran

Der MBTH-Assay wurde zur Identifizierung der Phenoloxidase-Aktivität in verschiedenen Proben verwendet. Hierzu wurde er auf zwei unterschiedlichen Matrizen mit je zwei unterschiedlichen Substraten (Tyramin und Dopamin) angewendet: zum einen in Form der Aktivitätsfärbung von nativen Proteinen, welche zuvor mit Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch getrennt wurden. Diese zur Bandenidentifizierung verwendete Färbemethode wurde bereits in Abschnitt 2.5.11 kurz vorgestellt. Zum anderen erfolgte der Test auf Phenoloxidaseaktivität als Schnelltest im Dot-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran. Beiden Methoden lag der gleiche Reaktionsmechanismus zu Grunde der im Folgenden kurz am Beispiel des Tyramins erläutert wird (Abb. 2-5).

Unter der Bezeichnung Phenoloxidase(aktivität) sind zwei Aktivitäten zusammengefasst: die Monophenoloxidase- und die Diphenoloxidaseaktivität, die sich im Wesentlichen durch den Umsatz unterschiedlicher Substrate unterscheiden.

Zum Nachweis der Monophenolhydroxylase-Aktivität (Cresolase-Aktivität) wurde für den Assay als Substrat das Monophenol Tyramin verwendet. Dieses wurde in *ortho*-Stellung unter Sauerstoffverbrauch und in Gegenwart der Monophenolhydroxylase zu dem Diphenol L-DOPA hydroxyliert. Im Unterschied dazu kann eine Diphenoloxidase keine Monophenole umsetzen [265]. Zum Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität (Catecholoxidase-Aktivität) wurde daher das diphenolische Substrat Dopamin verwendet, welches zu DOPACHINON oxidiert wurde.

Im MBTH-Assay reagierten die entstandenen Diphenole nicht wie üblich autokatalytisch weiter zu Melanin [266], sondern in einer Michaelis-Additionsreaktion zu einem stabilen rot gefärbten Farbstoffkomplex, der detektiert werden konnte (Abb. 2-5) [267-269].

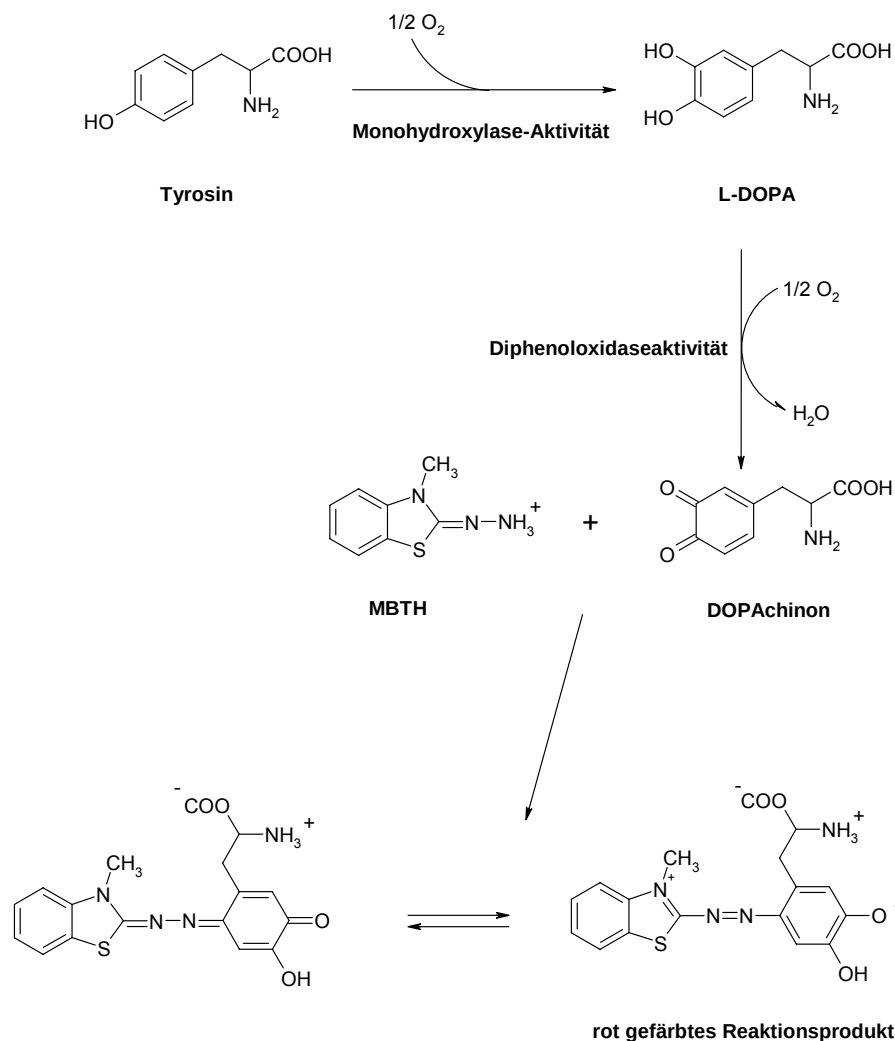


Abb. 2-5: MBTH-Assay für den Test auf Phenoloxidase-Aktivität mit Tyramin als Substrat. Im ersten Schritt findet die Oxidation des Tyrosins zu L-DOPA mittels einer Monophenoloxidase statt. Im zweiten Schritt wird L-DOPA von einer Diphenoloxidase zu DOPachinon oxidiert. Dieses reagiert in einer Michaelis-Addition mit MBTH zu einem stabilen rot gefärbten Farbstoffkomplex.

Der Dot-Blot-Test lieferte eine Möglichkeit, große Probenmengen auf bestimmte Proteine zu screenen [236]. In dieser Arbeit wurde er ohne Quantifizierung als einfaches und schnelles Testverfahren für den Nachweis von Phenoloxidaseaktivität auf einer PVDF-Membran verwendet.

Da von Arthropoden-Hämocyaninen bekannt war, dass sie durch die Zugabe von SDS im Hinblick auf die Phenoloxidaseaktivität aktiviert werden können [270-272] und die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Per a 3-Proteine mit den Arthropoden-Hämocyaninen verwandt sind [138, 143], wurden die Tests auf Phenoloxidaseaktivität sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von SDS durchgeführt.

Der Dot-Blot basierte unter Einbeziehung einiger Modifikationen und Weiterentwicklungen auf Pifferi und Baldassari [267-269]. Es wurden 3 μl Probe mit 3 μl Färbelösung (3 mM

Substrat, 0.3 mM MBTH (in H₂O gelöst) mit oder ohne 0.3% (w/v) SDS) auf einer PVDF-Membran zusammen gegeben. Der Nachweis der Enzymaktivität äußerte sich nach 5-30 Min. in einer rosa-roten-Färbung. Da insbesondere das Substrat Dopamin autokatalytisch weiterreagieren konnte, wurden stets Negativkontrollen (diverse Puffer mit Färbelösung) mit getestet. Als Positivkontrolle wurde die Tyrosinase von *Agaricus bisporus* in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0.3 mg/ml und 0.03 mg/ml in Phosphatpuffer B) verwendet. Nach Eintrocknung der Tropfen wurde deren Färbung mit dem Densitometer dokumentiert.

2.12 Generierung von Antikörpern

Polyklonale Antikörper für Western-Blot-Experimente und 2D-Immungelektrophorese wurden in Kaninchen generiert und von der Firma Charles River Laboratories (Kisslegg) bezogen.

Das Antiserum gegen gereinigtes natives Per a 3.03 (anti-Per a 3.03-AK) wurde durch Immunisierung des Kaninchens mit gereinigtem nativen Per a 3.03 in Schabepuffer C mit kompletten Freudschen Adjuvans von der Firma Charles River Laboratories (Kisslegg) 70 Tage nach der Erst-Injektion gewonnen.

Die Antiseren gegen gereinigtes andissoziiertes P II (anti-P II-AK) und unbehandelte Schabenhämolymphe (anti-*P.a.*HL-AK) stammten aus Beständen unserer Arbeitsgruppe von 1999 und wurde ebenfalls in Kaninchen gezogen. Alle Antiseren wurden bei mindestens -23°C gelagert.

2.13 Immunologische Methoden

Sämtliche der hier aufgeführten Methoden wurden freundlicherweise von Diplom-Biologin [REDACTED] an der Hautklinik des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeführt.

2.13.1 Bestimmung der Proliferationsindices

Die Messung der Proliferation der CD4⁺-T-Zellen erfolgte nach Bellinghausen et al. [273]. Dendritische Zellen (DC) dienten der Antigenpräsentation und wurden zuvor durch Allergenzugabe beladen. Nach fünf Tagen Cokultur mit autologen CD4⁺-T-Zellen wurde den Zellen [³H]-Thymidin zugegen, für acht Stunden inkubiert und anschließend über Messung der Radioaktivität der Einbau von [³H]-Thymidin bestimmt. Der Proliferationsindex berechnete sich aus der Radioaktivität der Allergen-beladenen DC zusammen mit CD4⁺-T-Zellen (in counts per minute) normiert auf die Radioaktivität der unbehandelten DC mit CD4⁺-T-Zellen.

2.13.2 Bestimmung der Leukotrienfreisetzung

Die Bestimmung der Leukotrienfreisetzung erfolgte nach Pierkes et al. [274]. Hierzu wurden die Leukocyten aus dem Patientenblut durch Dextran sedimentation und anschließender Zentrifugation bei 130 g für 15 Min. von den Erythrocyten getrennt isoliert. Die Stimulation erfolgte unter Zugabe von 50 µl Allergen zu 200 µl Leukocytensuspension in einem IL-3 haltigen Stimulationspuffer. Die Leukotrienfreisetzung wurde anschließend mit dem „CAST-2000 ELISA“ entsprechend den Herstellerangaben quantifiziert. Als Negativkontrolle diente IL-3-haltiger Stimulationspuffer alleine und als Positivkontrolle anti-IgE-Rezeptor-Antikörper.

2.14 Molekulare Proteinsequenzanalyse

2.14.1 Proteinsequenzen

Die Proteinsequenzen wurden aus der NCBI-Sequendatenbank [www.ncbi.nlm.nih.gov] im FASTA-Format erhalten. Alle verwendeten Sequenzen sind mit ihrer Accession-Number in Tabelle 2-6 zu Beginn dieses Kapitels gelistet.

2.14.2 Proteinsequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurden diese Sequenzen mit dem Programmpaket „Anthept 2000v5.2 release 1.1.6“ hinsichtlich Aminosäureanzahl, Aminosäurezusammensetzung, Molekulargewicht, molarem spezifischem Extinktionskoeffizient (bei 280 nm) und isoelektrischem Punkt ausgewertet. Hierzu wurden die Standardeinstellungen von Anthept beibehalten (molekulare Hydratation 0.3g H₂O/g Protein) [275-277].

2.14.3 Sequenzalignments

Für die Sequenzalignments wurden die Sequenzen zunächst in „ClustalX 1.83“ mit den Standardeinstellungen align und anschließend mit „GeneDoc“ (Version 2.6.002) manuell bearbeitet und Identitäten und Ähnlichkeiten der ausgewählten Sequenzen ausgewertet und eingefärbt [278, 279].

2.14.4 Bestimmung antigener Epitope

Die potentiellen antigenen Epitope wurden mit dem Algorithmus nach Parker et al. (1986) bestimmt. Dieser Algorithmus war in dem Programmpaket „Anthept 2000v5.2 release 1.1.6“ implementiert und diente der Bestimmung antigener sequenzieller Epitope [280]. Der Algorithmus berücksichtigte die atomare Flexibilität, Hydrophilie sowie die experimentelle HPLC Retentionszeit synthetischer Peptide [280]. Für die Determinierung dieser antigenen Epitope wurden Sequenzabschnitte ausgewählt, bei denen mindestens drei aufeinanderfolgende Aminosäuren einen antigenen Index von mindestens 50 besaßen. Alle Aminosäuren mit einem antigenen Index von unter 50 wurden nicht als potentiell antigen eingestuft.

2.15 Strukturanalyse am Proteinmodell

2.15.1 Homologie-Modellierung von Per a 3.0201

Die Homologie-Modellierung von Per a 3.0201 wurde freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] aus unserem Institut (Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt und diente vor allem der Lokalisierung allergener und potentiell antigener Epitope in der Quartärstruktur der Allergene.

Die Erstellung eines Homologie-Modells ermöglichte eine Vorhersage der dreidimensionalen Struktur eines Proteins durch Vergleich mit bekannten Proteinen ähnlicher Aminosäure-Sequenz. Für die Vorhersage der Faltung des Peptidrückgrats gilt eine ca. 25%ige Sequenz-identität bereits als ausreichend [281]. Der geringe effektive Gesamtfehler für das Proteinerückgrat von unter 2 Å zwischen Modell und Vorlage war ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden zur Strukturvorhersage, wie z.B. *ab-initio*-Modellierung [282]. Ein solches Verfahren war möglich, da eine geringfügige Änderung der Sequenz lediglich eine geringfügige Änderung der Struktur zur Folge hat [283].

Für die Modellierung wurde das Programm „Modeller 8v1“ verwendet, welches auf der Erfüllung von räumlichen Randbedingungen basierte [282, 284]. Die dem Programm zu Grunde liegende Algorithmen wurden von Šali und Blundell beschrieben [282]. Für das Per a 3.0201-Modell wurde ein Sequenzalignment des Klons Per a 3.0201 [138] mit der Sequenz der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* erstellt. Da die Proteine im Alignment eine 27%ige bzw. 30%ige Sequenzidentität und 49% bzw. 51% isofunktionelle Aminosäuren aufwiesen, konnte dieses Alignment für die Homologie-Modellierung verwendet werden. Als Template diente die Kristallstruktur der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* (1hcy) [226]. Die Orientierung der sechs Untereinheiten basierte auf der Kristallstruktur des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* [285].

2.15.2 Analyse der Homologie-Modelle

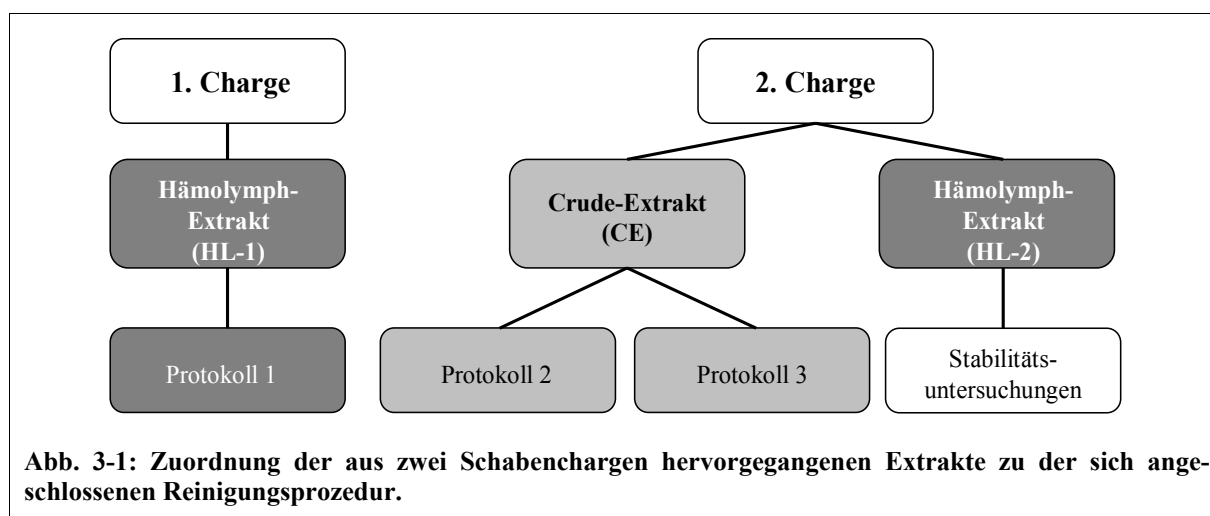
Die Homologie-Modelle wurden mit Hilfe zweier Programme ausgewertet. Mit YASARA (Twinset 7.1.18) zusammen mit POV-Ray (3.6; www.povray.org) oder auch mit RasMol wurden die Homologie-Modelle hinsichtlich ihrer Dimensionen, Strukturelemente (von Primär- bis Quartärstruktur) sowie potentiellen antigenen Epitope eingefärbt und analysiert [221].

3 ERGEBNISSE

In der Allergenforschung sowie für die Diagnostik von Allergien ist die Herstellung und Verwendung von Crude-Extrakten eine etablierte Methode, die es ermöglicht, schnell sämtliche Allergene einer Spezies in Lösung zu bringen [4, 286]. Zahlreiche solcher Extrakte werden auch kommerziell vertrieben [z.B. www.bencard.com, www.diagnostics.com, www.allergopharma.de]. Bei diesen Crude-Extrakten wurden jedoch bemängelt, dass diese in ihrer Zusammensetzung variierten und auch nicht standardisiert seien [95, 220]. Eine weitere Problematik diese Extrakte sind die durch die Extraktion enthaltenen Proteasen, die u.a. bei *Periplaneta americana* in hoher Konzentration nachgewiesen wurden und über Degradation der Allergene deutlichen Einfluss auf die Potenz der Extrakte haben können [286]. Aus diesem Grund war in dieser Arbeit bei der Herstellung von Crude-Extrakten aus *Periplaneta americana* im Crude-Extrakt-Puffer eine Mischung verschiedenster Protease-Inhibitoren enthalten.

Als weitere, jedoch deutlich aufwändigere Möglichkeit, Allergene aus der Schabe zu gewinnen wurde ein Hämolymp-Extrakt hergestellt, der den Vorteil hatte, dass keine Proteasen enthalten waren. Allerdings musste dabei berücksichtigt werden, dass dieser Hämolymp-Extrakt nicht das komplette Allergenspektrum der Amerikanischen Schabe (Abb. 1-6) enthalten konnte. In dieser Arbeit wurden die Begriffe Hämolymphe und Hämolymp-Extrakt als Synonym verwendet und mit HL abgekürzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren insgesamt auf zwei unterschiedlichen Schabenchargen, aus denen insgesamt drei Extrakte hervorgegangen waren. Aus der ersten Schabencharge wurde ein Hämolymp-Extrakt (HL-1) gewonnen, aus der zweiten Schabencharge wurde zum Hämolymp-Extrakt (HL-2) zusätzlich auch ein Crude-Extrakt (CE) hergestellt (Abschnitt 2.2.3). Ausgehend von diesen Extrakten konnten die Allergene Per a 3 und Per a 9 nach verschiedenen Protokollen isoliert werden (Abb. 3-1).



In dieser Arbeit werden im ersten Abschnitt (3.1) zunächst der Vergleich der Proteinzusammensetzung von Hämolymp- und Crude-Extrakt sowie die Reproduzierbarkeit der beiden hergestellten Hämolymp-Extrakte dargelegt. In Abschnitt 3.2 werden drei Reinigungsprotokolle vorgestellt, mit denen die Allergene Per a 3 und Per a 9 sowohl aus dem Crude-Extrakt als auch aus dem Hämolymp-Extrakt gewonnen wurden. Die biochemische, biophysikalische und immunologische Charakterisierung der isolierten Per a 3- und Per a 9 Allergene wird in den Abschnitten 3.3 und 3.4 behandelt.

3.1 Charakterisierung der Zusammensetzung und Reproduzierbarkeit der Extrakte

3.1.1 Vergleichende Untersuchungen von Hämolymp- und Crude-Extrakt, sowie erste Proteinzugeweisungen

Obwohl die Herstellung eines Crude-Extraktes eine gängige Methode darstellte, ist sie nicht nur aufgrund der enormen Scherkräfte im Mixer, sondern auch aufgrund der zusätzlichen Proteasen (z.B. aus dem Magen der Tiere) für Allergene ein nicht-schonendes Verfahren. Deutlich schonender für die Allergene war die Herstellung eines Hämolymp-Extraktes. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht alle Allergene aus der Amerikanischen Schabe auch tatsächlich in diesem Extrakt vorhanden sein konnten.

Die nachfolgenden Versuche zielten darauf ab, die Zusammensetzung der Extrakte zu vergleichen, wobei insbesondere von Interesse war, ob im Crude-Extrakt Veränderungen der Hämolymp-Proteine -insbesondere von Per a 3- auftraten. Hierzu wurden neben den spektrometrischen und enzymatischen Eigenschaften, die Extrakte auf unterschiedlichen Matrizen aufgetrennt, deren Zusammensetzung analysiert und in den Extrakten erste Proteine zugewiesen.

Grundlage aller Versuche war die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Extrakten. Diese wurden zunächst über die Ermittlung der Trockenmasse auf einen Konzentrationsbereich eingeengt und anschließend über Absorptionsspektroskopie genauer bestimmt.

3.1.1.1 Trockenmasse der Extrakte

Rein optisch unterschieden sich der Crude-Extrakt (CE) und die Hämolymphe (HL) in ihrer Färbung. Der CE war bräunlich gefärbt und die HL eher ockerfarbig (Abb. 3-2). Zusätzlich besaß der Crude-Extrakt einen starken Eigengeruch.



Abb. 3-2: Crude-Extrakt (CE) und Hämolymphe (HL) der zweiten Schabencharge. Rein optisch unterschieden sich beide Extrakte in ihre Färbung. Der CE hatte einen ins braune gehenden Farbton, wohingegen die HL ockerfarbig war. Zusätzlich wies der Crude-Extrakt einen starken Eigengeruch auf.

Zur Bestimmung der Trockenmasse beider Extrakte wurden 250 µl Probe für 18 h in der Gefriertrocknung getrocknet und die verbleibende Trockenmasse abgewogen.

Daraus ergab sich jeweils bezogen auf 1 ml für die Hämolymphe (HL-2) eine Trockenmasse von 71.43 mg und für den offensichtlich stärker verdünnten Crude-Extrakt eine von 59.98 mg.

Da insbesondere im Crude-Extrakt zusätzlich zu den Proteinen weitere Substanzen wie DNA, RNA und Lipide vorhanden waren, konnte die Trockenmasse nicht mit der Proteinmasse gleichgesetzt werden. Um die Proteinmasse und davon ausgehend die Proteinkonzentration angeben zu können, wurde der spezifische Extinktionskoeffizient der Extrakte bei 280 nm bestimmt.

3.1.1.2 Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten des Hämolymphe- und Crude-Extraktes

Hierzu wurde zunächst die Konzentration der in Phosphatpuffer B umgepufferten Extrakte sowohl mittels Bradford- als auch mittels Lowry-Assay bestimmt. Für eine höhere Genauigkeit wurden pro Assay zwei Eichgeraden mit zwei verschiedenen Proteinen verwendet: BSA und, aufgrund der Ähnlichkeit zu den Per a 3-Proteinen, das Hämocyanin von *Palinurus elephas* (Hc P.e.). Zusätzlich zur kalorimetrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und beide Werte im Lambert-Beerschen Gesetz korreliert. Diese Methode lieferte für die Extrakte die in Tabelle 3-1 dargestellten spezifischen Extinktionskoeffizienten:

Extrakt	Protein der Eichgeraden	ϵ_{280} basierend auf der Konzentrationsbestimmung nach Bradford [l/(g*cm)]	ϵ_{280} basierend auf der Konzentrationsbestimmung nach Lowry [l/(g*cm)]	Mittelwert von ϵ_{280} [l/(g*cm)]
HL-2	BSA	0.79	1.37	1.4
	Hc	0.90	1.42	
CE	BSA	5.61	1.99	2.0
	Hc	6.14	2.06	

Tabelle 3-1: Spezifische Extinktionskoeffizienten für den Hämolymp-Extrakt (HL-2) und den Crude-Extrakt (CE). Die Extinktionskoeffizienten wurden mit zwei unterschiedlichen kalorimetrischen Methoden sowie zwei unterschiedlichen Proteinen für die Eichgeraden ermittelt. Beide Extrakte stammten aus der zweiten Schabencharge.

Der Vergleich der Extinktionskoeffizienten zeigte, dass beide Assays deutlich differierende Ergebnisse lieferten. Die größten Diskrepanzen traten hierbei mit einem Faktor drei bei dem Crude-Extrakt auf (Tabelle 3-1). Dieser Extrakt bestand aus einer Vielzahl an Substanzen, darunter auch DNA, die sich laut Produktbeschreibung auf den Bradford-Assay störend auswirken könnte, wohingegen DNA bei dem verwendeten Lowry-Assay nicht als Störfaktor aufgeführt wurde [99, 252]. Aus diesem Grund und da die Extinktionswerte in Abhängigkeit vom Eichprotein lediglich um 4% voneinander abwichen, wurde als Richtwert für die Konzentrationsbestimmung der Extrakte der Mittelwert der Extinktionskoeffizienten aus den Lowry-Bestimmungen verwendet. Somit wurde für weitere Berechnungen für die HL-2 als Richtwert $\epsilon_{280}=1.4$ [l/(g*cm)] und für den CE als Richtwert $\epsilon_{280}=2.0$ [l/(g*cm)] verwendet.

Trotz zahlreicher Versuche gelang es in dieser Arbeit nicht, den spezifischen Extinktionskoeffizienten der HL-1 experimentell zu bestimmen. Da -wie nachfolgend in diesem Abschnitt erläutert- die Zusammensetzung von HL-1 und HL-2 unterschiedlich war, konnte der spezifische Extinktionskoeffizient von HL-2 nicht auf HL-1 übertragen werden.

In HL-1 stellten die Per a 3-Proteine den Proteinhauptanteil und waren zu nahezu gleichen Anteilen vertreten. Aus diesem Grund wurde für HL-1 als spezifischer Extinktionskoeffizient der Mittelwert der spezifischen Extinktionskoeffizienten der Per a 3-Isoformen mit $\epsilon_{280}=1.5$ [l/(g*cm)] angenommen.

Basierend auf diesen spezifischen Extinktionskoeffizienten wurden die Proteinkonzentrationen der nicht-umgepufferten Extrakte über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Als hinderlich erwies sich dabei die Tatsache, dass die aliquotierten Hämolymp-Extrakte zunächst nicht vereinigt wurden und es somit aufgrund der Probenpräparation nicht nur zu unterschiedlichen Proteinkonzentrationen, sondern auch zu Unterschieden in den Extraktzusammensetzungen und somit zu etwas veränderten spezifischen Extinktionskoeffizienten kommen musste. Da die Proben außerdem zusätzlich vor den Experimenten zentrifugiert wurden und stets eine Pelletbildung beobachtet wurde (Pellet enthielt Protein, überprüft mit

SDS-PAGE, Daten nicht gezeigt), konnten die Proteinkonzentrationen in den Aliquots auch nicht als konstant angesehen werden. Daher waren die über die Absorption der Extrakte ermittelten Konzentrationen (Tabelle 3-2) nicht als Absolutwerte zu verstehen, sondern dienten lediglich der Abschätzung.

Extrakt	ϵ_{280} [l/(g*cm)]	Konzentration [mg/ml]
HL-1	1.5*	37
HL-2	1.4	46
CE	2.0	39

Tabelle 3-2: Proteinkonzentration der verwendeten Schabenextrakte.

*Trotz zahlreicher Versuche zur Ermittlung des spezifischen Extinktionskoeffizienten der HL-1 in verschiedenen Puffersystemen, gelang keine vertrauenswürdige Bestimmung. Da sich jedoch die Zusammensetzung der HL-1 von der HL-2 unterschied (s. Abschnitt 3.1.2.1), konnte der spezifische Extinktionskoeffizient nicht von HL-2 auf die HL-1 übertragen werden. Als spezifischer Extinktionskoeffizient wurde daher der Mittelwert der Extinktionskoeffizienten der Per a 3-Isoformen mit $\epsilon_{280\text{nm}}=1.5$ [l/(g*cm)] verwendet.

3.1.1.3 Absorptionsspektren

Wie zu Beginn des Abschnitts erwähnt, unterschieden sich der Crude-Extrakt und der Hämolymp-Extrakt bereits in ihrer Färbung (Abb. 3-2). Aus diesem Grund wurden von beiden stark verdünnten Extrakten UV/Vis-Spektren aufgenommen (Abb. 3-3).

Diese wiesen mehrere Besonderheiten auf: das für aromatische Aminosäuren typische Absorptionsmaximum bei 278 nm war im Crude-Extrakt in den UV-Bereich zu 271 nm verschoben. Zusätzlich war in diesem Extrakt eine gegenüber der Hämolymphe deutlich höhere Absorption im nahen UV-Bereich zu beobachten. Durch Verdünnungsexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um ein reines Streuartefakt handelte. Daher musste davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um die Absorption von Crude-Extrakt-Bestandteilen wie z.B. DNA und RNA handelte, deren Adenosin-Bausteine bei 260 nm absorbierten. Zusätzlich konnte im Crude-Extrakt noch ein weiteres Absorptionsmaximum bei 410 nm detektiert werden, welches in der Hämolymphe nicht auftrat (Abb. 3-3).

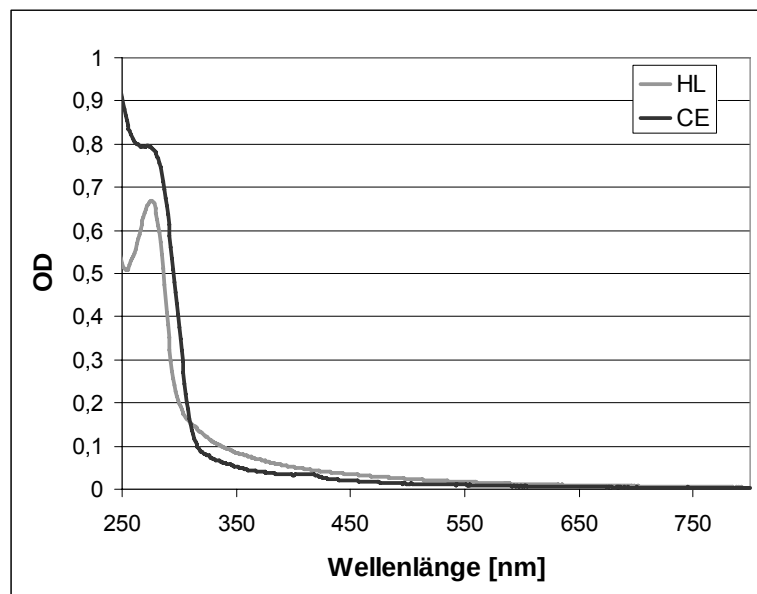


Abb. 3-3: Absorptionsspektren der beiden Schabenextrakte.

Hämolymphe (HL) und Crude-Extrakt (CE) wurden für diese Spektren 1:100 mit Schabenpuffer D verdünnt. Alle Spektren wurden gegen den Puffer korrigiert.

Die HL absorbierte maximal bei 278 nm und wies bis 800 nm keine weiteren Absorptionsmaxima, sondern eine langsam abfallende Absorption zwischen 300 nm und 600 nm auf. Auch im CE war die typische Absorption der aromatischen Aminosäuren zu beobachten, war jedoch zu 271 nm verschoben. Der CE wies durch die schwache Absorption bei 410 nm eine weitere Besonderheit auf, die in der HL nicht beobachtet wurde.

Das Absorptionsspektrum der Hämolymphe war im Wesentlichen durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 278 nm gekennzeichnet (Abb. 3-3). Weiterhin wurde eine zwischen 300 nm und 600 nm nur langsam abfallende Absorption beobachtet, die auch bei Normierung der Spektren auf die gleiche Proteinkonzentration weiterhin im Bereich von 350 nm erhöht war (Spektrum nicht gezeigt).

Der Vergleich der Quotienten von OD280/OD260 ergab für die Hämolymphe 1.18 und für den Crude-Extrakt 0.95, was auf einen höheren Streuanteil und/oder höherer Anteil an Adenosin-Bestandteilen im CE gegenüber der HL hinwies.

3.1.1.4 Gelelektrophoretisches Verhalten

Um die Extrakte auf Proteinebene weiter analysieren zu können, wurden die Proben auf SDS- und nativen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und zusätzlich im Western-Blot (WB) mit polyklonalen anti-*Periplaneta americana* Hämolymphe-Antikörpern (anti-*P.a.* HL-AK) markiert. Ziel war zum einen der Vergleich der Bandenmuster von HL und CE sowie die Überprüfung, ob die Proteine im CE intakt oder degradiert waren.

Hierzu wurden die Extrakte zunächst zur Abdeckung eines breiten Molekulargewichtsbereichs in denaturierter Form auf einem 5-15%igen SDS-Gradientengel aufgetrennt (Abb. 3-4 A).

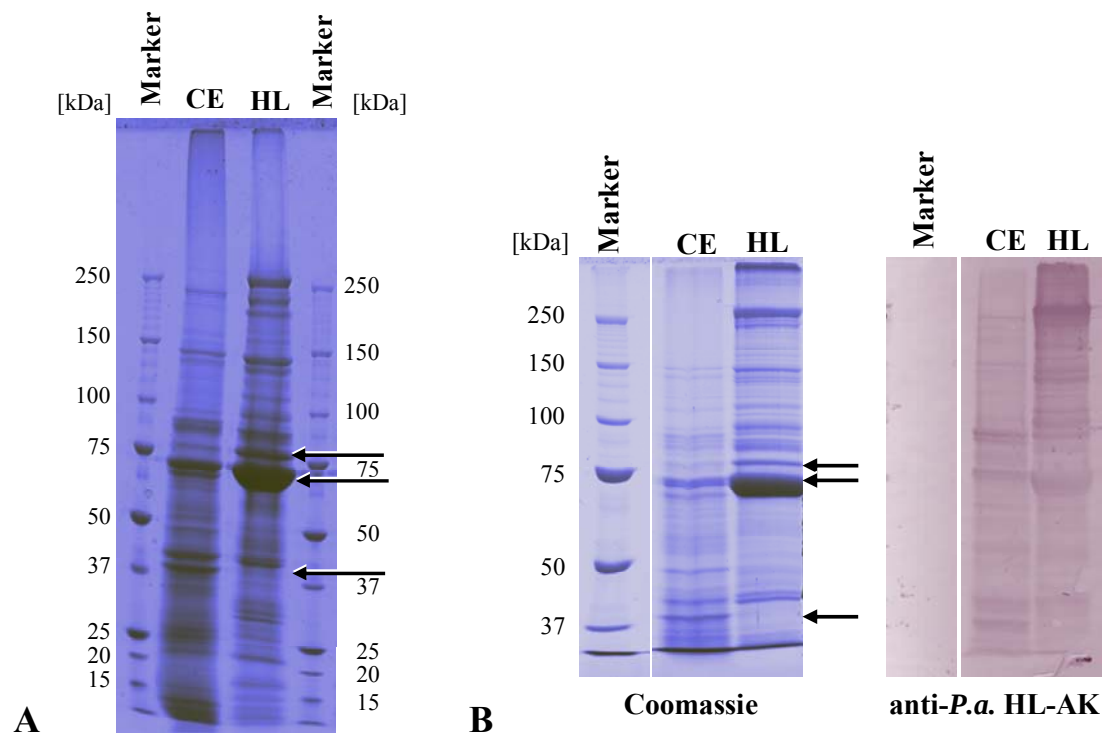


Abb. 3-4: Vergleich von Crude-Extrakt (CE) und Hämolymphe (HL) auf SDS-Gelen mit anschließender Detektion mit anti-*Periplaneta americana* Hämolymphe-Antikörper (anti-*P.a.*HL-AK) im Western-Blot (WB).

A) Auf dem SDS-Gradientengel (5-15%) wurden 91 µg HL und 78 µg CE aufgetragen. Als Marker wurde der BioRad-Proteinstandard verwendet. Die Proteindetektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung. CE und HL stammten aus der zweiten Schabencharge. Bei den mit Pfeilen markierten Proteinen handelte es sich von oben nach unten um zwei Per a 3-Isoformen sowie um Per a 9. Diese Proteine wurden in dieser Arbeit identifiziert, isoliert und charakterisiert. In der HL dominierten denaturierte Proteine mit einem Molekulargewicht von über 60 kDa, wohingegen im CE Proteine hauptsächlich unter 75 kDa vertreten waren.

B) Für diese 7.5%ige SDS-PAGE wurden 16 µg CE und 18 µg HL-2 aufgetragen. Als Marker wurde der BioRad-Proteinstandard verwendet. Bei den mit Pfeilen markierten Proteinen handelte es sich von oben nach unten um zwei Per a 3-Isoformen sowie um Per a 9. Das Referenzgel wurde mit der Coomassie-Färbung gefärbt und die übrigen Proben im Western-Blot Verfahren geblottet. Die Proben stammten aus der zweiten Schabencharge. Als Primärantikörper wurde anti-*P.a.* HL-AK 1:100000 und als Sekundärantikörper anti-rabbit-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase 1:1000 verwendet.

Die AK-Markierung bestätigte, dass in der HL gegenüber dem CE ein deutlich größerer Anteil an hochmolekularen Proteinbanden von über 60 kDa vorhanden war, wohingegen im CE eher Proteine unter 75 kDa dominierten. Diese Bandenverteilung deutete darauf hin, dass Hämolymphe-Proteine im CE teilweise zu niedermolekularen Proteinen degradiert wurden. Die Per a 3-Isoformen (mit den oberen Pfeilen markiert) waren in beiden Extrakten vorhanden, wohingegen Per a 9 (unterer Pfeil) im HL-Extrakt nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden war.

Sowohl die HL als auch der CE wiesen auf dem SDS-Gradientengel zahlreiche Proteinbanden in einem Molekulargewichtsbereich von 250 kDa bis 10 kDa auf (Abb. 3-4 A). Die Pfeile markierten dabei, von oben nach unten gesehen, zwei Per a 3-Isoformen (HL und CE) und Per a 9 (CE), die in nachfolgenden Abschnitten 3.3 und 3.4 isoliert, identifiziert und charakterisiert wurden (Abschnitte 3.2 bis 3.4). Die Per a 3-Isoformen (mit den oberen Pfeilen markiert) waren in beiden Extrakten vorhanden, wohingegen Per a 9 (unterer Pfeil) im HL-Extrakt nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden war.

Insgesamt waren Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von über 60 kDa in der HL stärker vertreten als im CE; im CE dominierten dagegen Proteine unter 75 kDa.

Diese Beobachtungen wurden auch auf einer 7.5%igen SDS-PAGE mit anschließender anti-*P.a.* HL-AK-Detektion im Western-Blot bestätigt (Abb. 3-4 B): die Markierung der HL-spezifischen Proteine (und eventuell kreuzreagierender Proteine) wies in der HL eine höhere Bandenzahl von über 60 kDa auf, wohingegen im CE die Markierung der niedermolekularen Proteine dominierten. Eventuell war dieser Effekt auf die stärkere Verdünnung der HL-Proteine im CE zurückzuführen oder auf Kreuzreaktionen mit CE-Proteinen oder aber darauf, dass die HL-Proteine im CE zu niedermolekularen Proteinen degradiert worden waren.

Aus diesem Grund wurden die Extrakte ebenfalls auf der nativen PAGE analysiert. Hierbei wurde zunächst überprüft, ob der pH-Wert des Trenngels (pH 8.8 und pH 7.5) einen signifikanten Einfluss auf die Bandentrennung und -schärfe hatte (Abb. 3-5).

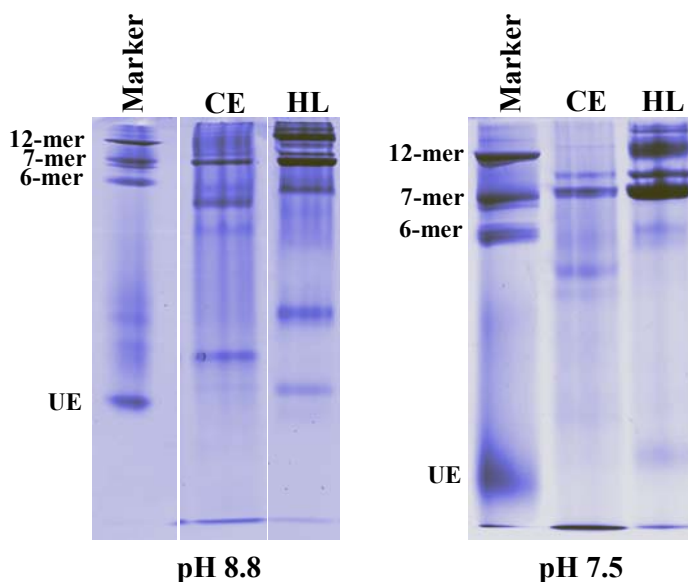


Abb. 3-5: 7.5%ige native PAGE mit Trenngelpuffer pH 8.8 bzw. pH 7.5.

Es wurden 16 µg CE und 19 µg HL auf dem pH 8.8 Gel und 51 µg HL und 43 µg CE auf dem pH 7.5 Gel im Verhältnis 2:3 mit nativem Probenpuffer (BPB) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung. Als Referenz wurde das andissoziierte Hämocyanin von *Astacus astacus* (Astacus-Marker) verwendet.

Der differierende pH-Wert im Trenngel hatte den größten Einfluss auf die bei pH 8.8 weiter in das Gel eingewanderten Proteine. Da bei pH 8.8 eine bessere Bandentrennung und -schärfe zu beobachten war, wurden native Gele nachfolgend standardmäßig mit pH 8.8 im Trenngelpuffer verwendet.

Der differierende pH-Wert im Trenngel hatte den größten Einfluss auf die bei pH 8.8 weiter in das Gel eingewanderten Proteine, die bei pH 7.5 eine völlig andere Mobilität aufwiesen (Abb. 3-5). Da bei pH 8.8 eine bessere Bandentrennung und -schärfe beobachtet wurde, wurden nativen Gele nachfolgend standardmäßig mit pH 8.8 im Trenngelpuffer verwendet.

Auf den nativen Gelen zeigten beide Extrakte interessanter Weise eine gegenüber der SDS-PAGE deutlich reduzierte Bandenzahl: in der HL wurden etwa acht und im CE sieben deutliche Banden mit der Coomassie-Färbung unterschieden. Von diesen Banden zeigten die in der HL die geringste Mobilität und eine ähnliche elektrophoretische Beweglichkeit wie die 6-mere und 12-mere des Hämocyanin-Markers (*Astacus astacus*, *Astacus*-Marker) (Abb. 3-5). Dies war entweder auf höhere Proteinaggregate, bestehend aus unterschiedlichen Untereinheiten, oder aber auf unter den Bedingungen nur schwach negativ geladene Proteine zurückzuführen.

Zunächst wurde überprüft, ob diese Aggregate im CE eventuell dissoziiert vorlagen. Dazu wurden die Extrakte auf einer nativen PAGE getrennt, geblottet und mit anti-*P.a.* HL-AK detektiert. Als Referenzgel wurde ein identisch beladenes Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 3-6).

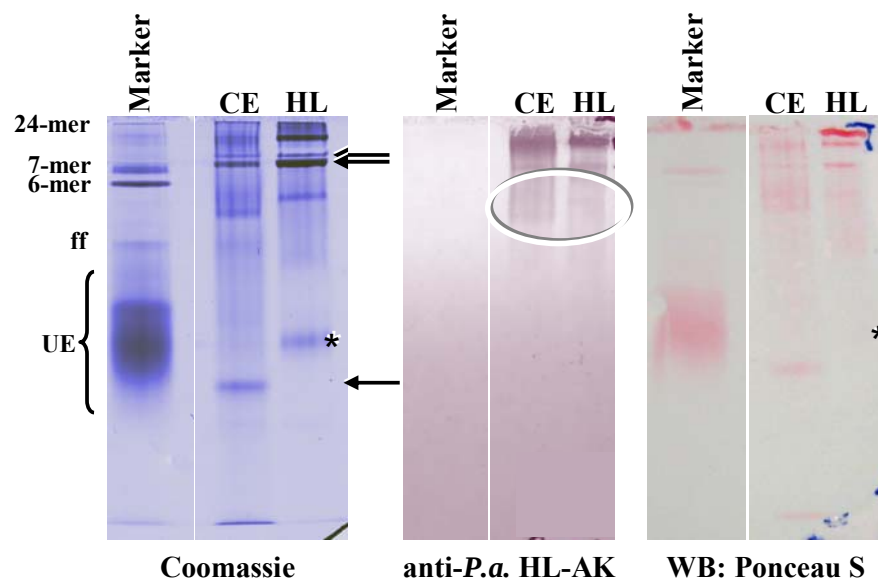


Abb. 3-6: 7.5%ige native PAGE mit anschließender anti-*Periplaneta americana* Hämolymphe-Antikörper (anti-*P.a.* HL-AK)-Detektion im WB.

Für die native PAGE wurden je 16 µg CE und 18 µg HL 2:3 mit BPB versetzt auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet. Das Referenzgel wurde mit der Coomassie-Färbung gefärbt und die übrigen Proben im Western-Blot Verfahren geblottet. Als Referenz für den erfolgreichen Blot wurde zusätzlich die mit Ponceau S-gefärbte Membran dokumentiert. Als Primärantikörper wurde anti-*Periplaneta americana* Hämolymphe-Antikörper (anti-*P.a.* HL-AK) 1:100000 und als Sekundärantikörper anti-rabbit-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase 1:1000 verdünnt verwendet.

Trotz unterschiedlicher Bandenmuster auf der nativen PAGE erkannte der anti-*P.a.* HL-AK mit der stärksten Färbung sowohl in der HL als auch im CE identische Banden. Zum einen zeigte dies vor allem bei der Crude-Extrakt Probe die hohe Sensitivität der AK-Färbung als auch, dass im CE keine Dissoziation oder Degradation der HL-Proteine stattgefunden hatte. Lediglich in dem eingekreisten Bereich erkannte der AK in CE und HL sehr diffuse, jedoch unterschiedliche Proteinbanden. Die mit * gekennzeichnete Proteinbande wurde vom AK nicht erkannt. Eventuell war die Probe nach dem Transfer zu gering konzentriert, da sie auch bei der Ponceau S-Färbung nicht zu erkennen war. Die mit Pfeilen markierten Proteinen entsprachen denen in der SDS-PAGE markierten Per a 3-Isoformen sowie Per a 9 (von oben nach unten) (Abb. 3-5).

Die Detektion mit dem anti-*P.a.* HL-AK zeigte deutlich, dass im CE ebenso wie in der HL im Wesentlichen die oberen Banden vom anti-*P.a.* HL-AK erkannt wurden (Abb. 3-6). Dies verdeutlichte zum einen die hohe Sensitivität der AK-Färbung im Western-Blot, da die HL-Proteine im CE in stark verdünnter Form vorlagen. Zum anderen konnte darüber ausgeschlossen werden, dass die markierten Proteinaggregate im CE vollständig dissoziiert waren. Insgesamt wurden in der HL und im CE vom AK identische Banden erkannt. Lediglich in dem auf dem Western-Blot eingekreisten Bereich erkannte der AK in den Extrakten diffuse, jedoch etwas unterschiedliche Proteinbanden, die nicht näher identifiziert wurden.

Von besonderem Interesse für diese Arbeiten waren die drei mit Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden, bei denen es sich um zwei Per a 3-Proteine und Per a 9 handelte (von oben nach unten), die bereits ebenfalls bei der SDS-PAGE kennzeichnet wurden (Abb. 3-6). Auch diese nativen Gele bestätigten das Vorkommen der Per a 3-Isoformen in beiden Extrakten in ihrer nativen hexameren Oligomerisierung, deren Mobilität bereits aus meiner Diplomarbeit bekannt war [148]. Per a 9 war in der HL nicht zu erkennen (Abb. 3-6).

Die mit * gekennzeichnete HL-Proteinbande wurde vom anti-*P.a.* HL-AK nicht erkannt. Eventuell war sie nach dem Transfer zu gering konzentriert, da sie auch nicht mit Ponceau S angefärbt wurde. Andere Banden mit einer ähnlichen Mobilität wurden erfolgreich transferiert, wie die Ponceau S-Färbung bestätigte (Abb. 3-6).

Da die Bandenanzahl auf der SDS-PAGE die Anzahl der Banden auf der nativen PAGE deutlich überstieg, lag die Vermutung nahe, dass in der Hämolymphe neben Proteinaggregaten (Multimere) positiv geladene Proteine vorhanden waren, die auf den nativen Gelen aufgrund des Versuchsaufbaus nicht detektiert werden konnten. Daher wurde eine weitere native PAGE durchgeführt, bei der Anode und Kathode gewechselt wurden, sodass in diesem System positiv geladene Proteine in die Matrix einwandern konnten. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten allerdings weder mit der Coomassie-Färbung noch mit der Silberfärbung nach Nesterenko Proteinbanden im Gel detektiert werden (Abbildung nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen wurde, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei beiden Extrakten keine positiv geladenen Proteine in die Gelmatrix einwanderten.

3.1.1.5 Größenausschlusschromatographie

Um einen Größenvergleich nativer HL- und CE-Proteinen zu ermöglichen und auch eventuell positiv geladene Proteine mit berücksichtigen zu können, wurden beide Extrakte auf einer Größenausschlussäule (SEC, S-300, 16/60) mit identischen Protokollen aufgetrennt und die relevanten Fraktionen sowohl auf einer SDS-PAGE als auch auf einer nativen PAGE analysiert (Abb. 3-7). Die Auftrennung erfolgte in Anlehnung an die Größenausschlusschromatographie von Protokoll 2 mit einem etwas veränderten Fraktionssammelfenster (Abschnitt 2.3.5).

Die Hämolymphe eluierte von der SEC in fünf Peaks, von denen die zwei dominantesten bei 59 ml und 86.5 ml von der Säule eluierten (Abb. 3-7). Der Crude-Extrakt hingegen eluierte in acht Peaks von denen die zwei größten Peaks bei 59 ml und 151 ml von der Säule eluierten.

Ein ausgeprägter Elutionspeak (hier bei 150.5 ml) mit hoher Absorption war bei allen säulen-chromatographischen Schritten des Crude-Extraktes zu beobachten und konnte weder auf einer SDS- noch auf einer nativen PAGE einem Protein zugeordnet werden. Wahrscheinlich handelte es sich daher um ein bei 280 nm absorbierendes Pigment.

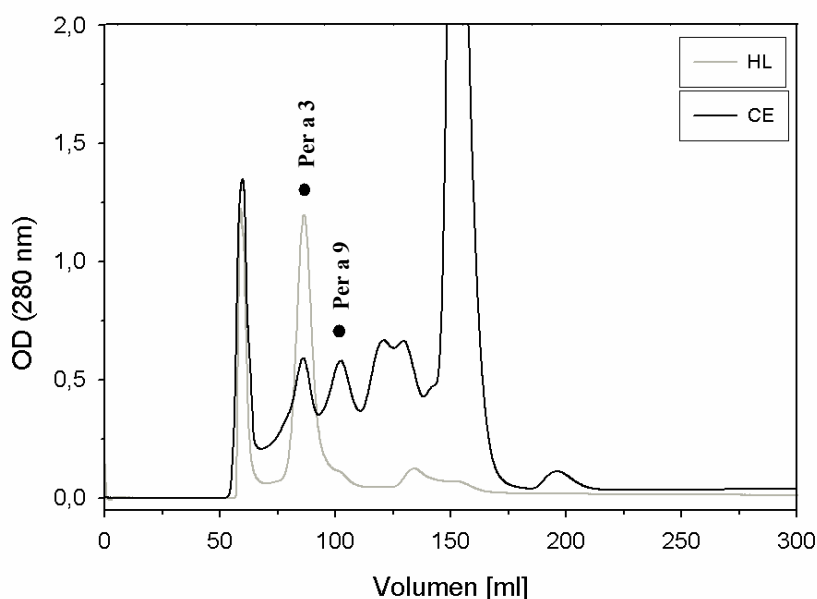


Abb. 3-7: Vergleich der mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) erhaltenen Elutionsprofile von CE und HL.

Es wurden 42 mg HL bzw. 78 mg CE auf die Größenausschlusssäule (S-300; 16/60) bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. aufgegeben und mit Schabepuffer D eluiert.

Der erste Punkt bei 86.5 ml markierte die Elution von Per a 3, der zweite Punkt bei 101.5 ml die Elution von Per a 9 (Retentionsvolumina 84.5 ml und 99.5 ml). Ein ausgeprägter Peak mit hoher Absorption, hier bei 150.5 ml trat im Crude-Extrakt immer bei Säulenchromatographien auf, konnte jedoch keinem Protein zugeordnet werden. Es könnte sich um ein bei 280 nm absorbierendes Pigment gehandelt haben.

Dieser SEC-Lauf bestätigte zum Teil die Beobachtung auf den nativen Gelen: der CE enthielt deutlich mehr kleinere Proteine als die HL. Ob in der HL tatsächlich größere Proteine als im CE vorhanden waren, konnte mit dieser SEC nicht beantwortet werden, da der erste Peak dem Ausschlussvolumen der Säule entsprach.

Insgesamt zeigten die Elutionsprofile der SEC eindeutig, dass im CE der Anteil an niedermolekularen Proteinen gegenüber der HL deutlich erhöht war, ohne, dass hochmolekulare Proteine vollständig dissoziierten oder degradiert waren (Abb. 3-7). Ob in der HL tatsächlich größere Proteine als im CE vorhanden waren, konnte mit dieser SEC nicht beurteilt werden, da der erste Peak dem Ausschlussvolumen der Säule entsprach und demnach sämtliche Proteine und Aggregate enthielt, die größer als 1.5 MDa waren. Die in dieser Arbeit aufgereinigten und charakterisierten Allergene Per a 3 und Per a 9 wurden in diesem Elutionsprofil (Abb. 3-7) beschriftet und mit Punkten markiert. Die Zuordnung der Allergene

erfolgte über Massenspektrometrie der aus der Reinigung hervorgegangenen Proteine (Abschnitt 3.2) und ist in Abschnitt 3.3 für Per a 3 und für Per a 9 in Abschnitt 3.4 dargelegt.

3.1.1.6 Phenoloxidase-Aktivität

Phenoloxidasen übernehmen bei Insekten verschieden Rollen: sie sind an der Sklerotisierung von Ootheken und Cuticla, bei der Immunabwehr gegen eindringende Mikroorganismen und beim Wundverschluss beteiligt [231, 287-289]. Auch in der Hämolymphe von *Periplaneta americana* wurde in der Literatur bereits eine Prophenoloxidase-Aktivität beschrieben [290].

Unter der Bezeichnung Phenoloxidase(aktivität) werden zwei Aktivitäten zusammengefasst: die Monophenoloxidase- und die Diphenoloxidaseaktivität, die zwei prinzipiell verschiedene Reaktionen katalysieren. Die Monophenoloxidase, auch Tyrosinase genannt kann sowohl Mono- als auch Diphenole umsetzen, wohingegen die Diphenoloxidase, die auch als Catecholoxidase bezeichnet wird lediglich Diphenole umsetzen kann [265].

Für eine erste Untersuchung, ob sowohl im Crude-Extrakt als auch in der Hämolymphe unter den gegebenen Pufferbedingungen (Crude-Extrakt- bzw. HämolympHPuffer) eine Phenoloxidase-Aktivität nachgewiesen werden kann, wurden die Extrakte in einem ersten Schnelltest mit dem MBTH-Assay im Dot-Blot-Verfahren untersucht.

MBTH-Assay der Schabenextrakte im Dot-Blot

Hierfür wurden beide Extrakte mit und ohne Aktivierung durch SDS zum Nachweis der Diphenoloxidase-Aktivität mit Dopamin und zum Nachweis der Monophenoloxidase-Aktivität mit Tyramin versetzt. Als Negativkontrolle dienten Schabenpuffer B und D und als Positivkontrolle wurden zwei um den Faktor 10 unterschiedliche Konzentrationen an Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (Tyr) verwendet. Da beide Extrakte eine deutliche Eigenfärbung besaßen (Abb. 3-2), wurde als zusätzliche Kontrolle die Eigenfärbung der Extrakte dokumentiert (Abb. 3-8).

In der HL war sowohl mit als auch ohne SDS eine deutliche Diphenoloxidase-Aktivität nachweisbar, wohingegen im CE kein Umsatz von Dopamin beobachtet wurde; auch Tyramin konnte vom CE nicht umgesetzt werden. Der Umsatz von Tyramin konnte in der HL aufgrund der Eigenfärbung des Extraktes nicht mit Sicherheit ausgewertet werden. Eventuell war eine schwache Monophenoloxidase-Aktivität vorhanden (Abb. 3-8).

Dopamin	HL	CE	Tyr 0.3 µg; 3 µg	Puffer: Schabenpuffer D und B
mit SDS			 	 
ohne SDS			 	 
Eigenfärbung				
Tyramin	HL	CE	Tyr 0.3 µg; 3 µg	Puffer: Schabenpuffer D und B
mit SDS			 	 
ohne SDS			 	 

Abb. 3-8: Phenoloxidase-Aktivität im MBTH-Assay des Hämolympf- (HL) und Crude-Extraktes (CE) mit den Substraten Dopamin und Tyramin im Dot-Blot-Verfahren.

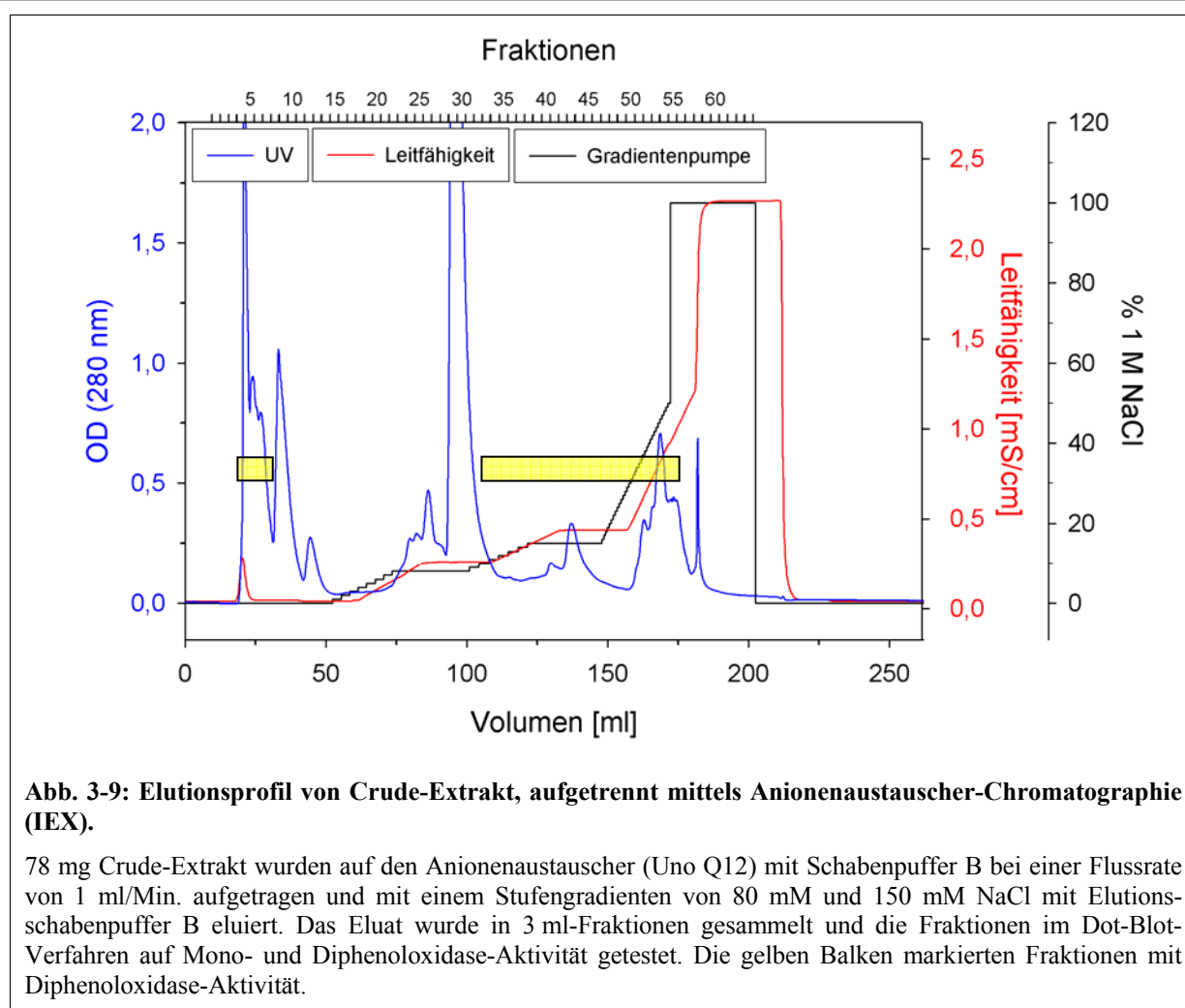
Für diesen Dot-Blot wurden 137 µg HL, 117 µg CE und 0.3 µg (links) bzw. 3 µg (rechts) Tyrosinase von *Agaricus bisporus* (Tyr) verwendet. Um die Autooxidation des Dopamins abschätzen zu können, wurden als Negativkontrollen Schabenpuffer B und D mit der Färbelösung versetzt. Als Positivkontrolle wurde die Tyrosinase von *Agaricus bisporus* (Tyr) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die Aktivitätsfärbung fand sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von SDS statt. Für eine eindeutige Beurteilung der Aktivität wurde zusätzlich die Eigenfärbung der Extrakte dargestellt.

Die Hämolymphe konnte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von SDS unter den gegebenen Versuchsbedingungen Dopamin umsetzen und wies daher eine eindeutige Diphenoloxidase-Aktivität auf. Die Beurteilung der Monophenoloxidase-Aktivität in der HL war aufgrund der Eigenfärbung des Extraktes nicht eindeutig auswertbar. Der Crude-Extrakt wies weder eine Mono- noch eine Diphenoloxidase-Aktivität auf: weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von SDS wurden Tyramin oder Dopamin umgesetzt.

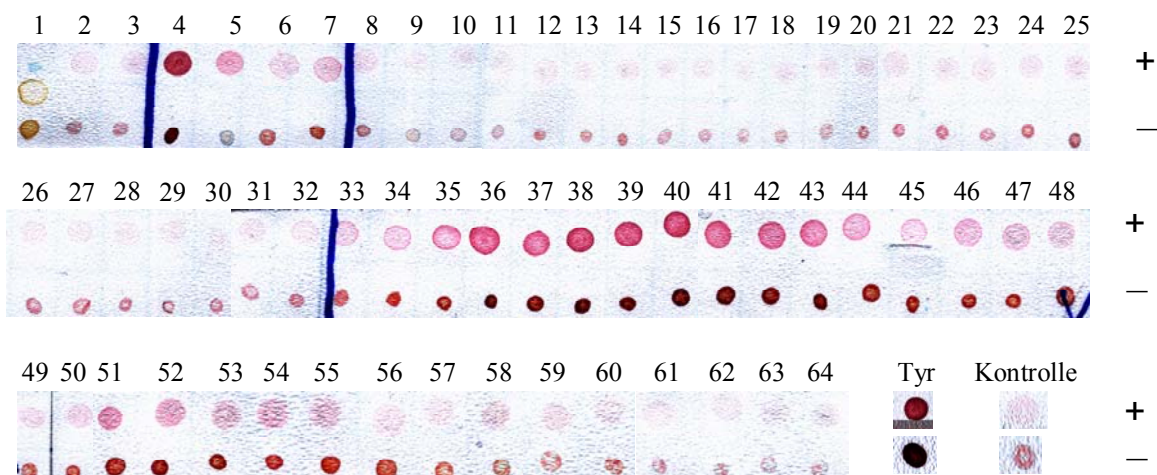
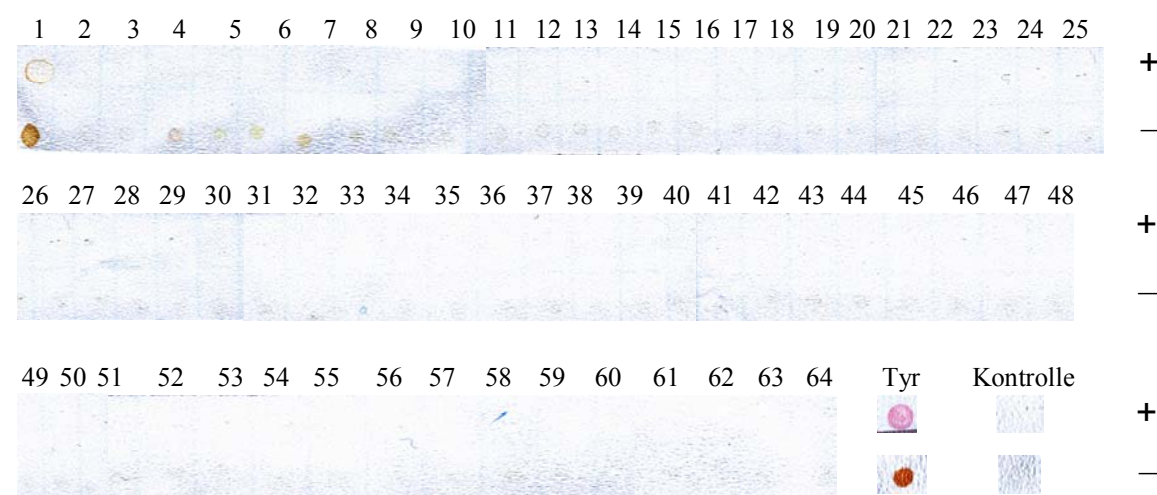
Um die Phenoloxidase-Aktivität bestimmten Proteinbanden zuweisen zu können, wurden sowohl einzelne Fraktionen von über den Anionenaustauscher getrenntem Crude-Extrakt erneut mit dem MBTH-Assay im Dot-Blot getestet als auch auf nativen Gelen aufgetrennte Hämolympf- und Crude-Extrakte mit der Aktivitätsfärbung angefärbt.

MBTH-Assay von mittels Anionenaustauscher-Chromatographie fraktioniertem Crude-Extrakt im Dot-Blot

Für die Trennung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX) wurde der Crude-Extrakt mit einem Stufengradienten auf einer Uno Q12-Säule aufgetrennt. Diese Chromatographie entsprach dem ersten Reinigungsschritt nach Protokoll 2 und ist unter Berücksichtigung der isolierten Proteine in Abschnitt 3.2.2 ausführlicher dargelegt.



In den ersten 15 Fractionen eluierten Proteine, die nicht an die Anionenaustauscher-Matrix gebunden hatten. Gebundene Proteine wurden stufenweise mit 80 mM und 150 mM NaCl haltigem Elutionspuffer B von der Säule verdrängt (Abb. 3-9). Die fractionierten Proben wurden anschließend im Dot-Blot Verfahren auf ihre Diphenol- bzw. Monophenoloxidase-Aktivität mit den Substraten Dopamin und Tyramin getestet (Abb. 3-10).

A) Dopamin**B) Tyramin****Abb. 3-10: Di- (A) und Monophenoloxidase-Aktivität (B) der IEX-Fractionen im Dot-Blot.**

A) Diphenoloxidase-Aktivität im MBTH-Assay. Es wurden 3 µl Eluat mit Dopamin als Substrat mit (+) und ohne (-) SDS als Aktivator versetzt. Als Positivkontrolle wurde 0.3 µg *Agaricus*-Tyrosinase („Tyr“) und als Negativkontrolle Schabenpuffer B („Kontrolle“) verwendet.

B) Monophenoloxidase-Aktivität im MBTH-Assay. Es wurden 3 µl Eluat mit Tyramin als Substrat mit (+) und ohne (-) SDS als Aktivator versetzt. Als Positivkontrolle diente 0.3 µg *Agaricus*-Tyrosinase, als Negativkontrolle Schabenpuffer B.

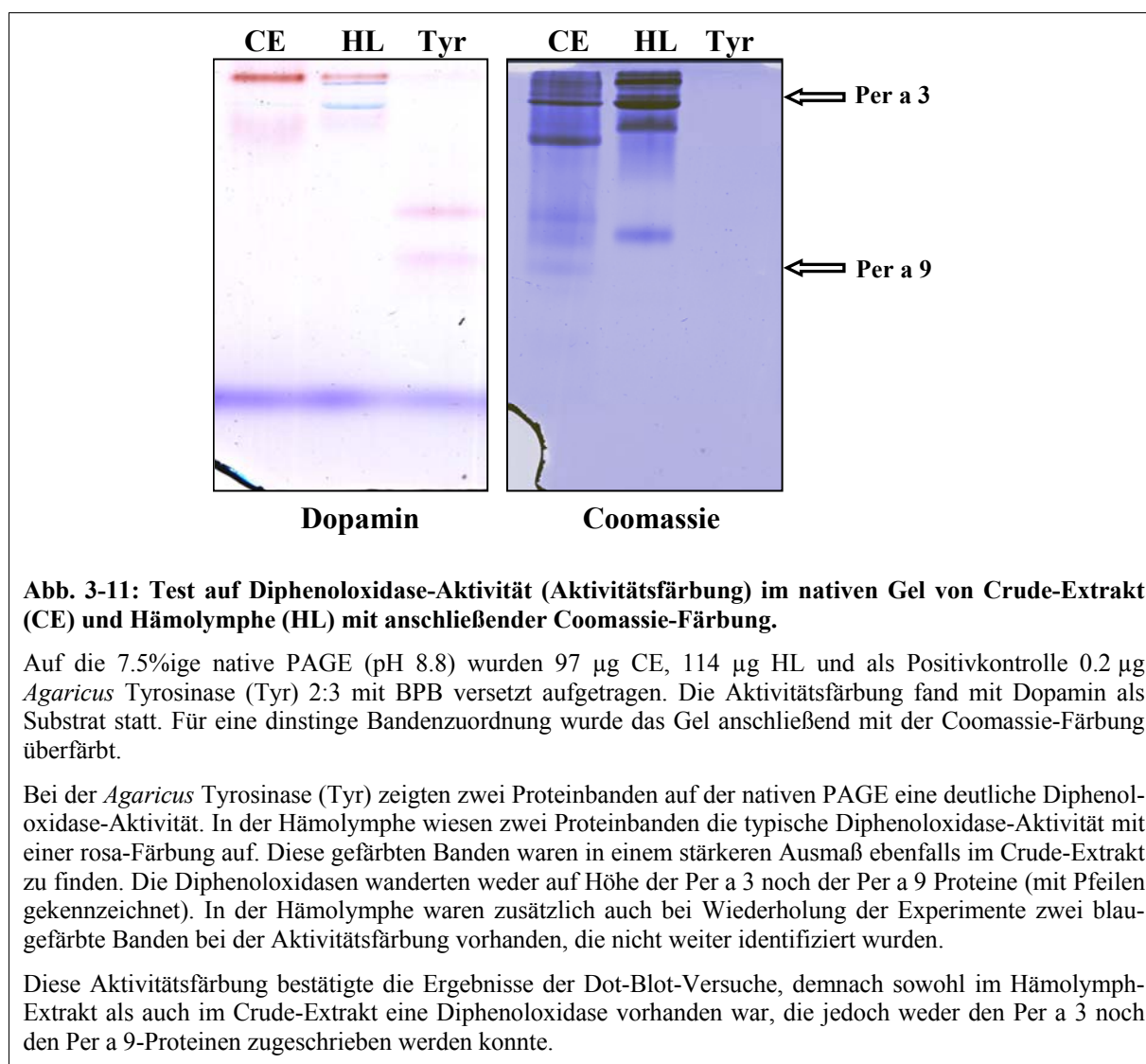
Die Fraktionen 4 bis 7 sowie die Fraktionen 33 bis 56 zeigten eindeutige Diphenoloxidase-Aktivität und wurden im Elutionsprofil (Abb. 3-9) als gelbe Balken eingezeichnet. Eine Monophenoloxidase-Aktivität wurde in keiner Fraktion nachgewiesen. Die an die Matrix gebundene Phenoloxidase eluierte über einen weiten Fraktionsbereich.

Die Analyse der einzelnen IEX-Fractionen zeigte eine eindeutige Diphenoloxidase-Aktivität in den Fraktionen 4 bis 7 sowie 33 bis 56, die im Elutionsprofil mit gelben Balken markiert wurden (Abb. 3-9, Abb. 3-10). Da die Phenoloxidase-Aktivität interessanter Weise nicht im unbehandelten CE, sondern nur nach chromatographischer Trennung beobachtet wurde, war im Extrakt eventuell ein Inhibitor der Diphenoloxidase vorhanden, der durch die IEX offenbar vom Enzym abgetrennt werden konnte.

Eine Monophenoloxidase-Aktivität konnte wie zuvor weder mit noch ohne SDS in den Fraktionen nachgewiesen werden und bestätigte somit die vorausgegangenen Dot-Blot-Ergebnisse (Abb. 3-8).

Aktivitätsfärbung auf der nativen PAGE

Um die gemessene Diphenoloxidase-Aktivität einer definierten Proteinbande zuordnen zu können, wurden die Extrakte auf nativen Gelen aufgetrennt und anschließend mit der Aktivitätsfärbung mit Dopamin als Substrat angefärbt. Für eine deutlichere Bandenzuweisung wurde das aktivitätsgefärbte Gel anschließend mit Coomassie überfärbt (Abb. 3-11).



Durch diese Aktivitätsfärbung wurden in der HL und dem CE jeweils zwei Proteinbanden unterschiedlicher Intensität angefärbt. Interessanterweise war diese Färbung trotz geringerer Proteinauftragung im Crude-Extrakt deutlich ausgeprägter als in der Hämolymphe. Das Vorhandensein je zweier aktiver Proteinbanden könnte auf eine partielle Dissoziation einer Diphenoloxidase oder auf zwei unterschiedliche Diphenoloxidasen hinweisen. Die aktivitäts-

gefärbten Banden zeigten eindeutig, dass die Aktivität weder auf Per a 3 noch auf Per a 9 zurückzuführen war.

Offensichtlich wurde die Phenoloxidase im Crude-Extrakt tatsächlich durch einen Inhibitor inhibiert, der sowohl säulen- als auch gelchromatographisch abgetrennt werden konnte.

Zusätzlich zur eigentlichen Aktivitätsfärbung wurden in der Hämolymphe auch bei einer Wiederholung der Experimente zwei Proteinbanden blau angefärbt (Abb. 3-11). Diese Färbung wurde als Hämolymphe-Artefakt eingestuft und in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Da auch in den ersten ungebundenen Fraktionen des IEX-Laufs eine Diphenoloxidase-Aktivität gefunden wurde, bei der es sich auch um ein unter diesen Bedingungen positiv geladenes Protein handeln haben könnte, wurden die Extrakt-Proben zusätzlich auf einer nativen PAGE mit umgekehrter Polung wiederholt. Allerdings konnten weder mit der Aktivitätsfärbung noch mit der Silberfärbung nach Nesterenko Proteinbanden in diesem Gele detektiert werden (Abbildung nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden musste, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine positiv geladene Diphenoloxidase in der Hämolymphe oder dem Crude-Extrakt vorhanden war.

3.1.2 Reproduzierbarkeit der Extrakte

Ein wichtiger Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Reproduzierbarkeit der verwendeten Extrakte. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob zum einen Aliquots einer Extrakt-Charge und zum anderen Hämolymphe-Extrakte aus verschiedenen Schabenchargen eine reproduzierbare Proteinzusammensetzung aufwiesen.

3.1.2.1 Vergleichende Untersuchungen der Hämolymphe aus zwei unterschiedlichen Schabenchargen

In dieser Arbeit wurden zwei Schabenchargen verwendet, aus denen mit identischem Verfahren die Hämolymphe gewonnen wurde. Beide Chargen setzten sich aus Weibchen und Männchen, Nymphen, diversen Larvenstadien sowie Ootheken zusammen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Isolierung und Charakterisierung der Per a 3-Allergene lag, wurden diese Allergene als Marker für die Reproduzierbarkeit der Extrakte verwendet.

Zusammensetzung auf Polyacrylamid-Gele

Um die Reproduzierbarkeit bei Aliquots einer Charge beurteilen zu können, wurden gleiche Volumina zufällig ausgewählter Proben der Hämolymphe der zweiten Schabencharge auf einer SDS-PAGE und einer nativen PAGE aufgetragen und mit 1 bis 6 in Abb. 3-12 gekennzeichnet. Pro Aliquot wurde die Hämolymphe von ca. 40 Tieren vereinigt.

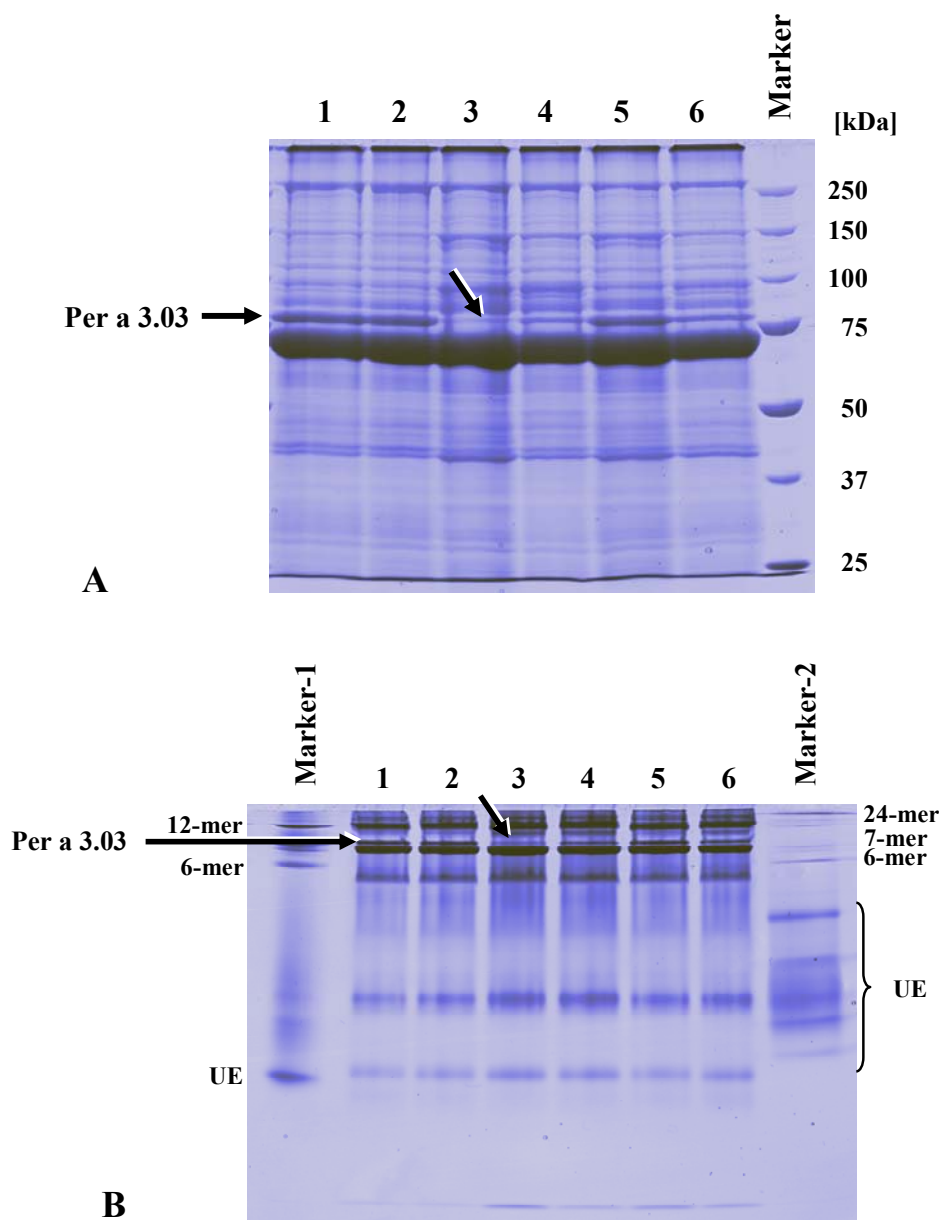


Abb. 3-12: Zusammensetzung ausgewählter Aliquots (1 bis 6) aus der zweiten Hämolymphe-Charge, analysiert auf SDS-PAGE (A) und nativer PAGE (B).

A) 7.5%ige SDS-PAGE. Es wurden pro Gelspur 0.42 µl Protein appliziert. Die Detektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung. Es wurde darauf verzichtet, die Proben auf die gleiche Konzentration zu normieren, um auch Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben erkennen zu können. Es wurde soviel Protein aufgetragen, dass zusätzlich zu Per a 3 auch geringer konzentrierte Proteine zu erkennen waren.

B) 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den SDS-Gelen wurden auch bei dieser PAGE 0.42 µl Protein zuvor 2:3 mit BPB verdünnt appliziert. Bei Marker-1 handelt es sich um den *Astacus*-Marker und bei Marker-2 um den *Eurypelma*-Marker. Die Detektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung.

Insbesondere bei Probe 3 war auf beiden Gelen der gegenüber den anderen Proben mit einem Pfeil gekennzeichnete differierende Gehalt an der 80 kDa-Per a 3-Isoform zu beobachten. Das Fehlen dieser Isoform wurde allerdings auch nicht durch zusätzliche Proteinbanden in dieser Probe kompensiert.

Dabei fiel auf, dass insbesondere der Anteil einer Per a 3-Isoform, die in dieser Arbeit als 80 kDa-Per a 3-Isoform oder auch als Per a 3.03 bezeichnet wurde (Tabelle 4-3, Übersicht

Namensgebung der Per a 3-Isoformen) gegenüber den restlichen Proteinen in den jeweiligen Proben signifikant schwankte. Am auffälligsten war dabei Probe 3, in der die 80 kDa-Per a 3-Isoform fast nicht vorhanden war (Abb. 3-12, mit Pfeil gekennzeichnet). Das Fehlen dieser Isoform wurde in Probe 3 offenbar auch nicht durch das Auftreten einer neuen Proteinbande kompensiert. Gegenüber dieser außerordentlichen Proteinschwankung waren die übrigen Unterschiede zwischen den Aliquots als vernachlässigbar gering einzustufen.

Diese Proteinverteilung der einzelnen Hämolympheproben war auch über einen Lagerungszeitraum von 16 Monaten bei -23°C unverändert (Abbildung nicht gezeigt).

Interessanterweise waren im Unterschied zur Hämolymphe aus der zweiten Charge die Aliquots der Hämolymphe aus der ersten Schabencharge (HL-1) insbesondere im Hinblick auf die 80 kDa-Per a 3-Isoform sehr gut reproduzierbar (Abbildung nicht gezeigt). Um dennoch miteinander vergleichbare Ergebnisse mit den Hämolympheproben aus der zweiten Schabencharge erhalten zu können, wurden die Proben 4 bis 9 dieser zweiten Charge vereinigt, erneut auf Polyacrylamid-Gelen analysiert allgemein als HL-2 bezeichnet (Abb. 3-13).

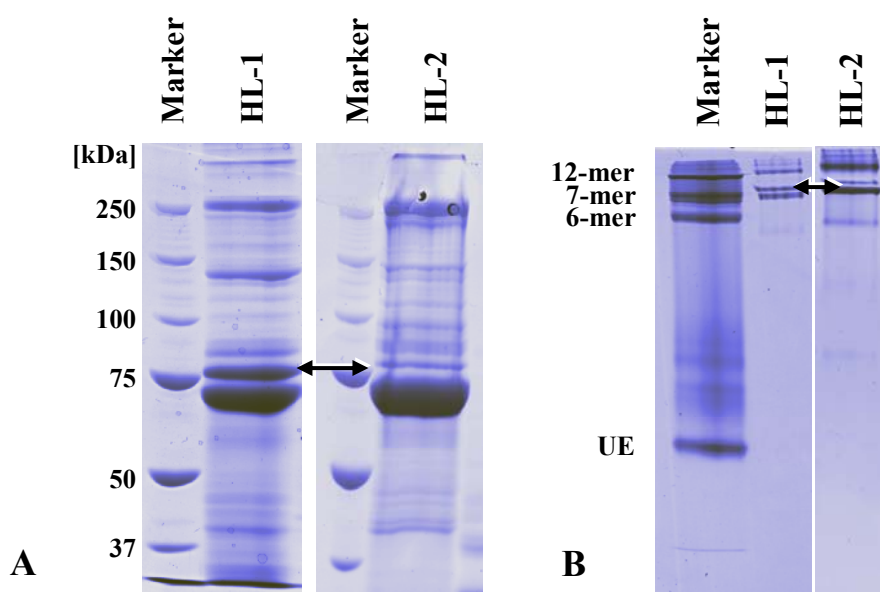


Abb. 3-13: Vergleich der Zusammensetzung von HL-1 und HL-2 auf SDS-PAGE (A) und nativer PAGE (B).

A) 7.5%ige SDS PAGE. Es wurden jeweils 36 µg HL-1 bzw. HL-2 auf die SDS-PAGE appliziert und mit der Coomassie-Färbung detektiert. Als Referenz wurde der BioRad-Proteinstandard verwendet.

B) 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Es wurden 4 µg HL-1 und 13 µg HL-2 im Verhältnis 3:4 mit BPB auf die native PAGE appliziert und mit der Coomassie-Färbung detektiert. Als Referenz diente der *Astacus*-Marker.

Insgesamt gab es bei der SDS-PAGE in dem kompletten Molekulargewichtsbereich u.a. in der Intensität differierende Proteinbanden. Am signifikantesten, vor allem im Hinblick auf diese Arbeit und die Reinigung von Per a 3, war auch nach Vereinigung der Aliquots der Konzentrationsunterschied der 80 kDa-Per a 3-Isoform, der sich auch auf der nativen PAGE widerspiegelte und zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet wurde.

Auch nach Vereinigung der Hämolympheproben war weiterhin auf der SDS-PAGE und auch auf der nativen PAGE zu erkennen, dass in der HL-2 die 80 kDa-Per a 3-Isoform im

Vergleich zu den übrigen Proteinen und im Unterschied zur HL-1 in deutlich geringerer Konzentration vorlag (Abb. 3-13, mit Pfeilen gekennzeichnet). Eine mögliche Ursache hierfür wird im Zusammenhang mit der Einordnung der Per a 3-Proteine zu den Hexamerinen in der Diskussion erörtert (Abschnitt 4.1.2).

Absorptionsspektren

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Proteinzusammensetzung von HL-1 und HL-2 sich auch im Absorptionsverhalten der Probe widerspiegelte, wurden von beiden HL-Chargen Absorptionsspektren aufgenommen, die für eine bessere Vergleichbarkeit auf eine Konzentration von 1 mg/ml normiert wurden (Abb. 3-14).

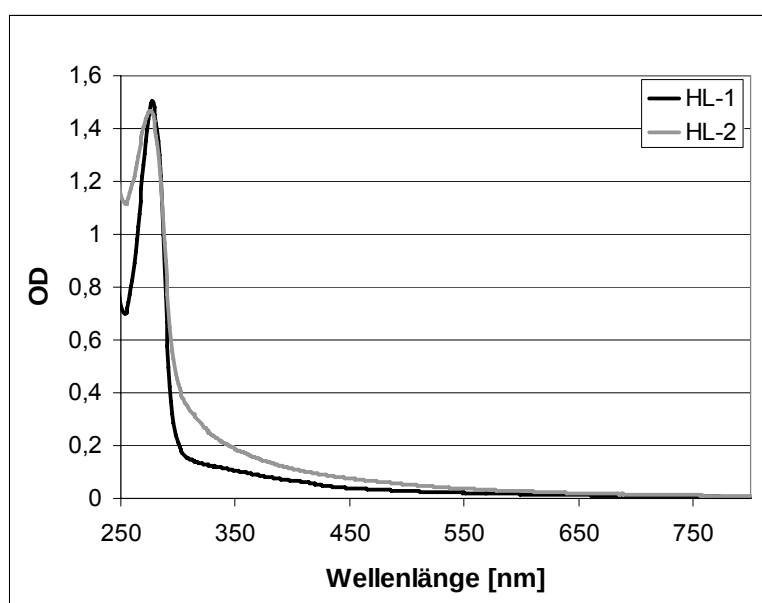


Abb. 3-14: Absorptionsspektren der beiden Hämolymphe-Extrakte.

Bei diesem Spektrum wurden beide HL-Proben gegen die jeweilige Pufferabsorption korrigiert und auf 1 mg/ml normiert. Die HL-1 lag in Schabepuffer A und die HL-2 in Schabepuffer D vor.

Außer dem für aromatische Aminosäuren typischen Absorptionsmaximum bei 278 nm, zeigten die HL-Proben bis 800 nm keine weiteren ausgeprägten Absorptionsmaxima. Eine schwache Absorption wurde zusätzlich in der HL-1 bei 350 nm beobachtet. In der HL-2 war gegenüber der HL-1 der Streuanteil erhöht, sodass die schwache Absorption bei 350 nm eventuell überdeckt wurde.

Beide HL-Proben wiesen das für aromatischen Aminosäuren typische Absorptionsmaximum bei 278 nm auf (Abb. 3-14). Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten dieser Proben wurde in Abschnitt 3.1.1.2 erläutert. Für HL-1 wurde $\epsilon_{280\text{nm}}=1.5 \text{ [l/(g*cm)]}$ und für HL-2 $\epsilon_{280\text{nm}}=1.4 \text{ [l/(g*cm)]}$ bestimmt.

Der Vergleich der Quotienten von OD280/OD250 ergab für die Hämolymphe der ersten Charge (HL-1) 1.99 und für die Hämolymphe der zweiten Charge (HL-2) 1.22. Offenbar war in der HL-2 gegenüber der HL-1 der Streuanteil erhöht. Zusätzliche absorbierende Pigmente waren in den HL-Proben nicht zu beobachten.

Allerdings wurde in der HL-1 eine zusätzliche schwache Absorption bei ca. 350 nm detektiert, die in der HL-2 eventuell aufgrund der höheren Streuung nicht aufgelöst wurde. Bei dieser Absorption könnte es sich um die der Phenoloxidase handeln. Phenoloxidasen zählen wie die Hämocyane zu den Typ III Kupferproteinen und weisen im oxygenierten Zustand zusätzliche Absorption bei ca. 340 nm auf [291].

3.1.2.2 Aliquots des Crude-Extraktes

Wie eingangs erwähnt, wurde in dieser Arbeit lediglich ein einziger Crude-Extrakt aus einer Schabencharge hergestellt (Abb. 3-1). Aufgrund des Versuchsdesigns konnte davon ausgegangen werden, dass alle Aliquots des Crude-Extraktes eine identische Proteinverteilung aufwiesen (Abschnitt 2.2.2). Um zu verifizieren, dass diese Verteilung auch über die Zeit der Lagerung reproduzierbar blieb, wurden die Aliquots (1 bis 6) des Extraktes nach ca. 16 Monaten Lagerung bei -23°C auf ihre Zusammensetzung hin auf SDS- und nativer PAGE überprüft (Abb. 3-15).

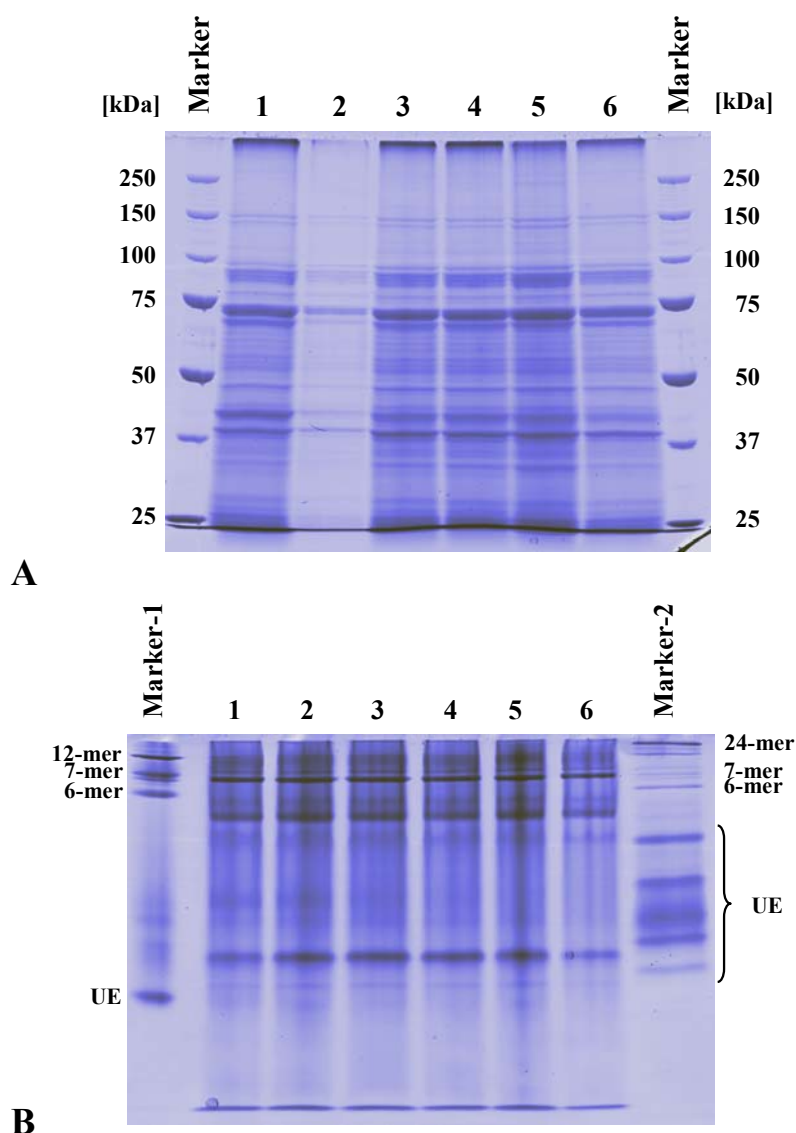


Abb. 3-15: Zusammensetzung der Aliquots des Crude-Extraktes (1 bis 6) auf SDS-PAGE (A) und nativer PAGE (B).

A) 7.5%ige SDS-PAGE. Es wurden je 16 µg CE pro Spur auf die SDS-PAGE aufgetragen. Als Marker wurde der BioRad-Proteinstandard verwendet. Die Proteindetektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung.

B) 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Es wurden je 16 µg CE 2:3 mit BPB versetzt auf die native PAGE appliziert. Bei Marker-1 handelte es sich um den *Astacus*-Marker und bei Marker-2 um den *Eurypelma*-Marker. Die Proteindetektion erfolgte mit der Coomassie-Färbung.

Beide Gele belegten eindeutig, dass sich die einzelnen Crude-Extrakt Aliquots in ihrer Zusammensetzung nicht unterschieden und dass Konzentrationsunterschiede, wie z.B. bei Aliquot 2 auf der SDS-PAGE auf einen Pipettierfehler zurückgeführt werden mussten. Diese Gele belegten zusätzlich, dass die Proteine in dem Extrakt auch über eine lange Lagerungszeit intakt blieben und nicht z.B. durch Proteasen verdaut wurden.

Sowohl auf der SDS-PAGE als auch auf der nativen PAGE konnten keine signifikanten Unterschiede im Bandenmuster der Aliquots des CE festgestellt werden (Abb. 3-15). Konzentrationsunterschiede zwischen den Spuren, wie z.B. bei Aliquot 2 auf der SDS-PAGE waren auf einen Pipettierfehler zurückzuführen. Diese Gele belegten zusätzlich, dass die Protease-Inhibitoren in dem Extrakt wirkten: auch über 16 Monate bei -23°C blieben die Extraktproteine intakt und wurden weder dissoziiert noch wurden sie proteolytisch abgebaut.

3.1.3 Fazit der Extraktvergleiche

Die Extraktvergleiche zeigten, dass der Crude-Extrakt auch nach Lagerung weiterhin eine stabile Proteinzusammensetzung aufwies, die in den einzelnen Aliquots reproduzierbar war. Wohingegen einzelne Hämolympbproben aus zwei Schabenchargen und sogar innerhalb einer Schabencharge deutliche Unterschiede insbesondere bei der Konzentration der 80 kDa-Per a 3-Isoform (Per a 3.03) zeigten. Für nachfolgende Extraktionen ist daher das Vereinigen der HL-Proben für reproduzierbare Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf immunologische Untersuchungen unerlässlich. Obwohl bislang beim CE keine Vergleiche zu anderen Schabenchargen möglich waren, ist es sinnvoll, zukünftig experimentell zwischen Extrakten aus verschiedenen Chargen zu unterscheiden.

Der Vergleich von CE mit der HL zeigte deutlich mehr Proteinspezies im CE, die das Isolieren einzelner Proteine erschweren könnten. Eine Degradation oder Dissoziation von HL-Proteinen wurde im Crude-Extrakt nicht beobachtet, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass oligomere Proteine -insbesondere die für diese Arbeit wichtigen hexameren Per a 3-Isoformen- durch die Scherkräfte im Mixer nicht dissoziiert oder zerstört wurden.

Beide Extrakte enthielten außerdem eine Diphenoloxidase, die im Crude-Extrakt nur nach chromatographischer Trennung aktiv war. Eventuell war sie aufgrund eines Inhibitors im Crude-Extrakt nicht aktiv.

Ausgehend vom HL und CE wurden im Folgenden die bereits angesprochenen Per a 3 und Per a 9-Proteine mit verschiedenen Reinigungsprotokollen isoliert und diese Allergene anschließend charakterisiert.

3.2 Isolierung allergener Proteine aus *Periplaneta americana*

Die Aufreinigungsprotokolle für die Isolierung der Allergene Per a 3 und Per a 9 aus *Periplaneta americana* wurden in dieser Arbeit vielfach modifiziert. Da die Ausarbeitung und Optimierung der Aufreinigung einen wichtigen Bestandteil dieser Arbeit darstellten, werden in diesem Abschnitt drei unterschiedliche Aufreinigungsprotokolle ausgehend von Hämolymp- bzw. Crude-Extrakten vorgestellt.

Der Hämolymp-Extrakt wurde nach Protokoll 1 im ersten Reinigungsschritt mittels einer Anionenaustauscher-Säule (Bio-Scale Q2) gereinigt. Um Allergene aus dem Crude-Extrakt isolieren zu können, wurde eine Anionenaustauscher-Säule (Uno Q12) mit achtfach höherer Proteinkapazität als die der Bio-Scale Q2 gewählt. Da zu diesem Zeitpunkt weder auf Erfahrungen bei der Reinigung von Proteinen aus einem Crude-Extrakt noch auf Erfahrungen mit diesem Anionenaustauscher zurückgegriffen werden konnte, wurden verschiedenste Reinigungsprotokolle getestet. Zwei unterschiedlich effektive Prozeduren des Crude-Extraktes werden in der Reinigung nach Protokoll 2 und Protokoll 3 vorgestellt. Eine genaue Übersicht über die drei unterschiedlichen Reinigungsprotokolle unter Berücksichtigung der verwendeten Extrakte und chromatographischen Säulen gibt Abb. 2-2.

Das Ziel der Aufreinigungen war die Isolierung der Per a 3- und Per a 9-Allergene in nativer Form und in präparativen Mengen. Hierbei sollten die zwei bereits aus meiner Diplomarbeit bekannten Per a 3-Isoformen separat voneinander gewonnen werden. Basierend auf deren biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung wurden diese Isoformen in Anlehnung an die Allergennomenklatur in meiner Diplomarbeit als Per a 3.1 und Per a 3.2 bezeichnet [148]. In dieser jetzt vorliegenden Arbeit gelang es, die isolierten Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass die gewählten Bezeichnungen nicht optimal waren und bei der neuen Datenlage auch zu Verwirrungen führten. Aus diesem Grund wurde bei der Darlegung der Reinigung darauf verzichtet, die Isoformen explizit zu benennen. Sie wurden stattdessen basierend auf ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE als 80 kDa-Per a 3-Isoform und 73 kDa-Per a 3-Isoform benannt. Eine offizielle Bezeichnung und Zuordnung dieser Isoformen folgt in Abschnitt 3.3 mit der Per a 3-Charakterisierung. Eine Übersicht über die verwendeten Bezeichnungen ist in der Diskussion in Tabelle 4-3 dargestellt.

3.2.1 Aufreinigung der Hämolymphe nach Protokoll 1

Wie u.a. im vorherigen Abschnitt deutlich wurde, sind die Per a 3-Allergene die Hauptbestandteile in der Hämolymphe von *Periplaneta americana* (Abb. 3-4 Abb. 3-5). Ziel war es, diese Per a 3-Isoformen aus der Hämolymphe zu isolieren.

Für deren Reinigungsstrategie konnte auf die Erfahrungen zweier Diplomarbeiten in unserem Institut zurückgegriffen werden [148, 292]. Die dort bereits entwickelten Reinigungs-

protokolle wurden in meiner Arbeit im Hinblick auf die Proteinausbeute (Quantität) sowie die Reinheit der Per a 3-Isoformen (Qualität) optimiert. Als effektiv stellte sich dabei folgende dreigliedrige Reinigungsstrategie heraus, die in dieser Arbeit als Protokoll 1 bezeichnet wird:

1. Anionenaustauscher-Chromatographie der Hämolymphe (HL)
(Bio-Scale Q2, linear ansteigender NaCl-Gradient von 0 mM bis 450 mM)
2. Anionenaustauscher-Chromatographie (Rechromatographie) zweier Per a 3-haltigen Peaks
(Bio-Scale Q2, linear ansteigender NaCl-Gradient von 0 mM bis 450 mM)
3. Größenausschlusschromatographie zweier Per a 3-haltiger Proben
(S-300; 16/60)

Die ersten beiden Schritte zielten darauf ab, die 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoform effektiv voneinander zu trennen. Im dritten Schritt wurden von diesen Isoformen weitere Proteine mit unterschiedlichem Stokes-Radius in der Größenausschlusschromatographie abgetrennt.

3.2.1.1 Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)

Für den ersten Reinigungsschritt der Hämolymphe wurde diese nach Bedarf mit Schabenpuffer A verdünnt und bei 4°C über den Anionenaustauscher (Bio-Scale Q2) aufgetrennt. Als Bindungspuffer wurde Schabenpuffer A (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5 (4°C)) und zur Elution Elutionsschabenpuffer A (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5 (4°C)) verwendet. Ein typisches Elutionsprofil von 1 ml aufgetragenem, zuvor 1:3 verdünntem Hämolymp-Extrakt ist in Abb. 3-16 dargestellt und gliederte sich typischerweise in zwei Schritte. Im ersten Schritt eluierten in den ersten 13 Fraktionen Hämolymp-Bestandteile, die nicht an die Anionenaustauscher-Matrix gebunden hatten. Im zweiten Schritt eluierten bei konstant ansteigender Salzkonzentration (0 - 450 mM NaCl, Elutionsschabenpuffer A) typischerweise drei Proteinpeaks, deren Proteine an die Anionenaustauscher-Matrix unterschiedlich stark gebunden hatten (Abb. 3-16).

Die Überprüfung einzelner IEX-Fraktionen auf 7.5%igen Polyacrylamid-Gelen (SDS- und nativer PAGE) zeigte stets, dass die Nachweisempfindlichkeit der Coomassie-Färbung nicht ausreichend war, um die nicht-gebundenen Hämolymp-Proteine in den Fraktionen 6 und 8 anzufärben (Abb. 3-16). Wahrscheinlich hatten bei 280 nm absorbierende Pigmente oder freie aromatische Aminosäuren zusätzlich zur Absorption in diesen Fraktionen beitragen.

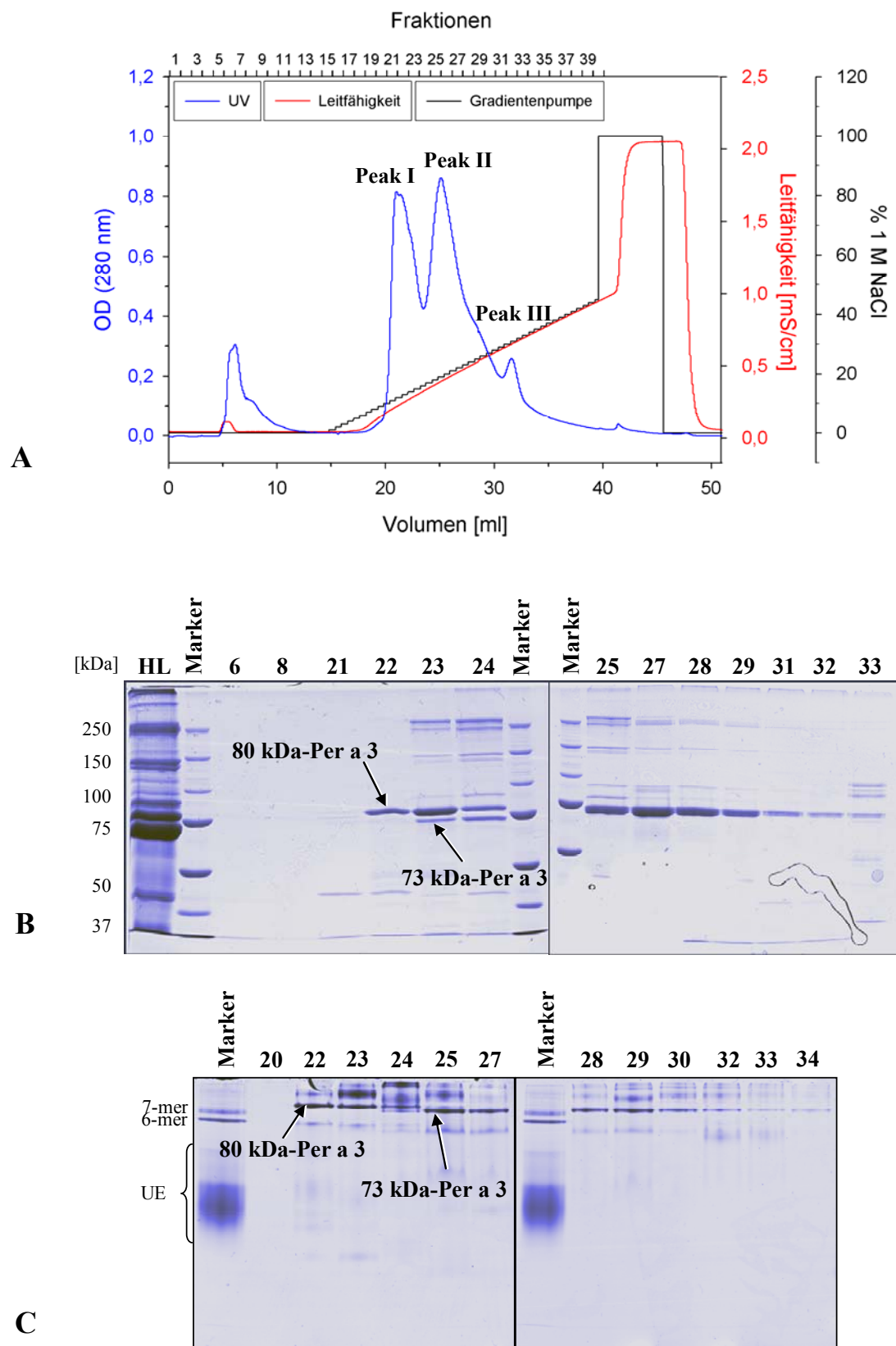


Abb. 3-16: Erster Reinigungsschritt der Hämolymphe von *Periplaneta americana* nach Protokoll 1.

A) Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX, Bio-Scale Q2). Es wurde 1 ml der 1:3 mit Schabepuffer A (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5) verdünnten HL auf den Anionenaustauscher bei 4°C aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linear ansteigenden Salzgradienten (0 - 450 mM NaCl) mit Elutionsschabepuffer A (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt.

Typischerweise eluierten die gebundenen HL-Bestandteile in drei Peaks von der Säule. Peak I eluierte maximal in Fraktion 22 bei 130 mM NaCl, Peak II in Fraktion 26 bei 190 mM NaCl und Peak III in Fraktion 33 bei 320 mM NaCl.

B) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Die Proben wurden 1:3 mit Schabenpuffer A verdünnt und vor der Elektrophorese 1:2 mit Denaturierungspuffer (DP) versetzt. Pro Spur (die Nummerierung der einzelnen Spuren entsprach dabei den Fraktionen des IEX-Laufes) wurden 25 µl Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Die HL enthielt zahlreiche Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten, wobei die 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoformen die dominierenden Proteinspezies darstellten und mit Pfeilen markiert wurden. Die 80 kDa-Per a 3-Isoform eluierte hauptsächlich in den Fraktionen 22 und 23, die 73 kDa-Per a 3-Isoform dominierte ab Fraktion 25.

C) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Pro Spur wurden jeweils 25 µl der zuvor 1:3 mit Schabenpuffer D und anschließend 3:4 mit nativem Probenpuffer (BPB) verdünnten Proben auf das Gel appliziert. Als Referenz wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Die Per a 3-Isoformen waren in den Fraktionen in ihrer nativen hexameren Form vorhanden und wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Sie zeigten eine ähnliche Mobilität wie das 7-mere Hämocyanin des *Eurypelma*-Markers. Die 73 kDa-Per a 3-Isoform wanderte etwas weiter in das Gel ein als die 80 kDa-Per a 3-Isoform. Zusätzlich waren in den Fraktionen weitere, jedoch nicht weiter identifizierte Proteine vorhanden.

Da die Per a 3-Isoformen nicht vollständig von einander isoliert wurden, wurden für eine Rechromatographie der Proben für die Peak I-Probe die Fraktionen 20 bis 23 und für die Peak II-Probe die Fraktionen 25 bis 30 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

Peak I eluierte maximal bei 130 mM NaCl in Fraktion 22 und enthielt hauptsächlich die 80 kDa-Per a 3-Isoform. Peak II eluierte über einen weiten Volumenbereich bei 190 mM NaCl maximal und enthielt im Wesentlichen die 73 kDa-Per a 3-Isoform (Abb. 3-16). Beide Isoformen zeigten auf der nativen PAGE ihr typisches natives (hexameres) Laufverhalten, wie es bereits aus den Charakterisierungen in meiner Diplomarbeit bekannt war (Abb. 3-16 C) [148]. In Peak III dominierten mehrere Proteinbanden, die auf der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von über 75 kDa aufwiesen, die bei dieser Reinigung nicht näher analysiert wurden.

Da der verwendete Anionenaustauscher nur eine geringe Proteinkapazität besaß, mussten für die Aufreinigung von 4 ml Hämolymphe 13 solcher Anionenaustauscher-Läufe durchgeführt werden. Je nach aufgetragener Proteinkonzentration variierte dabei die Trennleistung der Säule [293], sodass jeder Lauf mittels SDS-PAGE überprüft wurde und die zu vereinigenden Fraktionen individuell angepasst wurden. Wie eingangs erwähnt, war das Ziel dieser Reinigung eine effektive Trennung 80 kDa-Per a 3- von der 73 kDa-Per a3-Isoform. Da diese nach dem ersten Reinigungsschritt in einigen Fraktionen jedoch weiterhin parallel vorhanden waren, wurde sich für eine erneute Chromatographie über den Anionenaustauscher entschieden. Für eine solche Rechromatographie wurden die Peak-Fractionen mehrere Läufe vereinigt. Ausgehend von dem hier vorgestellten Elutionsprofil wurden von Peak I die Fraktionen 20 bis 23 und von Peak II die Fraktionen 25 bis 30 vereinigt, mit Schabenpuffer A umgepuffert und aufkonzentriert. Diese Proben wurden im zweiten Reinigungsschritt erneut über den Anionenaustauscher aufgetrennt (Abb. 3-17, Abb. 3-18).

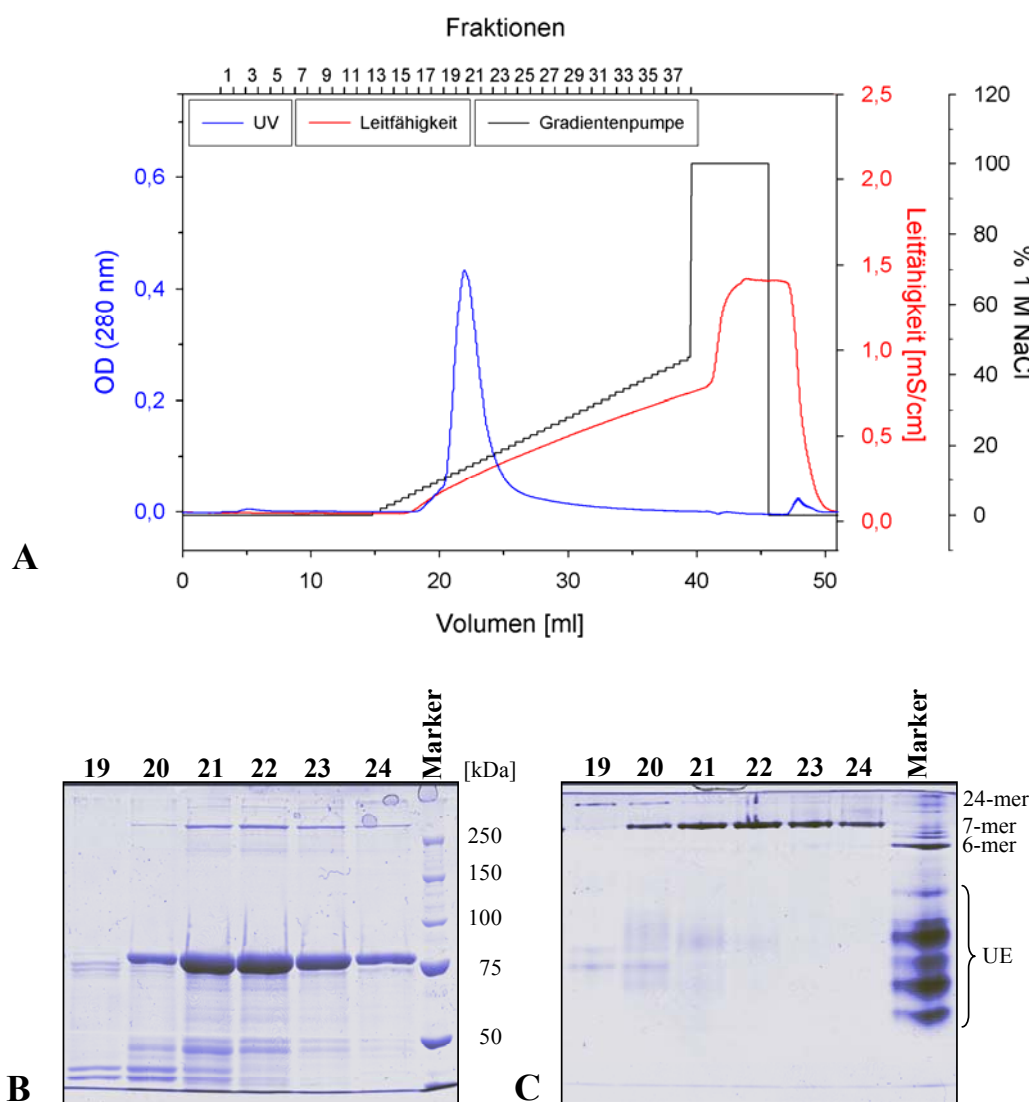
Peak I-Probe (Protokoll 1)

Abb. 3-17: Rechromatographie der Peak I-Probe nach Protokoll 1 über den Anionenaustauscher mit 7.5%igen SDS- und nativen Kontrollgelen.

A) Anionenaustauscher-Rechromatographie von Peak 1 (Bio-Scale Q2). Es wurde 1 ml der Peak I-Lösung erneut auf den Anionenaustauscher mit Schabenpuffer A aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linear ansteigendem Salzgradienten (0 - 450 mM NaCl) mit Elutionsschabenpuffer A, bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt.

Die Peak I-Probe eluierte in einem Peak, dessen Maximum bei 130 mM NaCl in Fraktion 21 lag.

B) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 µl der zuvor 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Die Peak I-Probe enthielt neben der 80 kDa-Per a 3-Isoform noch weitere Proteinbanden sowohl unterhalb von 50 kDa als auch oberhalb von 250 kDa.

C) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen nativen Gelen. Es wurden je 25 µl der zuvor 2:3 mit BPB versetzten Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Insbesondere in den Fraktionen 20 bis 24 war eindeutig die hexamere Bande der 80 kDa-Per a 3-Isoform zu erkennen, die eine ähnliche elektrophoretische Beweglichkeit aufwies wie das 7-mere Hämocyanin des *Eurypelma*-Markers. Die Fraktionen 20 und 21 enthielten noch zusätzliche Proteinbanden mit ähnlicher Mobilität wie die Untereinheiten des *Eurypelma*-Markers. Für die anschließende Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen 20 bis 24 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

Die **Peak I-Probe** eluierte bei dieser Rechromatographie maximal mit einem Peak bei 130 mM NaCl in Fraktion 21 von der Säule (Abb. 3-17). Die Kontrolle auf dem 7.5%igen SDS-Gel ergab jedoch, dass zusätzlich zur 80 kDa-Per a 3-Isoform in den Fraktionen 20 bis 24 weitere Proteinbanden, sowohl unterhalb von 50 kDa als auch oberhalb von 250 kDa vorhanden waren. Das elektrophoretische Laufverhalten der 80 kDa-Per a 3-Isoform auf der nativen PAGE entsprach dem 7-mer vom dissoziierten 24-meren Hämocyanin von *Eurypelma californicum* („*Eurypelma*-Marker“) (Abb. 3-17). Dies zeigte, dass die 80 kDa-Per a 3-Isoform in ihrer nativen hexameren Struktur vorlag; sie stellte im Eluat dieser IEX erwartungsgemäß die dominierende Proteinspezies dar.

Insgesamt ermöglichte diese Rechromatographie die erfolgreiche Trennung der 80 kDa- von der 73 kDa-Per a 3-Isoform. Um die 80 kDa-Per a 3-Isoform weiter aufzureinigen, wurden die Fraktionen 20 bis 24 dieser Rechromatographie vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert. Für eine bessere Nachvollziehbarkeit dieser Reinigung wurde diese Lösung weiterhin als Peak I-Probe bezeichnet.

Bei der Rechromatographie der **Peak II-Probe** eluierte diese ebenfalls in nur einem Peak von der Säule. Dessen Maximum lag bei 190 mM NaCl in Fraktion 23 (Abb. 3-18).

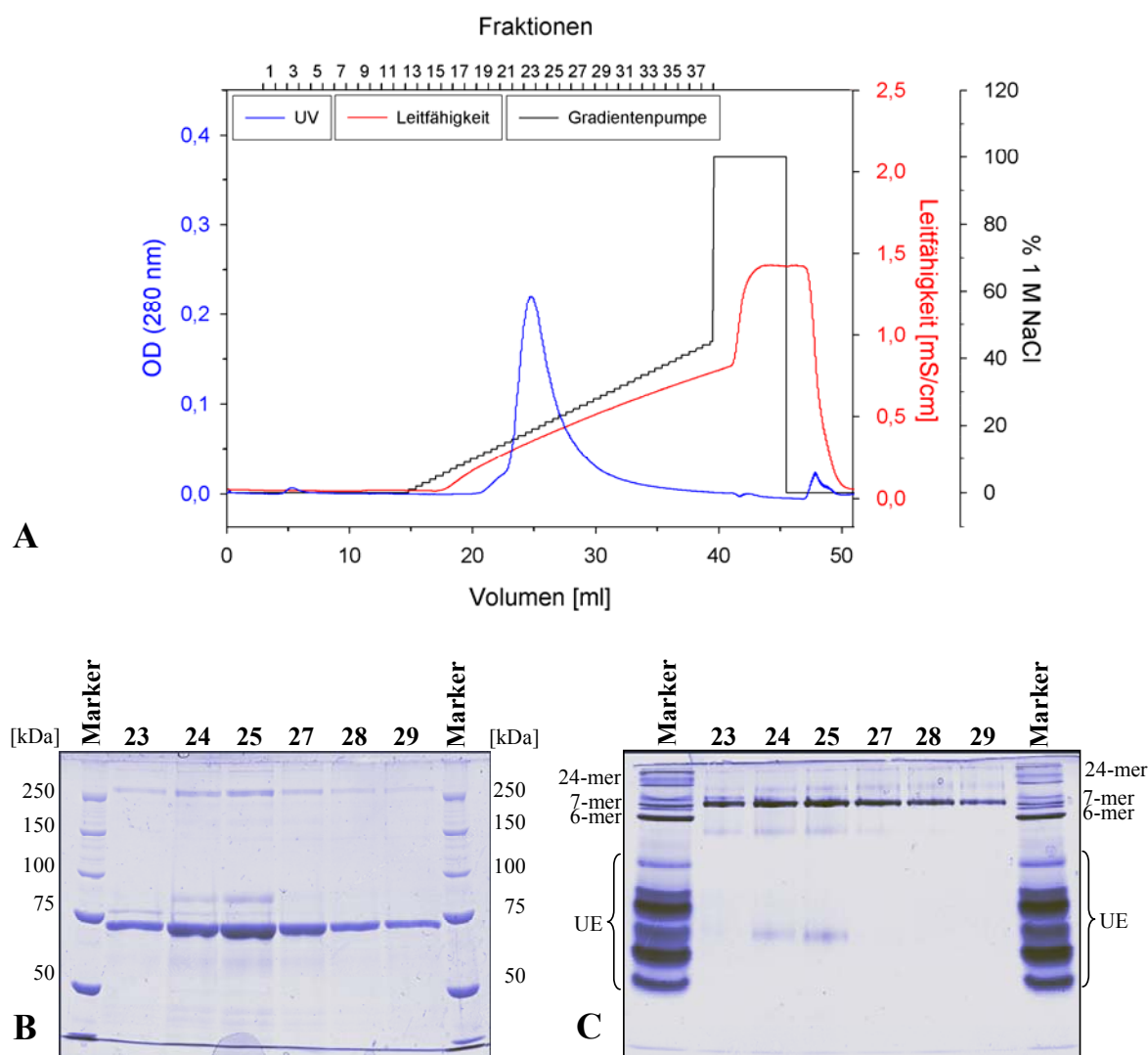
Peak II-Probe (Protokoll 1)

Abb. 3-18: Rechromatographie der Peak II-Probe nach Protokoll 1 über den Anionenaustauscher mit 7.5%igen SDS- und nativen Kontrollgelen.

A) Anionenaustauscher-Rechromatographie von Peak II (Bio-Scale Q2). Es wurde 1 ml der Peak II-Lösung erneut auf den Anionenaustauscher mit Schabepuffer A aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linear ansteigendem Salzgradienten (0 - 450 mM NaCl) mit Elutionsschabepuffer A, bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt.

Die Peak II-Probe eluierte in einem Hauptpeak, dessen Maximum bei 190 mM NaCl in Fraktion 23 lag.

B) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 µl der zuvor 1:2 mit DP versetzte Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Die Peak II-Probe enthielt in Fraktion 23 außer der 73 kDa-Per a 3-Isoform noch zusätzlich geringe Mengen der 80 kDa-Per a 3-Isoform. In den Fraktionen 24 und 25 war zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform noch ein 88 kDa-Protein vorhanden.

C) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Es wurden je 25 µl der zuvor 2:3 mit BPB versetzten Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Wie bereits bei dem SDS-Gel waren auch auf der nativen PAGE in den Fraktionen 24 und 25 zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform weitere Proteine vorhanden. In allen aufgetragenen Fraktionen war die 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden, die generell ein wenig weiter in die Gelmatrix einwanderte wie die 80 kDa-Per a 3-Isoform [148]. Dennoch blieb deren Mobilität mit der des 7-meren Hämocyanins des *Eurypelma*-Markers vergleichbar. Für die anschließende Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen 24 bis 30 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

Die Kontrolle der Fraktionen auf SDS- und nativer PAGE zeigten eindeutig, dass die 73 kDa-Per a 3-Isoform in allen Fraktionen die dominierende Proteinspezies darstellte und ab Fraktion 27 bereits in hoher Reinheit vorlag (Abb. 3-18). Auf der nativen PAGE konnte aufgrund des elektrophoretischen Verhaltens zusätzlich dessen intakte native hexamere Struktur bestätigt werden. Auch die Rechromatographie der Peak II-Probe bestätigte die erfolgreiche Trennung der beiden Per a 3-Isoformen.

Um einen zu großen Verlust der 73 kDa-Per a 3-Isoform zu vermeiden, wurden trotz der Anwesenheit weiterer Proteine für die sich anschließende Größenausschlusschromatographie die Fraktionen 24 bis 30 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert. Für eine bessere Nachvollziehbarkeit dieser Reinigung wurde diese Lösung weiterhin als Peak II-Probe bezeichnet.

3.2.1.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Der letzte Reinigungsschritt in der Größenausschlusschromatographie hatte zum Ziel, von den rechromatographierten Per a 3-Lösungen (Peak I und Peak II) Hämolymp- Proteine mit einem anderem Stokes-Radius als den der Per a 3-Proteine abzutrennen.

Die **Peak I-Probe** eluierte von der SEC mit einem Hauptpeak nach 78.5 ml und einem deutlich kleineren Nebenpeak nach 93.5 ml Retentionsvolumen (Abb. 3-19).

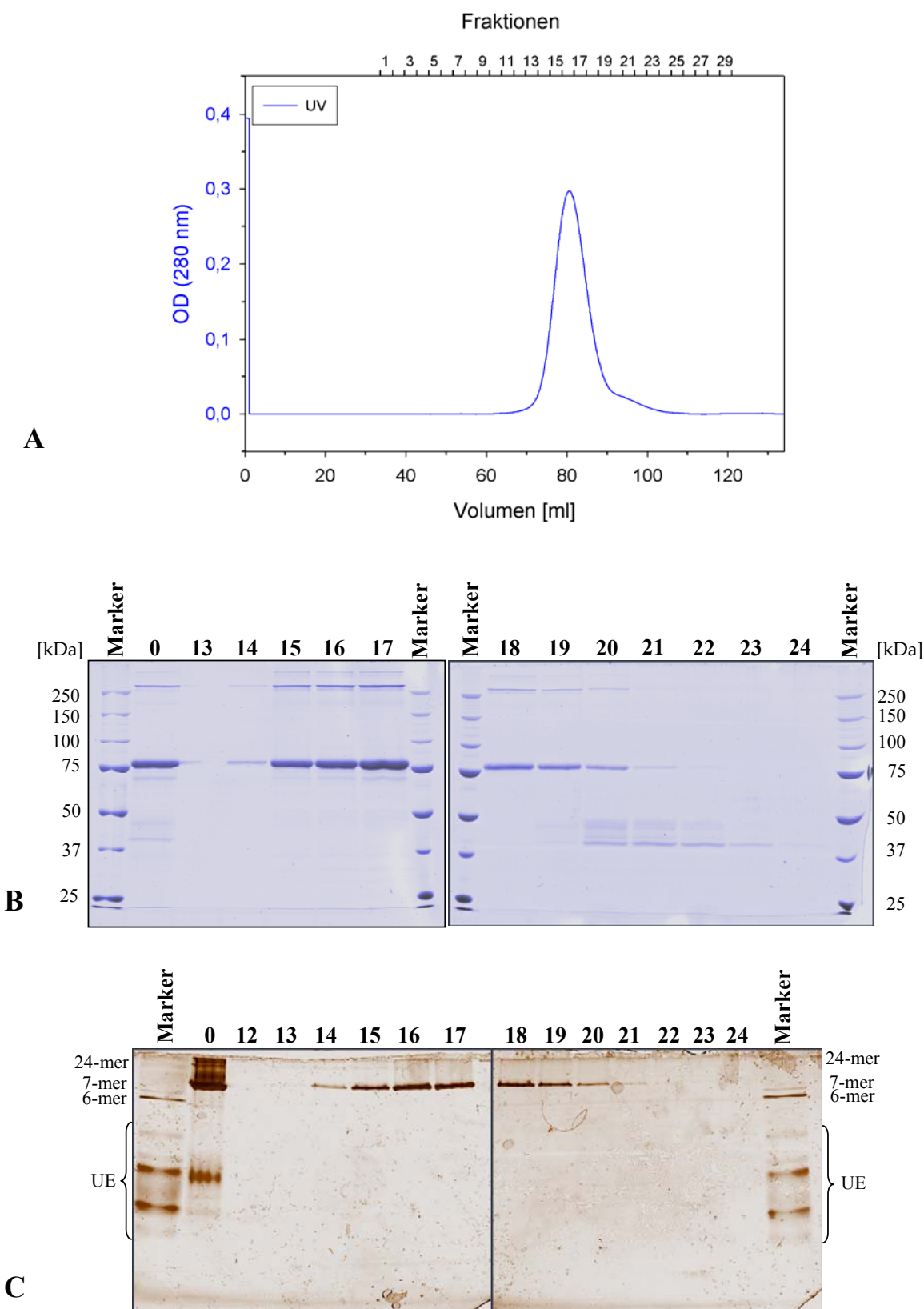
Peak I-Probe (Protokoll 1)

Abb. 3-19: Größenausschlusschromatographie der Peak I-Probe nach Protokoll 1 mit 7.5%igen SDS- und nativen Kontrollgelen.

A) Größenausschlusschromatographie (SEC; S-300 ;16/60) von Peak I. Es wurden 2 ml der Peak I-Probe auf die SEC mit Schabenpuffer C (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. aufgetragen, eluiert und in 3 ml-Fractionen gesammelt.

Die Probe eluierte nach 78.5 ml Retentionsvolumen in einem Haupt- und nach 93.5 ml Retentionsvolumen in einem deutlich kleineren Nebenpeak.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fraktionen auf Coomassie-gefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 µl der 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet. Die auf die SEC aufgegebene Peak 2-Lösung wurde als Fraktion „0“ bezeichnet und wurde zusätzlich 1:10 mit Schabenpuffer C verdünnt auf das Gel appliziert.

Der Hauptpeak enthielt in den Fraktionen 14 bis 19 hauptsächlich die 80 kDa-Per a 3-Isoform. Der Nebenpeak enthielt auf der SDS-PAGE niedermolekulare Proteine mit Molekulargewichten zwischen 37 kDa und 50 kDa.

C) Kontrolle einzelner SEC-Fraktionen auf silbergefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Pro Spur wurden je 25 µl der zuvor 1:2 mit Schabenpuffer C verdünnten und 2:3 mit BPB versetzten Probe auf das Gel appliziert. Als Referenz wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Die nativen Gele zeigten, dass die 80 kDa-Per a 3-Isoform in den Fraktionen 14 bis 19 in hoher Reinheit und in ihrer intakten hexameren Oligomerisierung vorlag. Den niedermolekularen Proteinen des Nebenpeaks konnten auch auf dieser silbergefärbten nativen PAGE keine Proteinbanden zugeordnet werden.

Für die weitere Proteincharakterisierung wurden für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 12 bis 24 vereinigt und aufkonzentriert.

Die Kontrolle der jeweiligen Fraktionen zeigte insbesondere auf der nativen PAGE, dass nach diesem letzten Reinigungsschritt die 80 kDa-Per a 3-Isoform in hoher Reinheit und in der intakten hexameren Oligomerisierung vorlag (Abb. 3-19). Auffällig war allerdings auf der SDS-PAGE die hochmolekulare Proteinbande bei über 250 kDa, der auf der nativen PAGE keine separate Proteinbande zugeordnet werden konnte (Abb. 3-19). Eine solche hochmolekulare Proteinbande wurde bereits in meiner Diplomarbeit beobachtet und wurde bei dieser Reinigung nach Protokoll 1 ebenfalls bei der Fraktionskontrolle zusammen mit der 73 kDa-Per a 3-Isoform auf SDS-Gelen angefärbt (Abb. 3-20). Diese Beobachtung wird zusammen mit der weiteren Charakterisierung der Per a 3-Isoformen in Abschnitt 3.3 erneut aufgegriffen.

Dem zweiten kleineren Peak der SEC konnten auf dem SDS-Gel niedermolekulare Proteine mit Molekulargewichten von 37 kDa bis 50 kDa zugeordnet werden, denen auf der silbergefärbten nativen PAGE allerdings keine separate Proteinbanden zugeordnet werden konnten (Abb. 3-19).

Die **Peak II-Probe** eluierte von der Größenausschlusssäule nach 81.5 ml Retentionsvolumen in nur einem Peak. Jedoch waren bei der Kontrolle der Fraktionen sowohl auf der SDS-PAGE als auch auf der nativen PAGE überraschender Weise zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform weitere Proteinbanden zu erkennen (Abb. 3-20). Insbesondere in den Fraktionen 16 und 17 wurden ober- und unterhalb der 73 kDa-Per a 3-Isoform zusätzlich drei Proteinbanden auf der nativen PAGE beobachtet (Abb. 3-20). Bei der obersten Bande mit der geringsten Mobilität handelte es sich wahrscheinlich um die Diphenoloxidase, die bereits zuvor in der Hämolymphe nachgewiesen wurde (Abb. 3-11). Die übrigen beiden Banden wurden in dieser Arbeit nicht weiter identifiziert.

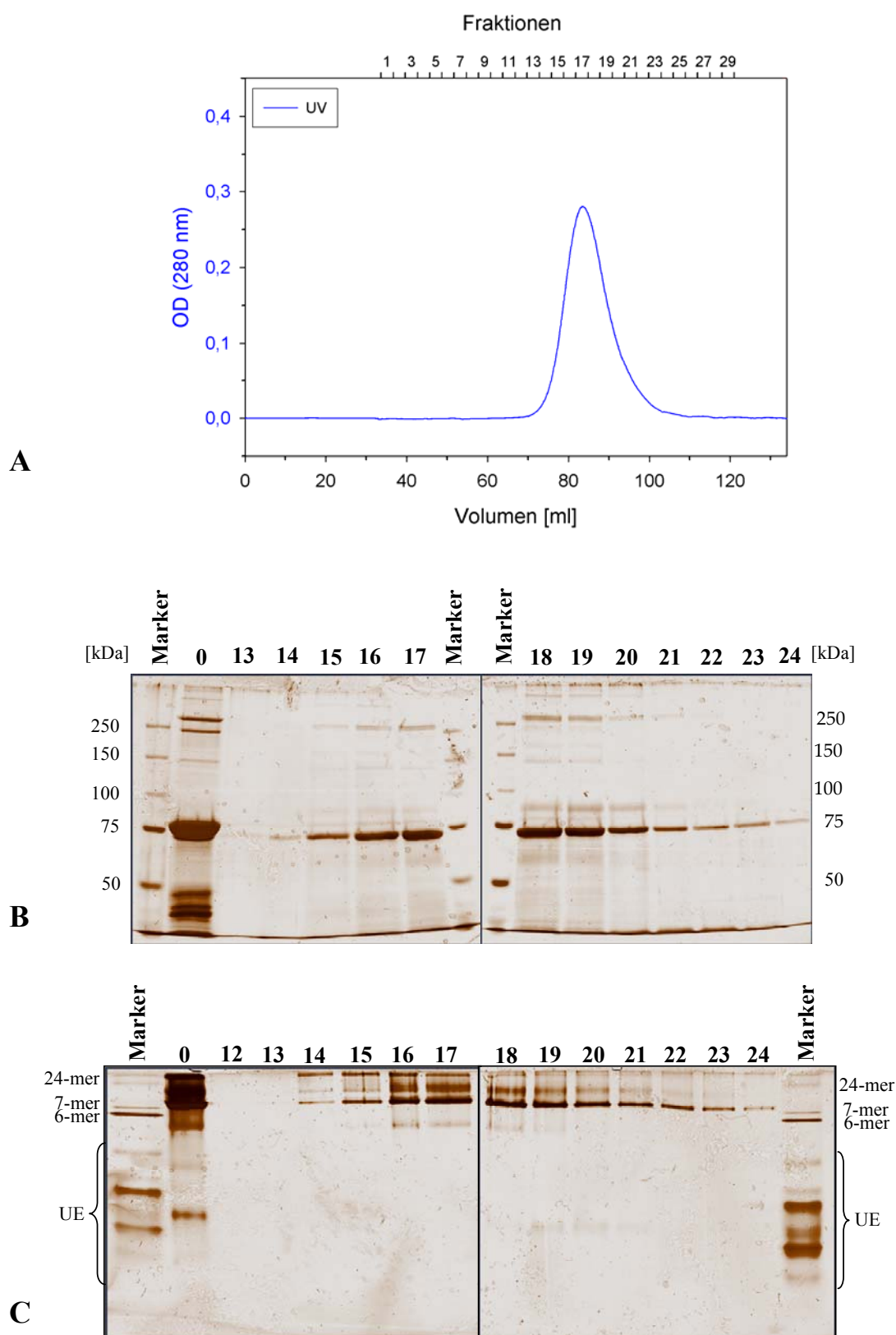
Peak II-Probe (Protokoll 1)

Abb. 3-20: Größenausschlusschromatographie der Peak II-Probe nach Protokoll 1 mit 7.5%igen SDS- und nativen Kontrollgelen.

A) Größenausschlusschromatographie (SEC; S-300 ;16/60) von Peak II. Es wurden 2 ml der Peak I-Probe auf die SEC mit Schabepuffer C (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. aufgetragen, eluiert und in 3 ml-Fraktionen gesammelt.

Die Probe eluierte in einem Hauptpeak nach 81.5 ml Retentionsvolumen von der SEC.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 µl der zuvor 2:3 mit Schabenpuffer C verdünnten und 1:2 mit DP versetzten Proben appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Die 73 kDa-Per a 3-Isoform eluierte über einen weiten Volumenbereich und war in den Fraktionen 15 bis 24 vertreten. Ab Fraktion 18 eluierte zusätzlich ein 88 kDa-Protein, welches offensichtlich einen ähnlichen Stokes-Radius besaß wie die hexamere 73 kDa-Per a 3-Isoform. Der Hauptpeak enthielt in den Fraktionen 14 bis 19 hauptsächlich die 73 kDa- Per a 3-Isoform.

C) Kontrolle einzelner SEC-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Pro Spur wurden je 25 µl der zuvor 1:2 mit Schabenpuffer C verdünnten und 2:3 mit BPB versetzten Proben auf das Gel appliziert. Als Referenz wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Die nativen Gele zeigten, dass die 73 kDa-Per a 3-Isoform in den Fraktionen 14 bis 24 in ihrer intakten hexameren Oligomerisierung vorlag. Auch auf diesen Gelen waren zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform weitere Proteinbanden zu erkennen. Bei der obersten Bande handelte es sich eventuell um die Diphenoloxidase, die in der HL nachgewiesen wurde (Abb. 3-11)).

Für die weitere Proteincharakterisierung wurden für die 73 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 11 bis 26 vereinigt und aufkonzentriert.

Für das Endergebnis dieser beiden SEC-Läufe wurden für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 12 bis 24 aus dem SEC-Lauf der Peak I-Probe (Abb. 3-19) und für die 73 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 11 bis 26 aus dem SEC-Lauf der Peak II-Probe (Abb. 3-20) vereinigt und aufkonzentriert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie in Material und Methode beschrieben über die Messung der Absorption bei 280 nm (Abschnitt 2.6.1). Für die 80 kDa-Per a 3-Isoform wurde für den spezifischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{ nm}}=1.65\text{ [l/(g*cm)]}$ und für die 73 kDa-Per a 3-Isoform $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1.44\text{ [l/(g*cm)]}$ verwendet [148].

Somit wurden ausgehend von 150 mg Hämolymphe durch diese Reinigung nach Protokoll 1 insgesamt 4.1 mg der 80 kDa-Per a 3-Isoform und 5.3 mg der 73 kDa-Per a 3-Isoform isoliert. Dies entsprach einer Ausbeute von 2.7% (w/w) der 80 kDa-Per a 3-Isoform und von 3.5% (w/w) der 73 kDa-Per a 3-Isoform.

Die abschließende Überprüfung der Reinheit und Oligomerisierung der isolierten Per a 3-Isoformen erfolgte mittels SDS- und nativer PAGE (Abb. 3-21).

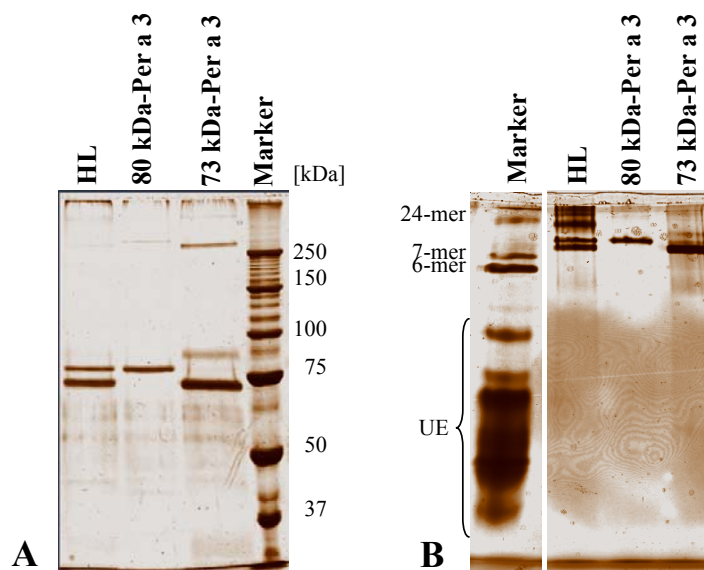


Abb. 3-21: SDS- und native PAGE der nach Protokoll 1 gereinigten Per a 3-Allergene aus der Hämolymphe der ersten Schabencharge.

A) silbergefärbte 7.5%ige SDS-PAGE. Es wurden je 0.23 µg der HL, 0.26 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform und 0.74 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform 1:2 mit DP versetzt appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

In der Hämolymphe wurden bei dieser Verdünnung lediglich die beiden Per a 3-Isoformen mit ihrem typischen Molekulargewicht von 80 kDa und 73 kDa nachgewiesen. Bei den niedermolekularen Banden (50-70 kDa) handelte es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung mit Keratinen, die in sämtlichen Spuren silbergefärbter SDS-Gele auftraten [242].

Die 80 kDa- Per a 3-Isoform wies auf der SDS-PAGE eine sehr hohe Reinheit auf. Dagegen lag bei der 73 kDa- Per a 3-Isoform zusätzlich ein weiteres Protein mit 88 kDa vor. Wie bereits zuvor, trat mit der 73 kDa-Per a 3-Isoform eine zusätzliche Proteinbande von über 250 kDa auf, bei der es sich wahrscheinlich um Aggregate der 73 kDa-Per a 3-Isoform handelte.

B) silbergefärbte 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Es wurden 0.21 µg der HL, 0.20 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform und 0.55 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform 2:3 mit BPB versetzt appliziert. Als Referenz wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Diese native PAGE zeigte eindeutig, dass die Per a 3-Proteine aus der Hämolymphe in ihrer intakten hexameren Form isoliert wurden. Eine partielle Dissoziation der Isoformen wurde nicht beobachtet. Der Anteil des 88 kDa-Proteins war gegenüber der Per a 3-Isoform so gering, dass auf eine weitere Reinigungsprozedur im Hinblick auf die ansonsten verringerte Proteinausbeute verzichtet wurde.

Hierbei wurde bei einer Auftragung von 0.2 µg der 80 kDa- Per a 3-Isoform und 0.6 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform auf der SDS-PAGE die Proteinnachweisgrenze für die Silberfärbung deutlich überschritten. Dennoch konnte bestätigt werden, dass die 80 kDa- Per a 3-Isoform sehr homogen war und auf der nativen PAGE auch die typische Hexamerbande aufwies (Abb. 3-21). Im Unterschied hierzu war in der 73 kDa-Per a 3-Probe auf der SDS-PAGE eine weitere Proteinbande bei 88 kDa nachweisbar, die auch auf der native PAGE als schwache Bande oberhalb des hexameren 73 kDa-Per a 3-Proteins beobachtet werden konnte (Abb. 3-21). Der Anteil dieser Bande war im Vergleich zur Per a 3-Isoform so gering, dass vor allem im Hinblick auf die damit verbundenen Proteinverluste darauf verzichtet wurde, die Probe einer erneuten Reinigungsprozedur zu unterziehen. Bei den niedermolekularen Banden

zwischen 50 kDa und 70 kDa handelte es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung mit Keratinen, die in sämtlichen Spuren silbergefärbter SDS-Gelen auftrat [242]. Die in der 73 kDa-Per a 3-Probe vorhandene Proteinbande von über 250 kDa trat auf SDS-Gelen häufig mit der 73 kDa-Per a 3-Isoform auf und wurde –ausgehend von einer anderen 73 kDa-Per a 3-Probe massenspektrometrisch als Aggregate dieser Isoform identifiziert (Abschnitt 3.3.2.1).

Die auf diese Weise isolierten Per a 3-Isoformen wurden für die Charakterisierung in Abschnitt 3.3 verwendet.

3.2.1.3 Fazit der Reinigung nach Protokoll 1

Mit diesem Protokoll gelang es, zwei Per a 3-Isoformen getrennt voneinander zu isolieren. Die 80 kDa-Per a 3-Isoform lag dabei in ausgesprochen hoher Reinheit vor, wohingegen bei der 73 kDa-Per a 3-Isoform zusätzlich eine 88 kDa-Bande auf der SDS-PAGE zu beobachten war. Insgesamt konnte durch dieses Reinigungsprotokoll für beide Isoformen, insbesondere für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die Proteinausbeute gegenüber der der Diplomarbeit signifikant verbessert werden. In der Diplomarbeit wurden unterschiedliche Elutionsgradienten benutzt und die Ausbeute der 80 kDa-Per a 3-Isoform betrug 0.23% (w/w) und die der 73 kDa-Per a 3-Isoform 3.1% (w/w).

3.2.2 Aufreinigung des Crude-Extraktes nach Protokoll 2

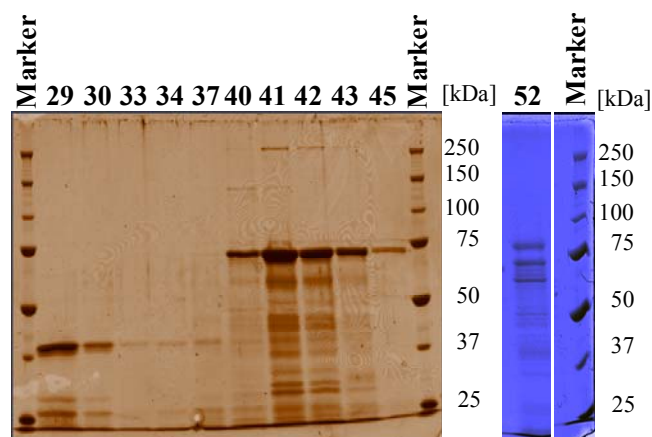
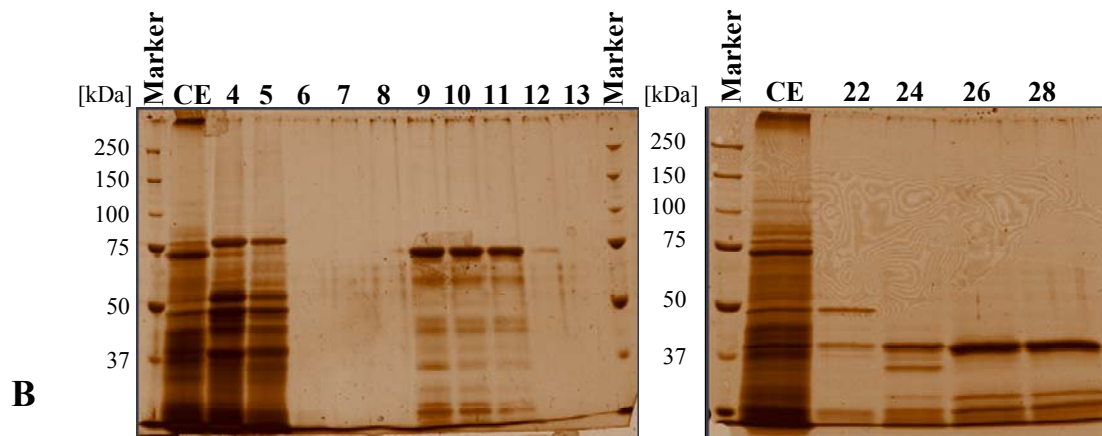
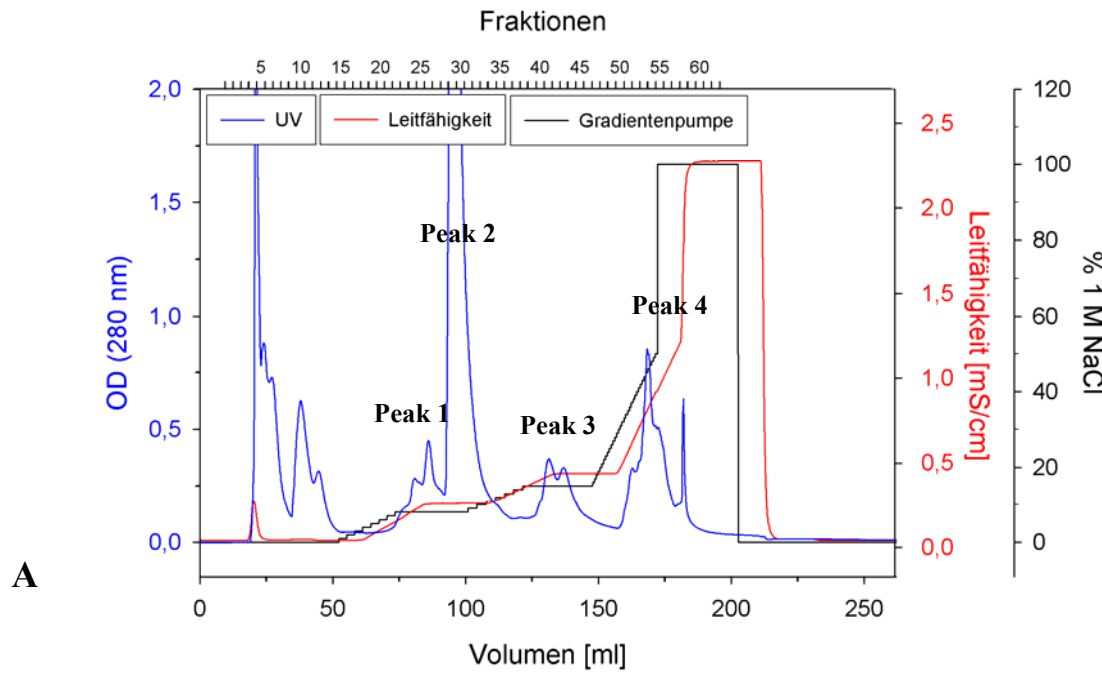
Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Reinigung nach Protokoll 1 wurde dieses Reinigungsprotokoll u.a. darauf hin ausgerichtet, die in der 73 kDa-Per a 3-Isoform enthaltene 88 kDa-Proteinbande bereits im Anionenaustauscherschritt von den Per a 3-Proteinen zu separieren, da eine Trennung des 88 kDa-Proteins von den Per a 3-Isoformen in der SEC offensichtlich nicht möglich war.

Die Aufreinigung nach Protokoll 2 zeichnete sich durch eine relativ kurze Aufreinigungszeit sowie eine erfolgreiche Trennung der Per a 3-Isoformen bereits im ersten Anionenaustauscher-Schritt aus (Abschnitt 2.3.3). Daher konnte die in Protokoll 1 noch benötigte Rechromatographie bei dieser Aufreinigung entfallen. Das für Protokoll 2 verwendete Reinigungsprotokoll gliederte sich somit in zwei Schritte:

1. Anionenaustauscher-Chromatographie des Crude-Extraktes (CE)
(Uno Q12; Stufengradient: 80 mM NaCl und 150 mM NaCl)
2. Größenausschlusschromatographie isolierter Peak-Proben
(S-300, 16/60)

3.2.2.1 Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)

Basierend auf diversen Testläufen wurden für die Elution der Per a 3-Isoformen zwei Salzkonzentrationen (80 mM NaCl und 150 mM NaCl) bestimmt, die bei dem Stufengradienten dieser IEX zur Anwendung kamen (Abb. 3-22). Für diese präparative Proteinaufreinigung wurden 40 ml Crude-Extrakt in insgesamt 20 Anionenaustauscherläufen aufgereinigt.



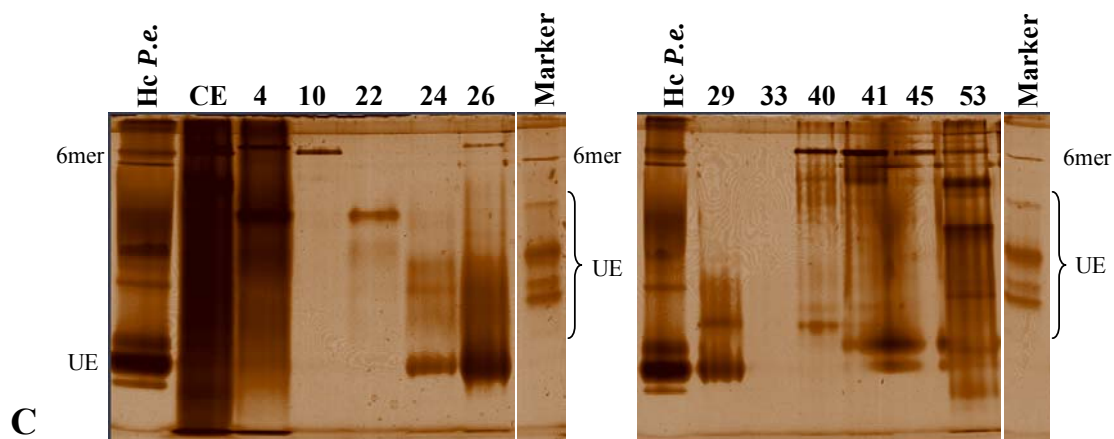


Abb. 3-22: Erster Reinigungsschritt des Crude-Extraktes von *Periplaneta americana* nach Protokoll 2.

A) Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX, Uno Q12). Es wurden 2 ml unverdünnter CE mit Schabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5) auf den Anionenaustauscher bei 20°C aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten (80 mM und 150 mM NaCl) mit Elutionsschabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Das Eluat wurde in 3 ml-Fractionen gesammelt.

Typischerweise eluierten die CE-Bestandteile in vier Peaks von der Säule. Die ersten beiden Peaks (Peak 1 und 2) eluierten bei 80 mM NaCl, Peak 3 bei 150 mM NaCl und Peak 4 schließlich bei linear ansteigendem Salzgehalt (150 mM - 500 mM NaCl).

B) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf silbergefärbten bzw. Coomassie-gefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurde je nach Gel 25 µl bzw. 13 µl bzw. 8 µl der zuvor 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. Der Crude-Extrakt wurde zusätzlich 1:30 mit Schabepuffer B verdünnt. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Der CE enthielt zahlreiche Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten. In Fraktion 4 und 5 war neben weiteren Proteinen die 80 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden und in den Fraktionen 9 bis 11 u.a. die 73 kDa-Per a 3-Isoform. In den Fraktionen 24 bis 30 dominierte ein 39 kDa-Protein, welches massenspektrometrisch als Per a 9 identifiziert wurde. An die Säule gebundenes 73 kDa-Per a 3 eluierte in den Fraktionen 40 bis 45.

C) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Pro Spur wurden je 25 µl der 3:4 mit BPB versetzten Proben appliziert. Der CE wurde zuvor zusätzlich 1:10 mit Schabepuffer B verdünnt. Als Referenz wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet.

Trotz der höheren Probenverdünnung konnte im CE durch Überladung keine Proteinbande identifiziert werden. Die 80 kDa-Per a 3 Isoform eluierte in Fraktion 4 und wies ebenso wie die 73 kDa-Per a 3-Isoform die für hexamere Per a 3-Isoformen typische Proteinbande auf. Per a 9 (Fraktion 24 - 29) zeigte eine ähnliche Mobilität wie die UE des *Palinurus*-Markers.

In dieser Reinigung passierte die 80 kDa-Per a 3-Isoform den Anionenaustauscher hauptsächlich in ungebundener Form, wohingegen die 73 kDa-Per a 3-Isoform an die Matrix gebunden hatte und in Peak 3 eluierte. Peak 2 enthielt im Wesentlichen Per a 9.

Für die weitere Aufreinigung wurden für Peak 2 (Per a 9) typischerweise die Fraktionen 29 bis 33 und für Peak 3 (73 kDa-Per a 3-Isoform) die Fraktionen 40 bis 45 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

Als Bindungspuffer wurde Schabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5) und zur Elution Elutionsschabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) verwendet.

Ein typisches Elutionsprofil von 2 ml aufgetragenem *Periplaneta* Crude-Extrakt zeichnete sich u.a. durch zahlreiche nicht gebundene Crude-Extrakt-Bestandteile sowie vier eluierenden Hauptproteinpeaks aus (Abb. 3-22). Von diesen absorbierte Peak 2 am stärksten.

Die nicht an den Anionenaustauscher gebundenen Crude-Extrakt-Bestandteile eluierten in den ersten 15 Fraktionen. Die Kontrolle dieser Fraktionen auf SDS- und nativer PAGE (Abb.

3-22 B, C) zeigte, dass neben zahlreichen Proteinen insbesondere in den Fraktionen 4 und 5 die 80 kDa-Per a 3-Isoform sowie in den Fraktionen 9 bis 11 die 73 kDa-Per a 3-Isoform ungebunden die Säule passierten (Abb. 3-22). Beide ungebundenen Per a 3-Isoformen eluierten als Hexamere in ihrer nativen Form (Abb. 3-22).

Die an die Säule gebundenen Proteine eluierten bei dem zweistufigen Salzgradienten in Gegenwart des Elutionsschabepuffer B im Wesentlichen in vier Hauptpeaks (Peak 1 bis 4) (Abb. 3-22). Die ersten beiden Peaks (Fraktion 22 bis 35) eluierten in der ersten Stufe bei 80 mM NaCl. Diese Peak-Fraktionen wiesen bei der SDS-PAGE fünf Proteinbanden unterschiedlicher Molekulargewichte unterhalb von 50 kDa auf (50 kDa, 39 kDa, 35 kDa, 29 kDa und 25 kDa) (Abb. 3-22). Dabei lag das 39 kDa-Protein in der höchsten Konzentration vor und eluierte über einen weiten Fraktionsbereich. Dieses 39 kDa-Protein wurde in dieser Arbeit massenspektrometrisch als Per a 9 identifiziert (Abschnitt 3.4.1). Auf der nativen PAGE besaß Per a 9 eine ähnliche Mobilität wie die Untereinheiten (UE) des *Palinurus*-Hämocyanins (Hc *P.e.*, *Palinurus*-Marker). Die ausführliche Charakterisierung von Per a 9 ist in Abschnitt 3.4 dargestellt.

Wie bereits bei der Untersuchung der Zusammensetzung des Crude-Extraktes deutlich wurde (Abschnitt 3.1) und auch auf den Kontrollgelen dieser Aufreinigung gut zu sehen war (Abb. 3-4, Abb. 3-5), war die 80 kDa-Per a 3-Isoform gegenüber der 73 kDa-Per a 3-Isoform nur in sehr geringen Mengen im CE vertreten. Da außerdem in diesem ersten Reinigungsschritt bereits ein großer Anteil der 80 kDa-Per a 3-Isoform die Säule ungebunden passiert hatte, war auf den Kontrollgelen in den Fraktionen 22 bis 33 (**Peak 1 und 2**) bei 80 mM NaCl die 80 kDa-Per a 3-Isoform auch mit der Silberfärbung nicht mehr nachweisbar (Abb. 3-22).

Insbesondere bei Peak 2 fiel in Fraktion 29 die hohe Absorption von über 2 (OD 280 nm) auf. Trotz des hohen Anteils von Per a 9 in dieser war es sehr unwahrscheinlich, dass dieses Protein alleine für diese hohe Absorption verantwortlich war. Ein solcher ausgeprägter Absorptionspeak wurde bei allen säulenchromatographischen Trennungen des Crude-Extrakt beobachtet und trat nicht zwangsläufig mit Per a 9 assoziiert auf (z.B. Abb. 3-7). Allerdings konnte er auch keinem anderen Protein zugewiesen werden. Wahrscheinlich handelte es sich daher um bei 280 nm absorbierende Pigmente.

In der zweiten Stufe bei 150 mM NaCl eluierte **Peak 3** in den Fraktionen 39 bis 45. Die Kontrolle dieser Fraktionen auf SDS- und nativer PAGE ergab, dass in diesen Fraktionen erwartungsgemäß die 73 kDa-Per a 3-Isoform in ihrer nativen Form und zusätzlich Proteine mit einem Molekulargewicht von unter 70 kDa eluierten (Abb. 3-22).

Peak 4 eluierte erst bei steigendem Salzgradienten von dem Anionenaustauscher und enthielt zahlreiche Proteinspezies, u.a. ein 80 kDa-Protein in Fraktion 52 (Abb. 3-22 B). Dabei könnte es sich um Transferrin gehandelt haben. Transferrin ist ein Hämolymp-Prottein, welches bisher in der Südamerikanischen Schabe *Blaberus discoidalis* mit einem Molekular-

gewicht von 78 kDa identifiziert wurde [294]. Ausgehend von der Sequenz weist es einen isoelektrischen Punkt von pHi 5.3 auf und ist somit stärker negativ geladen als die 80 kDa-Per a 3-Isoform und sollte daher auch stärker mit der Anionenaustauschermatrix wechselwirken als die Per a 3-Proteine. Eine Unterscheidung von Transferrin und den Per a 3-Proteinen war auf der SDS-PAGE aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts nicht möglich. Allerdings sind Transferrine im Unterschied zu den Per a 3-Proteinen Monomere, sodass dieses Protein spätestens mit der SEC von den Per a 3-Proteinen separiert werden sollte [294].

Wie eingangs erwähnt, konnte bei diesem Protokoll aufgrund der guten Trennung der Isoformen auf eine zusätzliche und auch zeitintensive Rechromatographie verzichtet werden. Für den zweiten und letzten Reinigungsschritt wurden von Peak 2 typischerweise die Fraktionen 29 bis 33 und von Peak 3 die Fraktionen 40 bis 45 vereinigt, mit Schabenpuffer D (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) umgepuffert und für die sich anschließende Größenausschlusschromatographie aufkonzentriert. Zur besseren Nachvollziehbarkeit dieser Aufreinigung wurden diese Lösungen weiterhin als Peak 2- und Peak 3-Probe bezeichnet.

3.2.2.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die **Peak 2-Probe** eluierte von der SEC mit einem Hauptpeak nach 99.5 ml sowie zwei deutlich kleineren Nebenpeaks, die nach 129.5 ml und 153.5 ml Retentionsvolumen von der S-300-Säule (16/60) eluierten (Abb. 3-23).

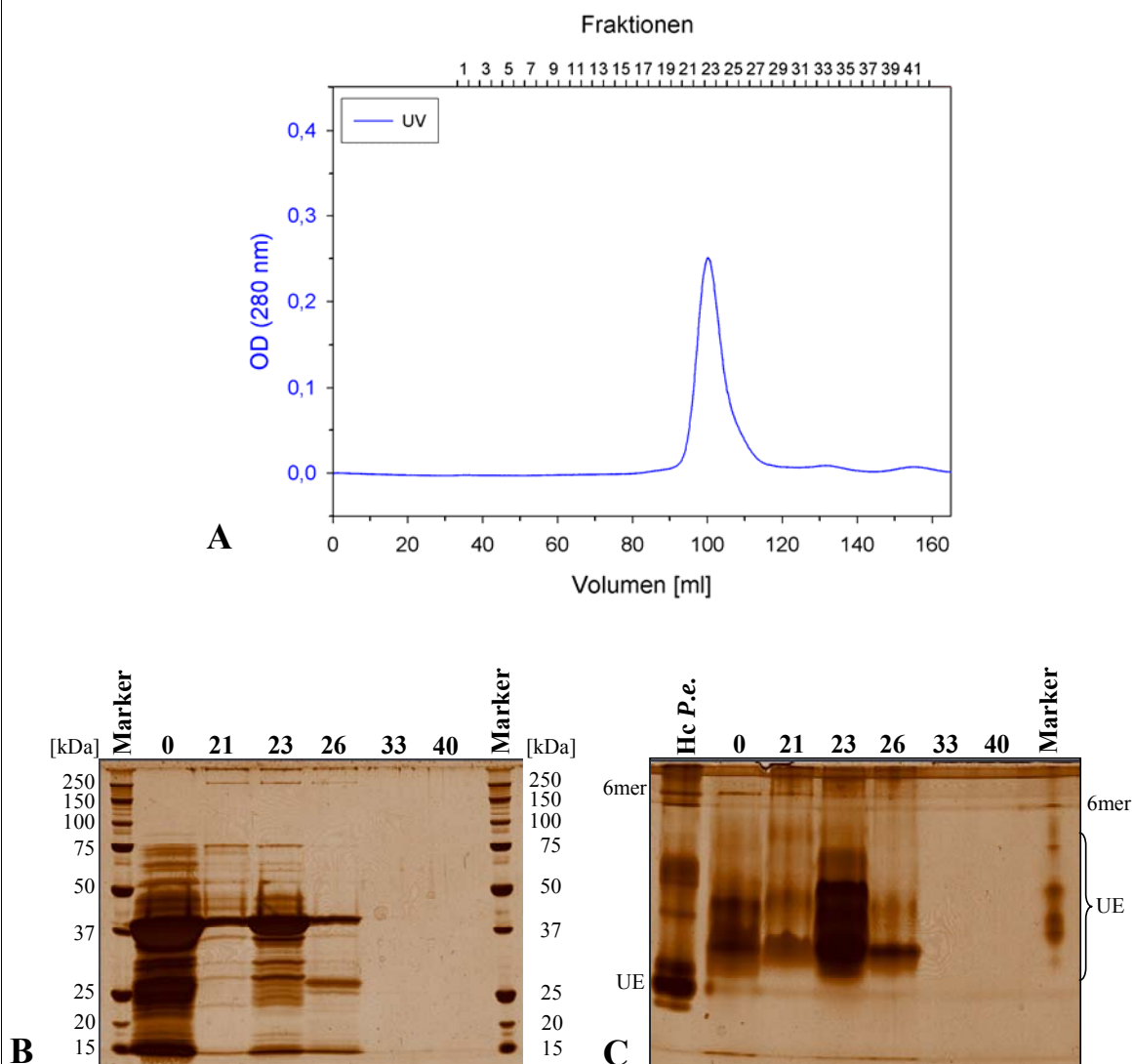
Peak 2-Probe (Protokoll 2)

Abb. 3-23: Größenausschlusschromatographie der Peak 2-Probe nach Protokoll 2 mit SDS- und nativem Kontrollgel.

A) Größenausschlusschromatographie (SEC; S-300; 16/60) von Peak 2. Es wurden 2 ml der Peak 2-Lösung auf die SEC mit Schabenpuffer D (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.8) aufgetragen. Die Proteine eluierten bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. in einem Haupt- und zwei Nebenpeaks nach 99.5 ml, 129.5 ml und 153.5 ml Retentionsvolumen von der SEC und wurden in 3 ml-Fractionen gesammelt.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fractionen auf silbergefärbten 10%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 μl der 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet. Die auf die SEC aufgegebene Peak 2-Lösung wurde als Fraktion „0“ bezeichnet.

Der Hauptpeak enthält in Fraktion 23 hauptsächlich Per a 9 bei 39 kDa. Den Nebenpeaks konnten auf dieser PAGE keine Proteinbanden zugeordnet werden.

C) Kontrolle einzelner SEC-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Die Proben wurden 2:3 mit Schabenpuffer D und anschließend 3:4 mit BPB versetzt, sodass eine identische Probenmenge wie auf die SDS-Gele appliziert wurde. Lediglich Fraktion „0“ wurde gegenüber der SDS-PAGE zusätzlich 1:8 mit Schabenpuffer D verdünnt. Als Referenz wurde neben dem schlecht aufgelösten *Eurypelma*-Marker das andisoziierte Hämocyanin von *Palinurus elephas* (Hc P.e., *Palinurus*-Marker.) verwendet.

Der Proteinhauptpeak setzte sich in den Fraktionen 21 und 23 aus auf der nativen PAGE schlecht aufgelösten Proteinbanden mit höherer Mobilität als die 6-meren Referenz-Hämocyanine zusammen. Den Nebenpeaks konnten auch auf der nativen PAGE keine Proteine zugeordnet werden.

Für die weitere Proteincharakterisierung wurden für Per a 9 die Fraktionen 21 bis 26 vereinigt und aufkonzentriert. Dieses Protokoll eignete sich nicht zur Gewinnung der 80 kDa-Per a 3-Isoform.

Die Kontrollgele dieses Laufs zeigten, dass der Proteinhauptpeak (99.5 ml Retentionsvolumen) hauptsächlich Per a 9 enthielt (Abb. 3-23). Eine Elution der nativen 80 kDa-Per a 3-Isoform wäre bei ca. 85 ml zu erwarten gewesen. Somit handelte es sich bei der 77 kDa-Proteinbande auf der SDS-PAGE in den Fraktionen 21 und 23 um keine der charakterisierten Per a 3-Isoformen (Abb. 3-23).

Die Proteine in den zwei kleinen Nebenmaxima hatten offensichtlich eine zu geringe Konzentration als dass sie bei der Kontrolle der Fraktionen auf SDS- und nativer PAGE mit der Silberfärbung hätten angefärbt werden können und wurden daher nicht weiter identifiziert.

Aus diesem Lauf wurden die Per a 9-haltigen Fraktionen 21 bis 26 vereinigt und für die Charakterisierung von Per a 9 aufkonzentriert. Die weiterführenden Experimente sind in Abschnitt 3.4 dargelegt.

Die Peak 3-Probe eluierte bei der Größenausschlusschromatographie mit vier Peaks nach 84.5 ml, 99.5 ml, 132.5 ml und 153.5 ml Retentionsvolumen (Abb. 3-24).

Peak 3-Proben (Protokoll 2)

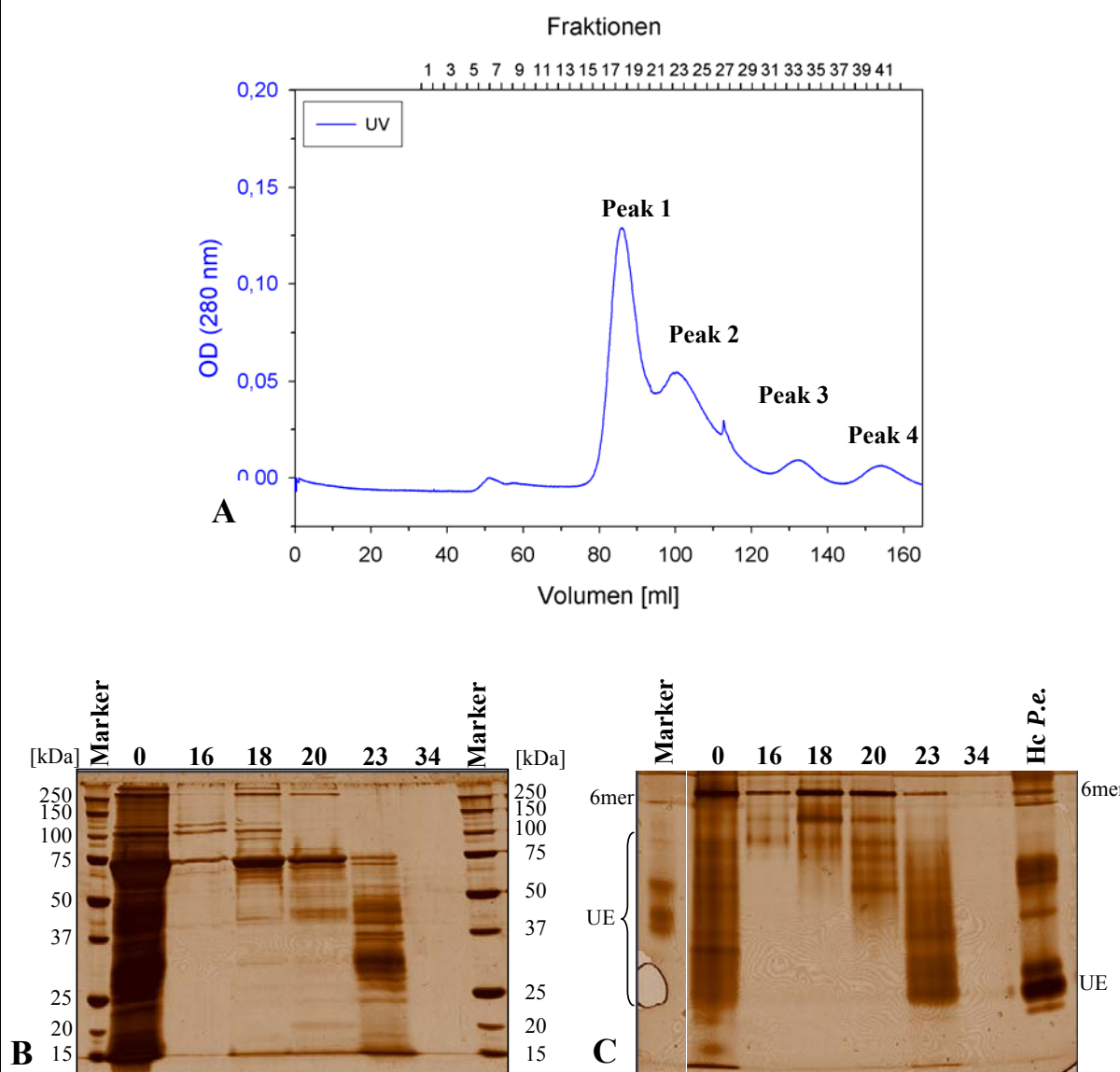


Abb. 3-24: Größenausschlusschromatographie der Peak 3-Probe nach Protokoll 2 mit SDS- und nativem Kontrollgel.

A) Größenausschlusschromatographie (S-300; 16/60) von Peak 3. Es wurden 2 ml der Peak 3-Lösung auf die SEC mit Schabenpuffer D (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) aufgetragen. Die Proteine eluierten bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. in vier Peaks nach 84.5 ml, 99.5 ml, 132.5 ml und 153.5 ml Retentionsvolumen von der SEC und wurden in 3 ml-Fraktionen gesammelt.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fraktionen auf silbergefärbtem 10%igen SDS-Gel. Pro Spur wurden je 25 µl der 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. „0“ bezeichnet die Peak 3-Lösung, die auf die SEC aufgegeben wurde. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

In den Fraktionen 16 bis 20 war hauptsächlich die 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden. In Fraktion 23 waren zahlreiche zusätzliche Proteinbanden unterhalb von 75 kDa vorhanden. Die Proteinkonzentrationen des dritten Peaks war offensichtlich zu gering, um auf dieser PAGE definierte Proteinbanden zu erkennen. Die Konzentration von Peak 4 war noch geringer.

C) Kontrolle einzelner SEC-Fraktionen auf silbergefärbtem 7.5%igen nativen Gel (pH 8.8). Die Proben wurden 2:3 mit Schabenpuffer D und anschließend 3:4 mit BPB versetzt sodass eine identische Probenmenge wie auf die SDS-Gele appliziert wurde. Lediglich Fraktion „0“ wurde gegenüber der SDS-PAGE zusätzlich 1:8 mit Schabenpuffer D verdünnt. Als Referenz wurde neben dem schlecht aufgelösten *Eurypelma*-Marker der *Palinurus*-Marker (Hc P.e.) verwendet.

Zusätzlich zur typischen Hexamerbande der 73 kDa-Per a 3-Isoform auf Höhe des 6-meren *Palinurus* Häm-

cyanins (Hc *P.e.*) waren in den Fraktionen 16 bis 20 weitere Proteinbanden zu erkennen, die weiter als Per a 3 in die Gelmatrix eingewandert waren. In Fraktion 23 bildeten die zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhandenen Proteine einen Schlier, der keine Erkennung bestimmter Proteinbanden zuließ. In Fraktion 34 konnte auch auf der nativen PAGE keine Proteinbanden detektiert werden.

Für die anschließende Proteincharakterisierung wurden für die 73 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 15 bis 20 vereinigt und aufkonzentriert.

Die Kontrolle der Fraktionen auf SDS- und nativer PAGE zeigten, dass nach 84.5 ml Retentionsvolumen in Peak 1 (Fraktion 18) hauptsächlich die hexamere 73 kDa-Per a 3-Isoform vertreten war. Peak 2 eluierte maximal in Fraktion 23 nach 99.5 ml Retentionsvolumen und enthielt zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform ein Proteingemisch mit einem dominierenden 31 kDa-Protein (Abb. 3-24). Die Proteinkonzentrationen von Peak 3 (Fraktion 34) und Peak 4 (Fraktion 41, nicht gezeigt) lagen unterhalb der Nachweisgrenze der Silberfärbung, sodass eine Proteinzuzuordnung nicht möglich war.

Aus diesem Lauf wurden für die 73 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktionen 15 bis 20 vereinigt und aufkonzentriert. Die weiterführende Charakterisierung der 73 kDa-Per a 3-Isoform ist in Abschnitt 3.3 dargelegt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie in Material und Methode beschrieben über die Messung der Absorption bei 280 nm (Abschnitt 2.6.1). Für die 73 kDa-Per a 3-Isoform wurde für den spezifischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{nm}} = 1.44 \text{ [l/(g*cm)]}$ und für Per a 9 $\epsilon_{280\text{nm}} = 0.92 \text{ [l/(g*cm)]}$ verwendet. Somit wurde ausgehend von 1556 mg CE 1.3 mg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 2.5 mg Per a 9 gewonnen. Dies entsprach einer Proteinausbeute von 0.08% (w/w) für die 73 kDa-Per a 3-Isoform und von 0.16% (w/w) für Per a 9.

Die Überprüfung dieser endgereinigten Proteine auf SDS- und nativer PAGE ergab, dass die Per a 3-Isoform zusätzlich zur 73 kDa-Bande weitere Proteinbanden bei 68 kDa und über 250 kDa aufwies (Abb. 3-25). Diese Banden wurden massenspektrometrisch untersucht und jeweils als Aggregat bzw. Bruchstück der 73 kDa-Per a 3-Isoform identifiziert (Abschnitt 3.3). Auf der nativen PAGE waren jedoch weder Aggregate noch Dissoziate oder proteolytische Bruchstücke nachweisbar (Abb. 3-25). Die Isolation der 73 kDa-Per a 3-Isoform von dem 88 kDa-Protein war mit Protokoll 2 erfolgreich.

In der Per a 9-Probe wurden auf dem SDS-Gel ebenfalls zusätzliche Banden mit geringerem Molekulargewicht angefärbt, von denen die Bande bei ca. 27 kDa massenspektrometrisch als Per a 9 Fragment identifiziert wurde (s. Anhang, Abschnitt 8.2.4). Möglicherweise könnte es sich bei den übrigen beiden Banden ebenfalls um Per a 9-Fragmente gehandelt haben oder aber um weitere Proteine, denen auf der nativen PAGE die schwach angefärbte Proteinbande unterhalb der ausgeprägten Per a 9- Bande zuzuordnen war (Abb. 3-25).

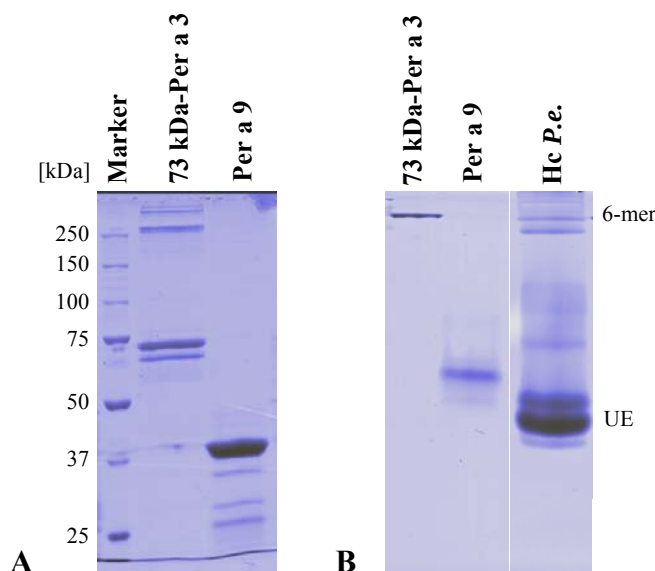


Abb. 3-25: Kontrolle der Reinheit und Oligomerisierung der nach Protokoll 2 isolierten Allergene aus dem Crude-Extrakt der zweiten Schabencharge.

A) Coomassie-gefärbte 7.5%ige SDS-PAGE. Es wurden 1.26 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 3.2 µg Per a 9 auf das Gel appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Die Per a 3-Isoform wies zusätzlich zur 73 kDa-Bande weitere Proteinbanden bei 68 kDa und über 250 kDa auf. Diese Banden wurden massenspektrometrisch analysiert und jeweils als Aggregat bzw. Bruchstück der 73 kDa-Per a 3-Isoform identifiziert. In der Per a 9 Probe waren ebenfalls zusätzlich zur 39 kDa-Bande weitere niedermolekulare Banden bei 35 kDa, 30 kDa und 27 kDa vorhanden, von denen die 27 kDa-Bande ebenfalls massenspektrometrisch als Per a 9-Fragment bestimmt wurde. Die Isolation der 73 kDa-Per a 3-Isoform von dem 88 kDa-Protein aus Protokoll 1 war bei dieser Aufreinigung nach Protokoll 2 gelungen.

B) Coomassie-gefärbte 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Es wurden 1.26 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 3.2 µg Per a 9 der zuvor 3:4 mit BPB versetzten Proben auf das Gel appliziert. Als Referenz diente der *Palinurus*-Marker (Hc *P.e.*).

Diese native PAGE zeigte eindeutig, dass die 73 kDa-Per a 3-Isoform trotz Spaltprodukte in seiner intakten hexameren Form und zusätzlich in hoher Reinheit auf der nativen PAGE vorlag. Auch die Per a 9-Probe wies eine sehr hohe Reinheit auf.

3.2.2.3 Fazit der Reinigung nach Protokoll 2

Bereits in dem ersten Reinigungsschritt über die IEX wurde deutlich, dass dieses Protokoll 2 nicht geeignet war, um die geringen Mengen der 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt effizient isolieren zu können. Insgesamt stellte sich die hohe Ionenstärke des Crude-Extraktes als problematisch für diese IEX heraus. Neben CaCl_2 und MgCl_2 aus dem Crude-Extrakt-Puffer erhöhten noch zusätzliche Ionen und vor allem DNA und RNA aus dem Schabenmazerat die Ionenstärke des Extraktes. Dadurch stieg die Leitfähigkeit beim Probenaufruf punktuell auf maximal 0.28 mS/cm an, sodass u.a. für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die Elutionsbedingungen von 80 mM NaCl erreicht waren und diese Isoform nur sehr schlecht an die Matrix binden konnte. Eine Überladung der Säule konnte bei der Auftragung von 80 mg CE bei einer Säulenkapazität von 160 mg ausgeschlossen werden. Eventuell wurde jedoch die Kapazität der Säule durch gebundene DNA und RNA herabgesetzt.

3.2.3 Aufreinigung des Crude-Extraktes nach Protokoll 3

Insgesamt stellte sich die Reinigung der Allergene aus dem Crude-Extrakt nach Protokoll 2 bei einer Ausbeute der 73 kDa-Per a 3-Isoform mit 0.08% (w/w) und 0% der 80 kDa-Per a 3-Isoform als nicht optimal heraus. Aus diesem Grund wurde das Protokoll insbesondere im Hinblick auf die Ausbeute optimiert.

In diesem Protokoll 3 wurde dafür im ersten Reinigungsschritt auf den Stufengradienten und den damit verbundenen kurzen Elutionszeiten verzichtet und stattdessen ein langsamer linear ansteigender Salzgradient (0 bis 200 mM NaCl) gewählt.

Das für Protokoll 3 verwendete Reinigungsprotokoll gliederte sich in zwei Schritte:

1. Anionenaustauscher-Chromatographie des Crude-Extraktes (CE)
(Uno Q12; linearer Gradient 0 bis 200 mM NaCl)
2. Größenausschlusschromatographie der isolierten Peak-Proben
(S-300; 26/60)

3.2.3.1 Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)

Für diese präparative Proteinaufreinigung wurden 18 ml Crude-Extrakt in insgesamt neun Anionenaustauscherläufen aufgereinigt. Im Zuge dieser Aufreinigung stellten sich 2 ml aufgetragener Crude-Extrakt als optimal heraus. Als Bindungspuffer wurde bereits wie zuvor Schabenpuffer B (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5) und zur Elution Elutionsschabenpuffer B (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) verwendet.

Ein typisches Elutionsprofil ist in Abb. 3-26 dargestellt. Dessen Verlauf ähnelte trotz linearem Salzgradienten dem IEX-Profil aus Protokoll 2 in erstaunlicher Weise (Abb. 3-22). Zusätzlich zu den ungebundenen Crude-Extrakt-Bestandteilen setzte sich das Elutionsprofil ebenfalls im Wesentlichen aus vier Peaks zusammen (Abb. 3-26).

Die nicht gebundenen Bestandteile passierten bis einschließlich Fraktion 9 die Anionenaustauscher-Säule (Abb. 3-26). Die Kontrolle dieser Fraktionen zeigte auf SDS- und nativer PAGE, dass insbesondere in Fraktion 3 zusätzlich zu zahlreichen weiteren Proteinen sowohl die 80 kDa-Per a 3-Isoform als auch die 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden waren (Abb. 3-26). Somit wies dieses Protokoll eine ähnliche Problematik auf, wie sie bereits im vorherigen Abschnitt in Protokoll 2 beobachtet wurde: die Ionenstärke des Extraktes war bei der Probenauftragung punktuell zu hoch, sodass die Per a 3-Isoformen nicht vollständig an die Matrix binden konnten.

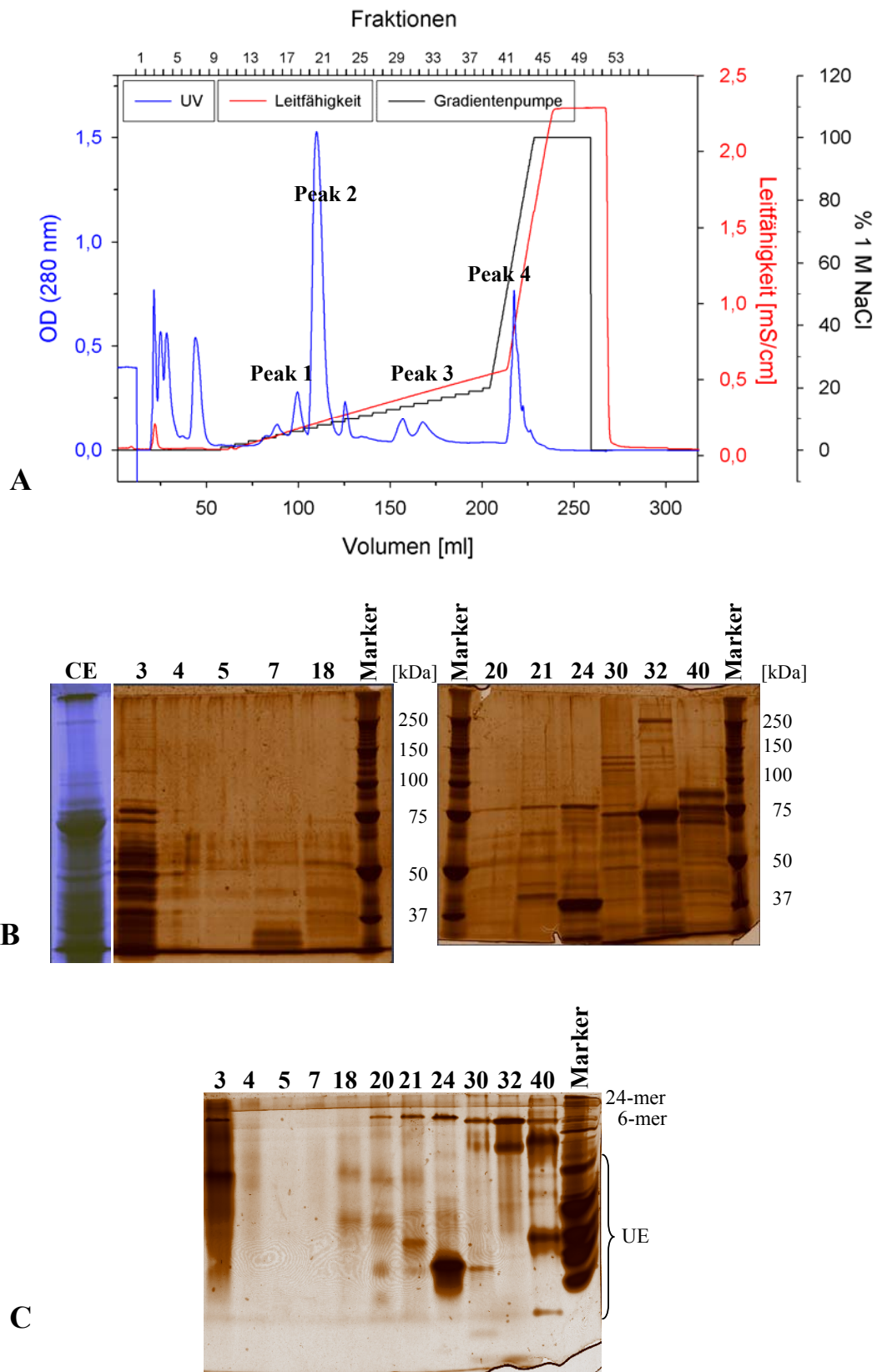


Abb. 3-26: Erster Reinigungsschritt des Crude-Extraktes von *Periplaneta americana* nach Protokoll 3.

A) Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX; Uno Q12). Es wurden 2 ml unverdünnter CE mit Schabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, pH 7.5) auf den Anionenaustauscher bei 20°C aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 200 mM NaCl mit Elutionsschabepuffer B (20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) bei einer Flussrate von 1 ml/Min. Das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt.

Typischerweise eluierten die CE-Bestandteile in vier Peaks bei 55 mM, 75 mM, 140 mM und 610 mM NaCl von der Säule.

B) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurde je 25 µl der 1:2 mit DP versetzten Probe appliziert. Zunächst wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und im Anschluss daran mit der sensitiveren Silberfärbung überfärbt. Um eine bessere Bandenzuordnung zu ermöglichen, wurde die Crude-Extrakt Spur (CE) mit der Coomassie-Färbung dargestellt. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

In Fraktion 3 waren neben zahlreichen weiteren Proteinen die 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden. Diese Isoformen konnten zum Großteil auch an die Säule binden und eluierten in den Fraktionen 20 bis 24 bzw. 30 bis 32. Zusammen mit der 80 kDa-Per a 3-Isoform eluierte in Fraktion 24 in hohen Konzentrationen Per a 9. Das in Protokoll 1 störende 88 kDa-Protein wurde bei diesem Protokoll von dem 73 kDa-Per a 3-Protein separiert und eluierte in Fraktion 40.

C) Kontrolle einzelner IEX-Fractionen auf silbergefärbten 7.5%igen nativen Gelen (pH 8.8). Pro Spur wurden 15 µl der 3:4 mit BPB versetzten Probe appliziert. Der CE wurde zuvor zusätzlich 1:10 mit Schabepuffer B verdünnt. Als Referenz wurde der *Eurytelma*-Marker verwendet.

Die native PAGE zeigte eindeutig, dass neben zahlreichen weiteren Proteinen in den Fraktionen 20 bis 24 die native hexamere 80 kDa-Per a 3-Isoform und in den Fraktionen 30 bis 40 die native hexamere 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden war. Per a 9 in Fraktion 24 wies eine ähnliche Mobilität wie die UE g des *Eurytelma*-Markers auf.

Obwohl ein gewisser Anteil der Per a 3-Isoformen den Anionenaustauscher ungebunden passierte, wurde ein Großteil der 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Proteine an die IEX gebunden. Die Per a 3-Isoformen wurden ebenso wie Per a 9 im Eluat in nativer Form nachgewiesen. Für die anschließende Größenausschlusschromatographie wurden von Peak 2 (80 kDa-Per a 3-Isoform, Per a 9) die Fraktionen 21 bis 24 und von Peak 3 73 kDa-Per a 3-Isoform) die Fraktionen 32 bis 37 vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

Peak 1 (Fraktionen 14 bis 18) enthielt hauptsächlich zwei gering konzentrierte Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa auf der SDS-PAGE (Fraktion 18, Abb. 3-26). **Peak 2** enthielt zusammen mit dem Nebenpeak in den Fraktionen 20 bis 24 neben zahlreichen anderen Proteinen, die zu isolierende 80 kDa-Per a 3-Isoform. Wie bereits von vorangegangenen Säulenchromatographien bekannt, war auch hier eine ausgeprägte Absorption in Fraktion 20 zu beobachten, die erneut nur geringe Mengen an Protein enthielt (Abb. 3-26). Zusammen mit der 80 kDa-Per a 3-Isoform eluierte in Fraktion 24 das in großen Mengen vorhandene 39 kDa-Protein (Abb. 3-26), welches bereits mit Protokoll 2 isoliert werden konnte und auch bei dieser Reinigung massenspektrometrisch als Per a 9 identifiziert wurde (Abschnitt 3.4). In **Peak 3** (Fraktionen 30 bis 37) war zusammen mit zahlreichen weiteren niedermolekularen Proteinen die 73 kDa-Per a 3-Isoform enthalten (Abb. 3-26). **Peak 4** (Fraktionen 40 bis 46) eluierte erst mit einer Salzkonzentration von über 200 mM NaCl und enthielt eine Vielzahl an Proteinen. Von besonderem Interesse war dabei die Proteinbande bei 88 kDa, die in der Hämolymphe-Aufreinigung aus Protokoll 1 immer mit der 73 kDa-Per a 3-Isoform assoziiert aufgetreten war und auch im letzten Reinigungsschritt über die Größenausschlusschromatographie von dieser nicht abgetrennt werden konnte (Abb. 3-20). Mit Protokoll 3 war es wie zuvor mit Protokoll 2 gelungen, das 88 kDa-Protein von der 73 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt heraus zu separieren.

Aufgrund der guten Trennung der Isoformen in diesem ersten Reinigungsschritt konnte auf eine Rechromatographie, wie sie in Protokoll 1 benötigt wurde, verzichtet werden.

Für die weitere Reinigung der Per a 3-Isoformen wurden von Peak 2 die Fraktionen 21 bis 24 und von Peak 3 die Fraktionen 32 bis 37 vereinigt und für die anschließende Größenausschlusschromatographie mit Schabenpuffer D umgepuffert und aufkonzentriert. Zur besseren Nachvollziehbarkeit der Reinigung wurden diese Lösungen auch weiterhin als Peak 2- und Peak 3-Probe bezeichnet.

3.2.3.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Beide Peak-Proben wurden auf einer Größenausschluss säule (S-300; 26/60) mit Schabenpuffer D chromatographiert. Das Elutionsprotokoll war bis auf ein unterschiedliches Sammelfenster für die Probenfraktionierung identisch (s. Anhang, Abschnitt 8.8.6).

Die **Peak 2-Probe** eluierte mit zwei Peaks nach 129.5 ml und 182.7 ml Retentionsvolumen, wobei der Hauptpeak zusätzlich eine Schulter (bei 210.7 ml) aufwies (Abb. 3-27). Da das Zeitfenster für Fraktionierung nicht optimal gewählt wurde, wurde der erste Peak manuell gesammelt und als „I“ bezeichnet.

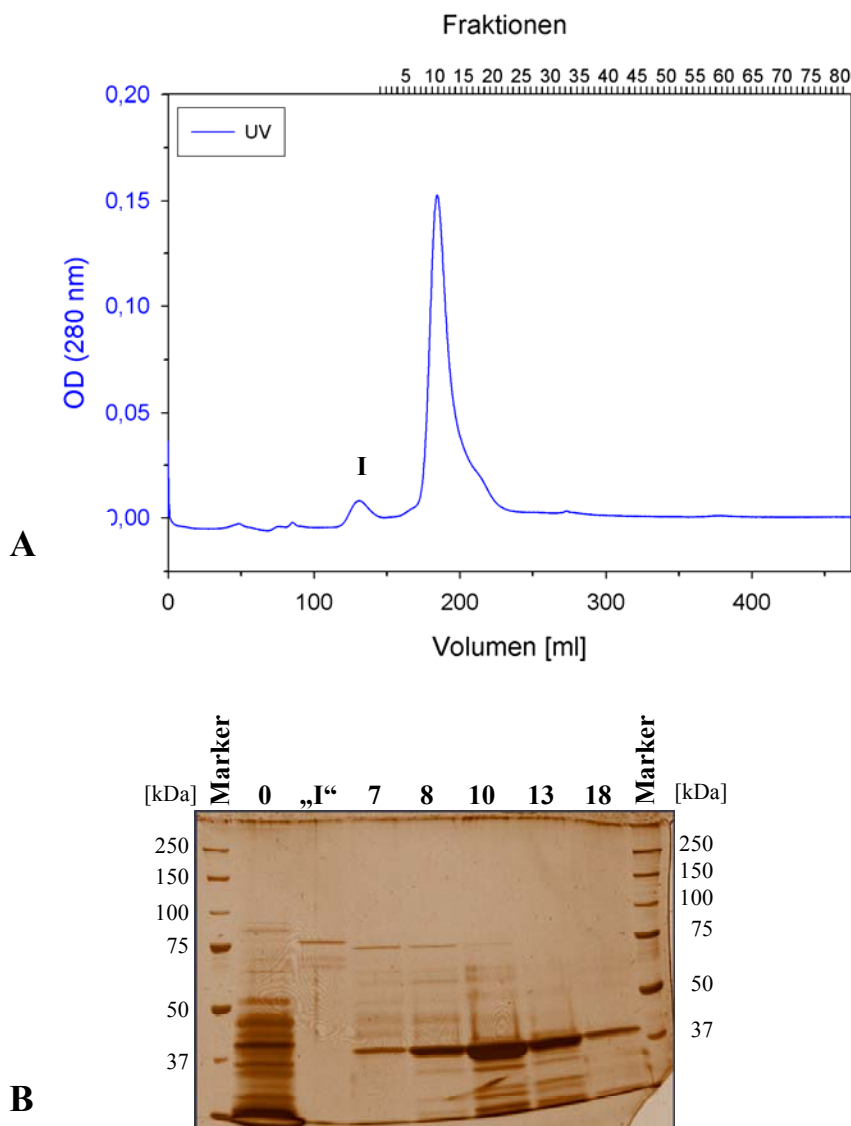
Peak 2-Probe (Protokoll 3)

Abb. 3-27: Größenausschlusschromatographie der Peak 2-Probe nach Protokoll 3 mit 7.5%igen SDS-Kontrollgel.

A) Größenausschlusschromatographie (S-300; 26/60) von Peak 2. Es wurden 2 ml der Peak 2-Lösung auf die SEC mit Schabenpuffer D (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) aufgetragen. Insgesamt wurde die Säule mit 646 ml Puffer gespült, im Elutionsprofil wurden die ersten 468 ml dargestellt; im Anschluss daran, wurde keine Proteinelution mehr beobachtet. Die Probe eluierte bei einer Flussrate von 1.3 ml/Min. mit zwei Peaks nach 129.5 ml und 182.7 ml Retentionsvolumen von der SEC und wurde in 4 ml-Fraktionen gesammelt. Der erste Peak wurde manuell gesammelt und im Folgenden als „I“ bezeichnet.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fraktionen auf silbergefärbten 7.5%igen SDS-Gelen. Pro Spur wurden je 25 µl der 1:2 mit DP versetzten Proben appliziert. Als Fraktion „0“ wurde die auf die SEC aufgegebene Peak 2-Lösung bezeichnet und mit „I“ der manuell gesammelte erste Peak. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Lediglich die manuell gesammelte Fraktion „I“ enthielt in geringen Mengen die 80 kDa-Per a 3-Isoform. Bereits ab Fraktion 7 dominierte über einen breiten Fraktionsbereich Per a 9 mit 39 kDa.

Für die weitere Proteincharakterisierung wurden für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die manuell gesammelte Fraktion „I“ und für Per a 9 die Fraktionen 7 bis 18 vereinigt und aufkonzentriert.

Die Kontrolle der Fraktionen auf der SDS-PAGE zeigte deutlich, dass in „I“ die gesuchte 80 kDa-Per a 3-Isoform, allerdings nur in geringer Menge vorhanden war (Abb. 3-27). Der Proteinhauptanteil verfiel bereits ab Fraktion 7 (bis Fraktion 18) auf Per a 9. Dieses eluierte nach 182.7 ml Retentionsvolumen im Hauptpeak zusammen mit weiteren niedermolekularen Proteinen. Für die nachfolgenden Proteincharakterisierungen wurde für die 80 kDa-Per a 3-Isoform die Fraktion „I“ verwendet und aufkonzentriert und für Per a 9 die Fraktionen 7 bis 18 vereinigt und aufkonzentriert.

Für die Größenausschlusschromatographie der **Peak 3-Probe** wurde das Sammelfenster gegenüber dem vorherigen Lauf neu angepasst. Die Peak 3-Probe eluierte im Wesentlichen mit einem Hauptpeak (130.7 ml Retentionsvolumen) und zwei Nebenpeaks (90.7 ml und 178.7 ml Retentionsvolumen) (Abb. 3-28).

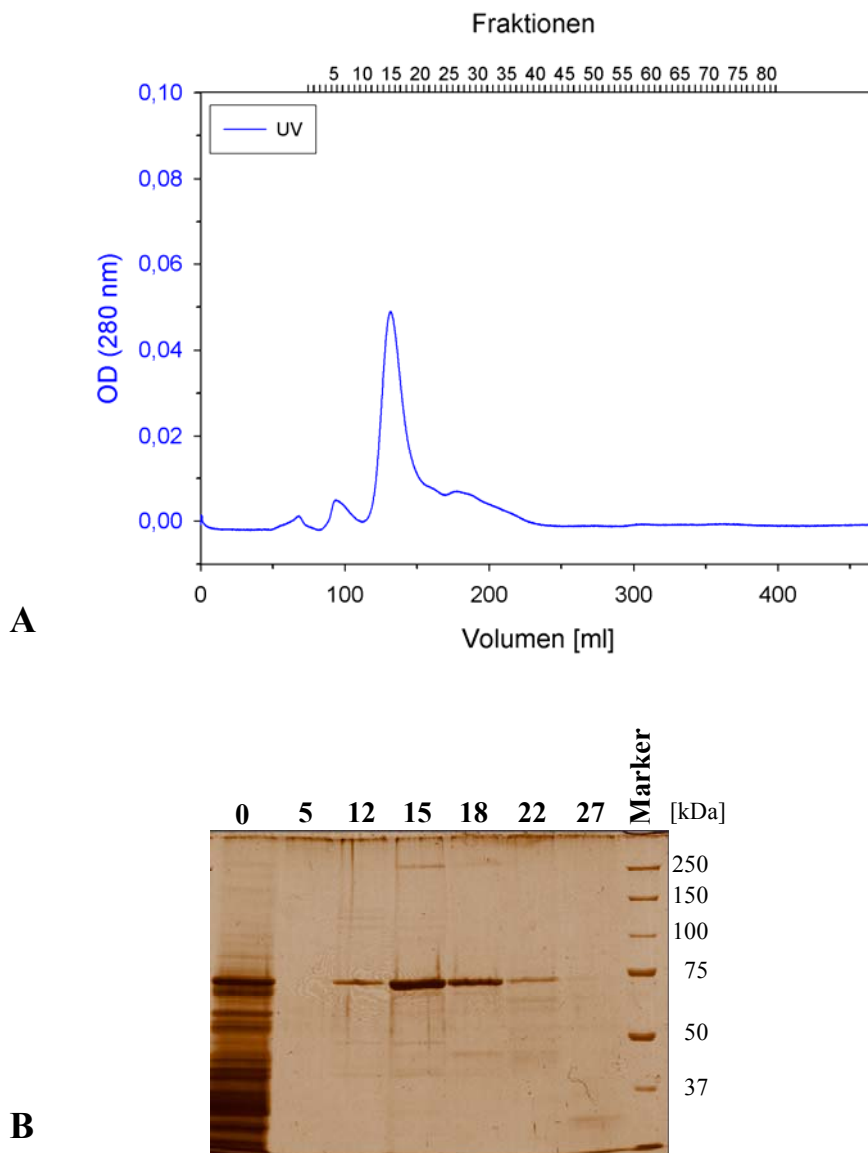
Peak 3-Probe (Protokoll 3)

Abb. 3-28: Größenausschlusschromatographie der Peak 3-Lösung nach Protokoll 3 mit 7.5%igem SDS-Kontrollgel.

A) Größenausschlusschromatographie (SEC; S-300; 26/60) von Peak 3. Es wurden 2 ml der Peak 3-Lösung auf die SEC mit Schabenpuffer D (100 mM TRIS/HCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.8) aufgetragen. Vom Elutionsprofil wurden wie zuvor lediglich die ersten 468 ml dargestellt. Die Proteine eluierten bei einer Flussrate von 1.3 ml/Min. in drei Peaks nach 90.7 ml, 130.7 ml und 178.7 ml Retentionsvolumen von der SEC und wurden in 4 ml-Fractionen gesammelt.

B) Kontrolle einzelner SEC-Fractionen auf silbergefärbtem 7.5%igem SDS-Gel. Pro Spur wurden je 25 µl der 1:2 mit DP versetzten Proben appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

Auf der SDS-PAGE konnte Fraktion 5 (Peak 1) keine Proteinbande zugeordnet werden. Die Proteinhauptmenge war in den Fraktionen 12 bis 18 mit der 73 kDa-Per a 3-Isoform vorhanden. Fraktion 27 (Peak 3) enthielt lediglich sehr geringe Mengen eines nicht weiter identifizierten 31 kDa-Proteins.

Für die Charakterisierung der 73 kDa-Per a 3-Isoform wurden die Fraktionen 11 bis 22 vereinigt und aufkonzentriert.

Der erste Nebenpeak in Fraktion 5 enthielt offensichtlich so geringe Proteinmengen, dass diesem auf der silbergefärbten SDS-PAGE keine Proteinbande zugeordnet werden konnte

(Abb. 3-28). Der Hauptpeak (130.7 ml) enthielt in den Fraktionen 11 bis 22 die 73 kDa-Per a 3-Isoform in hoher Reinheit. Im zweiten Nebenpeak (178.7 ml, Fraktion 27) eluierten geringe Mengen eines 31 kDa-Proteins (Abb. 3-28).

Für die weitere Proteincharakterisierung der 73 kDa-Per a 3-Isoform wurden die Fraktionen 11 bis 22 vereinigt und aufkonzentriert.

Der Vergleich der Retentionsvolumina der Per a 3-Isoformen zeigte, dass die 80 kDa-Per a 3-Isoform lediglich 1 ml früher von der SEC eluierte als die 73 kDa-Per a 3-Isoform. Somit bestätigten sich die Ergebnisse meiner Diplomarbeit (Isoformen aus der Hämolymphe), dass beide Per a 3-Isoformen auch im Crude-Extrakt einen ähnlichen Stokes-Radius aufwiesen, wobei die 80 kDa-Per a 3-Isoform etwas größer war als die 73 kDa-Per a 3-Isoform.

Die Konzentrationsbestimmungen der Proben ergaben, dass aus der Reinigung von 700.2 mg CE (18 ml) insgesamt 0.18 mg der 80 kDa-Per a 3-Isoform, 1.45 mg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 6.1 mg Per a 9 isoliert wurden. Dies entsprach einer Ausbeute von 0.03% (w/w) der 80 kDa-Per a 3-Isoform, von 0.21 % (w/w) der 73 kDa-Per a 3-Isoform und von 0.87% (w/w) Per a 9.

Die nach diesem Protokoll 3 gereinigten Proteine wurden abschließend auf SDS- und nativer PAGE auf ihre Reinheit und Oligomerisierung hin überprüft (Abb. 3-29).

Alle drei Proben zeigten auf der SDS-PAGE zusätzlich zu ihrer regulären Proteinbande (80 kDa, 73 kDa, 39 kDa) weitere niedermolekulare Banden, bei denen es sich um proteolytisch gespaltene Fragmente handelte, die für die Per a 3-Isoformen (Abschnitt 3.3.2.1) und für Per a 9 (Abschnitt 3.4.1) massenspektrometrisch identifiziert wurden (Abb. 3-29 A).

Die Kontrolle dieser Proben auf der nativen PAGE ergab, dass trotz partiellem proteolytischen Verdau der Großteil der isolierten Allergene weiterhin in ihrer nativen Form vorlag (Abb. 3-29 B). In ihrer nativen hexameren Form zeigten die Per a 3-Isoformen die typische ähnliche Mobilität wie das 7-mere Hämocyanin von *Eurypelma californicum* (*Eurypelma*-Marker) bzw. des 6-meren Hämocyanins von *Palinurus elephas* (Hc *P.e.*, *Palinurus*-Marker.). Per a 9 wies eine ähnliche elektrophoretische Beweglichkeit wie die UE g der *Eurypelma*-Markers auf (Abb. 3-29 B).

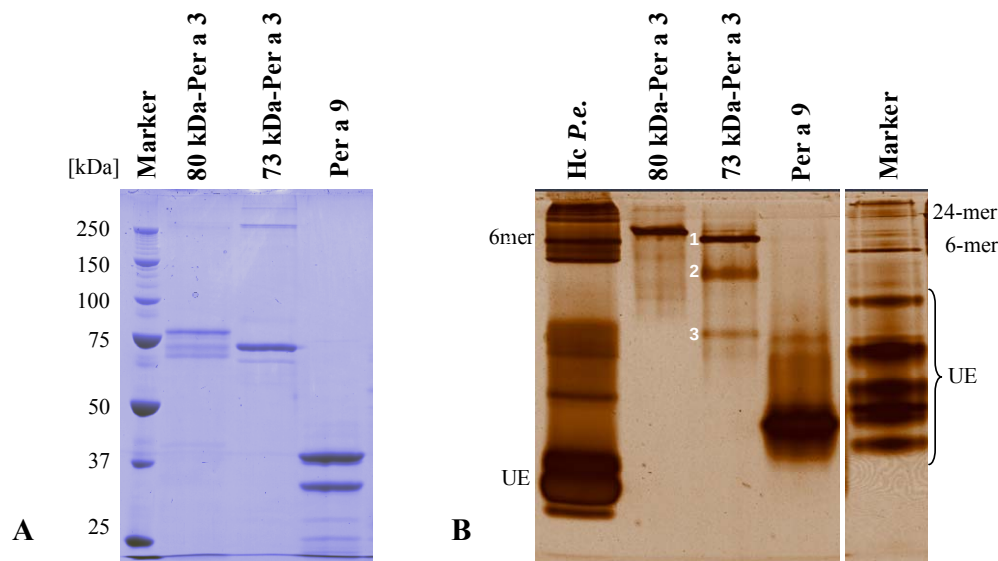


Abb. 3-29: Kontrolle der Reinheit und Oligomerisierung der nach Protokoll 3 isolierten Allergene.

A) Coomassie-gefärbte 7.5%ige SDS-PAGE. Es wurden 2.1 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform, 1.2 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 6.1 µg Per a 9 1:2 mit DP versetzt auf das Gel appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet.

In allen drei Proteinspuren waren zusätzlich zu den regulären Proteinbanden (80 kDa, 73 kDa und 39 kDa) weitere niedermolekulare Proteinbanden vorhanden. Einige dieser Banden wurden massenspektrometrisch untersucht und als Spaltprodukte des jeweiligen Allergens identifiziert. Diese Beobachtung wird im Abschnitt 3.3.2.1 und auch im Anhang (Abschnitt 8.2.1) detaillierter erläutert.

Auch mit diesem Protokoll war es gelungen, die 73 Da-Per a 3-Isoform von dem 88 kDa-Protein zu separieren.

B) Silbergefärbte 7.5%ige native PAGE (pH 8.8). Es wurden 0.25 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform, 1.5 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform und 6.1 µg Per a 9 3:4 mit BPB versetzt auf das Gel appliziert. Als Referenz dienten sowohl der *Eurypelma*-Marker als auch der *Palinurus*-Marker (Hc P.e.).

Diese native PAGE zeigte eindeutig, dass beide Per a 3-Proteine auch aus dem Crude-Extrakt in ihrer intakten hexameren Form isoliert werden konnten. Insbesondere die 80 kDa-Per a 3-Isoform lag in hoher Reinheit vor. Die 73 kDa-Per a 3-Isoform zeigte auf der nativen PAGE insgesamt drei Banden (mit 1 bis 3 gekennzeichnet). Die erste Bande entsprach der hexameren 73 kDa-Per a 3-Isoform. Bei Bande 2 und 3 handelte es sich wahrscheinlich um verschiedene Dissoziationsstufen, die in Abschnitt 3.3 genauer analysiert werden. Auch Per a 9, mit ähnlicher Mobilität wie die UE g des *Eurypelma*-Markers, lag in hoher Reinheit vor.

Lediglich in der 73 kDa-Per a 3-Probe waren auf der nativen PAGE zwei weitere Proteinbanden zu erkennen (Bande 2, 3, Abb. 3-29 B), bei denen es sich um unterschiedliche Dissoziationsstufen dieser Isoform handelte, wie Western-Blot-Experimente in Abschnitt 3.3 bestätigten.

3.2.3.3 Fazit der Reinigung nach Protokoll 3

Trotz der hohen Ionenstärke des Crude-Extraktes gelang es, mit diesem Protokoll 3 zusätzlich zur 73 kDa-Per a 3-Isoform und zu Per a 9 erstmalig aus dem Crude-Extrakt die 80 kDa-Per a 3-Isoform zu isolieren. Durch den linear ansteigenden Salzgradienten konnte zusätzlich die Ausbeute aller drei isolierter Allergene verbessert werden.

3.2.4 Fazit der Reinigungsprotokolle

Insgesamt wurden drei etwas unterschiedliche Reinigungsstrategien für die Isolierung von Per a 9 und der Per a 3-Isoformen aus der Hämolymphe und/oder Crude-Extrakt vorgestellt. Dabei konnte festgehalten werden, dass präparative Per a 9-Mengen lediglich aus dem Crude-Extrakt gewonnen wurden, wohingegen die Per a 3-Isoformen mit der höchsten Ausbeute aus dem Hämolymphe-Extrakt gewonnen werden konnten. Eine Zusammenfassung der isolierten Proteinmengen und -ausbeuten der jeweiligen Reinigungsprotokolle gibt Tabelle 3-3:

	80 kDa-Per a 3-Isoform	73 kDa-Per a 3-Isoform	Per a 9
Protokoll 1	4.1 mg (2.7%)	5.3 mg (3.5%)	---
Protokoll 2	---	1.3 mg (0.08%)	2.5 mg (0.16%)
Protokoll 3	0.18 mg (0.03%)	1.45 mg (0.21%)	6.1 mg (0.87%)

Tabelle 3-3: Proteinmengen und -ausbeuten der jeweiligen Reinigungsprotokolle.

Der große Vorteil des Crude-Extraktes lag in dessen schneller Gewinnung und Homogenität der Proben. Allerdings stellte sich für die Proteinreinigung die hohe Ionenstärke sowie der Anteil an DNA und RNA im Extrakt als problematisch heraus. Aus diesem Grund wird empfohlen für zukünftige Aufreinigungen ausgehend von dem Crude-Extrakt folgenden Punkte zu anzustreben:

1. Entsalzung des Crude-Extraktes, z.B. durch Dialyse, Verdünnung oder Umpufferung in Zentrifugalkonzentratoren. Danach sollten entweder neue Protease-Inhibitoren zugegeben werden oder der Extrakt unmittelbar nach der Behandlung aufgereinigt werden.
2. Entfernung der DNA und RNA aus dem Extrakt, z.B. durch Ammoniumsulfat-Fällung oder durch Zugabe von DNase bzw. RNase. Dadurch könnte die Kapazität und Langlebigkeit der Anionenaustauscher-Säule verbessert werden.

3.3 Charakterisierung von Per a 3 – den allergenen Hexamerinen aus *Periplaneta americana*

In dem Vergleich von Hämolymphe- (HL) und Crude-Extrakt (CE) der Amerikanischen Schabe wurde bereits die Frage aufgeworfen, ob die Extrakttherstellung u.a. einen Einfluss auf die Oligomerisierung der Extraktproteine gehabt haben könnte (Abschnitt 3.1). Von besonderem Interesse waren dabei die Allergene Per a 3 und Per a 9, die aus diesen Extrakten isoliert werden konnten und deren Charakterisierung in den Abschnitten 3.3 und 3.4 dargelegt sind.

Bei den Per a 3-Proteinen konnten aufgrund des Laufverhaltens in der denaturierenden SDS-PAGE zwischen einer 80 kDa- und einer 73 kDa-Per a 3-Isoform unterschieden werden (Abschnitt 3.2). Diese wurden massenspektrometrisch identifiziert (Abschnitt 3.3.2.1) und basierend auf diesen Ergebnissen als Per a 3.03 (80 kDa-Per a 3-Isoform) und P II (73 kDa-Per a 3-Isoform) bezeichnet. Eine Übersicht über die verwendeten Begrifflichkeiten ist in der Diskussion in Tabelle 4-3 dargestellt.

In Abschnitt 3.3.1 wird zunächst analysiert, in wieweit die Extraktgewinnung einen Einfluss auf die isolierten Per a 3-Isoformen (80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoform) hatte. Anschließend werden diese Isoformen eindeutig identifiziert sowie biochemisch und auch immunologisch genauer charakterisiert (Abschnitt 3.3.2). Im letzten Abschnitt (3.3.2.9) werden für die sequenziell bekannten Per a 3-Isoformen Per a 3.01 und Per a 3.0201 (theoretische) potentiell antigene Epitope vorgestellt, die über Algorithmen ermittelt wurden. Deren Lage in der Quartärstruktur beider Allergene wurde mit Hilfe von Homologie-Modellen analysiert.

3.3.1 Einfluss der Extraktgewinnung auf die Per a 3-Isoformen

Um den Einfluss der Extraktgewinnung auf die Per a 3-Isoformen abschätzen zu können, wurden zunächst die Molekulargewichte der einzelnen Isoformen aus beiden Extrakten in nativer Form im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge und in denaturierter Form auf der SDS-PAGE untersucht. Einen Einfluss auf die Molekülgestalt wurde über den Vergleich der elektrophoretischen Eigenschaften auf der nativen PAGE sowie über die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten analysiert.

3.3.1.1 Molekulargewichtsbestimmung

Die aufgereinigten Per a 3-Isoformen wurden zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge bei drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (6000 rpm, 8000 rpm und 10000 rpm) für 24 h zentrifugiert (Abb. 3-30). Der Gleichgewichtszustand wurde durch Vergleich der Messungen nach 23 h und 24 h überprüft. Die auf diese Weise entstandenen Konzentrationsverteilungen wurden mit dem Global Fit-Algorithmus des Programmpakets „UltraScan“ analysiert.

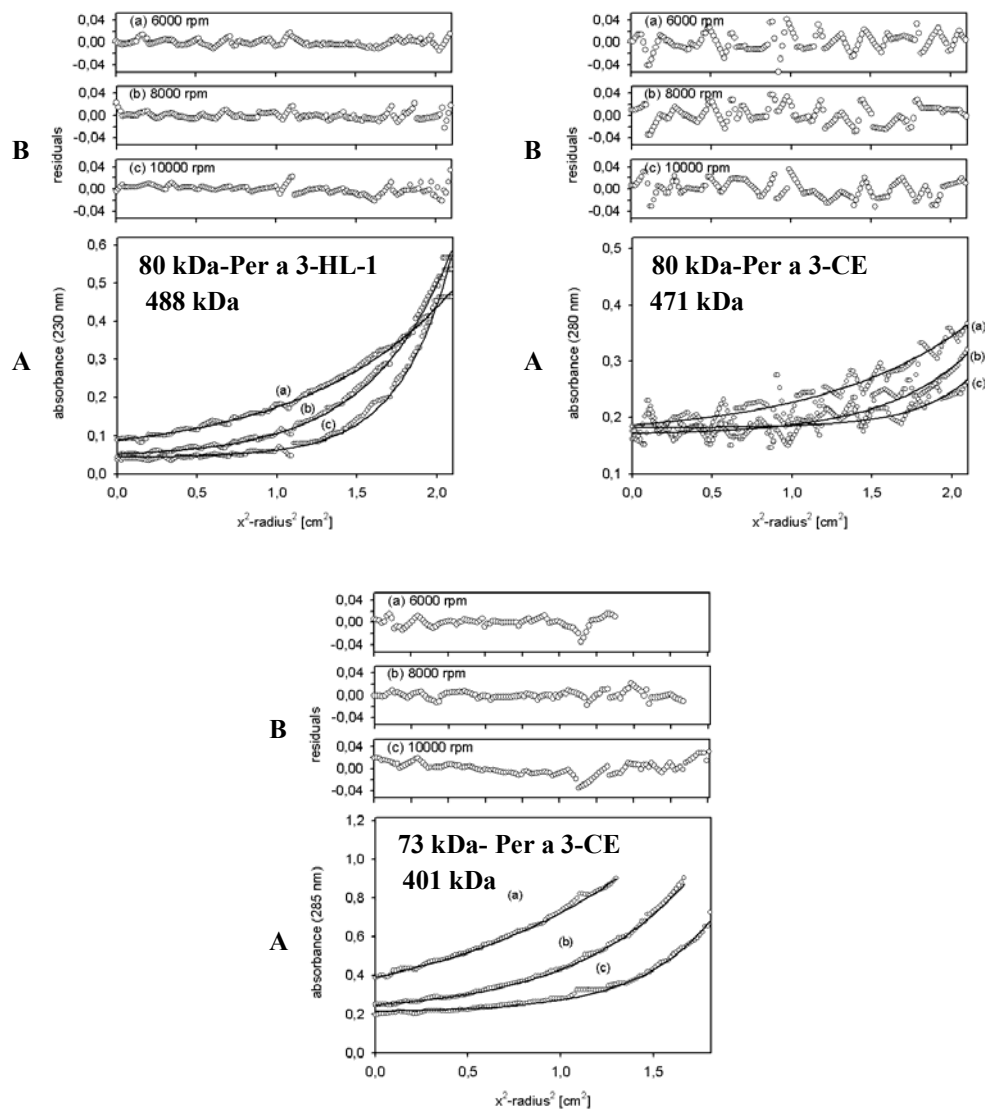


Abb. 3-30: Bestimmung des nativen Molekulargewichts der isolierten Per a 3-Isoformen im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge, aufgenommen im Absorptionsmodus.

Die Isoformen wurden in Schabenpuffer D für je 24 h bei 6000 rpm, 8000 rpm und 10000 rpm bei 20°C einem Gleichgewichtslauf unterzogen. Nach 24 h wurde die Absorptionsverteilung in den Zellen gemessen. Zur Überprüfung für die Einstellung des Gleichgewichts wurden die Proben zuvor ebenfalls nach 23 h gemessen (Daten in der Abbildung nicht dargestellt). Die gemessenen Daten wurden mit dem Global Fit-Algorithmus des „UltraScan“-Programms ausgewertet. Dargestellt wurde die Absorption der Proben bei der jeweiligen Detektionswellenlänge in Abhängigkeit zum relativen Radius (x^2 -radius²) bei (a) 6000 rpm, (b) 8000 rpm und (c) 10000 rpm. Die Messdaten wurden als Punkte und der Fit als Linie dargestellt. Als „residuals“ wurde die Abweichung der Simulation von den Messdaten in Abhängigkeit zum relativen Radius dargestellt. Für die 80 kDa-Per a 3-Isoformen wurden die Messungen von Channel 2, für die 73 kDa-Per a 3-Isoform-CE die Messungen von Channel 3 dargestellt. Die Standardabweichung (σ) für den Fit war bei 80 kDa-Per a 3- HL $1.2157 \cdot 10^{-2}$ und die Varianz (σ^2) $1.4778 \cdot 10^{-4}$. Für 80 kDa-Per a 3-CE war $\sigma = 1.6569 \cdot 10^{-2}$ und $\sigma^2 = 2.7453 \cdot 10^{-4}$ und für 73 kDa-Per a 3-CE war $\sigma = 1.1230 \cdot 10^{-2}$ und $\sigma^2 = 1.2611 \cdot 10^{-4}$.

Diese Analyse ergab für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus der HL (80 kDa-Per a 3-HL-1) ein natives Molekulargewicht von 488 kDa, für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem CE (80 kDa-Per a 3-CE) eines von 471 kDa und für die 73 kDa-Per a 3-Isoform aus dem CE (73 kDa-Per a 3-CE) ein natives Molekulargewicht von 401 kDa.

In diese Analyse flossen für die 80 kDa-Per a 3-Isoform (HL) sämtliche Scans zweier verwendeter Detektionswellenlängen (225 nm und 230 nm), für die 80 kDa-Per a 3-Isoform (CE) sämtliche Scans der Detektionswellenlänge 280 nm und für die 73 kDa-Per a 3-Isoform (CE) sämtliche Scans der Detektionswellenlänge 285 nm mit ein. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden in Abb. 3-30 lediglich die 24 h-Werte der Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge und einer Probenzelle („channel“) dargestellt. Die Messdaten (als Punkte) inklusive der jeweiligen Fit-Daten (als Linie) der drei Geschwindigkeiten sind jeweils unter A und die Abweichungen der Simulation von den Messdaten als „residuals“ jeweils unter B dargestellt (Abb. 3-30).

Auf diese Weise wurde für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus der Hämolymphe („80 kDa-Per a 3-HL-1“ aus Protokoll 1) ein natives Molekulargewicht von 488 kDa und für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt („80 kDa-Per a 3-CE“ aus Protokoll 3) ein etwas kleineres Molekulargewicht von 471 kDa erhalten. Für die 73 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt („73 kDa-Per a 3-CE“ aus Protokoll 2) wurde das native Molekulargewicht mit 401 kDa bestimmt. Da die Molekulargewichte der 80 kDa-Isoform aus HL und CE etwas voneinander abwichen, wurde die Genauigkeit der Molekulargewichte bestimmt, indem die Daten erneut ausgewertet wurden: an Stelle der automatisierten Scan-Auswahl wurden die einzelnen Scans in unterschiedlichen Kombinationen manuell ausgewählt, die resultierenden Molekulargewichte bestimmt und eine Standardabweichung berechnet.

Die Ergebnisse dieser Molekulargewichtsbestimmungen wurden im Vergleich zu den in meiner Diplomarbeit bestimmten nativen Molekulargewichten der Per a 3-Isoformen („HL-D“) in Abb. 3-31 dargestellt.

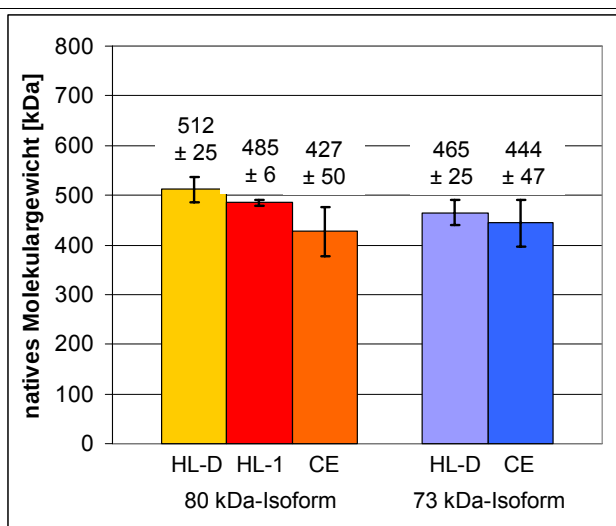


Abb. 3-31: Mittleres natives Molekulargewicht der nativen 80 kDa- und 73-kDa-Per a 3-Isoformen, isoliert aus Hämolymphe (HL) und Crude-Extrakt (CE) unter Berücksichtigung von deren Standardabweichung.

Bei der 80 kDa-Per a 3-Isoform aus der HL wurde zusätzlich zwischen der Isoform aus meiner Diplomarbeit (HL-D) und der nach Protokoll 1 isolierten Probe (HL-1) unterschieden.

Als Standardabweichung wurde in diesen Fällen die Abweichung des in einer parallelen Messung bestimmten Molekulargewichts mit dem Molekulargewicht aus der Sequenz vom Hämocyanin aus *Panulirus elephas* verwendet [148].

Dieser Vergleich zeigte, dass die Molekulargewichte der 80 kDa-Per a 3-Isoform aus der Hämolymphe (HL-D und HL-1) innerhalb der Standardabweichungen miteinander vergleichbar waren. Deutlich niedriger wurde jedoch das Molekulargewicht der 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt (CE) bestimmt. Diese Probe wurde unmittelbar nach der Messung in der analytischen Ultrazentrifuge zusätzlich auf einer SDS-PAGE analysiert und festgestellt, dass diese Isoform zum Messzeitpunkt bereits partiell proteolytisch verdaut war (Abb. 3-29). Da die Auswertung des nativen Molekulargewichts jedoch auf der Annahme eines Einkomponentensystems basierte, wurde wahrscheinlich durch diese Fragmente das Molekulargewicht zu niedrig bestimmt.

Für die 73 kDa-Per a 3-Isoform konnte zwischen der Isolation aus der Hämolymphe (HL-D) und aus dem Crude-Extrakt (CE) kein signifikanter Unterschied des nativen Molekulargewichts festgestellt werden (Abb. 3-31).

Um das mittlere Molekulargewicht der denaturierten Isoformen zu bestimmen, wurden je nach Extrakt und Isoform eine Vielzahl an SDS-Gelen ausgewertet und eventuell aufgetretene proteolytische Fragmente nicht mit berücksichtigt. Das Ergebnis der auf diese Weise gemittelten Molekulargewichte der denaturierten Untereinheiten wurde zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung in Abb. 3-32 dargestellt.

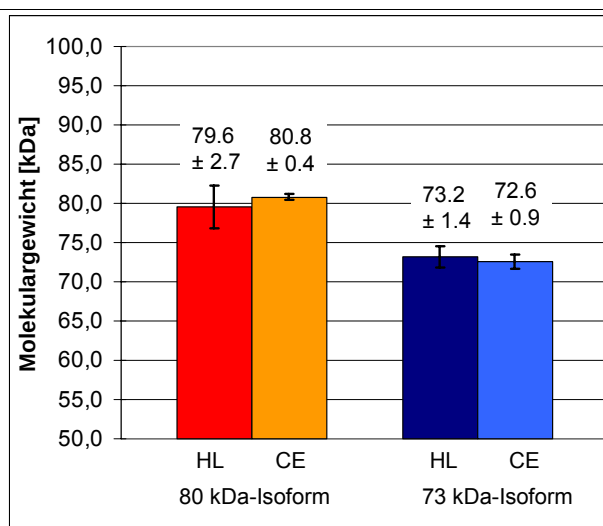


Abb. 3-32: Mittleres Molekulargewicht der denaturierten 80 kDa- und 73-kDa-Per a 3-Isoformen, isoliert aus Hämolymphe (HL) und Crude-Extrakt (CE) unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen konnte kein deutlicher Einfluss der Extrakte auf das Molekulargewicht der jeweiligen Isoform festgestellt werden (Abb. 3-32). Um eine größere Stichprobe (n) zu erhalten, wurden unabhängig vom Extrakt die Molekulargewichte der Isoformen gemittelt.

Dadurch konnte für 80 kDa-Per a 3-Isoform auf denaturierenden SDS-Gelen ein Molekulargewicht von $80 \text{ kDa} \pm 2 \text{ kDa}$ (n=60) und die 73 kDa-Per a 3-Isoform eines von $73 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$ (n=87) bestimmt werden.

Insgesamt bestätigten diese Molekulargewichtsexperimente, trotz Abweichungen des nativen Molekulargewichts der 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem Crude-Extrakt, eindeutig, dass die isolierten Per a 3-Isoformen unabhängig von der Extraktgewinnung in ihrer nativen hexameren Oligomerisierung vorlagen.

3.3.1.2 Molekülgestalt

Ob die Extraktgewinnung einen Einfluss auf den Stokes-Radius und/oder die Oberflächenladungen hatte, wurde über die elektrophoretische Beweglichkeit in der nativen PAGE (Abb. 3-33) und über Vergleich der Sedimentationskoeffizienten in der analytischen Ultrazentrifuge (Abb. 3-34) bestimmt.

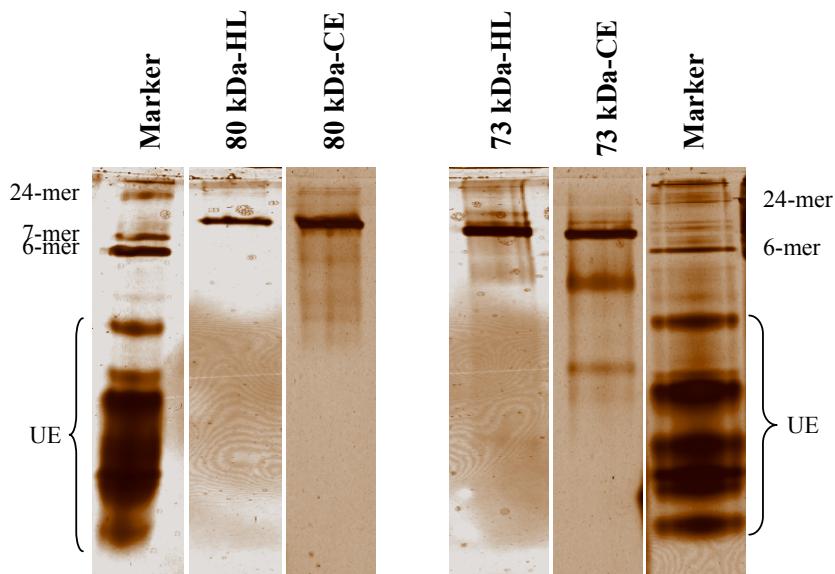


Abb. 3-33: Vergleich des elektrophoretischen Laufverhaltens der Per a 3-Isoformen aus HL und CE auf einer 7.5%igen nativen PAGE.

Es wurden $0.20 \mu\text{g}$ 80 kDa-HL und $0.55 \mu\text{g}$ 73 kDa-HL zuvor 2:3 mit BPB verdünnt auf das Gel appliziert. Die Crude-Extrakt-Proben wurden 3:4 mit BPB verdünnt und $0.25 \mu\text{g}$ 80 kDa-CE und $1.5 \mu\text{g}$ 73 kDa-CE auf das Gel appliziert. Als Proteinstandard wurde der *Eurypelma*-Marker verwendet. Die Proteindetektion erfolgte mit der Silberfärbung nach Nesterenko.

Die Isoformen beider Extrakte lagen in ihrer nativen hexameren Oligomerisierung vor. Deren Stokes-Radius und Proteinladung wurde durch die Extrakterstellung nicht beeinflusst.

Der Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der Isoformen aus HL und CE ließ auf einer 7.5%igen nativen PAGE keinen Unterschied bei den hexameren Per a 3-Banden erkennen (Abb. 3-33): die Hexamerbanden der Per a 3-Isoformen wanderten im Vergleich zum *Eurypelma*-Marker auf den nativen Gelen stets etwas langsamer als das reassozierte 6-mer des *Eurypelma*-Hämocyanins. Das unveränderte elektrophoretische Laufverhalten beider Isoformen bestätigte nicht nur die hexamere Oligomerisierung, sondern auch, dass die Extrakterstellung offensichtlich keinen Einfluss auf den Stokes-Radius und die Proteinladung beider Per a 3-Isoformen hatte.

Um ausschließen zu können, dass dieses Ergebnis durch die Polyacrylamid-Matrix beeinflusst war, wurden die Per a 3-Proteine -frei in Lösung vorliegend- ebenfalls im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge überprüft. Für diese Analyse wurden die isolierten Isoformen aus den unterschiedlichen Extrakten bei differierenden Geschwindigkeiten zentrifugiert und in verschiedenen Variationen nach der „(enhanced) van Holde-Weisheit-Methode“ ausgewertet (Messdaten nicht gezeigt). Die Mittelwerte dieser korrigierten Sedimentationskoeffizienten wurden in Abb. 3-34 unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus der HL war ebenso wie für die 73 kDa-Per a 3-Isoform aus der HL die Stichprobe (n) jeweils 3. Für die 80 kDa-Per a 3-Isoform aus dem CE, sowie der 73 kDa-Per a 3-Isoform aus dem CE war n jeweils 4.

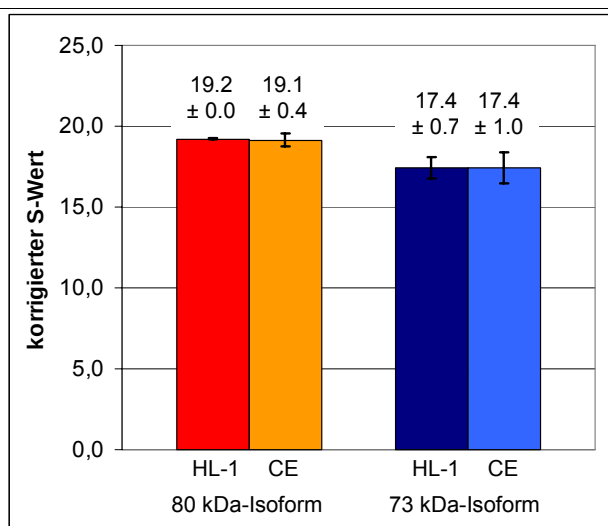


Abb. 3-34: Mittlere korrigierte Sedimentationskoeffizienten ($S_{20,w}$) der 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoformen, isoliert aus Hämolymphe (HL) und Crude-Extrakt (CE) unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass auch im Sedimentationslauf kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Isoformen aus HL und CE festgestellt werden konnte. Der mittlere

Sedimentationskoeffizient der 80 kDa-Per a 3-Isoform wurde mit 19 S ($S_{20,w}$) und für die 73 kDa-Per a 3-Isoform mit 17 S ($S_{20,w}$) bestimmt.

Somit wurde zusätzlich die Beobachtung aus der Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 3.2.3.2) bestätigt, demnach die 80 kDa-Per a 3-Isoform einen größeren Stokes-Radius aufwies als die 73 kDa-Per a 3-Isoform.

3.3.1.3 Fazit des Extrakteinflusses

Die aus dem Crude-Extrakt isolierten Per a 3-Isoformen zeigten ähnliche bis unveränderte Molekulargewichte, Proteinladungen und Stokes-Radien wie die Per a 3-Isoformen aus der Hämolymphe. Somit hatten das Mazerieren und die dabei auftretenden Scherkräfte keinen unmittelbaren Einfluss auf die multimeren Per a 3-Isoformen.

3.3.2 Biochemische und immunologische Charakterisierung der Per a 3-Isoformen

Basierend auf den in meiner Diplomarbeit bestimmten biochemischen und –physikalischen Eigenschaften der Per a 3-Isoformen, wurde zu diesem Zeitpunkt die 80 kDa-Per a 3-Isoform dem sequenzierten Klon Per a 3.01 (ehemals C12) und die 73 kDa-Per a 3-Isoform dem Klon Per a 3.0201 (ehemals C20) zugeordnet und im Zuge dessen in Anlehnung an die offizielle Allergennomenklatur als Per a 3.1 und Per a 3.2 bezeichnet [148, 295]. Eine Übersicht über die alte und neue Nomenklatur gibt Tabelle 4-3 in der Diskussion.

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war die Verifizierung dieser Zuordnung mittels Massenspektrometrie zu verifizieren sowie daran anknüpfend weitere Charakterisierungen durchzuführen. Neben der Bestimmung der isoelektrischen Punkte, wurden die Per a 3-Proteine u.a. auf Phenoloxidase-Aktivität getestet und Kreuzreaktionen zwischen den Isoformen in nativer und denaturierter Form analysiert. Für Allergene ein wichtiges Kriterium ist u.a. die Proteinstabilität. Hierzu wurde bei den Per a 3-Allergenen die Ausbildung von Disulfidbrücken überprüft sowie die Stabilität gegenüber chaotropen Reagenzien betrachtet. In Anlehnung an den lysosomalen Abbauweg in antigenpräsentierenden Zellen (APC) wurde zusätzlich die Stabilität gegenüber unterschiedlichen pH-Werten analysiert.

3.3.2.1 Massenspektrometrische Identifizierung der Per a 3-Isoformen

Die massenspektrometrische Untersuchung der Per a 3-Isoformen wurde von [REDACTED] ([REDACTED], Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Ziel war die Zuordnung der isolierten Per a 3-Proteine zu den sequenziell bekannten Klonen Per a 3.01 und Per a 3.0201.

Dafür wurden die isolierten Per a 3-Isoformen (80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoform) zunächst auf einer SDS-PAGE überprüft. Die anschließend massenspektrometrisch analysierten Banden wurden auf den Gelen gekennzeichnet (Abb. 3-35).

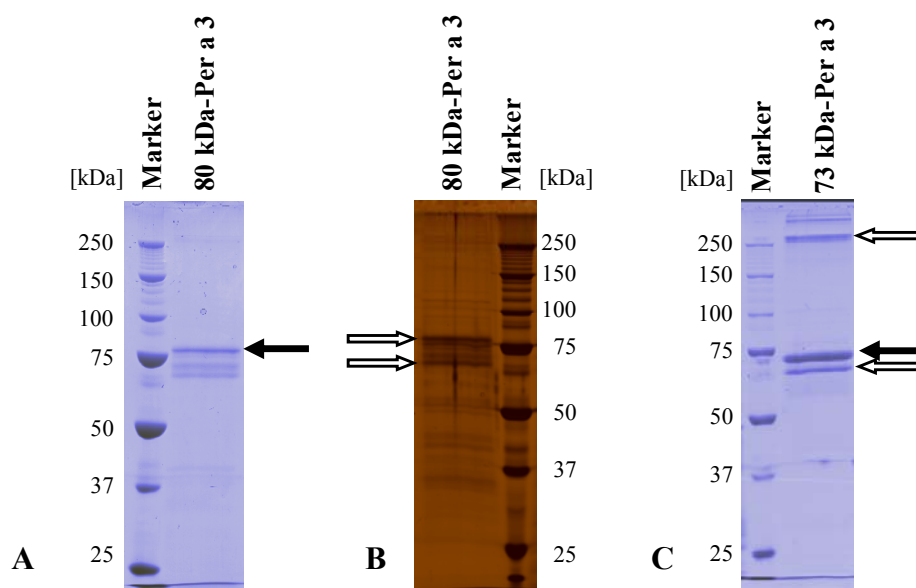


Abb. 3-35. 7.5%ige SDS-Gele der massenspektrometrisch analysierten Proben.

Als Proteinstandard wurde bei allen drei Gelen der BioRad-Marker verwendet.

A) Coomassie-gefärbte 7.5%ige SDS-PAGE der 80 kDa-Per a 3-Isoform, isoliert nach Protokoll 3 aus dem Crude-Extrakt. Es wurden 2.1 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform auf das Gel appliziert.

B) Silbergefärbte 7.5%ige SDS-PAGE der 80 kDa-Per a 3-Isoform, 2003 isoliert aus der Hämolymphe (Diplomarbeit). Es wurden 1.4 µg der 80 kDa-Per a 3-Isoform auf das Gel appliziert.

C) 7.5%ige SDS-PAGE der 73 kDa-Per a 3-Isoform, isoliert nach Protokoll 2 aus dem Crude-Extrakt. Es wurden 1.26 µg der 73 kDa-Per a 3-Isoform auf das Gel appliziert.

Die schwarz ausgefüllten Pfeile markierten die Proben, deren massenspektrometrisches Ergebnis im Alignment (Abb. 3-36) dargestellt wurde. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der übrigen vier mit weiß ausgefüllten Pfeilen markierten Proben findet sich im Anhang.

Auf diesen Gelen fiel wie bereits bei der Kontrolle der endgereinigten Proteine aus Protokoll 2 und 3 auf, dass sowohl die 80 kDa- als auch die 73 kDa-Per a 3-Isoform auf der SDS-PAGE zusätzlich zur regulären Hauptbande (mit schwarz ausgefüllten Pfeilen markiert) weitere Proteinbanden (mit weiß ausgefüllten Pfeilen markiert) aufwiesen (Abb. 3-35). Diese zusätzlichen Proteinbanden wurden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht. Deren Ergebnis wird im Anschluss an die Proteinhauptbanden kurz dargelegt.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der Proteinhauptbanden (schwarze Pfeile) wurde für die isolierten Per a 3-Isoformen im Sequenzalignment zusammen mit den beiden Per a 3.01 und Per a 3.0201 Isoformen dargestellt. Dabei wurden die sequenzierten Peptide der 80 kDa-Per a 3-Isoform in roter Schrift und die sequenzierten Peptide der 73 kDa-Per a 3-Isoform blau hinterlegt dargestellt (Abb. 3-36).

		*	20	*	40	*	60		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	MKTALVFAAVFAVFAARF	PDHKDYKQLADKQFLAKQRDVLRLFHRVHQHNILNDQVEVGI	:	60					
Per_a_3.02 :	-----						DI	GD	4
								g	
		*	80	*	100	*	120		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	PMTSKQTSATTVP	ESGEAVHGVLOEGHAR	PR	GEPPFSVNYEK	HREQAIMLYDILLYF	AANDYD	:	120	
Per_a_3.02 :	HYDIEANIGHYKY	PHVVK	NFISYYKKGLL	PRGEPPFSVY	YEKHREQAIKLEELFFA	AANDYD	:	64	
		p		prgepfsv	yekhreqai	l l	andyd		
		*	140	*	160	*	180		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	TFYKTACWARDRVNEGFMFY	SFSTIAVFHRDDMQGVMLPPPYEVYPYLFVDHVDVIHMAOKY	:	180					
Per_a_3.02 :	TFYKTACWARDRVNEGFMFY	ALTVAAFHREDDTKDLVLPPEYEVNPYLFVEDDVIQQAYKY	:	124					
	tfyktacwardrvnegmfmy	a fhr d	lpppyev	pylfv	dvi	a ky			
		*	200	*	220	*	240		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	MMKNAGSGEHHSHVIPVNFTLR	TQDHLLAYFTSDVNLNAFN	TYRYYPSWYNTTLYGHN	:	240				
Per_a_3.02 :	MTKESGTDKHVE	HVIPVNFTLR	SQEDLVAYFREDVDLNAFNMYERY	IYPSWENTTLYGKS	:	184			
	w k g h	hvipvnft	r q l ayf	dv	LNAFN Y5Ry	ypsw nttlyg			
		*	260	*	280	*	300		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	IDRRGEQFYTYTKQIYARYFLERLSND	LPDVYPFYYSKPVKSAYNPNLR	YHNGEEMFVRP	:	300				
Per_a_3.02 :	FDRRGEQFYTYHQIYARYFLERLSNS	LPDVKPEQYSKPLKTGYNPHLR	YHNGEEMFARP	:	244				
	drrgeqfyty	qiyaryflerlsn	lpdv pf	yskp k3	YNP L	Ryhngeemp rp			
		*	320	*	340	*	360		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	SNMYVTNFDLYYIADIKNYEKRVDAIDFGYAFDEHMKPHSLYHDVHGMEYLADMIEGNM	:	360						
Per_a_3.02 :	SNMYVTNFDLFYVSDIKNYERRVEKAIDFGYAFDEHRTPEYSLYHDQHGMDYLGOMIEGTR	:	304						
	snmy tnfdL5Y6sDIKnye	rvedAIDFGyaFdeh	p slyhd hgm yl	mieg					
		*	380	*	400	*	420		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	DSPNFYFYGSIYHMHSMIGHIVDPYHFMGLAF	SLHHPETVLRDPVFYQLWKRVDHIFQ	:	419					
Per_a_3.02 :	NSPHQYFYGSVFHFYRLLVGHVVDPYHKNGLAPSALEHPQTALRDPAFYQLWKRIDHIVQ	:	364						
	sp yfygs h y	gh vdpvhk glaPsaLEHP2TvlRDPaFYQLWKR	dh q						
		*	440	*	460	*	480		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	KYKNRLPRYTHDELAPEGVKVENVDVGKLYTYFEQ	EDMSLDMAVYVNNVDQHSNVDVQL	:	478					
Per_a_3.02 :	KYKNRLPRYTYDELSFPGVKIENVDVGKLYTYFEH	EHSLGNAMYLGKLEDYMKASIRAR	:	424					
	kyknrlpryt del f	gvk6eNVDVGKlytyfe	sl a y	6ed	6r				
		*	500	*	520	*	540		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	AVRLNHKPFPTYNIEVSSDKAQDVYVAVFLGPKYDYLGREYDLNDRRHVFVEMDRFPYHVG	:	538						
Per_a_3.02 :	HYRLNHKPFPTYNIEVSSDKAQDVYVRIFLGPKYDSLGECELDERRHVFVEMDRFVHKVE	:	484						
	rLNHKPFPTYNIEV3sdKaQdVYVr	flgpkyd lg e l	rrhYFVE6DRf	v					
		*	560	*	580	*	600		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	AGKTVIERNSHDSNIIAPERDSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDK	GHN	YCGYPENLLIPKG	:	598				
Per_a_3.02 :	AGKTVIERKSHDSII	SDSHDSYRNLFKKVSDALQEKDQYYIDKSHK	YCGYPENLLIPKG	:	544				
	agktvier shds ii	dsyr kKV ea	k qyy dk h	ycgypenll pkg					
		*	620	*	640	*	660		
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	KKGGQANTFYVIVTPYVKQDEHDFEPYNYKAFSYCGVGSERKYPDNKE	LYGYPFDRKIYSN	:	658					
Per_a_3.02 :	KKGGQNTFYVIVTPYVKQDEHDFEPYHYKAFSYCGVGHGRKYPDDKPLGFPFDRKI	HDY	:	604					
	kkggq	TfYVIVTPY6Kqdehdfepy	ykafsycgvg	rkYPD	Kp6g	pfdrki			
		*	680						
Per_a_3.03 :	-----								-
Per_a_3.01 :	DFYTPNMYFKDVIIFHKKYDEVGVQGH	-----	:	685					
Per_a_3.02 :	DFYTPNMYFKDVVIFHKKYDEVHDVTH	-----	:	631					
	dfytpnmyfkDV	IFHKkydev	h						

Abb. 3-36 Zuordnung der sequenzierten Peptide der isolierten Per a 3-Isoformen dargestellt im Sequenzalignment mit Per a 3.01 und Per a 3.0201.

Bei den blau hinterlegten Sequenzabschnitten handelte es sich um die mittels ESI-Q-TOF bestimmten

Peptidfragmente der 73 kDa-Per a 3-Isoform. Die Sequenzabdeckung der 73 kDa-Per a 3-Fragmente zu Per a 3.01 betrug 19.3% und zu Per a 3.0201 30.8%. Die Peptide der 80 kDa-Per a 3-Isoform entsprachen keiner bisher sequenziell bekannten Per a 3-Isoform, sodass es sich hierbei um eine neue Per a 3-Isoform handelte, die als Per a 3.03 benannt wurde und im Alignment in der oberen Zeile in roter Schrift dargestellt ist. Die Proteine wurden mit ClustalX 1.83 align und in GeneDoc 2.6 zusammen mit den manuell eingefügten Peptidfragmenten von Per a 3.03 dargestellt. Für das Alignment wurden folgende Sequenzen aus *Periplaneta americana* verwendet: Per_a_3.01 = AAB 09629, Per_a_3.02=Per a 3.0201 = AAB 09632.

Diese Analyse zeigte, dass die 13 von der 80 kDa-Per a 3-Isoform stammenden Peptidfragmente (in roter Schrift dargestellt), mit keiner der bisher bekannten Per a 3-Isoformen ausreichend übereinstimmte. Die Sequenzen waren zwar ähnlich, jedoch nicht identisch (Abb. 3-36). Daher musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei der isolierten Isoform nicht wie ursprünglich angenommen um Per a 3.01 handelte. Vielmehr handelte es sich bei der 80 kDa-Per a 3-Isoform um eine neue -bisher sequenziell unbekannte- Per a 3-Isoform, die in dieser Arbeit isoliert und erstmals partiell sequenziert wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen und unter Einhaltung der offiziellen Allergennomenklatur wird die 80 kDa-Per a 3-Isoform daher im Folgenden **als Per a 3.03 bezeichnet** [295].

Die von der 73 kDa-Per a 3-Isoform stammenden sequenzierten Peptidfragmente (in blau hinterlegt) waren sowohl der Per a 3.01- als auch der Per a 3.0201-Isoform zuzuordnen (Abb. 3-36). Die Sequenzabdeckung der 73 kDa-Per a 3-Fragmente zu Per a 3.01 betrug 19.3% und zu Per a 3.0201 30.8%. Somit handelte es sich bei der analysierten 73 kDa-Per a 3-Peptidfragmenten nicht wie angenommen um reines Per a 3.0201, sondern um ein Gemisch bestehend aus Per a 3.01 und Per a 3.0201. Das Auftreten dieser beiden Per a 3-Isoformen in der 73 kDa-Probe könnte auf ein Hexamer zurückgeführt werden, welches sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zu gleichen oder verschiedenen Anteilen zusammensetzte, oder aber um zwei homohexamere Isoformen, die bei der Reinigung nicht voneinander separiert wurden. Die nachfolgenden Experimente zielten u.a. darauf ab, diese Fragestellung zu beantworten. Die 73 kDa-Per a 3-Probe wurde daher basierend auf dem ersten Reinigungsschritt nach Protokoll 1 **als P II bezeichnet**. Eine Übersicht der neuen und alten Per a 3-Bezeichnungen, sowie deren Zusammensetzung findet sich in der Diskussion in Tabelle 4-3.

Ein weiterer Punkt, der durch die Massenspektrometrie geklärt werden konnte, betraf die mit den weißen Pfeilen markieren Proteinbanden, die zum Teil bei längerer Lagerungszeit der isolierten Proben stärker hervortraten (Abb. 3-35). Bei der 67 kDa-Bande in der Per a 3.03-Probe (80 kDa-Per a 3-Isoform) handelte es sich um ein proteolytisches Spaltfragment von Per a 3.03, ebenso wie die 68 kDa-Bande bei P II (73 kDa-Per a 3-Isoform) proteolytisch gespaltenes P II war. Auch die mit den Per a 3-Proteinen assoziierte hochmolekulare Proteinbande von über 250 kDa auf der SDS-PAGE wurde in der P II-Probe ebenfalls eindeutig als P II identifiziert. Die zugehörigen Daten sind im Anhang dargestellt (Abschnitt

8.2.3). Das Auftreten einer solchen hochmolekularen P II-Bande wird in Zusammenhang mit der Kreuzvernetzung von Proteinen in der Diskussion erneut aufgegriffen (Abschnitt 4.1.2.7).

Somit konnte insgesamt ausgeschlossen werden, dass es sich bei den mit den Per a 3-Proteinen assoziierten Proteinbanden um Verunreinigungen handelte.

3.3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Ziel der isoelektrischen Fokussierung war bei der sequenziell nicht vollständig bekannten Per a 3.03-Isoform in der Bestimmung des isoelektrischen Punktes, sowie bei P II in der Analyse dessen heterogener Zusammensetzung.

Hierzu wurden die nativen Proben in unterschiedlichen Verdünnungen auf das SERVAPRECOTES Gel (pH 3-10) aufgetragen und über 2400 Vh fokussiert. Beide Per a 3-Isoformen stammten aus der Hämolymphe und wurden nach Protokoll 1 isoliert. Die Hämolymphe stammte aus der ersten Charge. Die Proteindetektion erfolgte anschließend mit der SERVAViolet 17-Färbung.

Die isoelektrische Fokussierung lieferte für Per a 3.03 eine Bande einen isoelektrischen Punkt (pHi) von ca. 5.8 (Abb. 3-37). Die in Spur 7 zusätzlich zu beobachtende Doppelbande wurde auf P II zurückgeführt, welches bei der Entfernung des Applikatorstreifens in die Nachbarspur übergetreten sein musste. Insgesamt wurde über das ganze Gel hinweg eine Artefaktbildung durch den Applikatorstreifen (in Abb. 3-37 mit Pfeil markiert) beobachtet. Im Unterschied zu Per a 3.03 wurden in der P II Probe deutlich zwei Banden mit einem pHi von etwa 6.4 und 6.5 detektiert. Die Hämolympheprobe war offenbar zu gering konzentriert, um Proteinbanden mit dieser Färbung nachzuweisen (Abb. 3-37).

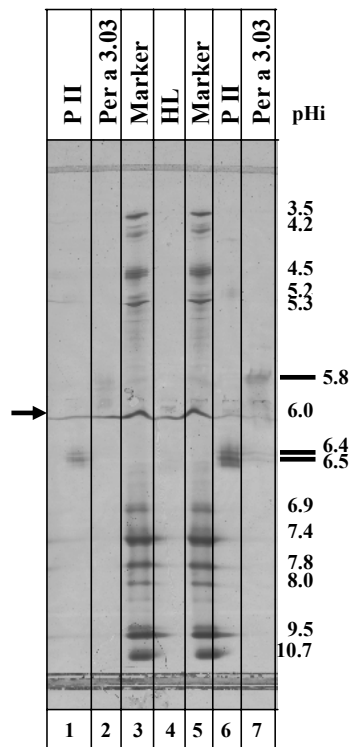


Abb. 3-37: Isoelektrische Fokussierung der isolierten Per a 3-Proben inklusive Auswertung der isoelektrischen Punkte.

Die Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf das SERVA PRECOTES Gel (pH 3-10) appliziert. Von links nach rechts (1 bis 7): 2 µg P II, 2 µg Per a 3.03, 5 µl Marker, 7.5 µg HL, 5 µl Marker, 5 µg P II, 5 µg Per a 3.03. Als Standard wurde der „SERVA Liquid Mix IEF Proteinstandard 3-10“ verwendet. Die Proteindetektion erfolgte mit der „SERVA Violet 17“-Färbung. Der Pfeil markierte die Lage des Applikatorstreifens, mit dem Artefakte in den Probenspuren verbunden waren. Die Balken kennzeichneten die Lage der Probenbanden.

Der isoelektrische Punkt (pHi) von Per a 3.03 wurde mit ca. 5.8 bestimmt. In der P II-Probe waren zwei Banden mit einem pHi von etwa 6.4 und 6.5 zu erkennen. Die Hämolympheprobe war für eine Detektion offensichtlich zu gering konzentriert, sodass keine isoelektrischen Punkte bestimmt werden konnten.

Sequenziell besitzen die in P II enthaltenen reifen Isoformen einen pHi von 6.16 (Per a 3.01, ohne Signalpeptid) bzw. 6.63 (Per a 3.0201). Für die nur partiell gereinigte Per a 3-Probe aus den Arbeiten von Wu et al., die als Cr-PI bezeichnet wurde, wurde eine Proteinhauptbande bei pHi 6.2 sowie weitere nicht näher bestimmte Nebenbanden detektiert [296]. Unter Berücksichtigung des breiten pH-Bereiches des IEF-Gels waren diese Ergebnisse mit einer Abweichung von 3-4% durchaus mit den theoretischen und aus der Literatur bekannten Ergebnissen vergleichbar. Insgesamt scheinen in Per a 3.03 mehr saure Aminosäuren, wie Aspartat und Glutamat vorhanden zu sein als in P II.

Da es sich bei den verwendeten Per a 3-Proben um die nativen Proteine handelte, musste die Doppelbande in der P II-Probe auf zwei unterschiedlich geladene Hexamere und somit auf ein heterogenes Proteingemisch zurückgeführt werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sich die P II-Probe aus einer Sorte an Heterohexameren bestehend aus Per a 3.01 und Per a 3.0201 zusammensetzte. Zu klären blieb jedoch weiterhin, wie genau das heterogene

Gemisch zusammengesetzt war. Dieser Aspekt wird unter Zusammenführung einzelner Ergebnisse in der Diskussion ausführlicher aufgegriffen (Abschnitt 4.1.3).

3.3.2.3 Disulfidverbrückung

Bei den meisten großen Hämolymp- Proteinen von Insekten sind nach Telfer et al. (1983) sowohl inter- als auch intramolekulare Disulfidbrücken höchst ungewöhnlich [146]. Dem gegenüber steht, dass Disulfidbrücken allgemein als ein die native Struktur stabilisierender Faktor gelten und sich die Per a 3-Proteine bisher als u.a. als sehr thermostabil herausgestellt hatten [148, 292, 297]. Daher wurde im Folgenden analysiert, ob in den Per a 3-Isoformen in der Tertiär- und/oder in der Quartärstruktur intramolekulare (innerhalb der Untereinheiten) bzw. intermolekulare (zwischen den Untereinheiten) Disulfidbrücken ausbilden werden. Bekannt war, dass in der Sequenz von Per a 3.01 drei Cysteine und bei Per a 3.0201 vier Cysteine vorhanden waren. Wie viel Cysteine in Per a 3.03 vorhanden waren, war unbekannt.

Für diese Analyse wurden die Proteine mit und ohne β -Mercaptoethanol als Redoxmittel auf eine 7.5%ige SDS-PAGE aufgetragen und deren Laufverhalten bzw. Molekulargewichte miteinander verglichen (Abb. 3-38).

Theoretisch waren bei der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten auf dem Gel hochmolekulare Aggregate zu erwarten, wohingegen bei der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zwei gegenteilige Effekte zu berücksichtigen waren: zum einen wäre die Mobilität erhöht, da das nicht vollständig entfaltete Protein einen kleineren hydrodynamischen Radius hätte und zum anderen könnte sich im Verhältnis zum Molekulargewicht weniger SDS anlagern, sodass die Mobilität verringert wäre [298]. Somit hing der zu beobachtende Effekt bei intramolekularen Disulfidbrücken stark von dem jeweiligen Protein ab und war auf SDS-Gelen nicht vorhersagbar.

In der Per a 3.03-Probe wurde in den Bandenmustern mit und ohne β -Mercaptoethanol kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 3-38). Die beobachtete Verschiebung der Proteinhauptbande bei 80 kDa in Gegenwart von β -Mercaptoethanol zu 78 kDa ohne Zugabe des Redoxmittels lag innerhalb der Standardabweichung des für diese Probe bestimmten Molekulargewichts (Abb. 3-32). Neue hochmolekulare Proteinbanden wurden in der Per a 3.03-Probe ohne Redoxmittel nicht zu beobachten.

In der P II-Probe konnte dagegen ein auffälliger Unterschied des Bandenmusters festgestellt werden (Abb. 3-38). Die auffälligste Veränderung betraf die 66 kDa-Bande in Gegenwart von β -Mercaptoethanol, an Stelle derer in der nicht-reduzierten Probe eine Bande bei 79 kDa detektiert wurde (in Abb. 3-38 mit * gekennzeichnet). Die P II-typische Proteinbande zeigte dafür eine um 2 kDa in den leichteren Molekulargewichtsbereich verschobene Proteinbande und lag somit außerhalb der Standardabweichung des Molekulargewichts von P II (± 1 kDa) (Abb. 3-32). Eine solche Verschiebung war auch reproduzierbar, wenn reduzierte und nicht-reduzierte Probe auf unterschiedlichen Gelen aufgetragen wurden (Abbildung nicht gezeigt).

Somit schienen die in P II enthaltenen Isoformen sich in ihrer intramolekularen Disulfidverbrückung zu unterscheiden. Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten waren bei keiner dieser Isoformen ausgebildet.

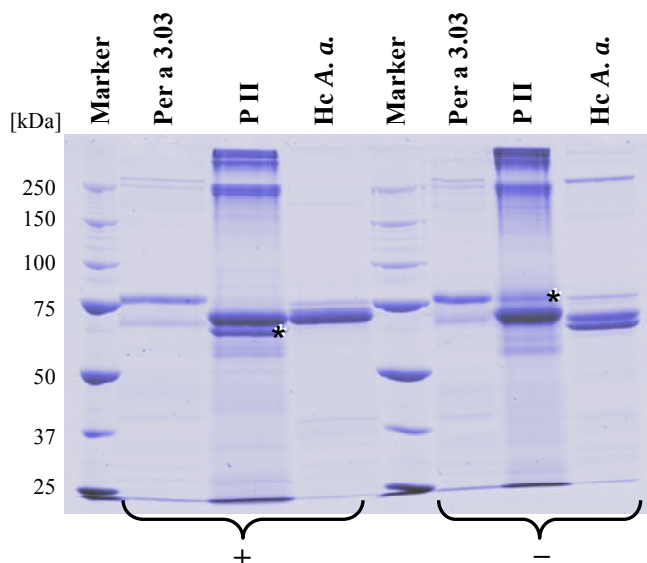


Abb. 3-38: Laufverhalten der isolierten Proteine mit (+) und ohne (-) β -Mercaptoethanol auf einer 7.5%igen SDS-PAGE.

Es wurden je 4.0 μ g Per a 3.03 und 12.6 μ g P II auf das Gel mit (+) und ohne (-) β -Mercaptoethanol als Redoxmittel auf das Gel appliziert. Als Positivkontrolle diente 7.1 μ g Hämocyanin von *Astacus astacus* (Hc A.a.). Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteinbanden wurde mit Hilfe von Quantity One bestimmt.

In der Per a 3.03-Probe war keine signifikante Veränderung des Bandenmusters mit und ohne β -Mercaptoethanol zu erkennen. Die zu beobachtende Molekulargewichtsverschiebung lag innerhalb der Standardabweichung des Molekulargewichts von Per a 3.03. Die P II-Probe zeigte ohne Redoxmittel zum einen eine signifikante Verschiebung und zum anderen das Auftauchen einer Bande bei 79 kDa (mit * gekennzeichnet).

Somit waren in Per a 3.03 eindeutig weder intra- noch intermolekulare Disulfidbrücken ausgebildet. In der P II-Probe waren dagegen zwei in ihrer intramolekularen Disulfidverbrückung unterschiedlichen Per a 3-Isoformen vorhanden, die beide jedoch keine Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten ausbildeten.

Zusätzlich wurde als Kontrolle der Experimente das Laufverhalten des Hämocyanins von *Astacus astacus* untersucht (Abb. 3-38). Von diesem war bekannt, dass Untereinheiten über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbrückt sind [299]. In Gegenwart von β -Mercaptoethanol waren in der Probe zwei Proteinbanden mit 79 kDa und 72 kDa vorhanden (Abb. 3-38). Ohne Zugabe des Redoxmittels war eine deutliche Veränderung des Bandenmusters zu erkennen. An Stelle der 72 kDa-Bande traten zwei Proteinbanden bei 69 kDa und 65 kDa, sowie eine hochmolekulare Bande außerhalb des Markerbereichs bei über 250 kDa. Diese letztere hochmolekulare Proteinbande zeigte deutlich die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke im Hämocyanin an. Die Aufteilung der 72 kDa-Proteinbande in die 69 kDa- und 65 kDa-Bande könnte auf unterschiedliche Untereinheiten mit verschiedenen ausgebildeten intramolekularen Disulfidbrücken zurückzuführen sein (Abb. 3-38). Eine nähere Analyse war nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Zusammenfassend belegen diese Experimente eindeutig, dass in keiner der Per a 3-Isoformen zwischen den Untereinheiten intermolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden. Eine Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken war dagegen insbesondere für P II durchaus möglich. Eindeutig war, dass in der P II-Probe eine deutliche Bandenverschiebung zu beobachten war, die die Beobachtung stützte, dass in P II verschiedene Isoformen vorhanden waren, die sich in der Ausbildung ihrer intramolekularen Disulfidbrücken unterschieden. Basierend auf der Anzahl der Cysteine wäre in Per a 3.01 maximal eine Disulfidbrücke und bei Per a 3.0201 maximal zwei Disulfidbrücken möglich. In wieweit diese Brücken im nativen Protein tatsächlich ausgebildet werden, konnte mit diesem Experimentaufbau nicht geklärt werden.

Unter Berücksichtigung der von den Per a 3-Isoformen erstellten Homologie-Modellen, die in Abschnitt 3.3.2.9 vorgestellt werden, konnte festgestellt werden, dass sowohl bei Per a 3.01 als auch bei Per a 3.0201 mindestens zwei Cysteine in ausreichender räumlicher Nähe zu liegen kommen, um eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden zu können. Die Position der Cysteine im Homologie-Modell bestätigte außerdem, dass zwischen den Untereinheiten keine Disulfidbrücken (intermolekular) ausgebildet werden können.

Offenbar war der Vergleich des Laufverhaltens von reduziertem und nicht-reduziertem P II auf einer SDS-PAGE nicht geeignet, um bei dieser Probe die intramolekularen Disulfidbrücken eindeutig nachzuweisen zu können. Um diese Fragestellung genauer zu klären, wäre es sinnvoll z.B. über Modifizierungen mit Iodoacetamid die genauere Anzahl der Sulfhydrylgruppen in den Per a 3-Proteinen zu überprüfen [300].

3.3.2.4 Phenoloxidase-Aktivität

Bei der Untersuchung der Phenoloxidase-Aktivität der Hämolymp- und Crude-Extrakte wurde in beiden eine eindeutige Diphenoloxidase-Aktivität festgestellt (Abschnitt 3.1.1.6), die im Crude-Extrakt jedoch nur nach gelchromatographischen Trennungen nachgewiesen werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass diese Diphenoloxidase-Aktivität im Elutionsbereich der Per a 3-Proteine im Anionenaustauscher vorhanden war (Abb. 3-9).

Um zu überprüfen, ob zusammen mit den isolierten Per a 3-Proben eventuell eine Phenoloxidase mit aufgereinigt wurde, wurden Per a 3-Proben aus verschiedenen Reinigungsprotokollen mit dem MBTH-Assay im Dot-Blot auf eine Phenoloxidase-Aktivität mit Dopamin und Tyramin als Substrate getestet (Abb. 3-39). Als Positivkontrolle diente dabei die Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*, die in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurde. Zur Abschätzung der Autooxidation des Dopamins dienten als Negativkontrollen Schabenpuffer B und Phosphatpuffer A.

	Dopamin		Tyramin	
	mit SDS	ohne SDS	mit SDS	ohne SDS
Per a 3.03 (Protokoll 3)				
Per a 3.03-D (Diplomarbeit, 2. Reinigung)				
Per a 3.03-D (Diplomarbeit, 1. Reinigung)				
P II (Protokoll 3)				
P II-D (Diplomarbeit, 2. Reinigung)				
Tyrosinase 0.1 mg/ml 1 mg/ml	 	 	 	 
Schabepuffer B				
Phosphatpuffer A				

Abb. 3-39: Diphenol- und Monophenoloxidase-Aktivität (MBTH-Assay) der isolierten Per a 3-Isoformen im Dot-Blot-Test.

Die isolierten Proben stammten aus unterschiedlichen Reinigungsprotokollen und wurden mit und ohne Zusatz von SDS auf ihre Fähigkeit getestet, Dopamin bzw. Tyramin umzusetzen. Als Positivkontrolle wurde die Tyrosinase von *Agaricus bisporus* in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Um die Autooxidation des Dopamins abschätzen zu können, wurden Schabepuffer B und Phosphatpuffer A als Negativkontrollen verwendet. Für diesen Schnelltest wurden die aufgetragenen Proteinmengen nicht normiert, sondern folgende Proteinmengen unverdünnt eingesetzt: 0.5 µg Per a 3.03 (Protokoll 3, in Schabepuffer D), 1.0 µg Per a 3.03-D (Diplomarbeit, 2. Reinigung in Schabepuffer C), 1.8 µg Per a 3.03-D (Diplomarbeit, 1. Reinigung in Phosphatpuffer A), 2.9 µg P II (Protokoll 3, Schabepuffer D), 8.3 µg P II-D (Diplomarbeit, 2. Reinigung, Schabepuffer C), 0.3 µg bzw. 3 µg Tyrosinase (Phosphatpuffer A).

Keine der Per a 3-Proben wies eine Monophenoloxidase-Aktivität auf, wohingegen in einigen Per a 3-Proben eine schwache Diphenoloxidase-Aktivität nachweisbar war. Diese war noch am stärksten in der Per a 3.03 Probe aus Protokoll 3 ausgeprägt, bei der interessanter Weise von allen Per a 3 -Proben die geringste Proteinkonzentration aufgetragen wurde. Insgesamt war die Diphenoloxidase-Aktivität in den Per a 3-Proben durch die Zugabe von SDS nicht wesentlich beeinflusst.

Wie bereits bei den Aktivitätsuntersuchungen der Extrakte festgestellt, wurde auch in den isolierten Per a 3-Proteinen keine Monophenoloxidase-Aktivität beobachtet (Abb. 3-39). Allerdings konnte jedoch in Abhängigkeit zum Reinigungsprotokoll eine schwache Diphenoloxidase-Aktivität in den Per a 3-Proben nachgewiesen werden, die durch die Zugabe von SDS nicht wesentlich beeinflusst war (Abb. 3-39). Die stärkste Aktivität war interessanter Weise in der Per a 3.03 Probe aus Protokoll 3 vorhanden, bei der gegenüber den anderen Per a 3-Proben eine viel geringere Proteinmenge aufgetragen wurde. P II aus dem gleichen Reinigungsprotokoll wies keine signifikante Aktivität auf (Abb. 3-39).

Um zu überprüfen ob diese partiell aktiven Proben sich durch Besonderheiten im Absorptionsverhalten auszeichneten, wurden von den Proben UV/Vis-Spektren aufgenommen.

3.3.2.5 Absorptionsspektren

Ein wichtiger Marker für Proteine mit Typ III-Kupferzentren, zu denen Phenoloxidasen und Hämocyanine zählen, ist die Absorption im oxygenierten Zustand bei 340 nm und 560 nm. Wobei der spezifische Extinktionskoeffizient bei 560 nm um den Faktor 20 geringer ist als bei 340 nm [291]. Unter Berücksichtigung der Phenoloxidasen-Aktivitätsexperimente wurden UV/Vis-Spektren von Per a 3-Proben aus verschiedenen Reinigungsprotokollen aufgenommen (Abb. 3-40). Die Per a 3-Probe aus der ersten Reinigung in der Diplomarbeit konnte aufgrund eines zu geringen Probenvolumens und -konzentration jedoch nicht mehr mit berücksichtigt werden. Für einen besseren Vergleich der Spektren, wurden diese in Abb. 3-40 auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml normiert.

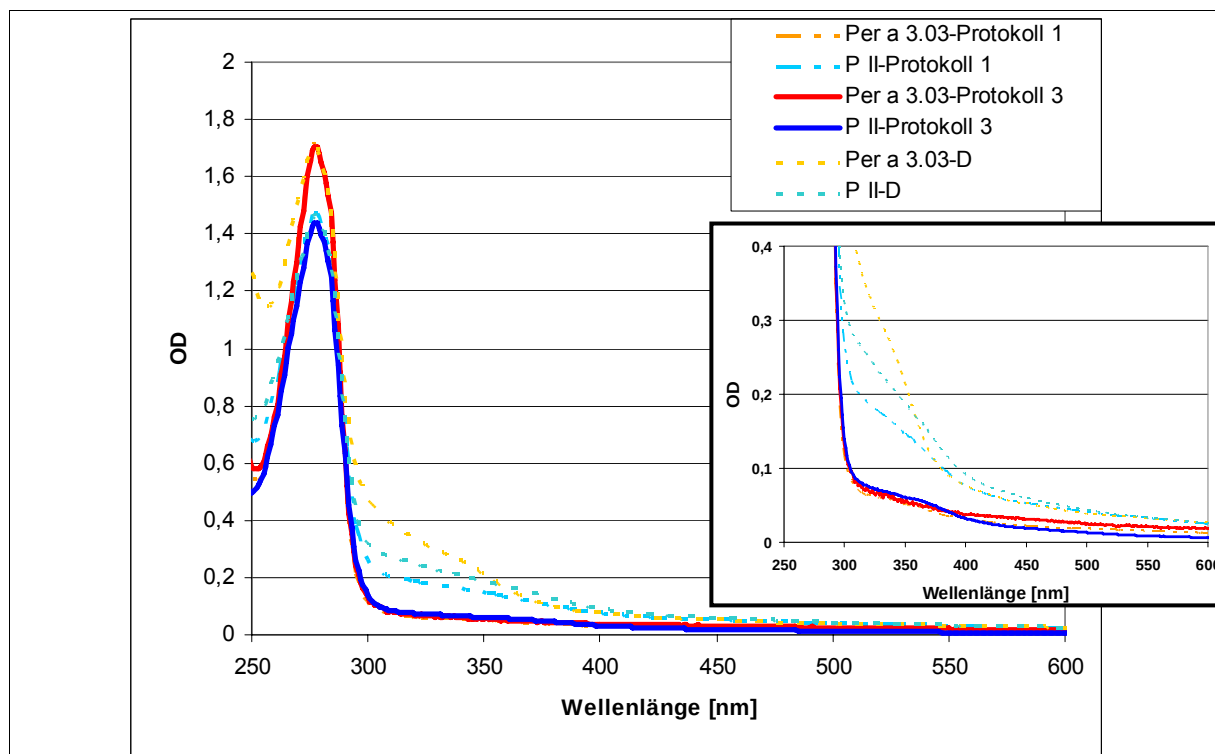


Abb. 3-40: Absorptionsspektren der nach unterschiedlichen Protokollen gewonnenen Per a 3-Isoformen.

Die Proben aus der Diplomarbeit stammten aus der damaligen zweiten Reinigung. Die Absorptionsspektren wurden gegen die Pufferabsorption korrigiert und für einen besseren Vergleich auf 1 mg/ml normiert. Die Absorption wurde zusätzlich in der kleinen Abbildung mit einer anderen Skalierung dargestellt. Je nach Aufreinigungsprotokoll war in der Per a 3.03 und/oder in der P II-Probe eine ansteigende Absorption zwischen 300 nm und 340 nm zu beobachten, jedoch nicht bei 560 nm. Die Absorption bei dieser Wellenlänge musste auf einen gebundenen Cofaktor zurückzuführen sein, da diese auch nach Umpufferung in Zentrifugalkonzentratoren weiterhin in der Probe beobachtet wurde. Ein Zusammenhang der 340 nm-Absorption zu den Proben mit Phenoloxidasen-Aktivität bestand nicht.

Neben der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm konnten in drei der sechs Proben eine zusätzliche ansteigende Absorption zwischen 300 nm und 340 nm, jedoch - eventuell aufgrund der geringen Konzentration- keine Absorption bei 560 nm gemessen werden (Abb. 3-39). Zur Verdeutlichung dieser Absorption wurde das Spektrum zusätzlich mit einer kleineren Skalierung dargestellt (Abb. 3-40 rechts). Die bei 340 nm absorbierenden Proben zeigten ebenfalls eine auffällig höhere Absorption bei 250 nm als die übrigen Per a 3-Proben. Daher musste davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil dieser Absorption auf eine stärkere Streuung in diesen Proben zurückgeführt werden musste. Eine Assoziation zwischen den Proben mit Absorption bei 340 nm und Proben mit Diphenoloxidase-Aktivität konnte jedoch nicht festgestellt werden, wie insbesondere die Beispiele der Per a 3-Proteine aus Protokoll 3 zeigten: Die Per a 3.03-Probe aus Protokoll 3 zeigte im Dot-Blot die höchste Aktivität und bei 340 nm keine signifikante Absorption. Wohingegen die nicht-aktive P II-Probe bei 340 nm zu einem geringen Anteil absorbierte (Abb. 3-39, Abb. 3-40). Die Ursache für die beobachtete Absorption konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Somit war die beobachtete Diphenoloxidase-Aktivität mit Sicherheit nicht auf die Per a 3-Isoformen zurückzuführen. Bei Arthropoden ist bekannt, dass Phenoloxidasen als Hexamere vorkommen und den Hämocyaninen und Hexamerinen sehr ähnlich sind [301], wodurch je nach Reinigungsprotokoll in den Per a 3-Proben offensichtlich eine in geringen Konzentrationen vorhandene Phenoloxidase mit enthalten war.

3.3.2.6 Kreuzreaktionen der Isoformen

Kreuzreaktionen von Proteinen sind ab einer mindestens 35%ige Sequenzidentität bei Peptidabschnitten die aus mindestens 80 Aminosäuren (AS) bestehen als wahrscheinlich einzustufen [302, 303]. Da von Per a 3.03 bislang lediglich die in Abschnitt 3.3.2.1 dargestellten Sequenzabschnitte bekannt waren, war die Beurteilung von Kreuzreaktionen zwischen Per a 3.03 und P II über Sequenzvergleiche nicht sinnvoll. Allerdings ermöglichte die Isolation ausreichend großer Mengen der Per a 3.03-Isoform aus der Hämolymphe (Protokoll 1) in dieser Arbeit die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen diese Per a 3-Isoform („anti-Per a 3.03-AK“) (Abschnitt 2.12). Gegen P II gerichtete polyklonale anti-P II-AK waren bereits in den Institutsbeständen vorhanden (Abschnitt 2.12).

Ziel der nachfolgenden Experimente war es, die Antikörperbindung des anti-Per a 3.03-AK und des anti-P II-AK insbesondere an die Per a 3-Proteine zu charakterisieren. Hierzu wurden die AK-Bindungseigenschaften an native und denaturierte Proteine im Western-Blot (Abb. 3-41, Abb. 3-42) und mit nativen Proteinen in der 2D-Immungelektrophorese (Abb. 3-43, Abb. 3-44) im Hinblick auf lineare bzw. diskontinuierliche Epitope analysiert. Außerdem zielten diese Versuche darauf ab die Probenzusammensetzungen der isolierten Per a 3-Proteine zu überprüfen und Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Proteinen zu testen.

Aufgrund der aufwändigen Reinigungsprozeduren stellten die isolierten Per a 3-Isoformen in dieser Arbeit generell einen limitierenden Faktor dar, sodass der Großteil der nachfolgenden Experimente an unbehandelten Hämolymp-Prob- durchgeföhrt wurde, in denen, wie zuvor erläutert, die Per a 3-Isoformen den Proteinhauptanteil darstellten. Da zudem in Abhängigkeit zur Schabencharge starke Konzentrationsunterschiede insbesondere bei Per a 3.03 auftraten, wurde für diese Experimente sowohl die Hämolymphe aus der ersten Charge (HL-1) als auch die Hämolymphe aus der zweiten Charge (HL-2) verwendet (Abschnitt 3.1.2, Abb. 3-41).

Für die Charakterisierung der AK-Bindung an lineare Epitope wurden auf einer 10%igen SDS-PAGE denaturierte HL-Proben beider Chargen aufgetrennt, anschließend im Western-Blot-Verfahren geblottet und die Proteine mit anti-Per a 3.03- bzw. anti-P II-AK als Primärantikörper detektiert. Zusätzlich wurde ein identisch beladenes Referenzgel mit Coomassie gefärbt (Abb. 3-41).

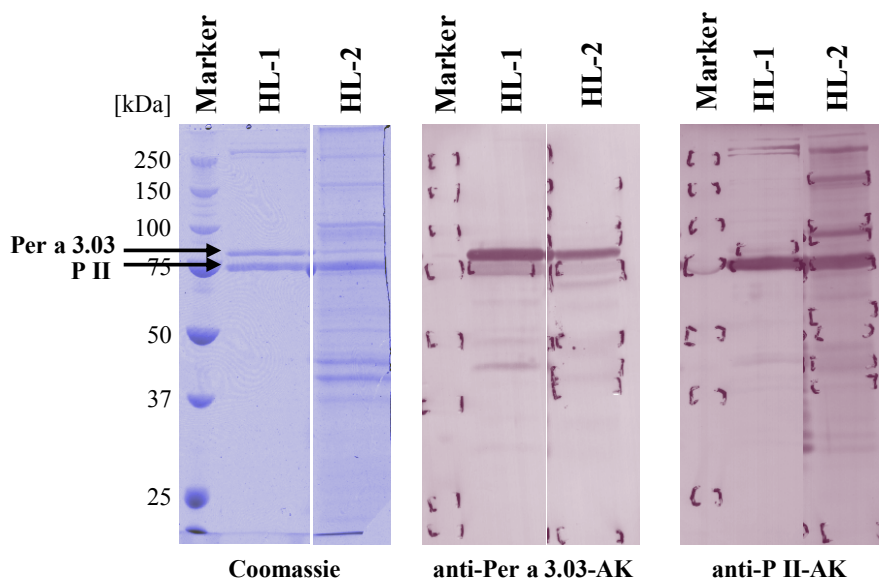


Abb. 3-41: Bindung zweier anti-Per a 3-Antikörper an denaturierte, geblottete HL-Proben beider Chargen.

Es wurden je 1 µg HL-1 und 14 µg HL-2 auf identisch beladene 10%ige SDS Gele appliziert. Als Proteinstandard wurde der BioRad-Marker verwendet. Das Referenzgel wurde mit Coomassie angefärbt und die übrigen Proben im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Primärantikörper wurde 1:100000 verdünnter anti-Per a 3.03-AK bzw. anti-P II-AK verwendet, der Sekundärantikörper wurde 1:1000 verdünnt.

Das Referenzgel spiegelte eindeutig den unterschiedlichen Per a 3.03-Gehalt in den beiden HL-Chargen wider, wobei Per a 3.03 auch noch in diesen geringen Konzentrationen vom anti-Per a 3.03-AK erkannt wurde. Deutlich schwächer hatte dieser AK an denaturiertes P II gebunden. Ein deutlich anderes Bindungsmuster wies der anti-P II-AK auf. Er erkannte sehr gut denaturiertes P II sowie weitere Proteinbanden höheren und niedrigeren Molekulargewichts, jedoch nur äußerst schwach Per a 3.03.

Auf dem Referenzgel war insbesondere bei HL-1 deutlich zu sehen, dass die Per a 3-Isoformen (80 kDa- und 73 kDa) in der HL einen außerordentlich hohen Anteil dargstellten, wobei insbesondere die Konzentration von Per a 3.03 in der HL-1 deutlich von der Konzen-

tration in der HL-2 abwich. (Abb. 3-41). Im Western-Blot wurde bei der Detektion mit dem anti-Per a 3.03-AK im Vergleich zum anti-P II-AK ein deutlich unterschiedliches Bindungsmuster beobachtet (Abb. 3-41).

Der **anti-Per a 3.03-AK** erkannte die denaturierte Per a 3.03-Isoform in beiden HL-Chargen sehr gut (Abb. 3-41). Insbesondere bei der HL-2-Probe bestätigte die deutliche Bandenfärbung die hohe Nachweisempfindlichkeit des Blot-Systems bei Verwendung der indirekten Antikörpermarkierung. Sehr viel schwächer, jedoch gut nachweisbar, erkannte der Antikörper ebenfalls lineare Epitope auf der P II-Isoform (73 kDa). Zusätzlich wurden unterhalb von 75 kDa weitere Banden vom AK detektiert, die jedoch nicht weiter identifiziert wurden (Abb. 3-41).

Im Unterschied dazu erkannte der **anti-P II-AK** wie erwartet sehr gut denaturiertes P II, jedoch fast gar kein Per a 3.03. Lediglich in der HL-1-Probe -mit hoher Per a 3.03-Konzentration- konnte eine schwache Bandenfärbung beobachtet werden. Stattdessen erkannte der Antikörper in auffälliger Weise hochmolekulare Proteinbanden, sowie zusätzliche niedermolekulare Banden (Abb. 3-41). Bei den hochmolekularen Banden von über 250 kDa handelte es sich um Aggregate der P II-Isoform, die bereits zuvor massenspektrometrisch identifiziert wurden (Abschnitt 3.3.2.1). Ob es sich bei der Bindung an die restlichen Banden um tatsächliche Kreuzreaktionen handelte oder aber um Artefakte, die auf eine nicht vollständig gereinigte zur Immunisierung verwendete P II-Probe zurückgeführt werden mussten oder aber um weitere P II-Aggregate bzw. Bruchstücke, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Um zu überprüfen, ob diese beiden Antikörper ein ähnliches heterologes Bindungsmuster an nativen HL-Proteinen zeigten, wurden zwei Methoden angewendet und miteinander verglichen. Zum einen wurde im Western-Blot die Bindung an Proben untersucht, die zuvor auf nativen Gelen aufgetrennt wurden (Abb. 3-42). Zum anderen wurde das Präzipitationsverhalten der nativen Proben in der 2D-Immungelektrophorese untersucht (Abb. 3-43).

Western-Blot

Für die Untersuchung der Kreuzreaktivitäten nativer Proben mit den anti-Per a 3-Antikörpern wurden HL-Proben beider Chargen auf 7.5%igen nativen Gelen aufgetrennt und anschließend im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Referenz diente andissoziiertes Hämocyanin aus *Astacus astacus* (Astacus-Marker). Als Primärantikörper wurden wie im vorherigen Western-Blot anti-Per a 3.03-AK und anti-P II-AK verwendet. Das Referenzgel wurde mit Coomassie gefärbt und spiegelte erneut den hohen Anteil der hexameren Per a 3-Proteine in der Hämolymphe wider (Abb. 3-42, mit Pfeil gekennzeichnet).

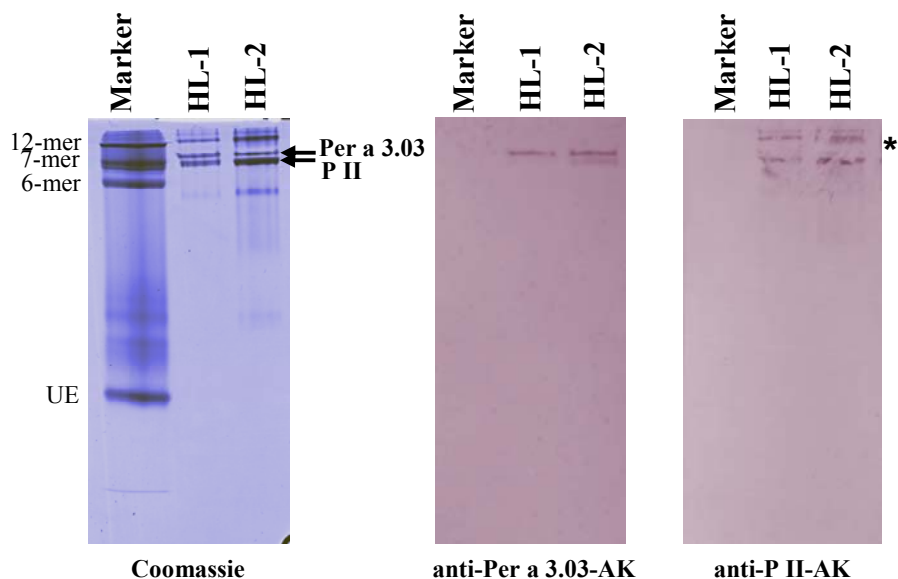


Abb. 3-42: Bindung zweier anti-Per a 3-Antikörper an native, geblottete HL-Proben beider Chargen.

Es wurden 1 µg HL-1 und 14 µg HL-2 zuvor 3:4 mit BPB verdünnt und auf identisch beladene 7.5%ige native Gele appliziert. Als Referenz wurde der *Astacus*-Marker verwendet. Das Referenzgel wurde mit Coomassie angefärbt und die übrigen beiden im Western-Blot-Verfahren geblottet. Primär- und Sekundärantikörper wurden wie zuvor bei den SDS-Gelen eingesetzt.

Der anti-Per a 3.03-AK erkannte außer nativem hexamerem Per a 3.03 auch natives hexameres P II. Auch der anti-P II-AK erkannte sehr deutlich hexameres P II. Allerdings hatte er deutlich schwächer an natives hexameres Per a 3.03 gebunden. Auch bei diesen nativ aufgetrennten Proben bestätigte sich, dass der anti-P II-AK an mindestens ein weiteres Protein in beiden HL-Proben binden konnte, welches eine langsamere Mobilität aufwies als die Per a 3-Proteine und mit * gekennzeichnet ist.

Auch bei den nativ geblotteten Proben zeigten die Per a 3-AK ähnliche Kreuzreaktivitäten: Der **anti-Per a 3.03-AK** erkannte bei den nativ geblotteten Proben spezifisch die 80 kDa- und 73 kDa-Per a 3-Isoformen, wohingegen der **anti-P II-AK** zwar natives P II erkannte, jedoch nur sehr schlecht natives Per a 3.03 (Abb. 3-42). Diese äußerst schwache Erkennung von Per a 3.03 ließ den Rückschluss zu, dass nur sehr wenige kreuzreaktive Epitope bzw. nur sehr wenige kreuzreaktive Antikörper im anti-P II-Serum vorhanden waren. Zusätzlich erkannte der Antikörper weitere HL-Proteine, die in Abb. 3-42 mit * gekennzeichnet wurden. Diese Banden zeigten eine ähnliche Mobilität wie das 12-mer des Referenzhäemocyanins (*Astacus*-Marker). Da auf SDS-Gelen beobachtet wurde, dass die P II-Probe aggregierte, bestand die Möglichkeit, dass diese Bande P II-Aggregate darstellte, oder dass es sich um ein anderes natives Protein handelte, dessen denaturierte Untereinheiten wahrscheinlich ebenfalls zuvor im Western-Blot vom anti-P II-AK erkannt wurden (Abb. 3-41). Da jedoch wie bereits angesprochen, nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich hierbei an Stelle einer Kreuzreaktion auch um ein Artefakt gehandelt haben könnte, wurden diese Banden nicht näher identifiziert.

Eine Kreuzreaktion zwischen Per a 3-Antikörpern und partiell dissoziiertem Häemocyanin von *Astacus astacus* konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3-42). Auch Kreuzreaktionen mit

denaturierten Hämocyaninen aus *Astacus astacus* und *Palinurus elephas* konnten ausgeschlossen werden (Abbildung nicht gezeigt). Um zu Per a 3-kreuzreaktive Proteine und potentielle Allergene zu identifizieren, sollten in weiterführenden Experimenten weitere Hämocyanine und soweit verfügbar auch Hexamerine auf Kreuzreaktionen mit Per a 3 getestet werden.

2D-Immungelelektrophorese

Das Ziel dieser Versuche lag im Wesentlichen darin, die Ergebnisse der Antikörperbindung an native Proben mit Hilfe der 2D-Immungelelektrophorese zu bestätigen. Der Vorteil der 2D-Immungelelektrophorese gegenüber dem Western-Blot nativer Proben lag zum einen in der weitmaschigen Agarosematrix, bei der die Wahrscheinlichkeit für Gelartefakte, wie z.B. Assoziation oder Dissoziation der Proben geringer eingestuft wurde als auf den engmaschigen Polyacrylamid-Gelen. Zum anderen wurden bei dieser Methode die Proteine nicht wie beim Western-Blot an eine Nitrocellulose-Membran adsorbiert, sodass auch dadurch ein möglicher Einfluss insbesondere auf Konformationsepitope weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Interessanter Weise ließ sich beim Vergleich der HL-Proben mit den jeweiligen anti-Per a 3-AK auf den Immungelen (Abb. 3-43) ein etwas anderes Erkennungsmuster als bei den Western-Blot Experimenten beobachten (Abb. 3-42).

Der anti-Per a 3.03-AK hatte im Western-Blot in der HL-1-Probe zwei Proteinbanden erkannt, wohingegen dieser AK auf dem **Immungel 1** mit der HL-1 vier Präzipitationspeaks ausbildete. Von diesen wurde Peak 3 Per a 3.03 und Peak 4 P II zugeordnet. Peak 1 und Peak 2 konnten nicht zugeordnet werden, mussten aufgrund der Trennmethode jedoch Proteine sein, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen weniger stark negativ geladen waren als die Per a 3-Isoformen. Auch die HL-2-Probe wies auf dem **Immungel 2** mit dem anti-Per a 3.03-AK vier Präzipitationspeaks auf. Analog zum Immungel 1 entsprach Peak 3 der Präzipitation mit Per a 3.03 und Peak 4 mit P II. Das Verhältnis von Peak 4 (P II) zu Peak 3 (Per a 3.03) war im Immungel 1 deutlich kleiner als im Immungel 2 und spiegelte somit sehr deutlich wider, dass in der HL-1 der Anteil an Per a 3.03 deutlich höher war als in der HL-2.

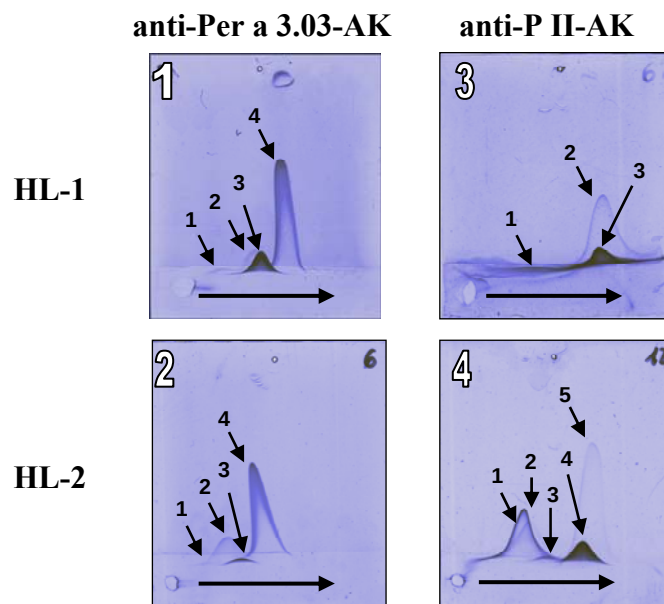


Abb. 3-43: 2D-Immungelektrophorese von HL-1 und HL-2 mit beiden anti-Per a 3-Antikörpern.

Die Immungele wurden wie folgt beladen **1)** 6 µg HL-1, 60 µl anti-Per a 3.03-AK **2)** 3 µg HL-2, 50 µl anti-Per a 3.03-AK **3)** 1 µg HL-1, 30 µl anti-P II-AK **4)** 3 µg HL-2, 50 µl anti-P II-AK.

Mit dem anti-Per a 3.03-AK waren in den HL-Proben beider Chargen vier Präzipitationspeaks zu erkennen, von denen zwei deutlich ausgeprägt waren. Peak 3 war dabei wahrscheinlich Per a 3.03 und Peak 4 P II zuzuordnen. Die unterschiedliche Höhe von Peak 3 spiegelte den in den HL-Chargen unterschiedlichen Per a 3.03-Gehalt sehr deutlich wider. Peak 1 und 2 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Mit dem anti-P II-AK waren in der HL-1 drei Präzipitationspeaks zu beobachten von den Peak 2 Per a 3.03 und Peak 3 P II zugeordnet wurde. Die HL-2 präzipitierte mit dem anti-P II-AK in mindestens fünf Peaks, von denen lediglich Peak 3 Per a 3.03 und Peak 4 P II zugeordnet werden konnten.

Im Western-Blot der nativen HL wurden bei der Detektion durch den anti-P II-AK in der Hämolymphe beider Chargen vier Proteinbanden erkannt (Abb. 3-42) Auf dem entsprechenden Immungel 3 waren jedoch lediglich drei Präzipitationspeaks und auf Immungel 4 fünf Präzipitationspeaks zu beobachten. Aufgrund eines anderen Antigen-Antikörper-Verhältnisses, konnten Peak 1 bis 3 aus Immungel 4 im **Immungel 3** nicht unterschieden werden und wurden dort nur als ein Peak (Peak 1) aufgelöst. Dieser Peak könnte der mit * gekennzeichneten Bande im Western-Blot zuzuordnen sein (Abb. 3-42). Dieser Zusammenhang wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Peak 2 von Immungel 3 entsprach wahrscheinlich Per a 3.03, welches schwach vom anti-P II-AK erkannt wurde. Peak 3 (Immungel 3) wurde auf die Präzipitation des Antikörpers mit P II zurückgeführt. Dem entsprechend handelte es sich bei Peak 3 vom **Immungel 4** um Per a 3.03 und bei Peak 4 folglich um P II. Peak 5 konnte keinem Protein zugeordnet werden.

Insgesamt erkannte der anti-Per a 3.03-AK sowohl natives Per a 3.03 als auch natives P II. Der anti-P II-AK erkannte dagegen sehr gut P II und zu einem deutlich geringeren Anteil Per a 3.03, sowie mindestens zwei weitere HL-Komponenten.

Identifikation der Per a 3-Proteine mittels 2D-Immungelektrophorese

Nachdem nun das Bindungsverhalten der Antikörper bekannt war, wurden die isolierten Per a 3-Proteine mittels 2D-Immungelektrophorese näher analysiert (Abb. 3-44).

Bei Per a 3.03 war von Interesse, ob die Antikörper-Bindung der Western-Blot-Experimente auch auf die 2D-Immungelektrophorese übertragbar waren. Bei P II lag der Fokus auf einer möglichen Unterscheidung der in P II enthaltenen Isoformen (Abschnitt 3.3.2.1).

Obwohl die durch Protokoll 1 isolierte Per a 3.03-Isoform in ausgesprochen hoher Reinheit vorlag (Abb. 3-21), bildeten sich auf dem **Immungel 5** zusammen mit dem anti-Per a 3.03-AK mindestens zwei Präzipitationspeaks aus (Abb. 3-44). Ein deutlich blau gefärbter, bei dem es sich um Per a 3.03 handelte und mindestens ein weiterer sehr schwach gefärbter zweiter Peak, der jedoch nicht mit Sicherheit zugeordnet werden konnte (Abb. 3-44).

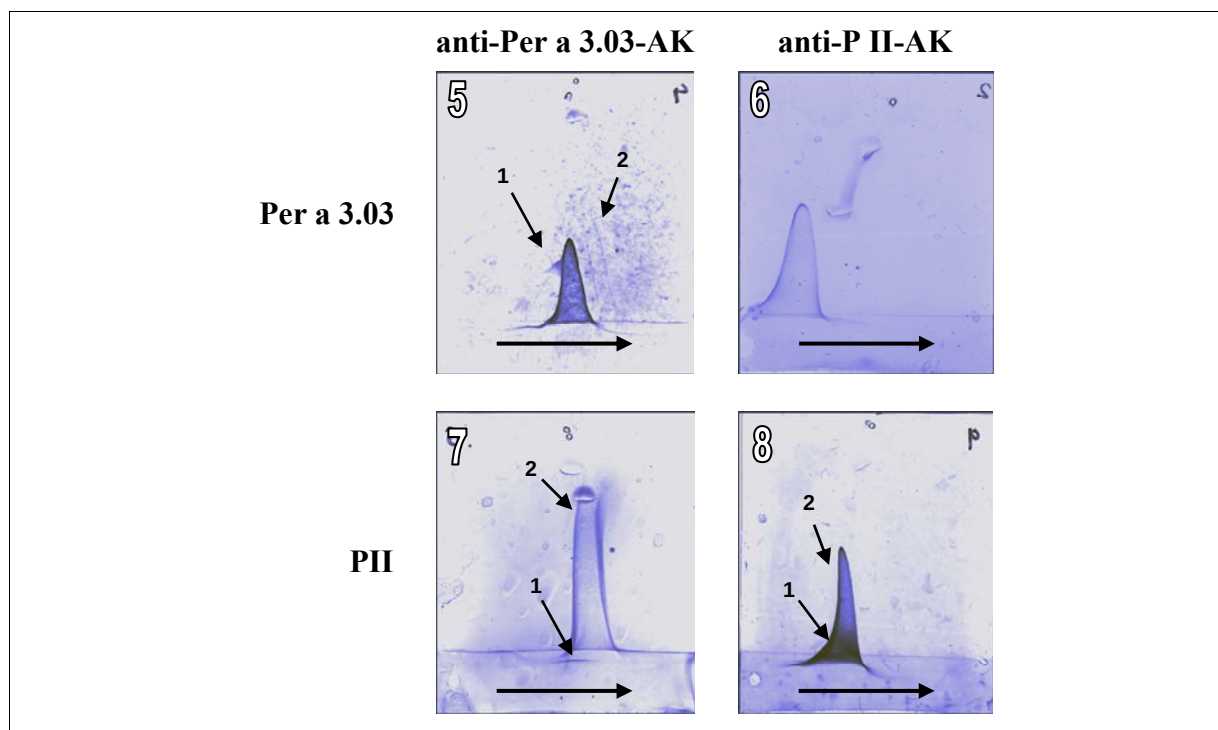


Abb. 3-44: 2D-Immungelektrophorese der isolierten Per a 3-Isoformen mit beiden anti-Per a 3-Antikörpern.

Die Probenzusammensetzung der Immungele war wie folgt: **5)** 5 µg Per a 3.03 (Protokoll 1), 20 µl AK **6)** 5 µg Per a 3.03 (Diplomarbeit), 13 µl AK **7)** 5 µg P II (Protokoll 1), 30 µl AK **8)** 5 µg P II (Protokoll 1), 12 µl AK.

Die isolierte Per a 3.03-Isoform zeigte zusammen mit dem anti-Per a 3.03-AK den erwarteten Präzipitationspeak. Zusätzlich war noch mindestens ein weiterer schwach angefärbter Peak zu erkennen, der nicht zugeordnet werden konnte. Im Widerspruch zu den Western-Blot Experimenten stand die deutliche Präzipitation des anti-P II-AK mit Per a 3.03. Das isolierte P II präzipitierte zusammen mit dem anti-Per a 3.03-AK in zwei Proteinpeaks, bei denen es sich möglicherweise um die beiden in P II enthaltenen Per a 3-Isoformen handelte, an die der anti-Per a 3.03-AK unterschiedlich gebunden hatte. Die Präzipitation von P II mit dem anti-P II-AK resultierte in zwei schlecht separierten Peaks, bei denen es sich ebenfalls um die in P II enthaltenen Isoformen Per a 3.01 und Per a 3.0201 gehandelt haben könnte. Eine Kreuzreaktion mit dem in der P II-Probe enthaltenen 88 kDa-Protein wurde nicht beobachtet.

Bei **Immungel 6** stand die Präzipitation der Per a 3.03-Isoform mit dem anti-P II-Antikörper in einem einzigen Peak im Widerspruch zu den Western-Blot-Experimenten (Abb. 3-41, Abb. 3-42), bei denen der anti-P II-AK nur zu äußerst geringen Anteilen Epitope auf Per a 3.03 erkannt hatte. Eine Verunreinigung dieser Per a 3.03-Probe mit P II konnte bei Überprüfung auf einer SDS-PAGE zuvor ausgeschlossen werden [148]. Da dieser Präzipitationspeak auch bei Wiederholung des Experimentes reproduzierbar war, konnte ebenfalls ein Artefakt ausgeschlossen werden. Vielmehr muss diese Beobachtung darauf zurückgeführt werden, dass beim Western-Blot nativer Proben auf eine Nitrocellulose-Membran offensichtlich Veränderungen der Proteinoberfläche auftraten, die im Fall von Per a 3.03 einen deutlichen Einfluss auf die anti-P II-AK-Bindung hatten.

Unter Einbeziehung der Western-Blot-Experimente konnte geschlussfolgert werden, dass der anti-P II-AK offensichtlich bei Per a 3.03 hauptsächlich Konformationsepitope und nahezu keine linearen Epitope erkannte.

Bei P II waren auf beiden Immungelen mehrere Peaks zu unterscheiden (Abb. 3-44). Auf dem **Immungel 7** präzipitierte die P II-Probe mit dem anti-Per a 3.03-AK in zwei sehr unterschiedlich hohen Peaks. Eine Präzipitation durch eine Verunreinigung mit Per a 3.03 wurden jedoch aufgrund der Kontrollgele (Abb. 3-21) ausgeschlossen. Unter Berücksichtigung, dass sich P II aus zwei Isoformen zusammensetzte, konnte diese Präzipitation auch darauf hindeuten, dass die beiden in P II enthaltenden Isoformen vom anti-Per a 3.03-AK deutlich unterschiedlich gut gebunden wurden. Auf dem **Immungel 8** waren mit anti-P II-AK ebenfalls zwei nicht gut separierte Präzipitationspeaks von P II vorhanden. Diese spiegelten wahrscheinlich ebenfalls das in P II enthaltene Isoformengemisch (Per a 3.01 und Per a 3.0201) wider. Mit dieser Methode war es somit zusätzlich zur IEF gelungen, die beiden in P II enthaltenen Isoformen (Per a 3.01 und Per a 3.0201) partiell voneinander zu trennen.

Fazit der Kreuzreaktionen der Isoformen

Sowohl mit den Western-Blot-Experimenten als auch mit der 2D Immungelektrophorese konnte ausgeschlossen werden, dass zwischen dem 88 kDa-Protein (als Verunreinigung in P II aus Protokoll 1 enthalten) und den Per a 3-AK Kreuzreaktionen auftraten (Abb. 3-44). Beide Methoden lieferten für die nativen Per a 3-Proteine etwas differierende Ergebnisse. Diese mussten entweder auf eine signifikant höhere Sensitivität der 2D Immungelektrophorese zurückgeführt werden, oder darauf, dass der Transfer und die Adsorption nativer Proteine an eine Nitrocellulose-Membran zum Verlust von Konformationsepitopen führte, was in einer differierenden AK-Erkennung resultierte.

Basierend auf diesen Untersuchungen konnten die getesteten Kreuzreaktionen der Per a 3-Isoformen mit den beiden anti-Per a 3-AK folgendermaßen zusammengefasst werden (Tabelle 3-4):

	Per a 3.03		P II	
	denaturiert	nativ	denaturiert	nativ
anti-Per a 3.03-AK	+++	+++	++	++
anti-P II-AK	+	+	+++	+++

Tabelle 3-4: Übersicht über die Kreuzreaktionen der nativen und denaturierten Per a 3-Isoformen mit den anti-Per a 3-AK. Die Einteilung der Reaktionen erfolgte von sehr deutlich (+++) über gering (+) bis gar nicht (-).

3.3.2.7 Untersuchungen zur Stabilität von isoliertem P II und Hämolymphe aus *Periplaneta americana*

Die Stärke der Immunantwort hängt u.a. von der Konzentration des Antigens, dem Eintrittsvektor in den Organismus, aber auch im Besonderen von der Struktur des entsprechenden Antigens ab. Bei den meisten respiratorischen Allergenen spielen Konformationsepitope für die IgE-Bindung eine wichtige Rolle [304, 305]. Somit ist eine intakte dreidimensionale Proteinstruktur und damit die Stabilität der Proteine für die Immunantwort von enormer Bedeutung [306]. Da aus den vorherigen Untersuchungen bekannt war, dass die Untereinheiten der Per a 3-Isoformen nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, wurde mittels chaotropen Reagenzien versucht, die hexameren Per a 3-Isoformen in ihre Untereinheiten zu zerlegen. In weiteren Experimenten wurde die Stabilität der Allergene im Hinblick auf die Antigenpräsentation verfolgt. Hierfür wurde zunächst die Proteininstabilität in einem Modellsystem gegenüber dem pH-Bereich der endosomal/lysosomalen Kompartimenten untersucht.

Stabilität gegenüber chaotropen Reagenzien

Eine besondere Eigenschaft der Per a 3-Proteine ist deren hohe Stabilität. Frühere Experimente hatten ergeben, dass die Per a 3-Proteine nicht wie die Hexamerine und auch nicht wie die verwandten Hämocyanine durch Inkubation in Dissoziationspuffer A (50 mM Glycin, 5 mM EDTA, pH 9.6) in ihre Untereinheiten zerlegt werden konnten [148, 292, 307-311].

Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Per a 3-Proteine gegenüber chaotropen Reagenzien untersucht, mit dem Ziel, die hexamere Oligomerisierung der Per a 3-Isoformen zu dissoziieren, ohne dabei die Untereinheiten zu denaturieren. Chaotrope Reagenzien stören die geordnete Wasserstruktur und vermindern dadurch die für Proteine wichtigen hydrophoben Kräfte. Für diese Stabilitätsuntersuchungen wurden unterschiedliche Puffersysteme mit

Harnstoff bzw. Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) in unterschiedlichsten Versuchen getestet, die im Folgenden am Beispiel dreier verschiedener Ansätze vorgestellt werden:

Im ersten Ansatz wurde die Stabilität der gereinigten P II-Isoform (aus Protokoll 3) gegenüber Dissoziationspuffer B (50 mM Glycin, 5 mM EDTA, 2.5 M Harnstoff, pH 9.6) untersucht. Die nächsten Ansätze wurden hauptsächlich aufgrund der limitierten Proteinmenge der gereinigten Isoformen an der Hämolymphe (HL-2) durchgeführt. Für den zweiten Ansatz wurde ein alkalischeres Puffermilieu sowie Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) als chaotropes Reagenz gewählt (Dissoziationspuffer C: 50 mM Glycin, 20 mM EDTA, 2 M GdnHCl, pH 10.5) und zusätzlich der Einfluss der Hämolymphe-Konzentration auf die Dissoziation untersucht.

Der dritte Ansatz fand ebenfalls bei pH 10.5 statt, wurde jedoch erneut mit Harnstoff als chaotropes Reagenz an analytischen HL-Konzentrationen getestet (Dissoziationspuffer D: 50 mM Glycin, 20 mM EDTA, 2.5 M Harnstoff, pH 10.5) und anschließend auf einen präparativen HL-Ansatz übertragen.

Auf diesen Experimenten aufbauend wurde in Kooperation mit der [REDACTED] (Hautklinik des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) von [REDACTED] in ihrer Diplomarbeit der Einfluss der hexameren Oligomerisierung der Per a 3-Isoformen auf deren Immunogenität und Allergenität im Vergleich zum Dissoziat analysiert [19, 273].

Stabilität von P II gegenüber Dissoziationspuffer B

Für die Untersuchung der Stabilität von P II in Gegenwart von Harnstoff konnte auf eine Untersuchungsreihe meiner Diplomarbeit zurückgegriffen werden (Abb. 3-45) [148].

Hierbei wurde die Stabilität in Abhängigkeit von 0 M bis 5 M Harnstoff in Dissoziationspuffer A auf einer nativen PAGE untersucht und beobachtet, dass ab 2 M Harnstoff bereits nach 1 h eine beginnende Dissoziation der Hexamere auftrat. Bei 3 M Harnstoff war nach 24 h der Proteinhauptanteil dissoziiert und eine beginnende Denaturierung konnte beobachtet werden.

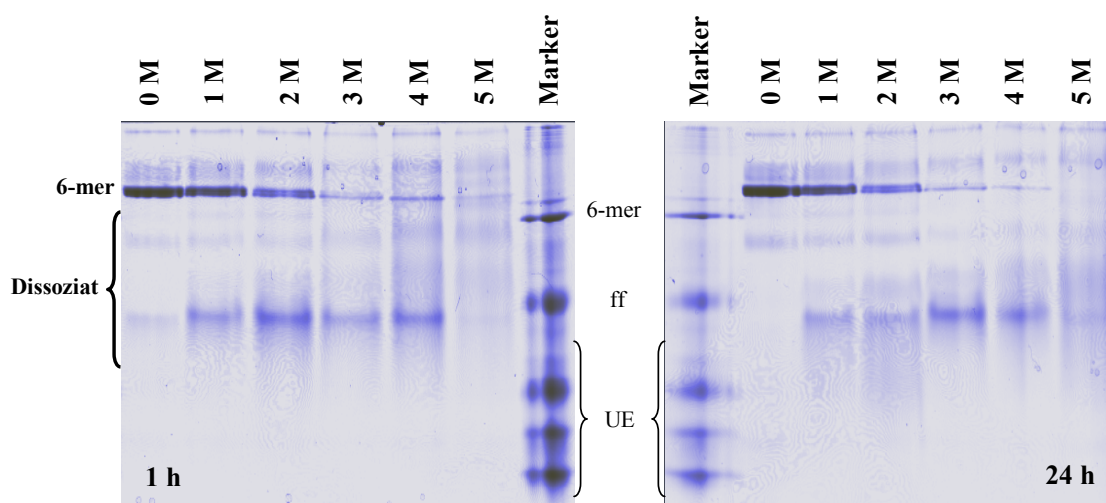


Abb. 3-45: Überprüfung von P II nach 1 h und 24 h Inkubation in Gegenwart von 0-5 M Harnstoff in Dissoziationspuffer A.

Pro Spur wurden 4.5µg Protein 2:3 mit BPB verdünnt aufgetragen und auf einer 7.5%igen nativen PAGE (pH 8.8) aufgetrennt. Als Referenz diente der *Eurypelma*-Marker, der zwischen den Gelen beschriftet wurde. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

Ab 1 M Harnstoff wurden zusätzlich zur typischen P II-Hexamerbande (6-mer) weitere Proteinbanden, insbesondere eine Bande auf Höhe der ff-Untereinheiten beobachtet (Dissoziat). P II begann nach 24 h Inkubation ab 3 M Harnstoff zu denaturieren. Bei 5 M Harnstoff war fast alles P II denaturiert, sodass keine deutlich abgegrenzten Proteinbanden mehr nachweisbar waren.

Um eine Denaturierung der Proben vermeiden zu können, wurde sich daher in nachfolgenden Experimenten für 2.5 M Harnstoff entschieden.

In diesem Dissoziations-Ansatz wurde P II 1:7 mit Dissoziationspuffer B auf eine Konzentration von 0.14 mg/ml verdünnt und für fünf Tage bei 20°C inkubiert. Für die Separation von Hexameren und Dissoziat wurde die Probe mittels Größenausschlusschromatographie (S-200, 16/60) aufgetrennt und die relevanten Fraktionen auf einer nativen PAGE überprüft (Abb. 3-46).

Die Probe eluierte in vier unterschiedlich ausgeprägten Peaks von der SEC, wobei interessanter Weise bei der Elution von Peak 3 ein Anstieg der Leitfähigkeit zu verzeichnen war. Peak 1 eluierte nach 80.5 ml Retentionsvolumen, Peak 2 nach 108.5 ml, Peak 3 nach 116.5 ml und der schwach ausgeprägte Peak 4 nach 125.5 ml. Die Überprüfung der relevanten Peak-Fractionen auf der nativen PAGE ergab, dass die dissoziierte P II-Probe sich aus Hexameren und einer weiteren Bande zwischen ff und bc-Untereinheiten des *Eurypelma*-Markers zusammensetzte, die beide in Peak 1 eluierten (Abb. 3-46). Die native P II-Probe wies zusätzlich zur Hexamerbande zwei weitere Proteinbanden auf, die bereits bei nativen P II-Proben aus dem Crude-Extrakt beobachtet wurden. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um verschiedene P II-Dissoziationsstufen (Abb. 3-46).

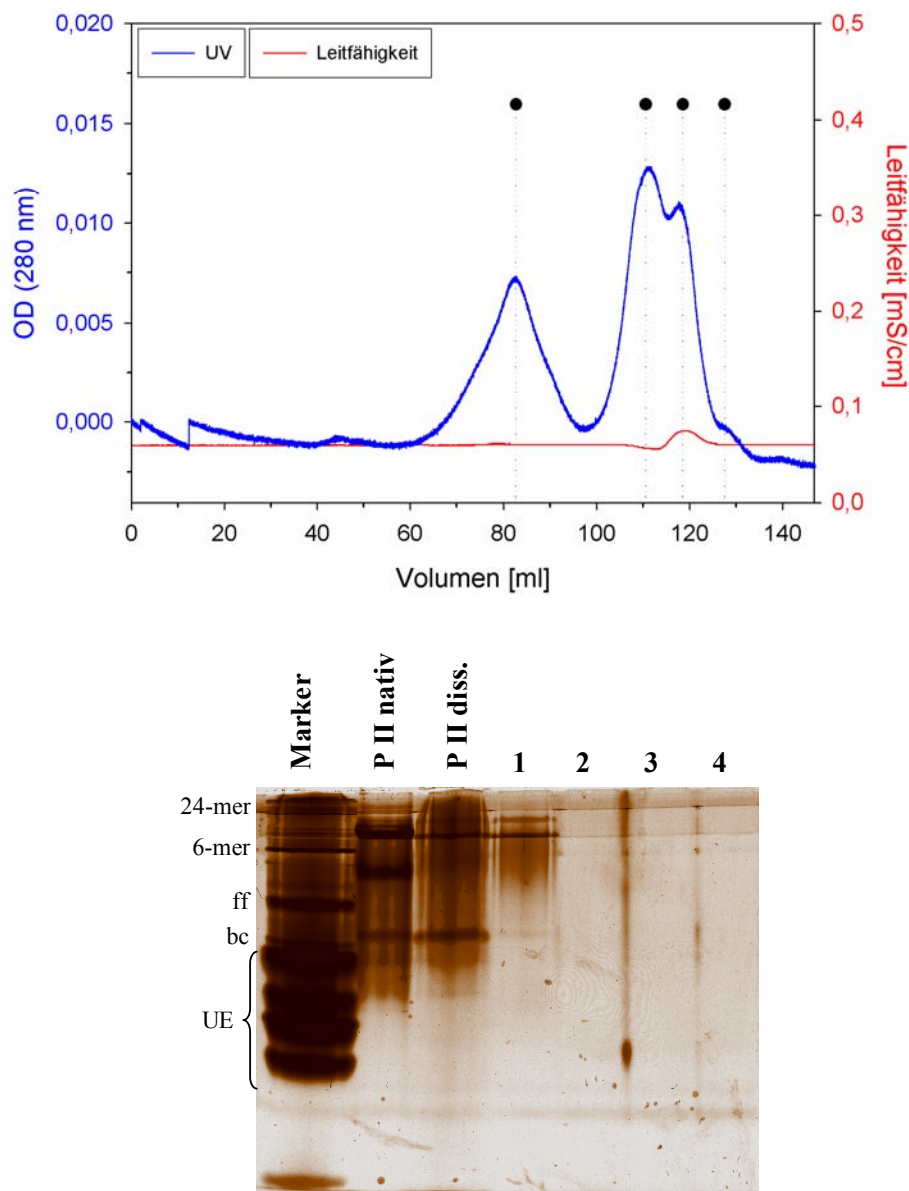


Abb. 3-46: Größenausschlusschromatographie der mit Dissoziationspuffer B dissoziierten P II-Probe mit Kontrolle der Peak-Fractionen auf einer silbergefärbten 7.5%igen nativen PAGE.

A) Größenausschlusschromatographie (S-200; 16/60). Es wurden 5 ml der dissoziierten Probe mit Dissoziationspuffer B bei einer Flussrate von 0.5 ml/Min. auf die Größenausschlussssäule aufgetragen. Die Proteine wurden mit 147 ml Puffer eluiert und in 1 ml-Fractionen gesammelt.

Das Dissoziat eluierte in vier Peaks von der Säule, wobei bei der Elution von Peak 3 ein Anstieg der Leitfähigkeit zu verzeichnen war. Peak 1 eluierte nach 80.5 ml Retentionsvolumen, Peak 2 nach 108.5 ml, Peak 3 nach 116.5 ml und der schwach ausgeprägte Peak 4 nach 125.5 ml.

B) Kontrolle der relevanten Peak-Fractionen auf einer silbergefärbten 7.5%igen nativen PAGE. Es wurden je 20 µl der zuvor 3:4 mit BPB versetzten Proben auf das 7.5%ige native Gel appliziert. Die native P II-Probe wurde zusätzlich zuvor 1:10 mit Schabepuffer C verdünnt (68 µg). Als Referenz diente der *Eurypelma*-Marker.

Das native P II wies auf der nativen PAGE insgesamt drei Proteinbanden auf, bei denen es sich wahrscheinlich zusätzlich zum Hexamer um unterschiedliche Dissoziationsstufen handelte. Beim Dissoziat wurden dagegen lediglich zwei Proteinbanden angefärbt. Die Peak 1 Fraction enthielt hexameres P II, den restlichen drei Peak-Fractionen konnte kein Proteinzustand zugewiesen werden.

Peak 1 enthielt hauptsächlich das hexamere P II, wohingegen weder Peak 2 noch Peak 3 auf der nativen PAGE ein Proteinzustand zugewiesen werden konnte (Abb. 3-46). Interessant war allerdings, dass das Dissoziat, welches auf der nativen PAGE zwei Proteinbanden aufwies, in vier Peaks von der Größenausschlusssäule eluierte. Das Auftreten von Peak 2 und Peak 3 war eventuell auf die Zusammensetzung der P II-Probe aus Per a 3.01 und Per a 3.0201 zurückzuführen.

Um trotz der geringen Proteinkonzentration in Peak 2 und 3 beurteilen zu können, ob tatsächlich eluierende Monomere oder ein Gemisch aus z.B. Monomeren, Di- und/oder Trimeren vorhanden waren, wurden die Fraktionen von Peak 2 und 3 (80-106) vereinigt. Sie wurden im Folgenden als Peak 2,3 bezeichnet. Von Peak 1 wurden die Fraktionen 45-78 und von Peak 4 die Fraktionen 107-115 vereinigt. Diese Proben wurden aufkonzentriert und für die immunologischen Untersuchungen mit PBS umgepuffert und erneut auf einer nativen PAGE überprüft (Abb. 3-47).

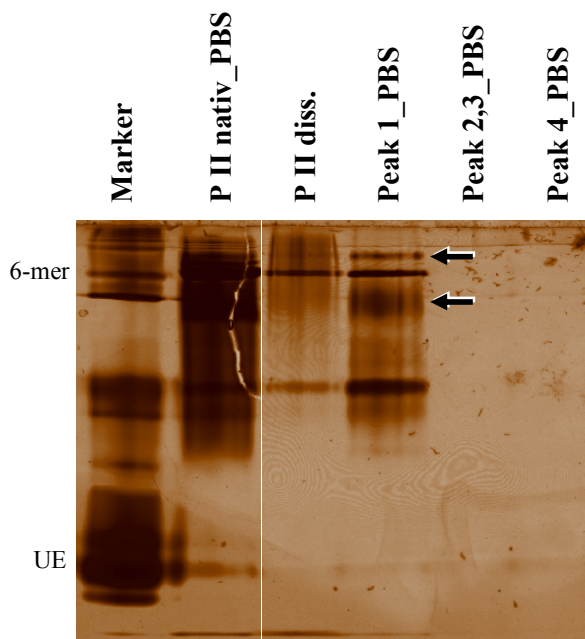


Abb. 3-47: Überprüfung der vereinigten und mit PBS umgepufferten Proben auf einer silbergefärbten 7.5% nativen PAGE.

Es wurden je 24 µl zuvor 3:4 mit BPB versetzte Proben auf das Gel appliziert. Es wurden 11.4 µg natives P II (P II nativ_PBS), 3.2 µg dissoziiertes P II (P II diss.) und 1.5 µg Peak 1_PBS aufgetragen. Die Proteinkonzentration der übrigen Peak-Proben (Peak 2,3_PBS, Peak 4_PBS) konnte aufgrund zu geringer Proteinkonzentration und –volumina nicht bestimmt werden, sodass die Proben unverdünnt verwendet wurden. Als Referenz diente der *Palinurus*-Marker.

Die umgepufferte native P II-Probe war für eine Detektion mit der Silberfärbung zu hoch konzentriert, sodass die Hexamerbande auf dieser PAGE nur sehr schwer zu erkennen war. Eine Reassoziierung der nicht umgepufferten dissoziierten P II-Probe (P II diss.) wurde nicht beobachtet. Ein deutlicher Unterschied war nach Umpufferung in der Peak 1-Probe zu erkennen. Diese zeigte in PBS mindestens vier Proteinbanden, die sowohl auf eine Aggregation als auch auf eine partielle Dissoziation der Peak 1-Probe hinwiesen (mit Pfeilen gekennzeichnet).

Doch auch mit den aufkonzentrierten Proben konnte den vereinigten Peak 2,3-Fractionen kein Protein zugeordnet werden. Allerdings fiel auf, dass die Peak 1-Probe nach der Umpufferung zwei weitere Banden auf der nativen PAGE aufwies (mit Pfeil gekennzeichnet Abb. 3-47). Die Aufkonzentrierung und/oder die Lagerung in PBS könnte bei partiell dissoziiertem P II zur Reassoziaton bzw. Aggregatbildung geführt haben.

Um auszuschließen, dass es sich dabei um Gelartefakte handelte, wurden diese Proben zusätzlich im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Als Referenz wurde natives hexameres P II des identischen Reinigungsprotokolls verwendet (Abb. 3-48).

Von dem sedimentierenden P II konnten bei 40000 rpm nur sehr wenige Sedimentationsfronten aufgenommen werden (Abb. 3-48 1A). Diese belegten dennoch eindeutig die Sedimentation der hexameren P II Probe mit 17 S ($S_{20,w}$), die dem gemittelten korrigierten S-Wert der unbehandelten hexameren P II-Probe entsprach (Abb. 3-34). Hiermit konnte zusätzlich bestätigt werden, dass natives P II in PBS weder aggregierte noch denaturierte noch in PBS eine Auflockerung der Quartärstruktur stattgefunden hatte. Die langsamer sedimentierenden Proteine waren eventuell den zusätzlichen Proteinbanden der P II Probe auf der nativen PAGE zuzuordnen (Abb. 3-47). Das Sedimentationsverhalten der Peak 1 Probe zeigte eine breite Verteilung von 0 bis 10 S ($S_{20,w}$) (Abb. 3-48). Somit enthielt die Probe unterschiedliche P II-Dissoziationsstufen. Für reine Monomere wäre, in Anlehnung an den Sedimentationskoeffizienten von Hämocyanin-Untereinheiten, eine sedimentierende Gruppe von etwa 5 S ($S_{20,w}$) zu erwarten gewesen [312]. Bei der Peak 2,3-Probe konnte trotz Messung bei 220 nm keine Sedimentationsfronten ausgemacht werden (Abb. 3-48 3). Eine Denaturierung der Proben konnte nicht ausgeschlossen werden.

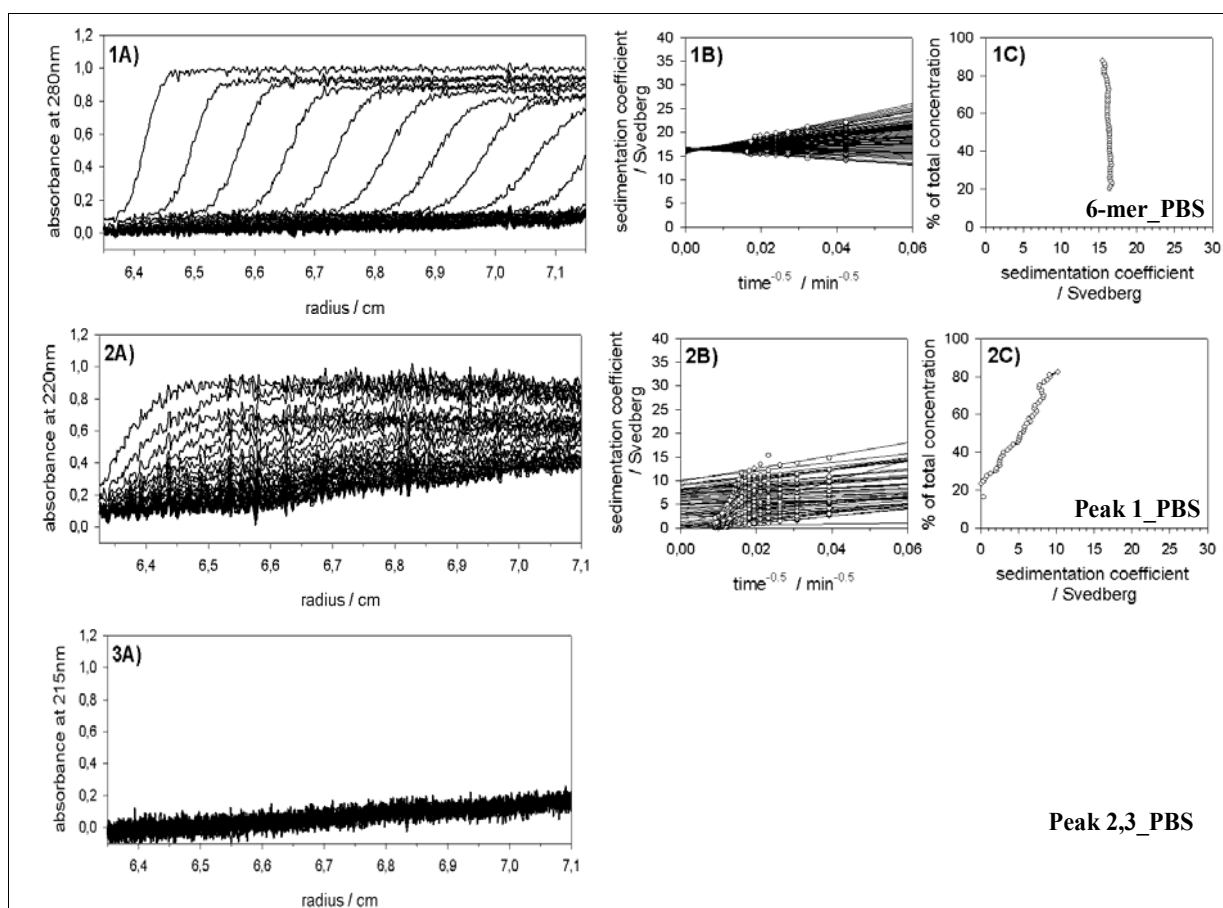


Abb. 3-48: Überprüfung der mit PBS umgepufferten Proben im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge.

Die unverdünnten Proben wurden bei 40000 rpm und 20°C zentrifugiert und die Sedimentationsfronten im Absorptionsmodus detektiert. Aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen (6-mer_PBS = 0.66 mg/ml, Peak 1_PBS = 0.082 mg/ml, Peak 2,3_PBS = Konzentration konnte nicht bestimmt werden) fand die Detektion der drei Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen statt. Der Verlauf der Sedimentation wurde mit der „enhanced van Holde-Weisheit“-Methode ausgewertet. Eine Pufferkorrektur wurde durchgeführt. Den Graphen entsprachen folgende Proben **1)** natives hexameres P II, **2)** gepoolte Peak 1-Fractionen **3)** gepoolte Peak 2,3-Fractionen. Mit **A** wurden jeweils die Sedimentationsfronten der einzelnen Proben gekennzeichnet. Mit **B** wurden die Extrapolationsgraphen der Proben, bereits gegen den jeweiligen Puffer korrigiert dargestellt und mit **C** die zugehörigen Verteilungsgraphen der korrigierten S-Werte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Graphen bis auf die Sedimentationsfronten identisch skaliert.

Die hexamere P II-Kontrolle wies auch in PBS weiterhin den für natives P II typischen Sedimentationskoeffizienten von 17 S ($S_{20,w}$) auf. Peak 1 enthielt eine polydisperse Lösung mit korrigierten Sedimentationskoeffizienten von 0 bis 10 S. Weder Hexamere noch höhere Aggregate wurden in dieser Probe beobachtet. Die Absorption der Peak 2,3-Probe war sogar bei 215 nm so gering, dass keine ordentlichen Sedimentationsfronten beobachtet wurden und die Probe nicht weiter ausgewertet werden konnte.

Der Vergleich der Proteinbanden auf der nativen PAGE (Abb. 3-47, Abb. 3-48) mit den Ergebnissen der Sedimentationsläufe lieferte für das native P II vergleichbare Daten, wohingegen für die Peak 1-Probe mit beiden Methoden deutlich differierende Ergebnisse erhalten wurden. Im Sedimentationslauf wurden in dieser Probe eindeutig keine sedimentieren Hexamere detektiert, wohingegen auf der nativen PAGE diese Probe eindeutig die P II-typische Hexamerbande sowie die zusätzliche Bande geringerer Mobilität aufwies. Da beim Sedimentationslauf die Proteine in Lösung vorlagen und nicht wie bei den Polyacrylamid-

Gelen durch eine engmaschige Matrix wandern mussten, wurde in diesem Zusammenhang an Stelle der nativen PAGE dem Ergebnis der Sedimentationsdaten vertraut.

Insgesamt zeigte sich an der Peak 1-Probe, dass das isolierte P II auch in Gegenwart von 2.5 M Harnstoff mit Dissoziationspuffer B nicht vollständig in die Monomere dissoziiert werden konnte.

Stabilität der HL gegenüber Dissoziationspuffer C

Um eine vollständige Dissoziation der Per a 3-Isoformen zu erreichen wurden daher die Pufferbedingungen verändert und die Stabilität von Hämolymp-Proben gegenüber 2 M Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) und bei pH 10.5 in Dissoziationspuffer C untersucht. Hierbei wurde zusätzlich der Einfluss zweier Hämolymp-Konzentrationen (0.15 mg/ml und 0.71 mg/ml) getestet.

Für die Einstellung der Konzentrationen wurden die Proben 1:314 („HL diss. A“) bzw. 1:64 („HL diss. B“) mit Dissoziationspuffer C verdünnt und für sieben Tage bei 20°C inkubiert.

Auf eine Analyse des Dissoziats mittels Größenausschlusschromatographie wurde aufgrund der damit verbundenen hohen Probenverdünnung und der mit der Aufkonzentrierung verbundenen Proteinverluste verzichtet. Die Überprüfung der Dissoziation der Proben fand stattdessen auf einer 7.5%igen nativen PAGE mit anschließendem Western-Blot (Abb. 3-49), sowie im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge statt (Abb. 3-50).

Von den aufgetragenen Proben zeigte auf der nativen PAGE lediglich die HL-Kontrollprobe (HL-K 4°C in Schabenpuffer D) das typische Bandenmuster, welches ebenfalls bereits in bekannter Weise im Western-Blot von dem anti-Per a 3.03-AK bzw. dem anti-P II-AK erkannt wurde (Abb. 3-49). Allerdings konnte weder auf der nativen PAGE noch mit der AK-Detektion bei den mit Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) versetzten Proben Proteinbanden detektiert werden. Beide Dissoziatproben waren unter den gewählten Dissoziationsbedingungen wahrscheinlich denaturiert und dann irreversibel aggregiert, wodurch die Proben nicht in die Gelmatrix einwandern konnten und am oberen Rand des Trenngels verblieben (Abb. 3-49).

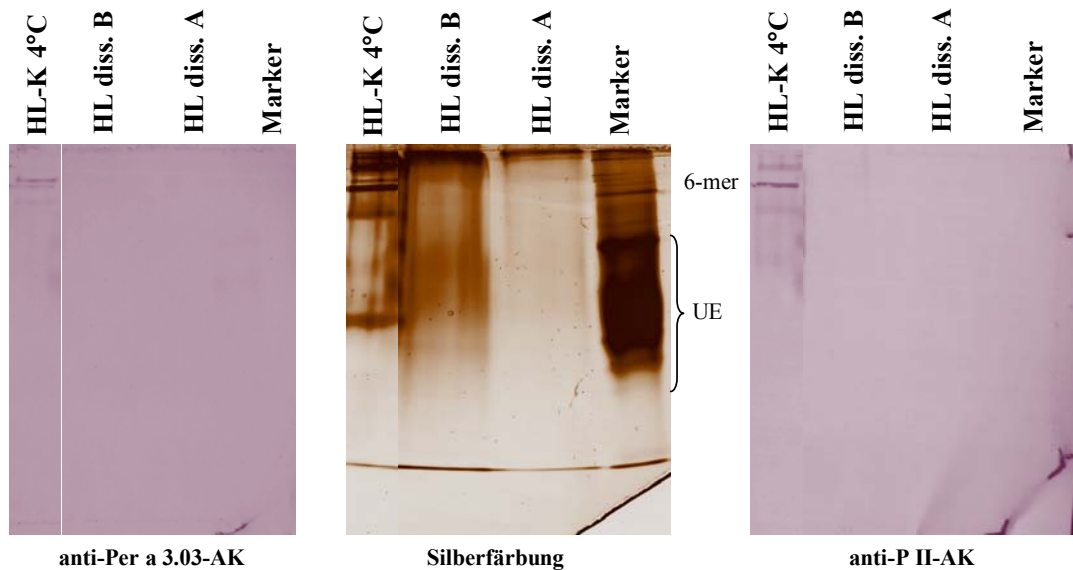


Abb. 3-49: Überprüfung der in Dissoziationspuffer C inkubierten Proben auf 7.5%iger nativer PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Es wurden 3 µg der HL-Kontrolle (HL-K 4°C, Schabenpuffer D), 3 µg der dissoziierten HL A (HL diss. A) und 13 µg der dissoziierten HL B (HL diss. B) 3:4 mit BPB versetzt auf das Gel appliziert. Das Referenzgel wurde mit der Silberfärbung nach Nesterenko gefärbt und die übrigen Gele im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Referenz diente der *Euryelma*-Marker. Als Primärantikörper wurde 1:100000 verdünnter anti-Per a 3.03-AK bzw. anti-P II-AK verwendet. Der Sekundärantikörper (anti-rabbit-IgG-AK) mit gekoppelter alkalischer Phosphatase wurde 1:1000 verdünnt.

Lediglich bei der Kontrolle in Schabenpuffer D waren die typischen hexameren Per a 3-Proteinbanden auf der nativen PAGE zu erkennen, die in gewohnter Weise von den beiden anti-Per a 3-AK im Western-Blot detektiert wurden. In den mit GdnHCl versetzten Dissoziatproben waren bei keiner Konzentration definierte Banden auf der nativen PAGE angefärbt und auch von den beiden AK wurden keine Proteinbanden detektiert. Beide Dissoziatproben schienen denaturiert oder aggregiert gewesen zu sein, sodass die Proteine nicht in die Gelmatrix einwandern konnten.

Daher wurden die Proben zusätzlich im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Eine Beurteilung der Dissoziation der Per a 3-Isoformen war auch trotz der Verwendung der Hämolymphe möglich, da die Per a 3-Isoformen den Hauptbestandteil in der Hämolymphe darstellten und mit 17 S bis 19 S ($S_{20,w}$) auch charakteristisch hohe Sedimentationskoeffizient aufwiesen (Abb. 3-34).

Die normale Verteilung der Sedimentationskoeffizienten unbehandelter HL wurde in Abb. 3-50 unter 1 (HL-K) dargestellt. Die sedimentierenden hexameren Per a 3-Proteine waren mit etwa 19 S ($S_{20,w}$) in dieser Probe gut vom Proteingemisch zu unterscheiden. Zusätzlich waren in der HL stets langsamer sedimentierende Proteinspezies vorhanden (Abb. 3-50).

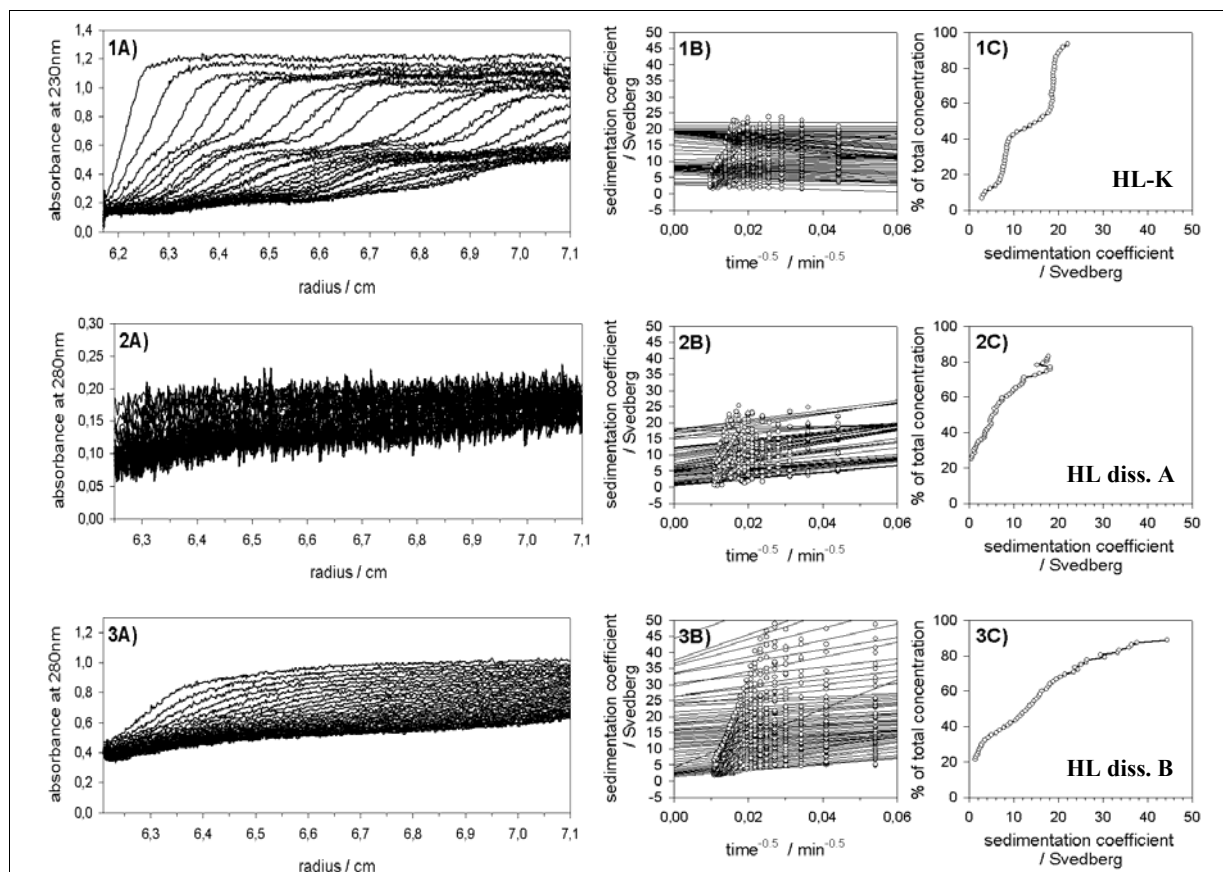


Abb. 3-50: Überprüfung der in Dissoziationspuffer C inkubierten Proben im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge.

Die unverdünnten Proben wurden bei 35000 rpm und 20°C zentrifugiert und die Sedimentationsfronten im Absorptionsmodus verfolgt. Aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen (HL-K = 0.15 mg/ml, HL diss. A = 0.15 mg/ml, HL diss. B = 0.71 mg/ml) fand die Detektion der drei Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen statt. Der Verlauf der Sedimentation wurde mit der „enhanced van Holde-Weisheit“-Methode ausgewertet. Eine Pufferkorrektur wurde durchgeführt. Den Graphen entsprachen folgenden Proben **1**) natives hexamere HL in Schabenpuffer D, **2**) 0.15 mg/ml HL versetzt mit Dissoziationspuffer C, **3**) 0.71 mg/ml HL versetzt mit Dissoziationspuffer C. Mit **A** wurden jeweils die Sedimentationsfronten der einzelnen Proben gekennzeichnet. Die Sedimentationsrichtung war von links nach rechts. Mit **B** wurden die Extrapolationsgraphen der Proben, bereits gegen den jeweiligen Puffer korrigiert dargestellt und mit **C** die zugehörigen Verteilungsgraphen der korrigierten S-Werte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Graphen bis auf die Sedimentationsfronten identisch skaliert.

Die HL-Kontrolle wies die typische S-Wert Verteilung der HL auf: zusätzlich zu den Per a 3-Proteinen von 17-19 S ($S_{20,w}$) wurden weitere langsamer sedimentierende Proteine in der HL beobachtet. Die Detektion der Sedimentationsfronten der HL diss. A wiesen ein hohes Rauschen auf, konnten aber dennoch ausgewertet werden. Die Probe enthielt eine Vielzahl an sedimentierenden Spezies, darunter auch noch einen geringen Anteil an hexameren Per a 3-Proteinen. Wohingegen bei der höheren HL-Konzentration (HL diss. B) eine deutliche Aggregation bzw. Denaturierung zahlreicher Spezies zu beobachten war. Definierte Gruppen konnten in dieser Probe nicht mehr zusammengefasst werden. Die Verwendung von 2 M GdnHCl war für die Dissoziation der Per a 3-Proteine offenbar nicht geeignet.

Eine erfolgreiche quantitative Dissoziation der Per a 3-Proteine konnte auch im Sedimentationslauf bei keiner der verwendeten HL-Konzentrationen verzeichnet werden (Abb. 3-50): bei der hohen HL-Konzentration (HL diss. B) war eindeutig eine Aggregation und/oder Denaturierung der Proteine zu beobachten (Abb. 3-50 3). Bei der geringer konzentrierten Hämolymphe (HL diss. A) wurde zwar keine Aggregation beobachtet, jedoch auch keine

vollständige Dissoziation der Per a 3-Proben, da ein sehr geringer Proteinanteil noch immer mit ca. 18 S ($S_{20,w}$) sedimentierte (Abb. 3-50 2).

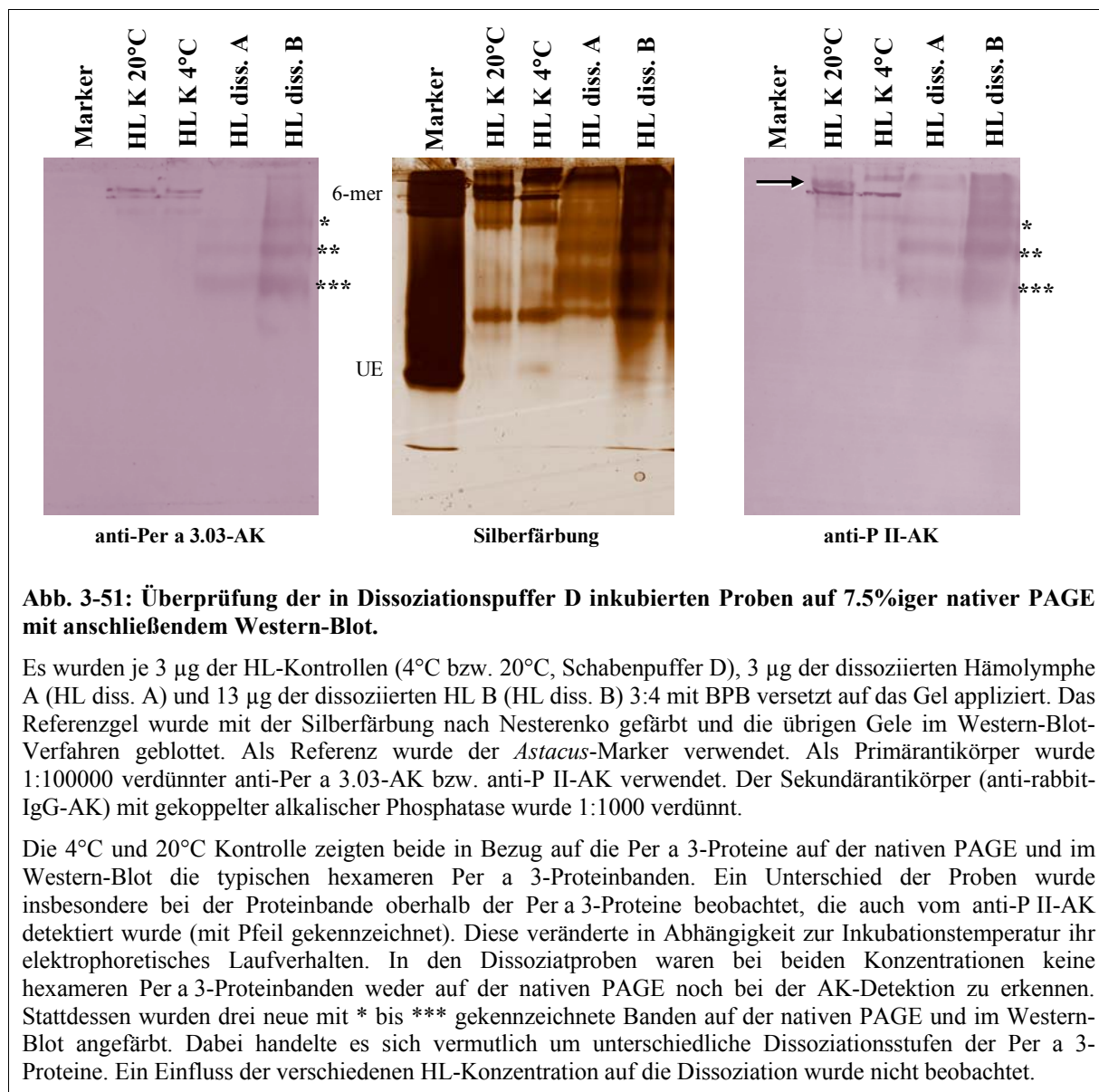
Die Kombination aus 2 M GdnHCl, alkalischem pH-Wert und der Entfernung bivalenter Ionen aus dem Extrakt war offenbar auch für die ansonsten stabilen Per a 3-Isoformen zu aggressiv und führte zur Denaturierung der Extrakt-Proteine. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgende Untersuchung anstelle des GdnHCl wieder auf 2.5 M Harnstoff zurückgegriffen. Die restlichen Pufferbedingungen wurden aus diesem Experiment übernommen.

Stabilität der HL gegenüber Dissoziationspuffer D

Auch für diese Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Hämolymphe-Konzentrationen (0.15 mg/ml und 0.71 mg/ml) verwendet. Diese wurden 1:314 (HL diss. A) bzw. 1:64 (HL diss. B) mit Dissoziationspuffer D (50 mM Glycin, 20 mM EDTA, 2.5 M Harnstoff, pH 10.5) versetzt und für sieben Tage bei 20°C inkubiert.

Für die Überprüfung der Dissoziation wurde erneut auf die native Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot (Abb. 3-51) sowie auf die analytische Ultrazentrifuge zurückgegriffen (Abb. 3-52). In diesem Experiment wurde zusätzlich zur Kontrolle bei 4°C (HL K 4°C) die Hämolymphe in Schabenpuffer D bei 20°C als weitere Kontrolle inkubiert (HL K 20°C).

Der Vergleich dieser beiden Kontrollproben auf der nativen PAGE und im Western-Blot zeigte, dass die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen keinen Einfluss auf die hexameren Per a 3-Proteine hatten (Abb. 3-51). Eine Veränderung war jedoch bei der Bande oberhalb der Per a 3-Proteine zu beobachten (Abb. 3-51, mit Pfeil gekennzeichnet): diese veränderte offensichtlich in Abhängigkeit zur Lagerungstemperatur ihre elektrophoretische Beweglichkeit. Dies war eventuell auf eine Dissoziation oder auf eine veränderte Tertiärstruktur zurückzuführen.



In beiden Dissoziatproben (HL diss. A und B) waren nach sieben Tagen Inkubation keine Hexamerbanden mehr auf der silbergefärbten nativen PAGE nachweisbar (Abb. 3-51). Stattdessen wurden mindestens drei in der nativen Kontrolle nicht vorhandene Proteinbanden detektiert, die auch im Western-Blot vom anti-Per a 3.03-AK und vom anti-P II-AK erkannt und in der Abb. 3-51 mit * bis *** gekennzeichnet wurden. Dabei handelte es sich offenbar um unterschiedliche Dissoziationsstufen der Per a 3-Proteine. Ein Einfluss der unterschiedlich eingesetzten HL-Konzentration auf die Dissoziation wurde nicht beobachtet.

Die Überprüfung der Proben in einem Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge konnte die vollständige Dissoziation der Per a 3-Isoformen ebenfalls bestätigen. Bei keiner Konzentration wurden deutliche mit 17-19 S ($S_{20,w}$)-sedimentierende Gruppen nachgewiesen. Vielmehr setzten sich die Dissoziatproben aus mit unter 10 S ($S_{20,w}$) sedimentierenden Spezies zusammen (Abb. 3-52).

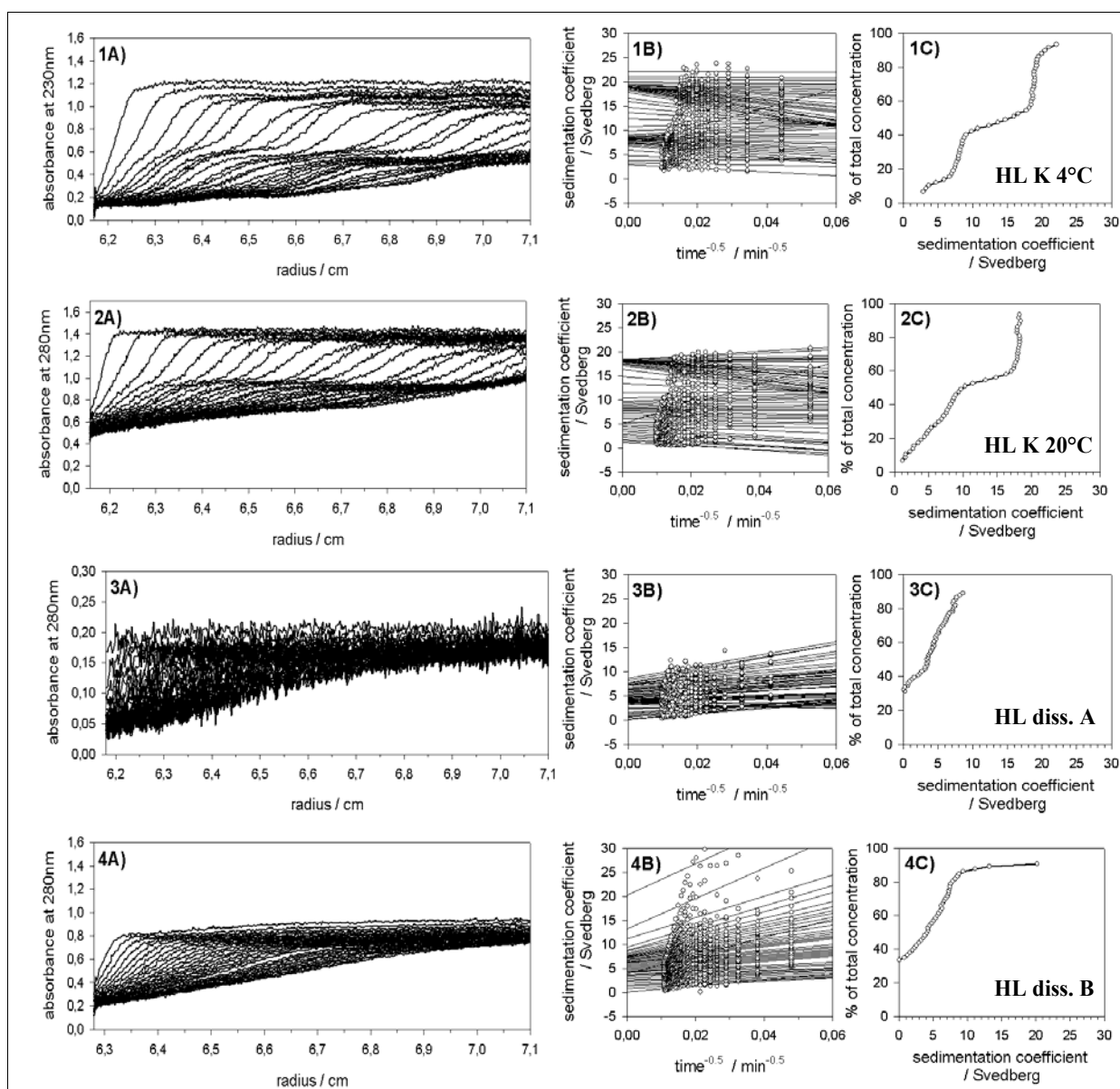


Abb. 3-52: Überprüfung der in Dissoziationspuffer D inkubierten Proben im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge.

Die unverdünnten Proben wurden bei 35000 rpm und 20°C zentrifugiert und die Sedimentationsfronten im Absorptionsmodus verfolgt. Aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen (HL K 4°C = 0.15 mg/ml, HL K 20°C = 0.15 mg/ml, HL diss. A = 0.15 mg/ml, HL diss. B = 0.71 mg/ml) fand die Detektion der drei Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen statt. Der Verlauf der Sedimentation wurde mit der „enhanced van Holde-Weischet“-Methode ausgewertet. Eine Pufferkorrektur wurde durchgeführt. Den Graphen entsprachen folgende Proben **1)** native hexamere HL in Schabenpuffer D, inkubiert bei 4°C, **2)** native hexamere HL in Schabenpuffer D, inkubiert bei 20°C, **3)** 0.15 mg/ml HL versetzt mit Dissoziationspuffer D, **4)** 0.71 mg/ml HL versetzt mit Dissoziationspuffer D. Mit **A** wurden jeweils die Sedimentationsfronten der einzelnen Proben gekennzeichnet. Mit **B** wurden die Extrapolationsgraphen der Proben, bereits gegen den jeweiligen Puffer korrigiert dargestellt und mit **C** die zugehörigen Verteilungsgraphen der korrigierten S-Werte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Graphen bis auf die Sedimentationsfronten identisch skaliert.

Ein Einfluss der Inkubationstemperaturen der HL-Kontrollen wurde bei den Sedimentationskoeffizienten der langsamer sedimentierenden Proben beobachtet. Ein signifikanter Einfluss auf die Per a 3-Protein konnte allerdings ausgeschlossen werden. Diese sedimentierten wie bereits bekannt als definierte Gruppe mit 17 bis 19 S ($S_{20,w}$). Die Sedimentationsfronten der HL diss. A wiesen ein hohes Rauschen auf, konnten aber dennoch ausgewertet werden. Die Probe enthielt nur noch mit unter 10 S ($S_{20,w}$) sedimentierende Proteinspezies, wohingegen bei der höheren HL-Konzentration (HL diss. B) zusätzlich drei S-Werte von über 10 S ($S_{20,w}$) beobachtet wurden. Insgesamt dissoziierten die Per a 3-Proteine in Dissoziationspuffer D sehr deutlich.

Wie bereits bei der HL-Kontrolle auf der nativen PAGE beobachtet (Abb. 3-51), bestätigte sich auch im Sedimentationslauf der Einfluss der Inkubationstemperaturen. Proteine die langsamer als mit 10 S sedimentierten, zeigten bei 20°C Lagerungstemperatur etwas andere Sedimentationseigenschaften als bei der Lagerung bei 4°C (Abb. 3-52 1,2). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in Schabenpuffer D als Puffersubstanz TRIS verwendet wurde, welches mit -0.028 pH/K eine starke Temperaturabhängigkeit aufwies und somit eventuell kein eigentlicher Temperatureffekt sondern vielmehr der pH-Einfluss auf diese Proteine detektiert wurde [237]. Da die Per a 3-Isoformen von der Lagerungstemperatur jedoch nicht beeinflusst waren, wurde bei späteren Experimenten auf unterschiedliche Kontrollen verzichtet.

Durch Erhöhung der EDTA-Konzentration sowie dem deutlich ins alkalische verschobene pH-Wert des Puffers war es erstmals gelungen, die hexameren Per a 3-Isoformen zu dissoziieren, ohne sie offensichtlich zu denaturieren. Daher konnte dieser Versuch auf einen präparativen Ansatz übertragen werden.

Präparative Herstellung von dissoziierten HL-Proteinen

Die Herstellung präparativer Mengen an Dissoziat war ein entscheidender Bestandteil für die von [REDACTED] in ihrer Diplomarbeit durchgeführten Experimente, in denen der Einfluss der hexameren Oligomerisierung der Per a 3-Isoformen auf deren Immunogenität und Allergenität im Vergleich zum Dissoziat untersucht wurde [19]. Voraussetzung dieser Experimente war eine Charge an dissoziierter und nativer Hämolymphe, die beide für die zellbiologischen Test in PBS vorliegen mussten. Daher wurden in diesem Ansatz die Proben zusätzlich nach der Dissoziation mit PBS umgepuffert und überprüft, ob dadurch oder durch längere Lagerung eine Reassoziaton der Proben auftrat.

Für die präparative Dissoziation wurden 45.6 mg HL 1:201 mit Dissoziationspuffer D versetzt (0.23 mg/ml) und für sieben Tage bei 20°C inkubiert. Die Dissoziation wurde erneut mittels nativer PAGE mit anschließendem Western-Blot sowie im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge überprüft (Abb. 3-53, Abb. 3-54). Anschließend wurden die Proben für die zellbiologischen Experimente mit PBS umgepuffert, bei 20°C gelagert und nach einem Monat auf der nativen PAGE und nach zwei Monaten mittels Sedimentationslauf auf eine Reassoziaton hin überprüft. Für eine bessere Vergleichbarkeit sind im Folgenden diese Experimente nicht chronologisch dargelegt, sondern die Proben jeweils parallel in Dissoziationspuffer und in PBS dargestellt (Abb. 3-53, Abb. 3-54).

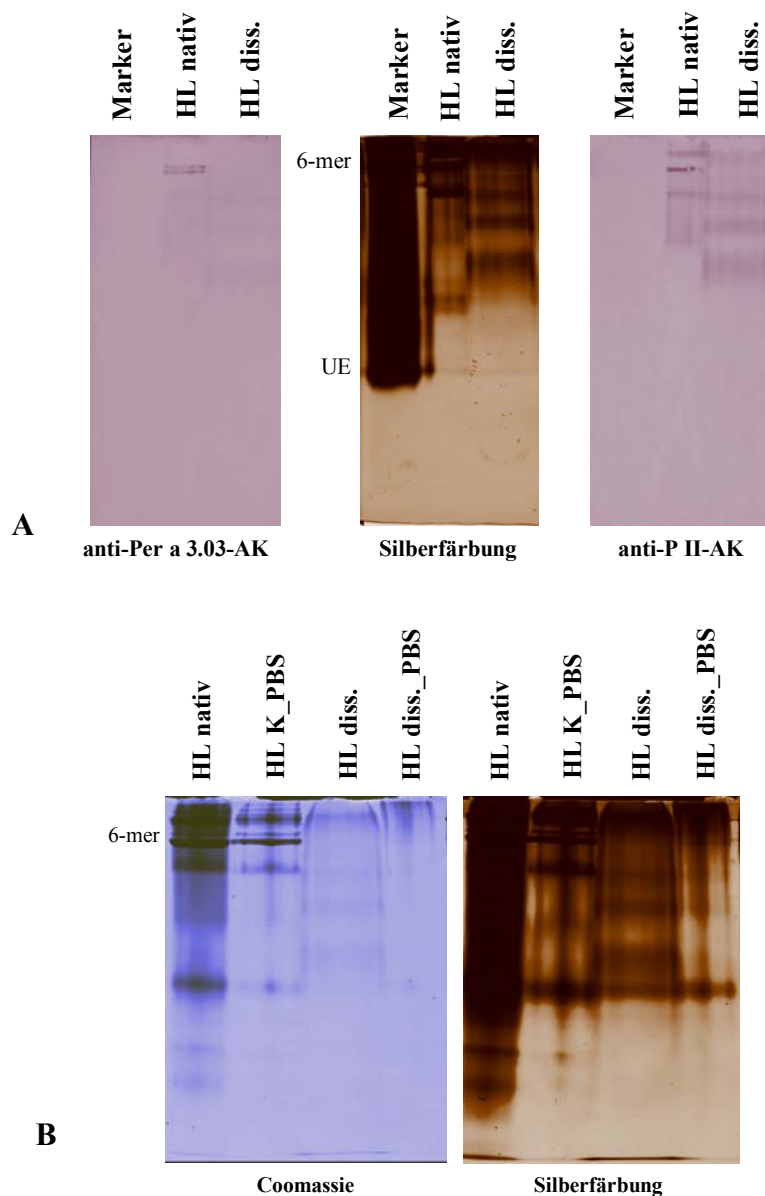


Abb. 3-53: Überprüfung der in Dissoziationspuffer D inkubierten Proben auf 7.5%iger nativer PAGE mit anschließendem Western-Blot (A) und Kontrolle der umgepufferten Proben auf 7.5%iger nativer PAGE (B).

A) Es wurden je 4 µg der HL-Kontrolle (HL K) und der dissoziierten Hämolymphe (HL diss.) 3:4 mit BPB versetzt auf das Gel appliziert. Das Referenzgel wurde mit der Silberfärbung nach Nesterenko gefärbt und die übrigen Gele im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Referenz wurde der *Astacus*-Marker verwendet. Als Primärantikörper wurde 1:100000 verdünnter anti-Per a 3.03-AK bzw. anti-P II-AK verwendet. Der Sekundärantikörper (anti-rabbit-IgG-AK) mit gekoppelter alkalischer Phosphatase wurde 1:1000 verdünnt.

Die HL-Kontrolle wies wie gewohnt die hexameren Per a 3-Proteine auf, die ebenfalls von den jeweiligen AK erkannt wurden. Auch die mit Dissoziationspuffer D dissoziierte HL zeigte auf der nativen PAGE und im Western-Blot das gleiche Dreier-Bandenmuster, wie es bereits vom vorherigen Versuch aus Abb. 3-51 bekannt war.

B) Es wurden je 7 µl der in PBS umgepufferten HL (HL_PBS), 4 µl nicht umgepufferte HL diss. und 2 µg HL diss._PBS 3:4 mit BPB versetzt auf das Gel appliziert. Als Referenz wurde unbehandelte native HL verwendet (HL nativ). Die Proteindetektion erfolgte zunächst mit der Coomassie-Färbung. Zur Detektion nur schwach konzentrierter Proteinbanden wurde das Gel mit der Silberfärbung nach Nesterenko überfärbt.

Nach dem Umpuffern der Proben in PBS wies die native Hämolymphe (HL_PBS) auch weiterhin die typischen hexameren Per a 3-Proteinbanden auf, wohingegen bei dem mit PBS umgepufferten Dissoziat (HL diss_PBS) aufgrund der geringen Proteinkonzentration auch bei dem silbergefärbten Gel nur schwache

Banden zu erkennen waren. Dennoch konnte eine Reassoziations der Per a 3-Proteine zu Hexameren auf diesen Gelen ausgeschlossen werden. Die nicht umgepufferte dissoziierte HL-Probe (HL diss.) wies auch noch nach einem Monat Lagerung das bekannte Dissoziationsmuster auf. Eine Denaturierung oder Aggregation dieser Probe wurde nicht beobachtet.

Wie bereits in dem vorherigen Versuch (Abb. 3-51), waren auch bei diesem Experiment auf der nativen PAGE die typischen hexameren Per a 3-Banden in der nativen HL (HL K) zu erkennen, die im Western-Blot von den jeweiligen AK erkannt wurden (Abb. 3-53). In dem HL-Dissoziat waren die Per a 3-Proteine erfolgreich dissoziiert: weder auf der nativen PAGE noch im Western-Blot waren die hexameren Per a 3-Banden nachweisbar, stattdessen waren die typischen Dissoziationsbanden zu erkennen, deren elektrophoretische Beweglichkeiten bereits aus dem vorherigen Versuch bekannt waren (Abb. 3-51). Diese Banden wurden auch von den beiden anti-Per a 3-AK erkannt, wobei die Färbung mit dem anti-Per a 3.03-AK gegenüber mit dem anti-P II-AK nur schwach ausgeprägt war (Abb. 3-53).

Nach dem Umpuffern der Proben mit PBS zeigte die native HL (HL_PBS) auf der nativen PAGE keine Veränderung des Bandenmusters, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass in PBS die Per a 3-Proteine weder dissoziierten noch aggregierten. Dieses Ergebnis war eine wichtige Voraussetzung für die immunologischen Versuche.

Offensichtlich war mit der Umpufferung des Dissoziats mit PBS ein deutlicher Proteinverlust verbunden, sodass selbst auf der silbergefärbten nativen PAGE nur schwach Dissoziationsbanden angefärbt wurden. Da allerdings auch keine hexameren Per a 3-Banden beobachtet wurden konnte eine Reassoziations ausgeschlossen werden (Abb. 3-53). Die nicht umgepufferte Dissoziationsprobe (HL diss., in Dissoziationspuffer D) zeigte auch nach einmonatigen Lagerung keine Veränderung des Bandenmusters, sodass auch nach längerer Lagerungszeit eine Denaturierung der Proben ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3-53).

Die Überprüfung dieser Proben im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge bestätigte die Ergebnisse der Gelelektrophorese weitestgehend (Abb. 3-54):

Sowohl in der Hämolymphe-Kontrolle (HL K, in Schabenpuffer D) als auch in der mit PBS umgepufferten HL (HL_PBS) wurde weiterhin deutlich die Sedimentation der hexameren Per a 3-Proteine detektiert (Abb. 3-54). Wie zuvor auf der nativen PAGE, so wurde auch im Sedimentationslauf weder eine Dissoziations noch eine Aggregation der Per a 3-Proteine in PBS festgestellt.

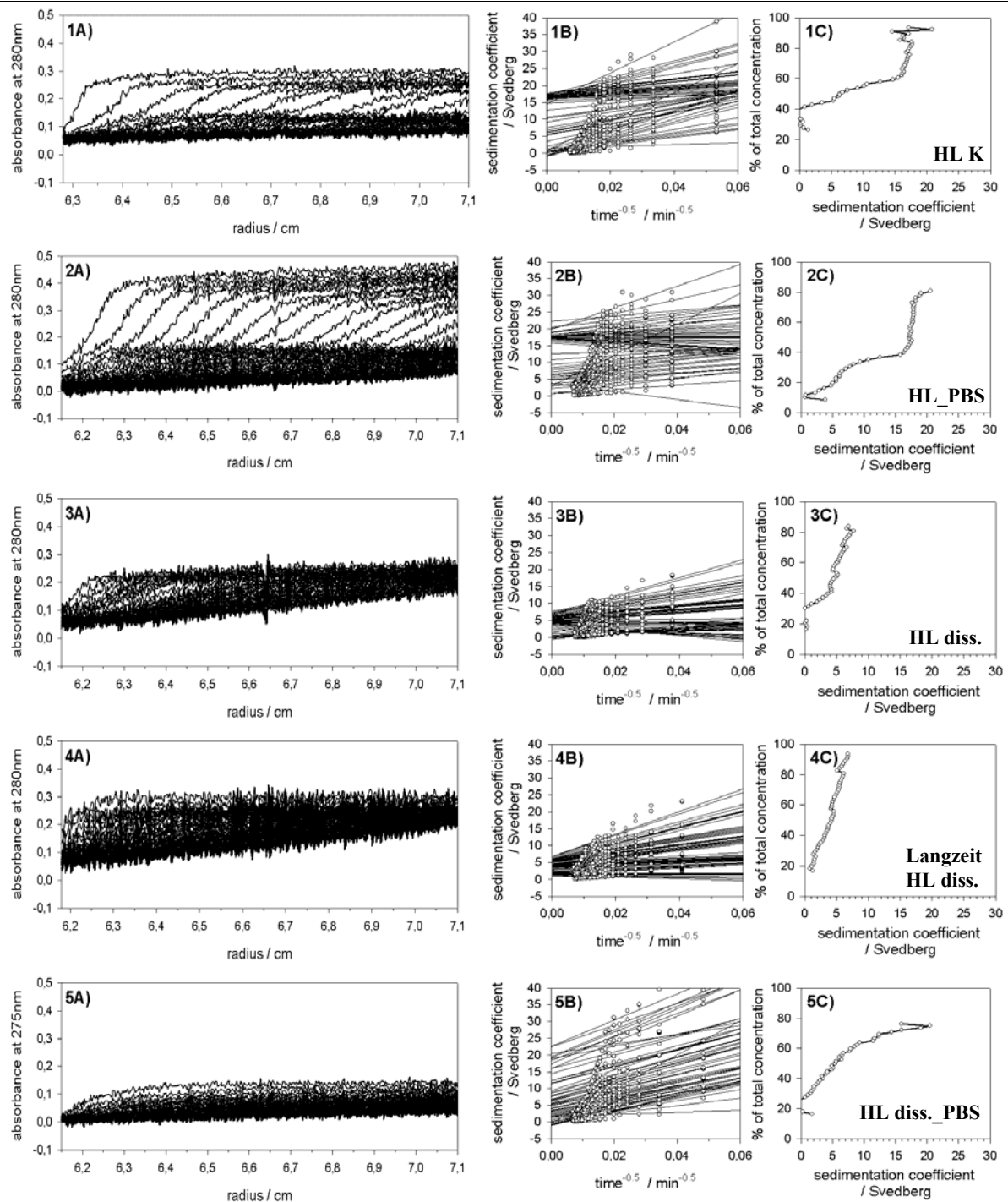


Abb. 3-54: Überprüfung der in Dissoziationspuffer D inkubierten Proben im Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge.

Die Proben wurden bei 35000 rpm und 20°C zentrifugiert und die Sedimentationsfronten im Absorptionsmodus verfolgt. Aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen (HL K = 0.46 mg/ml, HL_PBS = 0.38 mg/ml, HL diss. = 0.23 mg/ml, Langzeit HL diss. = 0.23 mg/ml, HL diss._PBS = 0.10 mg/ml) fand die Detektion der drei Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen statt. Der Verlauf der Sedimentation wurde mit der „enhanced van Holde-Weischet“-Methode ausgewertet. Eine Pufferkorrektur wurde durchgeführt. Den Graphen entsprachen folgende Proben **1)** unbehandelte native HL in Schabenpuffer D, **2)** native HL umgepuffert in PBS, **3)** dissoziierte HL in Dissoziationspuffer D, **4)** dissoziierte HL seit zwei Monaten mit Dissoziationspuffer D, **5)** dissoziierte HL umgepuffert mit PBS. Mit **A** wurden jeweils die Sedimentationsfronten der einzelnen Proben gekennzeichnet. Mit **B** wurden die Extrapolationsgraphen der Proben, bereits gegen den jeweiligen Puffer korrigiert dargestellt und mit **C** die zugehörigen Verteilungsgraphen der korrigierten S-Werte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Graphen bis auf die Sedimentationsfronten identisch skaliert.

Sowohl in der Hämolymphe-Kontrolle (HL K) als auch in der entsprechenden mit PBS umgepufferten HL

(HL_PBS) war deutlich die Sedimentation der hexameren Per a 3-Proteine zu sehen. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass die Per a 3-Proteine in PBS nicht aggregierten oder zerfallen waren. In der HL in Dissoziationspuffer D (HL diss.) waren die hexameren Per a 3-Proteine komplett dissoziiert. Nach zwei Monaten Lagerungszeit konnte keine signifikante Änderung der Dissoziatprobe festgestellt werden, wohingegen in dem mit PBS umgepufferten Dissoziat keine sedimentierende Gruppen mehr zusammengefasst werden konnten. Eine spezifische Reassoziaton der Per a 3-Proben konnte allerdings ausgeschlossen werden. Insgesamt war eine Auswertung der Sedimentationsfronten dieser Probe aufgrund der gering verfügbaren Probenkonzentration nur mit Hindernissen möglich. Die Auswertung der Messung bei 230 nm war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Für ein eindeutiges Ergebnis wäre eine Wiederholung der Messung mit höherer Probenkonzentration sinnvoll.

Ausgeschlossen werden konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Dissoziatproben in Abhängigkeit zur Lagerungszeit: die Per a 3-Proteine lagen auch nach zwei Monaten Inkubation in Dissoziationspuffer D weiterhin dissoziiert vor und waren nach dieser Zeit weder denaturiert noch aggregiert (Abb. 3-54).

Allerdings war in der Dissoziat-Probe nach der Umpufferung in PBS (HL diss._PBS) ein Unterschied zu beobachten: die Sedimentationsfronten konnten nicht mehr in Gruppen zusammengefasst werden, sondern es lag eine breite Verteilung an sedimentierenden Spezies von 0 bis 20 S ($S_{20,w}$) vor. Eine spezifische Reassoziaton der Per a 3-Proben konnte jedoch ausgeschlossen werden. Insgesamt war die Auswertung der zugehörigen Sedimentationsfronten aufgrund der geringen Probenkonzentration nur mit Hindernissen möglich. Eine Auswertung der Messung bei 230 nm war überhaupt nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Für eine eindeutige Aussage wäre eine Wiederholung der Messung mit höherer Proteinkonzentration nach der Umpufferung in PBS sinnvoll.

Stabilität gegenüber unterschiedlichen pH-Werten

Die pH-Stabilität ist bei Allergenen insbesondere in der Sensibilisierungsphase ein wichtiger Faktor: die von den dendritischen Zellen (DC) aufgenommenen Allergene werden über den lysosomalen Abbauweg durch Cathepsine in Peptidfragmente gespalten. Auf diesem Weg verändert sich der pH-Wert in den Lysosomen, sodass verschiedene Cathepsine bei ihrem jeweiligen pH-Optimum aktiv werden können. In den DC spielen bei dieser Proteolyse für die Antigenpräsentation insbesondere die Cathepsine B, D und S eine wichtige Rolle. Basierend auf deren pH-Optima wurde sich für die Stabilitätsuntersuchungen für pH 3.5, pH 6.0 und pH 6.5 entschieden [313, 314]. Die Inkubationstemperatur bei 37°C entsprach dabei der der immunologischen Untersuchungen. Da ein Großteil der Charakterisierungsversuche dieser Arbeit in Schabenpuffer D durchgeführt wurde, wurde zusätzlich die Stabilität der Proben in Schabenpuffer D bei 37°C überprüft. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass aufgrund der Temperaturabhängigkeit des TRIS-Puffers der pH-Wert bei 37°C zu pH 7.3 verschoben war. Als Kontrolle diente wie gewohnt eine Probe in Schabenpuffer D, die bei 4°C inkubiert wurde und dadurch einen pH-Wert von 8.2 hatte.

Insgesamt wurden für diese Experimente folgende Puffer verwendet: 0.1 M Citratpuffer (pH 3.5), 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6.0), 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6.5) und Schabepuffer D (pH 7.8, 20°C). Zur Untersuchung der pH-Stabilität der Per a 3-Proben wurde in Anknüpfung an die chaotropen Stabilitätsuntersuchungen sowie den immunologischen Experimenten auf die Hämolymphe (HL-2) zurückgegriffen.

Insgesamt wurde die Stabilität der Proben über sieben Wochen hinweg verfolgt und jeweils nach 24 h, einer Woche und nach sieben Wochen auf einer nativen PAGE mit anschließendem Western-Blot (anti-Per a 3.03-AK-Markierung) sowie in Sedimentationsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge überprüft. In Tabelle 3-5 sind diese Experimente mit den jeweiligen Abbildungsverweisen zusammengefasst.

Methode	Inkubationsdauer	Abbildung
Native PAGE mit anschließendem Western-Blot	24 h	Abb. 3-55
	1 Woche	Abb. 3-56
	7 Wochen	Abb. 3-57
Sedimentationslauf in der AUZ	24 h	Abb. 3-58
	1 Woche	Abb. 3-59
	7 Wochen	Abb. 3-60

Tabelle 3-5: Übersicht der Stabilitätsuntersuchungen mit Zuordnung zu den jeweiligen Abbildungen.

Zur besseren Nachvollziehbarkeit sind im Folgenden die Ergebnisse dieser Versuchsreihen nach Methoden getrennt dargestellt und erläutert.

Western-Blot

Für die Western-Blot-Experimente wurden die Proben zunächst auf 7.5%igen nativen Gelen aufgetrennt, anschließend geblottet und mit anti-Per a 3.03-AK markiert. Dieser Antikörper hatte den Vorteil, dass er sowohl Per a 3.03 als auch P II erkannte und somit die Stabilität der verschiedenen Isoformen verfolgt werden konnte.

Die nativ aufgetrennten Proben zeigten alle auf dem Coomassie-gefärbten Gel nach 24 h Inkubation die Per a 3-typtischen Hexamerbanden, ebenso wie eine deutliche Bande oberhalb der Hexamere, die im Folgenden als Bande 1 bezeichnet und mit * gekennzeichnet wurde (Abb. 3-55).

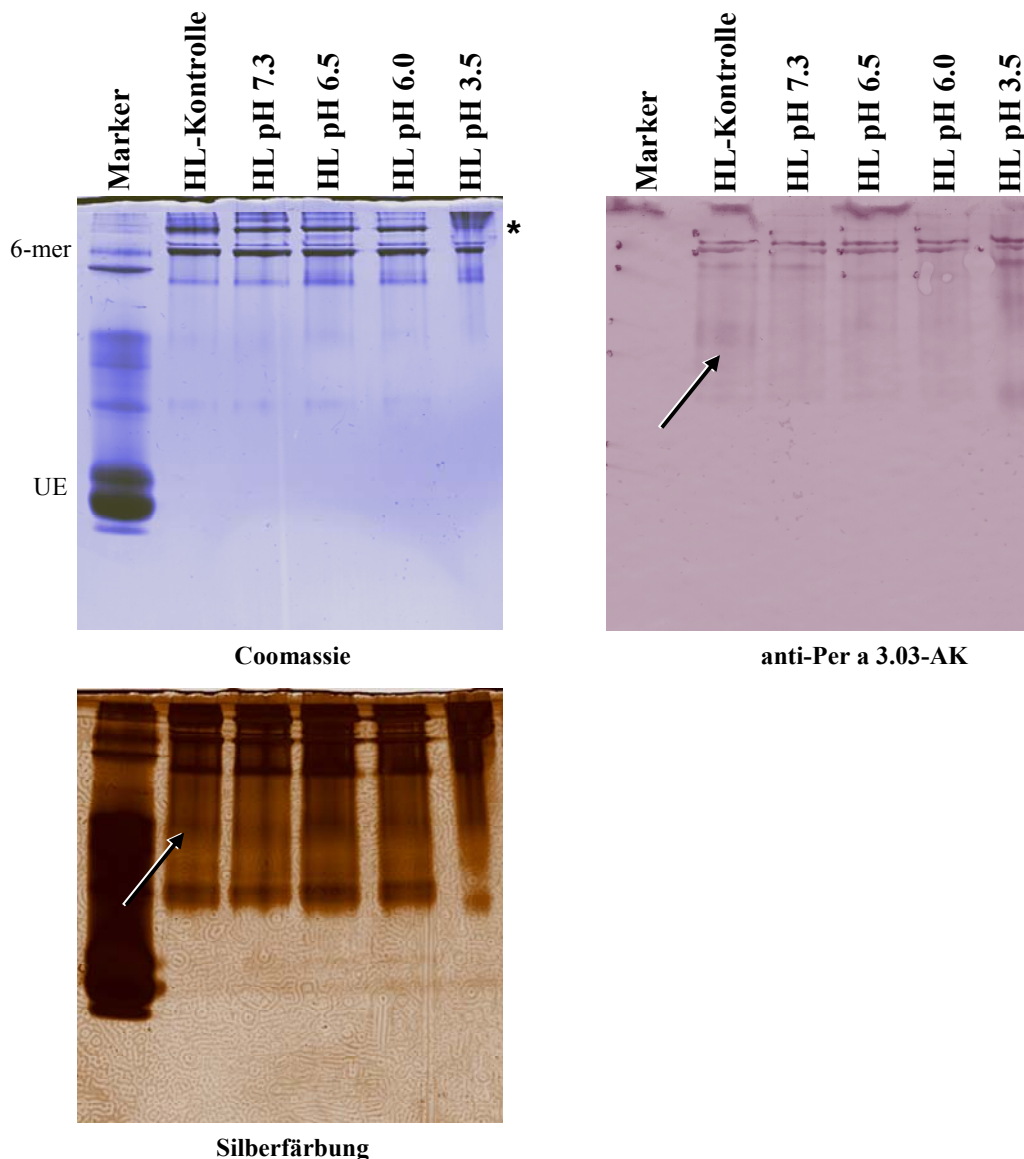
24 Stunden

Abb. 3-55: Überprüfung der pH-Stabilität nach 24 h auf der nativen PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Pro Spur wurden 11 µg zuvor 3:4 mit BPB verdünnte Proben aufgetragen und auf 7.5%igen nativen Gelen aufgetrennt. Als Referenz wurde der *Palinurus*-Marker verwendet. Das Referenzgel wurde mit Coomassie gefärbt und mit der Silberfärbung nach Nesterenko überfärbt. Die übrigen Proben wurden im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Primärantikörper wurde 1:100000 verdünnter anti-Per a 3.03-AK und als Sekundärantikörper 1: 1000 verdünnter anti-rabbit-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase verwendet.

In der HL-Kontrolle wurde zusätzlich zu den hexameren Per a 3-Proteinen vom anti-Per a 3.03-AK eine Proteinbande erkannt, die auch auf der silbergefärbten nativen PAGE angefärbt wurde. Diese mit Pfeil gekennzeichnete Bande wurde nach längerer Inkubationszeit nicht mehr beobachtet und konnte auch nicht eindeutig zugewiesen werden. Deutlichen Einfluss hatten die unterschiedlichen pH-Werte auf die mit * gekennzeichnete Bande, die vom anti-Per a 3.03-AK nicht erkannt wurde. Eine beginnende Dissoziation der Per a 3-Proteine wurde nach 24 h lediglich bei pH 3.5 beobachtet, wie die deutliche AK-Erkennung von zusätzlichen Banden zeigte. Bei den übrigen pH-Werten waren beide Per a 3 Banden weiterhin in ihrer typischen hexameren Oligomerisierung vorhanden.

Diese Bande 1 war u.a. bereits bei der Analyse der Kreuzreaktionen auf nativen Gelen aufgefallen und wurde auch dort in Abb. 3-42 mit * gekennzeichnet. Im Unterschied zu den übrigen pH-Werten war Bande 1 im sauren pH-Bereich bei pH 3.5 nicht mehr deutlich ausgeprägt. Stattdessen war ein breiter Schlier zu beobachten, der nicht weit in die Matrix eingewandert war (Abb. 3-55). Die schmale Spurenbreite bei pH 3.5 deutete darauf hin, dass es insgesamt bei pH 3.5 offensichtlich durch die hohe Protonenkonzentration zu Laufanomalien auf der nativen PAGE kam.

Die Antikörperdetektion im Western-Blot bestätigte in sämtlichen Proben die Hexamerbanden der Per a 3-Isoformen (Abb. 3-55). Sie zeigte jedoch auch, dass in der Kontrolle eine zusätzliche Proteinbande (mit Pfeil gekennzeichnet) zwischen dem Hexamer und den Untereinheiten des Referenzhämocyanins (*Palinurus*-Marker) vom anti-Per a 3.03-AK erkannt wurde. Diese Bande war auch auf der silbergefärbten PAGE zu erkennen (in Abb. 3-55 mit Pfeil gekennzeichnet) und wurde nach längerer Inkubationszeit nicht mehr beobachtet; sie konnte in diesen Versuchen nicht eindeutig zugeordnet werden (Abb. 3-56, Abb. 3-57).

Im Unterschied zu den übrigen pH-Werten wurde bei pH 3.5 bereits nach 24 h eine beginnende Dissoziation der Per a 3-Proteine beobachtet, wie das Auftreten dreier antikörpermarkierter Banden unterhalb der 6-mere zeigte, dennoch blieben weiterhin die Per a 3-Hexamerbanden nachweisbar (Abb. 3-55).

Nach einer Woche Inkubation wurde in der pH 3.5-Probe nur noch eine Dissoziatbande angefärbt, die beiden fehlenden waren zu diesem Zeitpunkt eventuell bereits denaturiert (Abb. 3-56). Interessanter Weise wurde bei pH 3.5 auch nur noch die Per a 3.03-Isoform von dem AK erkannt, obwohl auf dem Coomassie-gefärbten Gel deutlich beide Per a 3-Hexamerbanden zu erkennen waren. Diese Beobachtung wird in der Diskussion ausführlicher aufgegriffen (Abschnitt 4.1.3).

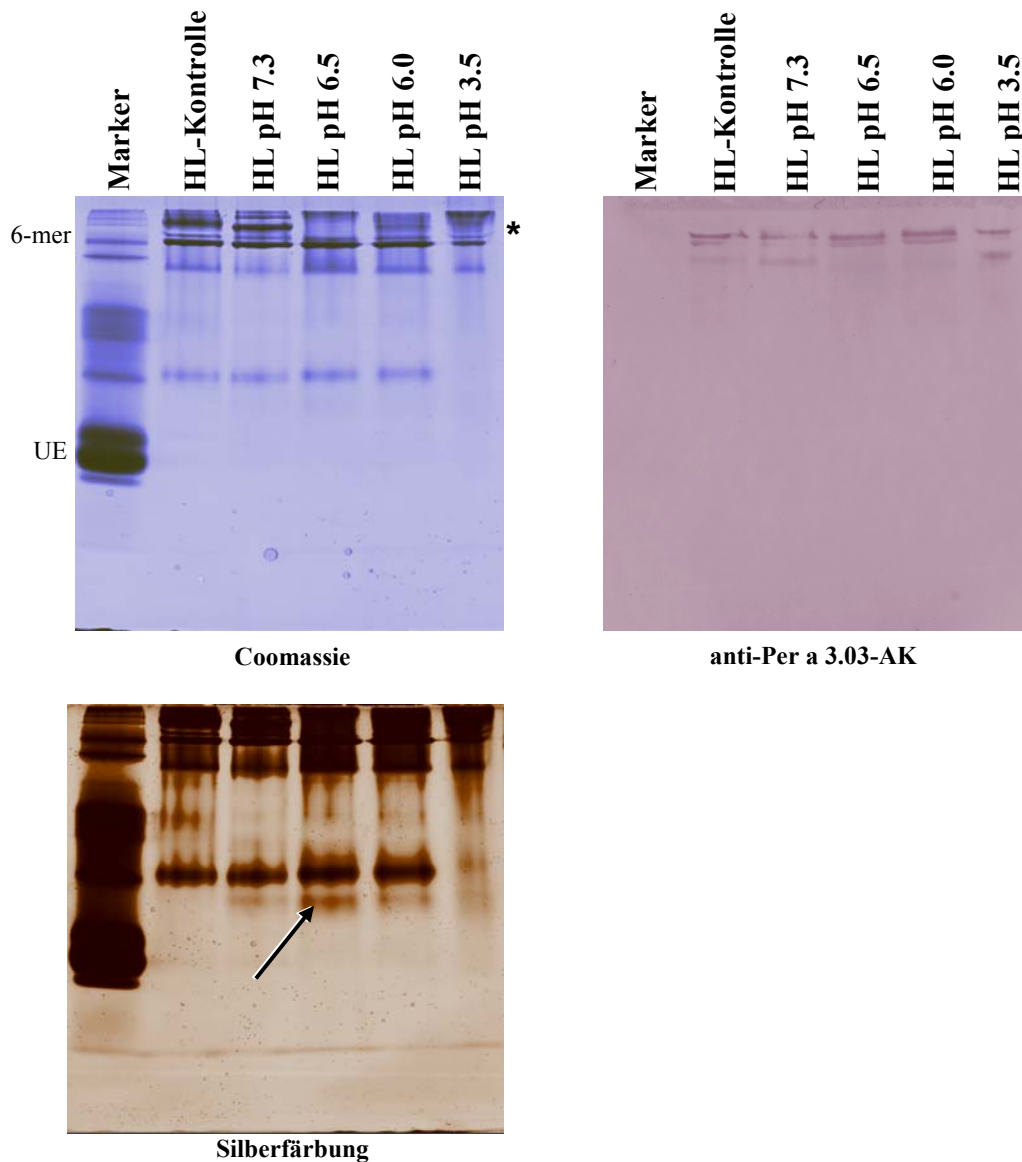
1 Woche

Abb. 3-56: Überprüfung der pH-Stabilität nach einer Woche auf der nativen PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Auftragung und Durchführung entsprachen dem Experiment nach 24 h.

Bei pH 3.5 war nach einer Woche Inkubation eine beginnende Denaturierung der Proteine zu beobachten. Im Unterschied zur Kontrolle (pH 8.2) und pH 7.3 war bei pH 6.5 und pH 6.0 Bande 1(*) -die vom AK nicht erkannt wurde- nicht mehr vorhanden. Statt dessen wurde auf der silbergefärbten PAGE eine neue, mit Pfeil gekennzeichnete Bande beobachtet, bei der es sich um Dissoziat der Bande 1 gehandelt haben könnte. Die Per a 3-Isoformen lagen auch nach einer Woche Inkubation bei pH 8.2 bis pH 6.0 weiterhin als Hexamere vor.

Ingesamt lagen nach einer Woche Inkubation die Per a 3-Isoformen von pH 8.2 (Kontrolle) bis pH 6.0 im Wesentlichen weiterhin in ihrer hexameren Oligomerisierung vor. Bande 1 (mit * gekennzeichnet) war nach einer Woche Inkubation nur noch in der Kontrolle und bei pH 7.3 auf den Coomassie-gefärbten Gelen zu beobachten (Abb. 3-56). Statt dieser wurde auf dem silbergefärbten Gel eine neue (mit Pfeil gekennzeichnete) Proteinbande beobachtet, die

wie Bande 1 nicht vom anti-Per a 3.03-AK erkannt wurde (Abb. 3-56). Möglicherweise handelte es sich dabei um Dissoziat der Bande 1.

Nach einem Inkubationszeitraum von sieben Wochen war in allen Proben eine Veränderung des elektrophoretischen Laufverhaltens auf der nativen PAGE zu beobachten (Abb. 3-57).

7 Wochen

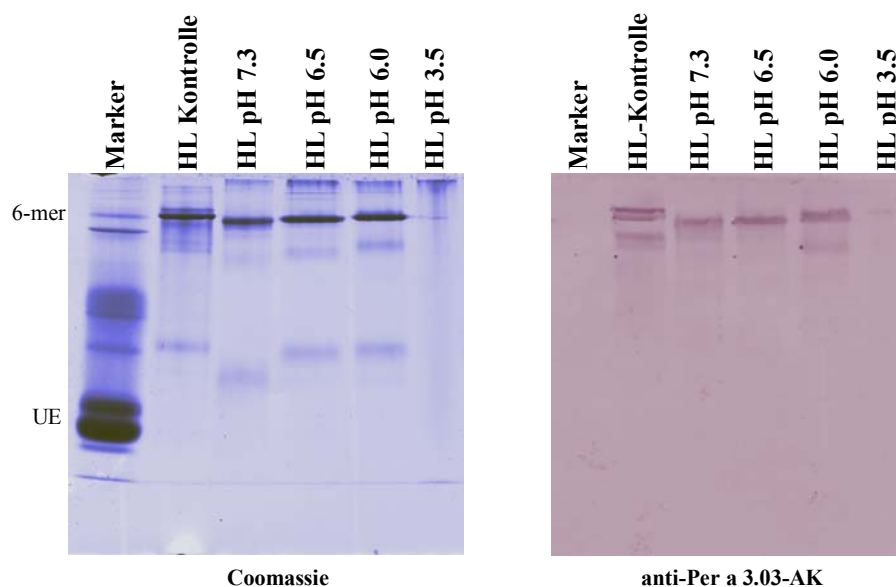


Abb. 3-57: Überprüfung der Langzeit-pH-Stabilität nach sieben Wochen auf der nativen PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Auftragung und Durchführung entsprachen den Experimenten nach 24 h und nach 1 Woche. Auf eine Überfärbung des Coomassie-gefärbten Gels mit der Silberfärbung nach Nesterenko wurde verzichtet.

In allen Proben waren nach sieben Wochen Inkubation deutliche Veränderungen zu beobachten: in der Kontrollprobe wurden zusätzlich zu den Per a 3-Proteinbanden zwei weiter in die Gelmatrix eingewanderte Banden vom anti-Per a 3.03-AK erkannt, bei denen es sich wahrscheinlich um Per a 3-Dissoziationsstufen handelte. Bei pH 3.5 waren nur äußerst schwach hexamere Per a 3-Banden zu erkennen, die restlichen Proteine waren nach sieben Wochen vollständig denaturiert und nicht in die Gelmatrix eingewandert. In den übrigen Proben wurde eine Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Per a 3-Isoformen beobachtet, was auf eine Veränderung der Quartärstruktur hindeutete. Eine Dissoziation der Per a 3-Isoformen wurde bei diesen Proben von pH 8.2 bis pH 6.0 auch nach sieben Wochen Inkubation nicht beobachtet.

In der Kontrolle wurden die Per a 3-Isoformen weiterhin als Hexamere sowohl bei der Coomassie-Färbung als auch bei der Antikörpermarkierung nachgewiesen. Zusätzlich wurden jedoch zwei weitere Banden unterhalb der Hexamere beobachtet, die auch vom anti-Per a 3.03-AK erkannt wurden, bei denen es sich eventuell um Dissoziationsstufen der Per a 3-Proteine handelte (Abb. 3-57). Die Proben bei pH 7.3, pH 6.5 und pH 6.0 zeigten untereinander im Hinblick auf die Per a 3-Proteine ein ähnliches Bandenmuster: an Stelle der typischen zwei Per a 3-Hexamerbanden war lediglich eine, jedoch etwas breitere Bande auf Höhe der 6-mere zu erkennen, die auch vom anti-Per a 3.03-AK erkannt wurde. Zwei weitere Proteinbanden, die zwischen den 6-meren und den Untereinheiten des Referenz-Hämo-

cyanins auftraten, wurden vom anti-Per a 3.03-AK nicht markiert. Somit handelte es sich nicht um Per a 3-Dissoziationsstufen. Bande 1 wurde nach 7 Wochen in keiner Probe mehr nachgewiesen (Abb. 3-57).

Unter diesen Versuchsbedingungen schien sich nach sieben Wochen die Quartärstruktur der Per a 3-Proteine zu verändern, wobei es sich nicht um eine vollständige Dissoziation bzw. Denaturierung handelte. Wohingegen in dem stark sauren pH-Wert von 3.5 nach sieben Wochen bis auf eine sehr schwache hexamere Per a 3-Bande alle Proteine denaturiert und nicht mehr in die Gelmatrix eingewandert waren (Abb. 3-57).

Analytische Ultrazentrifugation

Für die Sedimentationsexperimente wurden die identischen Proben und Zeitpunkte wie für die dargestellten Western-Blot-Experimente verwendet und ebenfalls auf die Oligomerisierung und somit auf die Stabilität hin untersucht (Abb. 3-58, Abb. 3-59, Abb. 3-60). Gelartefakte, wie sie bereits bei den Stabilitätsuntersuchungen gegenüber chaotropen Reagenzien beobachtet wurden, sollten mit der analytischen Ultrazentrifuge auszuschließen sein. Der Nachteil dieser Methode bestand allerdings darin, dass eine Unterscheidung der Per a 3-Isoformen -wie es im Western-Blot möglich war- nicht erfolgen konnte.

Als Marker für die Stabilitätsuntersuchungen wurde wie bereits zuvor der Sedimentationskoeffizient der Per a 3-Isoformen von 17-19 S ($S_{20,w}$) verwendet. Die Auswertung der Sedimentationsläufe erfolgte nach der „enhanced van-Holde-Weischet“-Methode. Im Falle einer diffizilen Auswertung der Proben wurde darauf geachtet, dass der für die Auswertung inkludierte Bereich die Sedimentationsfront der Per a 3-Isoformen erfasste, auch wenn dadurch langsamer sedimentierende Proteine nicht mehr in der Auswertung erfasst wurden.

Nach 24 h Inkubation konnte in allen Proben bis auf pH 3.5 der typische Sedimentationskoeffizient des Per a 3-Isoformengemisches von ca. 18 S ($S_{20,w}$) zusätzlich zu zahlreichen langsamer sedimentierenden Proteinen beobachtet werden (Abb. 3-58). Im Unterschied dazu konnte bei pH 3.5 nur ein sehr geringer Anteil als 17-19 S ($S_{20,w}$)-Gruppe zusammengefasst werden, die restlichen Sedimentationskoeffizienten zeigten eine breite Verteilung von 0 bis 25 S ($S_{20,w}$) (Abb. 3-58).

24 Stunden

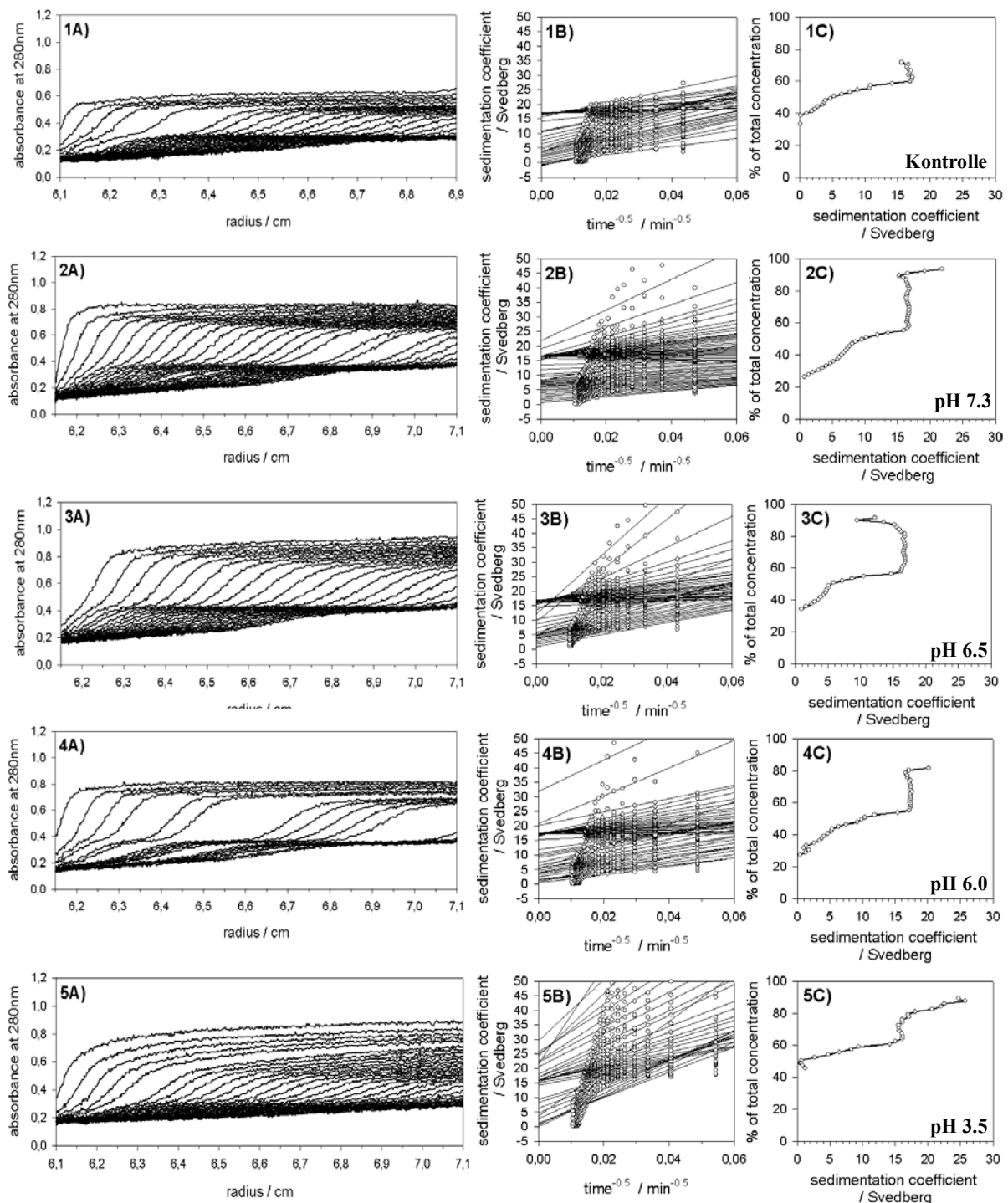


Abb. 3-58: Überprüfung der pH-Stabilität der HL-Proben nach 24 h Inkubation im Sedimentationslauf.

Es wurden jeweils 0.6 mg/ml HL mit dem jeweiligen Referenzpuffer bei 35000 rpm bei 20°C im Absorptionsverfahren bei 280 nm gemessen. Die Auswertung der Sedimentationsfronten erfolgte nach der „enhanced van-Holde-Weischet“-Methode. Den Graphen entsprachen folgende Proben: **1)** HL-Kontrolle, **2)** HL pH 7.3, **3)** HL pH 6.5, **4)** HL pH 6.0, **5)** HL pH 3.5. Mit **A** wurden jeweils die aufgezeichneten Sedimentationsfronten der jeweiligen Proben gekennzeichnet. Es wurden nur die Spektren abgebildet, die für die Auswertung übernommen wurden. Mit **B** wurden die Extrapolationsgraphen der Proben, bereits gegen den jeweiligen Puffer korrigiert dargestellt und mit **C** die zugehörigen Verteilungsgraphen der korrigierten S-Werte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Graphen ähnlich skaliert.

Bei allen pH-Werten bis auf pH 3.5 wurde nach 24 h der typische Sedimentationskoeffizient der hexameren

Per a 3-Isoformen von ca. 18 S ($S_{20,w}$) beobachtet. Lediglich in der pH 3.5-Probe waren zusätzliche hohe Aggregate sowie ein hoher Anteil sehr langsam sedimentierender Proteine zu erkennen.

Nach einer Woche Inkubation konnte die pH 3.5-Probe mit der „enhanced van-Holde-Weisheit“-Methode nicht mehr ausgewertet werden. Die zugehörigen Sedimentationsfronten waren sehr stark abgeflacht, was auf sehr kleine Partikel oder auf aufgefaltete Proteine hindeutete (Abb. 3-59 5A). Offensichtlich waren die Per a 3-Proteine vollständig dissoziiert oder denaturiert. Bei den übrigen pH-Werten konnten keine signifikanten Veränderungen der 18 S-Fraktion festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Per a 3-Proteine nach einer Woche Inkubation weiterhin in ihrer hexameren Oligomerisierung vorlagen (Abb. 3-59).

Nach sieben Wochen Inkubation waren bei pH 3.5 die Proteine vollständig denaturiert und keine Sedimentationsfronten mehr zu unterscheiden (Abb. 3-60 5A). Auch bei pH 7.3 war interessanter Weise eine Auffaltung und/oder ein Abbau der Per a 3-Proteine zu beobachten, wohingegen bei den übrigen pH-Werten jeweils immer noch deutlich die 18 S-Fraktion beobachtet werden konnte (Abb. 3-60). Lediglich beim Vergleich der Sedimentationsfronten mit denen der einwöchigen Inkubation fiel auf, dass die langsamer als Per a 3-sedimentierenden Proben nach sieben Wochen Inkubation offenbar noch langsamer sedimentierten als nach einer Woche Inkubation (Abb. 3-59, Abb. 3-60).

1 Woche

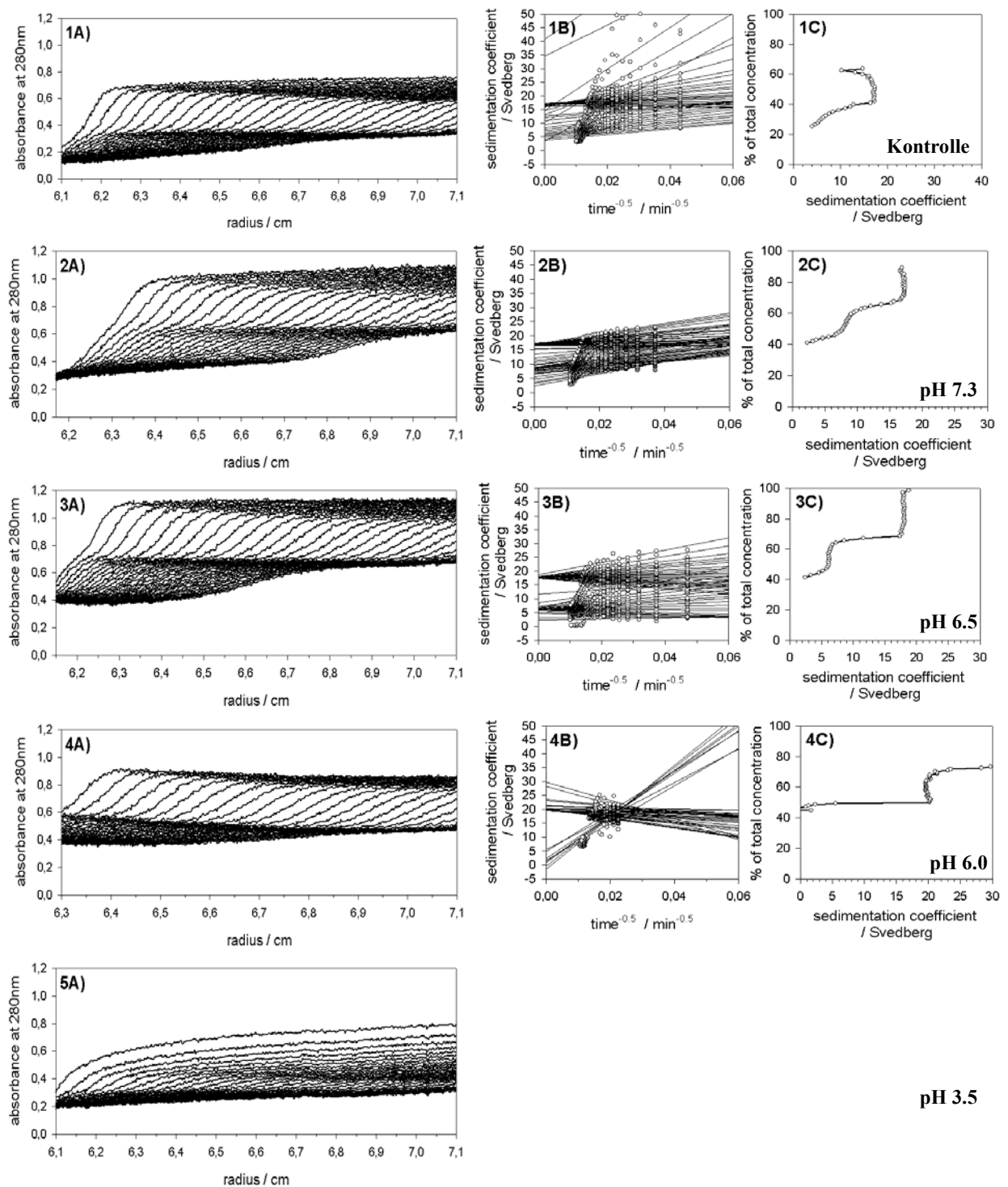


Abb. 3-59: Überprüfung der pH-Stabilität der HL-Proben nach einer Woche Inkubation im Sedimentationslauf.

Der experimentelle Aufbau, Proben und Messverfahren entsprachen der 24 h Messung.

Bei pH 3.5 konnten die Sedimentationsfronten nicht mehr ausgewertet werden. Offensichtlich waren bei diesem pH-Wert nach einer Woche Inkubation nur noch sehr langsam sedimentierende Proteine vorhanden und die Per a 3-Proteine dissoziiert oder denaturiert. Bei den übrigen pH-Werten lagen die Per a 3-Proteine auch noch nach einer Woche stabil in ihrer hexameren Oligomerisierung vor.

7 Wochen

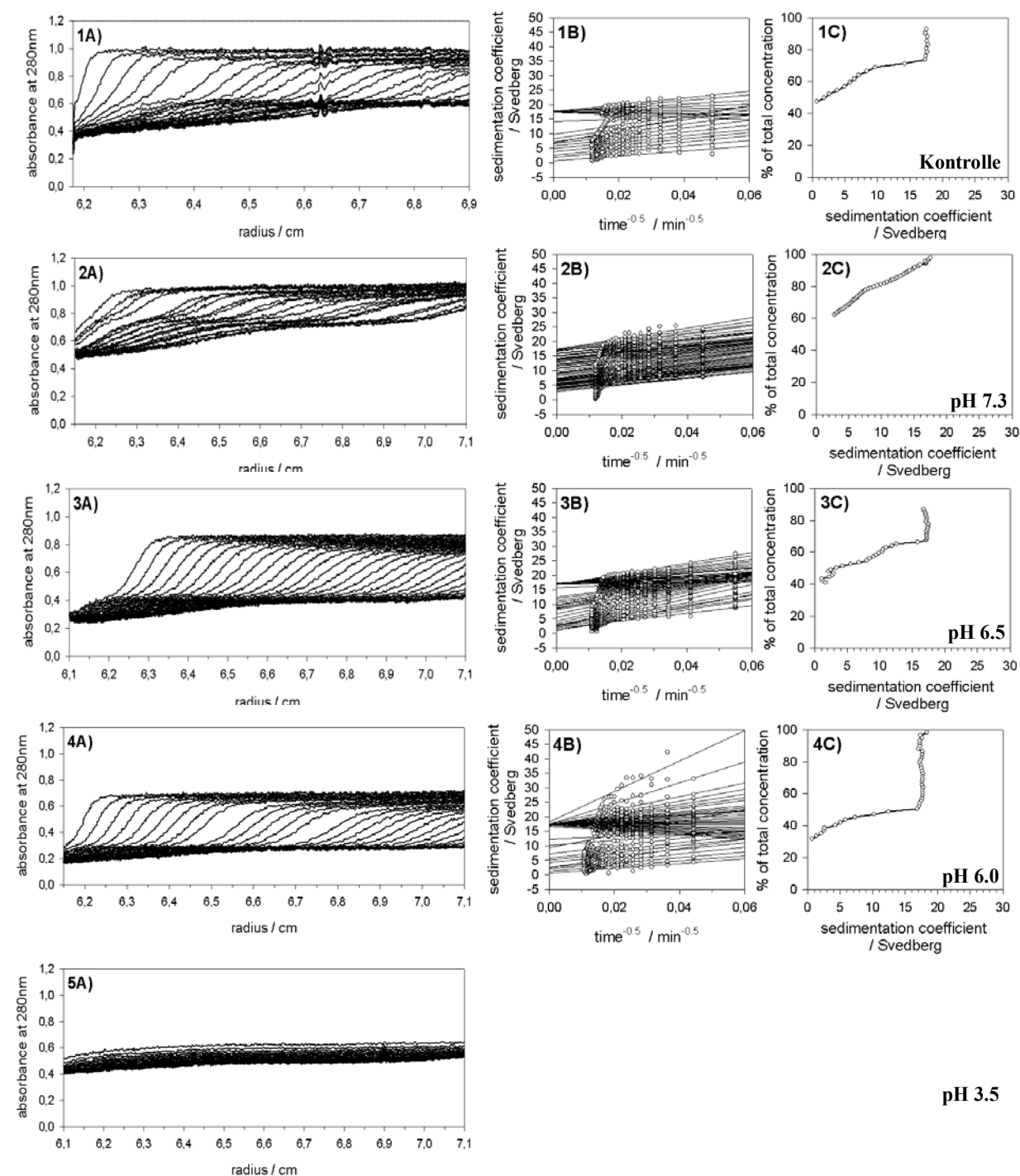


Abb. 3-60: Überprüfung der pH-Stabilität der HL-Proben nach sieben Wochen Inkubation im Sedimentationslauf.

Der experimentelle Aufbau, Proben und Messverfahren entsprachen der 24 h Messung.

Nach sieben Wochen Inkubation waren bei pH 3.5 sämtliche Proteine denaturiert und eine Auswertung mit der „enhanced van-Holde-Weisheit“-Methode nicht mehr möglich. In der Kontrolle sowie bei pH 6.5 und pH 6.0 waren hexamere Per a 3 Proteine auch weiterhin vertreten. Bei pH 7.3 war eine breite S-Wert-Verteilung zu beobachten und es konnten keine sedimentierenden Gruppen mehr unterschieden werden. Offensichtlich kam es in dieser Probe zu einem partiellen Zerfall, jedoch nicht zur Aggregation, der Per a 3-Proteine.

Der Vergleich der Western-Blot Experimente mit den erhaltenden Sedimentationskoeffizienten-Verteilungen lieferte für die Kontrolle, pH 6.5 und pH 6.0 gute Übereinstimmungen. Offensichtlich wieder als Gelartefakt einzustufen war die nach einer Woche bei pH 3.5 auf dem Western-Blot zu beobachtende Hexamerbande, die im Sedimentationslauf nicht bestätigt wurde (Abb. 3-56, Abb. 3-59). Auch die Hexamere bei pH 7.3 nach sieben Wochen Inkubation waren im Sedimentationslauf nicht so eindeutig ausgeprägt wie als Bande auf der nativen PAGE (Abb. 3-57, Abb. 3-60). Insgesamt wurde bei keinem pH-Wert und zu keinem Zeitpunkt eine Aggregation der Per a 3-Proteine beobachtet. In diesem Experiment waren die Per a 3-Proteine insgesamt am stabilsten in der Kontrollgruppe (pH 8.2).

Unabhängig vom pH-Wert wurde bei Per a 3 beobachtet, dass nach sieben Wochen bei 37°C auf dem Western-Blot eine Veränderung der Quartärstruktur, allerdings noch keine Dissoziation auftrat. Diese geringe Veränderung wurde im Sedimentationslauf nicht aufgelöst. Dennoch wäre zu empfehlen die Proteine bei einer längeren Lagerungszeit auch weiterhin in Schabepuffer D einzufrieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Per a 3-Proteine eine hohe pH-Stabilität aufwiesen. Sie blieben von pH 8.2 bis pH 6.0 im Wesentlichen in ihrer hexameren Oligomerisierung über einen langen Zeitraum sogar bei 37°C erhalten, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Allergene zu Beginn des lysosomalen Weges aufgrund des pH-Wertes automatisch in ihre Untereinheiten zerfallen und darüber die Proteolyse eingeleitet werden kann.

Fazit der Stabilitätsuntersuchungen

Gegenüber Harnstoff und alkalischem pH-Wert wiesen die Per a 3-Isoformen eine ausgesprochen hohe Stabilität auf: auch nach zwei Monaten Inkubation konnte keine vollständige Denaturierung beobachtet werden. In einem pH-Bereich von pH 6.0 bis 8.2 lagen die Per a 3-Isoformen auch bei 37°C über einen langen Zeitraum weiterhin als Hexamere vor. Allerdings deutlich weniger stabil waren die Per a 3-Isoformen gegenüber dem stark sauren pH-Wert von 3.5, bei dem die Allergene innerhalb einer Woche denaturierten.

3.3.2.8 Immunologische Charakterisierung

Im Zuge meiner Arbeit wurde eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Per a 3-Isoform isoliert und als Per a 3.03 bezeichnet. Dessen Immunogenität wurde in Zusammenarbeit mit der [REDACTED] (Hautklinik des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) von [REDACTED] im Rahmen ihrer Diplomarbeit bestimmt.

Zur Charakterisierung der Immunogenität wurden ausgereifte dendritische Zellen (DC), die während der Ausreifungsphase mit unterschiedlichen Per a 3.03-Konzentrationen gepulst worden waren, zusammen mit CD4⁺-T-Zellen kokultiviert. Nach fünf Tagen wurde über den

$^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau die Proliferation der Zellen gemessen (Abb. 3-61). Als Positivkontrolle dienten Tetanustoxoid (TT)-gepulste DC und als Negativkontrolle unbehandelte DC.

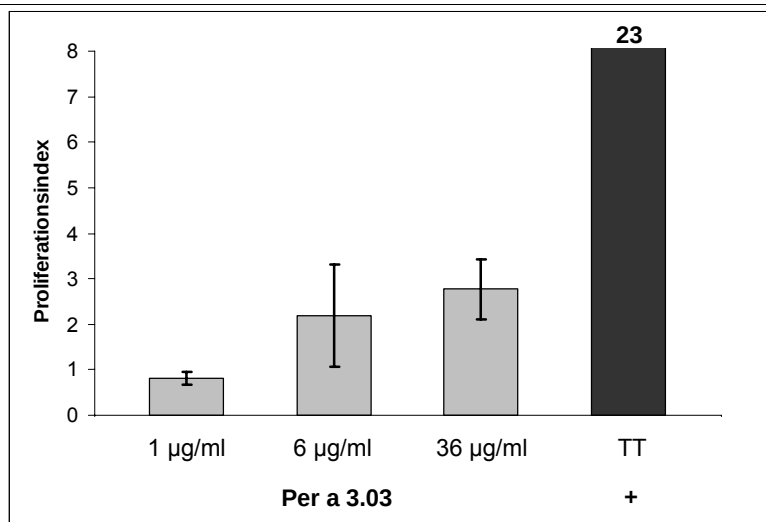


Abb. 3-61: Proliferationsinduktion durch Per a 3.03.

Die dendritischen Zellen (DC) wurden wie im Abschnitt 2.13.1 beschrieben kultiviert und ausgereift. Am Tag sechs wurden zusammen mit dem Aufreißungscocktail unterschiedliche Per a 3.03 Konzentrationen zugegeben. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte reife DC und als Positivkontrolle Tetanustoxoid (TT) (1 µg/ml)-beladene DC. Es wurden pro Ansatz 10^4 DC mit 10^5 autologen CD4^+ -T-Zellen kokultiviert und nach fünf Tagen die Proliferation über den $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau bestimmt. Als Proliferationsindex (Probe im Verhältnis zur Negativkontrolle) wurde der Mittelwert aus vier Versuchen unter Berücksichtigung der Standardabweichung dargestellt.

Mit steigender Per a 3.03-Konzentration wurde eine zunehmende Proliferation beobachtet.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass von reifen DC präsentierte Per a 3.03 in der Lage war T-Zellen zu aktivieren und somit deren Proliferation zu induzieren (Abb. 3-61). Diese Proliferation konnte als spezifisch angesehen werden, da diese mit zunehmender Per a 3.03-Konzentration anstieg (Abb. 3-61). Insgesamt wies Per a 3.03 bei den eingesetzten Konzentrationen eine deutliche Immunogenität auf.

Für die Beurteilung der Allergenität von Per a 3.03 müsste z.B. in einem Basophilen-Aktivierungstest die Leukotrienausschüttung gemessen werden. Dies war aufgrund der limitierten Per a 3.03-Menge in dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

3.3.2.9 Epitope in den Primär- und Quartärstrukturen der Per a 3-Isoformen

Die besondere Fähigkeit eines Allergens besteht darin im Körper eine IgE-Antwort zu induzieren, wozu mindestens zwei IgE-Antikörper (oder auch B-Zell-Rezeptoren) an bestimmte Aminosäuresequenzabschnitte des Allergens binden müssen [33]. Bei diesen Abschnitten handelt es sich um sequenzielle (lineare) und/oder konformationelle (diskontinuierliche) Epitope [34]. Trotz Kenntnisse zahlreicher Epitopsequenzen sind bis jetzt keine allgemeingültigen Sequenzabschnitte bekannt, die ein Protein zum Allergen werden lassen [34, <http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>].

Bei Per a 3.01 wurden inzwischen vier sequenzielle allergene Epitope (B-Zell-Epitope) von Wu et al. (2003) identifiziert, die bei einem Datenbankabgleich interessanter Weise keine Übereinstimmung mit einer anderen als allergen klassifizierten Proteinsequenz aufwiesen [http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi, 140, 148]. Diese bekannten linearen allergenen Epitope von Per a 3.01 werden in den nachfolgenden Abschnitten theoretisch, potentiell antigenen Epitopen gegenübergestellt. Diese wurden über einen Algorithmus in der Primärstruktur von Per a 3.01 und Per a 3.0201 postuliert und in der Quartärstruktur dieser Allergene lokalisiert.

Korrektur der Per a 3.01-Sequenz

Von Per a 3.01 wurde von Wu et al. (1996) die Sequenz mit der Kennung „AAB09629“ veröffentlicht, die jedoch auf Nukleotidebene fehlerhaft war und somit zu einer Translationsverschiebung führte, die von Prof. Dr. Thorsten Burmester (Zoologisches Institut und Museum Grindel, Abteilung Tierphysiologie, Universität Hamburg) festgestellt und manuell korrigiert wurde [persönliche Mitteilung]. Der Vergleich der beiden resultierenden Aminosäuren-Sequenzen wurden im Sequenzalignment in Abb. 3-62 dargestellt. Da die Verschiebung auf einen 30 Aminosäure-umfassenden Bereich in den Positionen 60 bis 90 begrenzt war, und die restlichen Positionen identisch waren, sind nur die ersten 120 AS dargestellt, das komplette Alignment findet sich im Anhang (Abb. 8-6).

	*	20	*	40	
Per_a_3_01 :	MKTALVFAAVVAFVAAREF	PDHKDYKQLADKQFLAKQ	RDVL	:	40
k_Pera3_01 :	MKTALVFAAVVAFVAAREF	PDHKDYKQLADKQFLAKQ	RDVL	:	40
		MKTALVFAAVVAFVAAREF	PDHKDYKQLADKQFLAKQ	RDVL	
	*	60	*	80	
Per_a_3_01 :	RLFHRVHQHNILNDQVEVG	I	PMTSKQTSATTVP	PSGEAVH	: 80
k_Pera3_01 :	RLFHRVHQHNILNDQVEVG	N	TYDIEANIGNYST	EDVVKQF	: 80
		RLFHRVHQHNILNDQVEVG		P	
	*	100	*	120	
Per_a_3_01 :	GVLQEGHARE	RGEPEFSVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD	:	120	
k_Pera3_01 :	MAYFKKGMLS	RGEPEFSVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD	:	120	
		RGEPEFSVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD			

Abb. 3-62: Ausschnitt des Sequenzalignments der veröffentlichten und der korrigierten Per a 3.01-Sequenz.

Die Korrektur wurde von Prof. Dr. Thorsten Burmester vorgenommen und bezog sich auf die Aminosäuren der Positionen 60 bis 90. Da die übrigen Abschnitte zwischen den beiden Sequenzen identisch waren, sind lediglich die ersten 120 AS des Alignments dargestellt. Der Grund für die Korrektur war ein Fehler auf Nukleotidebene, die zu einer Translationsverschiebung führte. Für das Alignment wurden folgende Sequenzen verwendet: Per_a_3_01= AAB 09629, k_Pera3_01= korrigierte Sequenz von Prof. Dr. Thorsten Burmester, persönliche Mitteilung.

Alle weiteren Alignments und Analysen basierten stets auf der korrigierten Per a 3.01 Sequenz, die in den jeweiligen Experimenten als Per a 3.01 bezeichnet wurde und lediglich in der Bildunterschrift ergänzend als korrigiert gekennzeichnet wurde. Diese Korrektur hatte keinen Einfluss auf die sequenziell bekannten allergenen Per a 3.01-Epitope, die im nachfolgenden Alignment gelb hinterlegt dargestellt wurden (Abb. 3-63).

Theoretische potentiell antigene Epitope in der Per a 3-Primärstruktur

Für die Vorhersage theoretischer potentiell antigenen Epitope stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung, von denen zwei für die Per a 3-Proteinen verwendet wurden. Die Analyse nach Jameson und Wolf beruhte auf der Hydrophobizität und der Flexibilität des Peptidrückgrats [315]. Diese linearen potentiell antigenen Epitope wurde von Wu et al. (1996) für die Per a 3-Isoformen in der Primärstruktur bestimmt und in meiner Diplomarbeit in der Quartärstruktur lokalisiert und ausführlich diskutiert [138, 148]. Der Vollständigkeit halber wurden diese Epitope ebenfalls im nachfolgenden Alignment in rot hinterlegt dargestellt (Abb. 3-63) und wurden zusätzlich mit dem Ergebnis des zweiten Algorithmus nach Parker et al. verglichen.

Die Analyse nach Parker et al. war in dem Programmpaket „Anthept2000“ implementiert [280]. Diese ermittelte unter Berücksichtigung der atomaren Flexibilität, Hydrophilie sowie der experimentellen HPLC Retentionszeit synthetischer Peptide potentielle sequenzielle antigene Epitope. Diese Epitope wurden sowohl für die korrigierte Per a 3.01-Sequenz (inklusive Signalpeptid) als auch für Per a 3.0201 ermittelt und in grün im Alignment dieser beiden Sequenzen zusammen mit dem Hämocyanin von *Panulirus interruptus* dargestellt (Abb. 3-63).

In diesem Alignment waren die Per a 3-Isoformen zueinander 65% identisch und besaßen 77% isofunktionelle Aminosäuren. Zu dem Hämocyanin von *Panulirus interruptus* wies Per a 3.01 eine 27%ige Identität und eine 49%ige Ähnlichkeit auf. Per a 3.0201 war zu dem Hämocyanin zu 30% identisch und zu 51% homolog.

Seite 163

folgende Sequenzen verwendet: Per_a_3.1= korrigierte Per a 3.01 Sequenz, Per_a_3.02= Per a 3.0201=AAB 09632, Hc_Pan_int=1HCY.

Eine Übersicht über die von GeneDoc ermittelten AS-Identitäten und -Ähnlichkeiten sind in Tabelle 3-6 aufgeführt.

	Per a 3.01	Per a 3.0201	Hc Pan int
Per a 3.01	685 0 0	65% 77% 8%	27% 49% 6%
Per a 3.0201	452 535 58	631 0 0	30% 51% 7%
Hc Pan int	192 344 44	206 344 48	657 0 0

Tabelle 3-6: Aminosäure-Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten aus dem Alignment (Abb. 3-63).

Die Auftragung entsprach der GeneDoc-Auswertung: jeweils die erste Zeile stellte den Anteil der identischen Aminosäuren dar, die zweite Zeile den Anteil der isofunktionellen Aminosäuren und die dritte Zeile jeweils den Anteil der Lücken im Alignment. Bei den grau hinterlegten Feldern wurden die Angaben in Form der Aminosäureanzahl und bei den weiß hinterlegten Zeilen in Prozent angegeben.

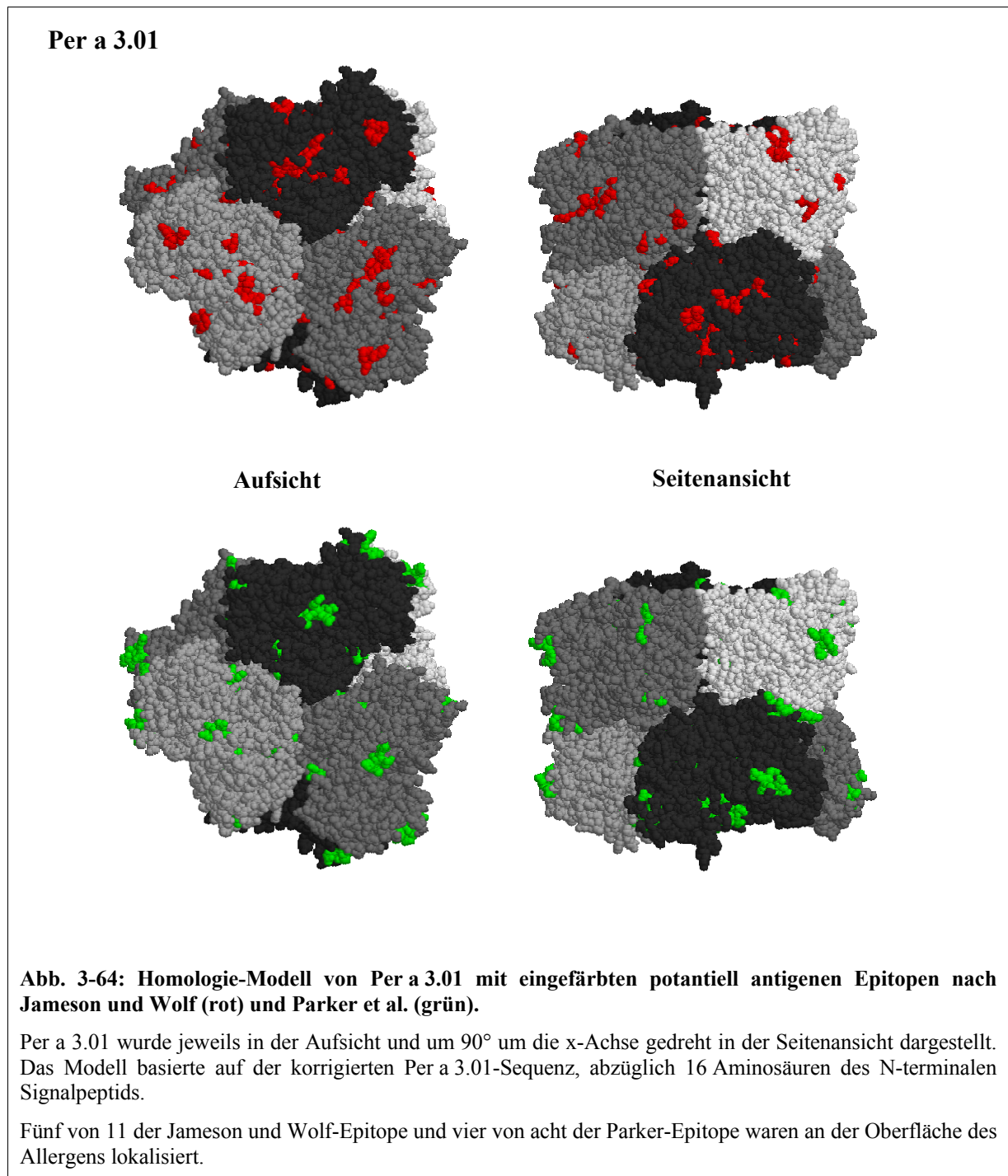
Nach Parker et al. wurden bei Per a 3.01 acht und bei Per a 3.0201 neun Sequenzabschnitte als potentiell antigen eingestuft, die im Alignment grün hinterlegt wurden („Parker-Epitope“) (Abb. 3-63). Der Vergleich dieser Epitope mit den allergenen Epitopen (gelb) zeigte keine hohe Übereinstimmung (Abb. 3-63). Eine ähnlich schlechte Übereinstimmung mit den allergenen Epitopen lieferte der Algorithmus nach Jameson und Wolf (rot, „Jameson und Wolf-Epitope“). Auch der Vergleich der Ergebnisse der beiden Algorithmen untereinander ergab, dass durch diese bei den Per a 3-Isoformen zum Großteil unterschiedliche Sequenzabschnitte als potentiell antigen eingestuft wurden (Abb. 3-63).

Trotz der schlechten Übereinstimmung der allergenen Epitope (gelb) mit den potentiell antigenen Epitopen (rot bzw. grün) war von Interesse, ob diese vorhergesagten potentiellen Epitope auch im nativen Zustand der Per a 3-Allergene tatsächlich für Antikörper zugänglich wären. Da von Hexamerinen bisher keine Röntgenstruktur bekannt war, wurden die Quartärstrukturen der Per a 3-Isoformen über Homologie-Modellierung bestimmt und in denen die Lage der potentiellen Epitope analysiert (Abb. 3-64, Abb. 3-65).

Für Per a 3.01 konnte dabei auf das von Diplom-Biologe [REDACTED] (Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erstellte Homologie-Modell zurückgegriffen werden, welches bereits in meiner Diplomarbeit vorgestellt wurde [148]. Das Homologie-Modell von Per a 3.0201 -ebenfalls von [REDACTED] erstellt- wird nachfolgend kurz erläutert.

Potentiell antigene Epitope in der Quartärstruktur von Per a 3.01

Das Homologie-Modell von Per a 3.01 basierte auf dem Sequenzalignment von Per a 3.01 (korrigiert) mit der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus*. Als Template diente die Kristallstruktur der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* (1HCY), die auch bereits für das vorherige Sequenzalignment verwendet wurde (Abb. 3-63) [226]. Das Modell basierte auf der Annahme, dass sich Per a 3.01 aus sechs homologen Untereinheiten zusammensetzte. Die Orientierung der sechs Untereinheiten basierte auf der Kristallstruktur des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* [285].



In diesem Modell wurden für eine bessere Übersichtlichkeit die Untereinheiten in verschiedene Graustufen eingefärbt. Die nach Jameson und Wolf vorhergesagten potentiell antigenen Epitope wurden entsprechend dem Alignment aus Abb. 3-63 in rot und die potentiell antigenen Epitope nach Parker et al. in grün eingefärbt. Zusätzlich zur Aufsicht wurde das Per a 3.01-Modell in der Seitenansicht dargestellt (Abb. 3-64).

Die potentiell antigenen Epitope beider Algorithmen waren über das ganze Molekül verteilt. Fünf der 11 nach Jameson und Wolf vorhergesagten potentiell antigenen Epitope waren auch im Hexamer an der Proteinoberfläche exponiert. Ähnlich lagen die Verhältnisse für Parker et al., bei dem vier der acht bestimmten potentiellen antigenen Epitope an der Oberfläche zu liegen kamen (Abb. 3-64).

Potentiell antigene Epitope in der Quartärstruktur von Per a 3.0201

Das Homologie-Modell von Per a 3.0201 basierte auf einem Sequenzalignment von Per a 3.0201 mit der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus*. Als Template diente die Kristallstruktur der Untereinheit a des Hämocyanins von *Panulirus interruptus* (1hcy), die auch bereits für die Modellierung von Per a 3.01 verwendet wurde [226]. Das Modell basierte auf der Annahme, dass sich Per a 3.0201 aus sechs homologen Untereinheiten zusammensetzt. Die Orientierung der sechs Untereinheiten basierte auf der Kristallstruktur des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* [285].

Auch bei diesem Modell wurden für eine bessere Übersichtlichkeit die Untereinheiten in verschiedene Graustufen eingefärbt. Die nach Jameson und Wolf vorhergesagten potentiell antigenen Epitope wurden erneut in rot und die potentiell antigenen Epitope nach Parker erneut in grün eingefärbt. Zusätzlich zur Aufsicht wurde das Per a 3.0201-Modell um 90° gedreht in der Seitenansicht dargestellt (Abb. 3-65).

Die potentiell antigenen Epitope beider Algorithmen waren wie bei Per a 3.01 über das ganze Molekül verteilt. Acht der 12 nach Jameson und Wolf vorhergesagten potentiell antigenen Epitope waren auch im Hexamer an der Proteinoberfläche exponiert, wohingegen nach Parker et al. vier der neun bestimmten potentiellen antigenen Epitope an der Oberfläche zu liegen kamen (Abb. 3-65).

Offensichtlich eignete sich bei Per a 3.0201 der Algorithmus von Jameson und Wolf und bei Per a 3.01 der Algorithmus nach Parker et al. besser für die Beschreibung von oberflächen-exponierten Sequenzabschnitten.

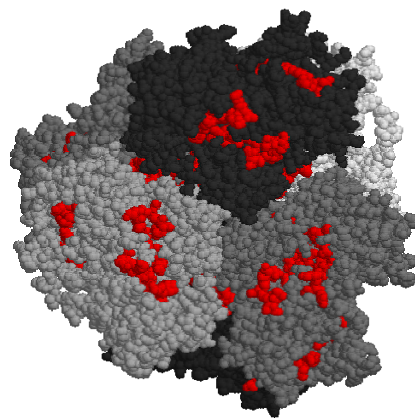
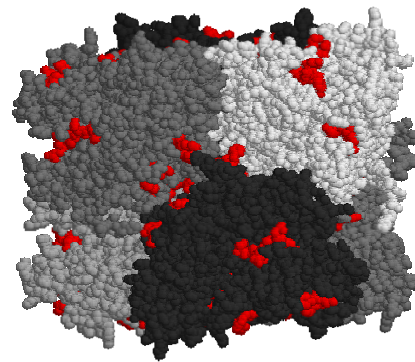
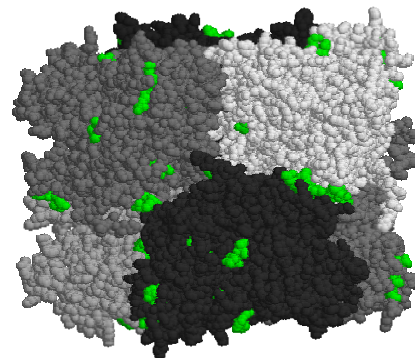
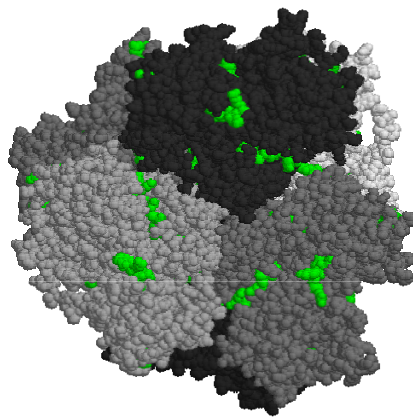
Per a 3.0201**Aufsicht****Seitenansicht**

Abb. 3-65: Homologie-Modell von Per a 3.0201 mit eingefärbten potentiell antigenen Epitopen nach Jameson und Wolf (rot) und Parker et al. (grün).

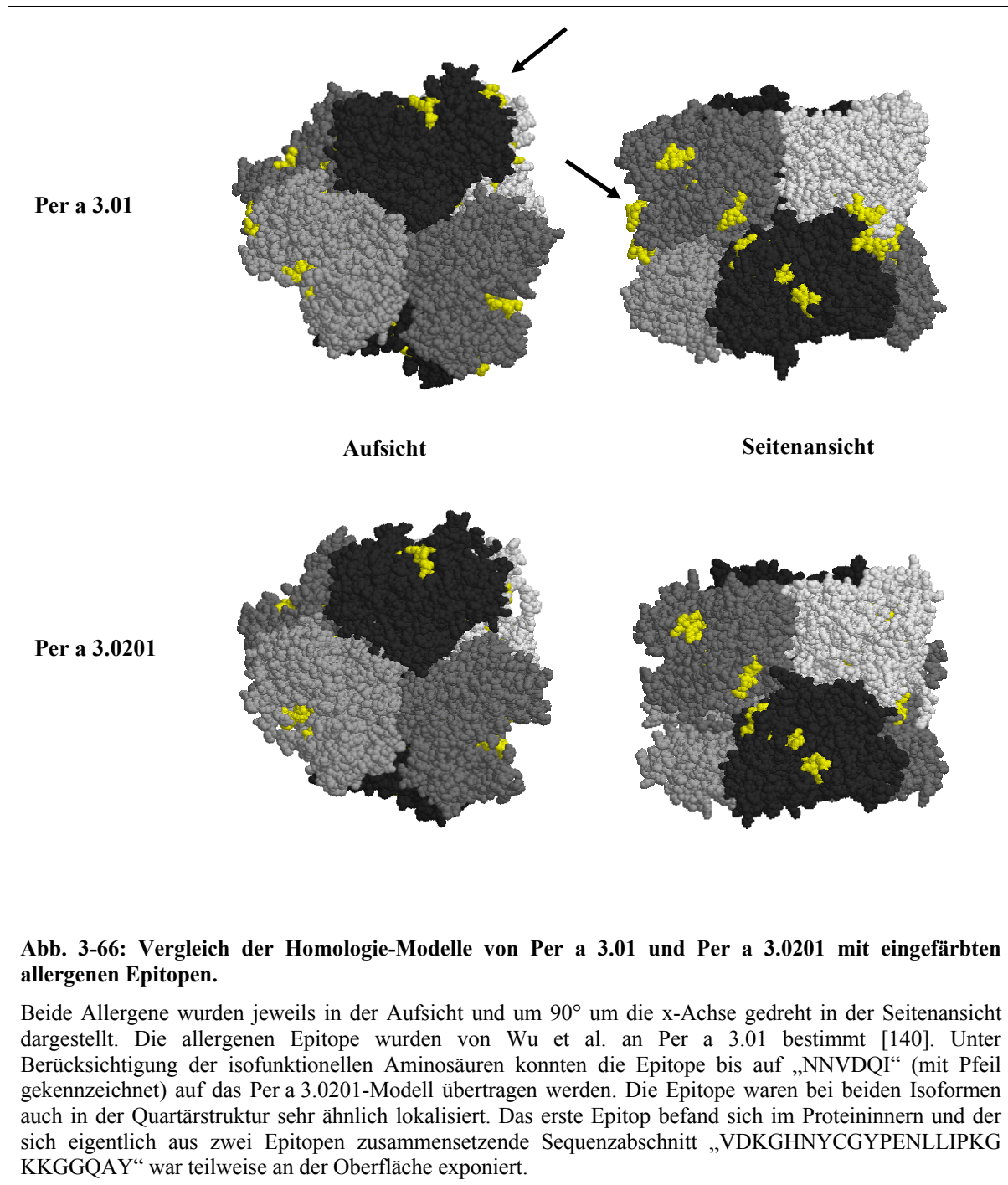
Per a 3.0201 wurde jeweils in der Aufsicht und um 90° um die x-Achse gedreht in der Seitenansicht dargestellt.

Acht von 12 der Jameson und Wolf-Epitope waren an der Oberfläche von Per a 3.0201 lokalisiert. Von den Parker-Epitopen befanden sich vier von neun Sequenzabschnitten an der Oberfläche des Allergens.

Vergleich der allergenen Epitope in den Quartärstrukturen der Per a 3-Isoformen

Die allergenen Epitope wurden von Wu et al. an Per a 3.01 bestimmt und bei dieser Isoform im Sequenzalignment gelb hinterlegt dargestellt (Abb. 3-63). Die Lokalisierung dieser Epitope bei dem Per a 3.01-Homologie-Modell wurde bereits in meiner Diplomarbeit ausführlicher analysiert. Daraus ging hervor, dass das erste Epitop („TVLRDPVFYQ“) im Proteininnern lokalisiert und die Übrigen im Wesentlichen an der Oberfläche exponiert waren [148].

Unter Austausch isofunktioneller Aminosäuren waren die für Per a 3.01-bestimmten allergenen Epitope bis auf das Epitop „NNVDQI“ auch in der Per a 3.0201-Sequenz zu finden (Abb. 3-63). Übertragen auf das Homologie-Modell von Per a 3.0201 ergab sich dabei die in Abb. 3-66 dargestellte Lokalisation. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde das Per a 3.01-Modell zusammen mit dem Per a 3.0201-Modell erneut dargestellt (Abb. 3-66).



Die Pfeile kennzeichneten bei Per a 3.01 das „NNVDQI“-Epitop, welches in Per a 3.0201 nicht vorhanden war. Ebenso wie in Per a 3.01, so war auch bei Per a 3.0201 das erste Epitop („TVLRDPVFYQ“) im Proteininnern lokalisiert und der eigentlich sich aus zwei Epitopen

zusammensetzende Sequenzabschnitt „VDKGHNYCGYPENLLIPKGKKGGQAY“ war unter Berücksichtigung der isofunktionellen Aminosäuren in Per a 3.0201 ähnlich lokalisiert wie in Per a 3.01 (Abb. 3-66): das Epitop durchzog die Untereinheit und war dabei teilweise an der Oberfläche exponiert.

Aufgrund der hohen 65%igen Identität und einer 77%igen Ähnlichkeit der Per a 3-Isoformen entsprach die Ähnlichkeit der Modelle sowie die ähnliche Lokalisation der Epitope durchaus den Erwartungen.

Fazit der Epitopvorhersage

In der Literatur wird die Vorhersagerichtigkeit solcher Algorithmen für potentiell antigene Epitope mit 50-60% angegeben [316]. Für Per a 3.01 lag in Bezug auf die allergenen Epitope die Richtigkeit jedoch deutlich niedriger. Somit kann eine solche Vorhersage keinesfalls als Ersatz für die experimentelle Epitop-Bestimmung dienen [140]. Auch war die Einstufung eines Sequenzabschnitts zu einem potentiell antigenen Epitop mit diesen Algorithmen nicht automatisch mit der Lokalisation auf der Oberfläche des nativen Proteins korreliert.

Ingesamt wäre neben der experimentellen Bestimmung der linearen allergenen Epitope von Per a 3.0201 auch insbesondere die Bestimmung von allergenen Konformationsepitopen der Per a 3-Isoformen von großem Interesse. Denn konformationelle Epitope spielen nachweislich bei den meisten respiratorischen Allergenen eine wichtige Rolle bei der IgE-Bindung [136, 304]. Deren exakte Bestimmung ist jedoch experimentell äußerst aufwändig, da zum einen die Struktur des Allergens genau bekannt sein muss und zum anderen zusätzlich für die Röntgenstrukturanalyse monoklonale IgE-AK isoliert bzw. generiert werden müssen [34, 44]. Um zu untersuchen, ob bei den Per a 3-Allergenen Konformationsepitope überhaupt eine Rolle spielen, wäre es sinnvoll in zukünftigen Experimenten die Allergenität von nativen gereinigten Per a 3-Isoformen mit denaturierten gereinigten Per a 3-Isoformen z.B. im Basophilen-Aktivierungstest vorab zu vergleichen [317].

Für eine spezifische Immuntherapie könnten, auf den Kenntnissen der allergenen Epitope aufbauend, durch gezielte Mutagenese hyperallergene Per a 3-Proteine generiert werden, wodurch die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks deutlich reduziert werden könnte, wie dies bereits z.B. für das Hausstauballergen Der p 2 erfolgreich gelang [318].

3.3.2.10 Fazit der Per a 3-Charakterisierung

Aus der Hämolymphe und dem Crude-Extrakt von *Periplaneta americana* konnten zwei hexamere Per a 3-Isoformen isoliert werden, wobei die Extraktgewinnung keinen unmittelbaren Einfluss auf die multimeren Proteine hatte. Eine dieser isolierten Isoformen war bisher sequenziell noch nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit als Per a 3.03 bezeichnet. Deren pHi wurde mit 5.8 bestimmt und weder inter- noch intramolekulare Disulfidbrücken sind in dieser Isoform ausgebildet. Das immunogene Potential konnte nachgewiesen werden; der Nachweis der Allergenität steht weiterhin aus. Die zweite isolierte Per a 3-Isoform setzte sich aus einem Gemisch an Per a 3.01 und Per a 3.0201 zusammen und wurde als P II bezeichnet. Diese Probe wies isoelektrische Punkte bei pHi 6.4 und 6.5 auf. In beiden Isoformen konnten Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten ausgeschlossen werden. Allerdings schienen sich diese Isoformen in der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zu unterscheiden. Die genaue Zusammensetzung der P II-Probe wird in der Diskussion ausführlich aufgegriffen.

Gegenüber Harnstoff und Hydrolyse wiesen die Per a 3-Isoformen eine sehr hohe Stabilität auf, sodass eine Dissoziation der Proben auch nur durch alkalischen pH-Wert, der Entfernung bivalenter Ionen und dem Zusatz von Harnstoff erreicht werden konnte.

Da von den Per a 3-Proteinen noch keine Röntgenkristallstruktur existierte, wurde die Lage der allergenen und potentiell antigener Epitope in Homologie-Modellen der Per a 3.01 und Per a 3.0201 lokalisiert. Dabei bestätigte sich, dass die Algorithmen zur Vorhersage theoretischer potentieller antigener Epitope nicht geeignet sind, um allergene Epitope vorherzusagen und keinesfalls die experimentelle Epitop-Bestimmung ersetzen können. Die hauptsächliche Lokalisation der allergenen Epitope an der Oberfläche der Isoformen bietet eine Möglichkeit, dass durch die hexamere Oligomerisierung die Multivalenz der Isoformen und daran gekoppelt, die Allergenität der Per a 3-Proteine erhöht wird.

3.4 Charakterisierung von Per a 9 – der allergenen Arginin-Kinase aus *Periplaneta americana*

Die Arginin-Kinase Per a 9 aus *Periplaneta americana* ist ein sehr potentes Majorallergen, welches bereits sequenziell bekannt ist und auch biochemisch teilweise charakterisiert wurde. Die Experimente dieser Arbeit verstehen sich daher als Ergänzung zu den Charakterisierungsarbeiten von Brown et al. [198, 214] bzw. werden später auf deren Grundlagen diskutiert werden (Abschnitt 4.2).

Ausgehend von der Reinigung von Per a 9 aus dem Crude-Extrakt von *Periplaneta americana* wurde das Protein massenspektrometrisch identifiziert und die Proteinausbeute bestimmt. Die anschließende biochemische Charakterisierung umfasste u.a. die Molekulargewichtsbestimmung des nativen und denaturierten Proteins und damit eng verbunden, Aussagen zur Tertiär- und Quartärstruktur der Arginin-Kinase. Es wurde überprüft, inwieweit Per a 9 in der Schabenhämolymphe vorhanden ist und Ähnlichkeiten zu den Per a 3-Majorallergenen bestehen. Abschließend wurde die Allergenität von Per a 9 anhand der Leukotrienausschüttung von Basophilen in einer ersten Fallstudie bestimmt.

3.4.1 Reinigung, Identifizierung und Sequenzanalyse

Die Reinigung von Per a 9 erfolgte zusammen mit der Gewinnung der Per a 3-Proteine nach den Protokollen 2 und 3 aus dem Crude-Extrakt der Amerikanischen Schabe und wurde in Abschnitt 3.2 ausführlich dargelegt. Um das isolierte 39 kDa-Protein beider Reinigungsprozeduren eindeutig als Per a 9 identifizieren zu können, wurde das Protein massenspektrometrisch untersucht. Diese massenspektrometrischen Daten wurden von [REDACTED] ([REDACTED], Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) gewonnen und analysiert.

Durch den tryptischen Verdau wurden zehn Peptidfragmente erhalten und identifiziert, die zu 100% der Sequenz von Per a 9 zuzuordnen waren. Diese sind in der Sequenz der Arginin-Kinase gelb eingefärbt und lieferten eine 37%ige Sequenzabdeckung (Abb. 3-67). Das Ergebnis dieser Analyse wurde in einem Sequenzalignment zusammen mit sechs Arginin-Kinasen aus unterschiedlichen Invertebraten-Spezies dargestellt (Abb. 3-67).

Das für diese Massenspektrometrie verwendete Protein wurde nach Protokoll 2 gereinigt; die massenspektrometrische Analyse des 39 kDa-Proteins aus Protokoll 3 ermöglichte ebenfalls eine eindeutige Zuordnung zu Per a 9 und ist lediglich im Anhang (Abschnitt 8.2.5) aufgeführt.

		*	20	*	40	*	60	
Per_a_9	:	MVDAAVLEKLEAGFAKLAAS	-DSKSLKKYLTKEVFDNLKT	KKT	PSFGSTLLDVIQSGLE	:	59	
Bla_g	:	MVDAAVLEKLEAGFAKLAAS	-DSKSLRRKYLTKEVFDNLKT	KKT	PTFGSTLLDVIQSGLE	:	59	
Plo_i_1	:	MVDAATLEKLEAGFSKLAAS	-DSKSLKKYLTREVEDALKNKKT	-SFGSTLLDSIQSGVE	:	58		
Der_p_20	:	MVDQAVIDKLEAGFQKLOSSAEC	SHLLKKYLTRNVLDACKGRKT	-GMGATLVDVQSGEE	:	59		
Lit_v_2	:	MADAIVLEKLEAGFKLEAAT	DSKSLKKYLTKEVFDLKKDKRT	-SLGATLLDVIQSGVE	:	59		
Hom_g	:	MADAATIAKLEEGFKLEAAT	DSKSLKKYLSKDIEDSLKAKKT	-SLGATLLDVIQSGVE	:	59		
		M DaA 6 KLEaGF KL a d	kSLl4KYL34 6fD lK 44T	G TL6Dv6QSG E				
		*	80	*	100	*	120	
Per_a_9	:	NHDSGVGIYAPDAEAYVAFAD	LFDPPIEDYHGGFKKTDKHP	PKDWGDVDTLGNLDPAGEY	:	119		
Bla_g	:	NHDSGVGIYAPDAEAYTVFAD	LFDPPIEDYHGGFKKTDKHP	PKDWGDVDTLGNLDPAGEY	:	119		
Plo_i_1	:	NLHSGVGIYAPDAEAYVVFAD	LFDPPIEDYHNGFKKTDKHP	PKNWGDVDTLGNLDPAGEY	:	118		
Der_p_20	:	NLDSGVGIYAPDAESYTFELF	DPVIEDYHKGFKPTDKHP	QTDGVDNTLCNVDPNNEE	:	119		
Lit_v_2	:	NLDSGVGIYAPDAEAYTLFAP	LFDPPIEDYHVGFKQTDKHP	NKDFGDVNSFVNVDPECKE	:	119		
Hom_g	:	NLDSGVGIYAPDAEAYSLEAP	LFDPPIEDYHKGFKQTDKHP	AKDFGDVSKFINVDPECKE	:	119		
		N dsGVG6YAPDAEaY 6Fa	LFDP6IEDYH GFK TDKHP	k15GDV N6DP g 5				
		*	140	*	160	*	180	
Per_a_9	:	IISTRVRCGRSMQGYPFNPCLTEA	QYKEMEDKVSSTLSGLEAELKGQFY	PLTGMTKEVQQ	:	179		
Bla_g	:	IISTRVRCGRSMQGYPFNPCLTEA	QYKEMEDKVSSTLSGLEEGELKGQFY	PLTGMTKEVQQ	:	179		
Plo_i_1	:	VVSTRVRCGRSMQGYPFNPCLTEA	QYKEMEEKVSSTLSGLEEGELKG	TFPLTGMSKEBQQ	:	178		
Der_p_20	:	VISTRVRCGRSLQGYPFNPCLTEA	QYKEMEEKVKGQLNSFEGELKG	TYYPPLTGMSKEBQQ	:	179		
Lit_v_2	:	VISTRVRCGRSLQGYPFNPCLTES	QYKEMEAQVSSTLSGLEEGELKG	TYYPPLTGMSKEVQQ	:	179		
Hom_g	:	VISTRVRCGRSMQGYPFNPCLTEA	QYKEMEEKVSSTLSGLEEGELKGSY	FPLTGMTKEVQQ	:	179		
		66STRVRCGRS62GYPFNPCLTEa	QYKEME KVsstLs lEgELKG	55PLtGM Ke QQ				
		*	200	*	220	*	240	
Per_a_9	:	KLIDDHFLFKEGDRFLQANACRF	WPTGRGIYHNDAKTFLVWCNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	239		
Bla_g	:	KLIDDHFLFKEGDRFLQANACRF	WPTGRGIYHNDAKTFLVWCNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	239		
Plo_i_1	:	QLIDDHFLFKEGDRFLQANACRF	WPSGRGIYHNENKTFLVWCNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	238		
Der_p_20	:	QLIDDHFLFKEGDRFLQANACRF	WPVGRGIFHNDNKTFLIWWNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	239		
Lit_v_2	:	KLIDDHFLFKEGDRFLQANACRY	WPAGRGIYHNDNKTFLVWVNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	239		
Hom_g	:	KLIDDHFLFKEGDRFLQANACRY	WPAGRGIYHNDNKTFLVWVNEED	HRLRIISMQMGDDL	:	239		
		LIDDHFLFKEGDRFLQaANACR5WP	GRGI5HNd KTFL6W	NEEdHLR6ISMQmGGDL				
		*	260	*	280	*	300	
Per_a_9	:	GQVYRRLVTA VNDIEKRIPFS	SHDDRDLGFLTF CPTNLGTTVR	ASVHIKVPKLAADKAKLEE	:	299		
Bla_g	:	GQVYRRLVTA VNDIEKRVPF	SHDDRDLGFLTF CPTNLGTTVR	ASVRIKVPKLAADKKLEE	:	299		
Plo_i_1	:	KQVYKRLVRCVNDIAKRIPFS	SHNERDLGFLTF CPTNLGTTVR	ASVHIKLPKLAADKAKLEE	:	298		
Der_p_20	:	KQVFRLRLNGVNHIEKKLP	FSRDDRDLGFLTF CPTNLGTTIR	ASVHIKLPKLAADRKLEE	:	299		
Lit_v_2	:	GQVFRRLTS AVNIEKRIPFS	SHDDRDLGFLTF CPTNLGTTVR	ASVHIKLPKLAANREKLEE	:	299		
Hom_g	:	GQVYRRLVSA VNDIEKRVPF	SHDDRDLGFLTF CPTNLGTTVR	ASVHIKLPKLAANREKLEE	:	299		
		QV5 RL VN lE46PFSh dRLGFLTF	CPTNLGTT6RASVhIK6PKLAA14	kLEE				
		*	320	*	340	*		
Per_a_9	:	VACKYNLQVRGTRGEHTEAEGG	VYDISNKR RMGLTEYDAVK	EMNDGIAELIKLESSL	:	356		
Bla_g	:	VACKYNLQVRGTRGEHTEAEGG	VYDISNKR RMGLTEYDAVK	GMNDGIAELIKIESSL	:	356		
Plo_i_1	:	VASKYHLQVRGTRGEHTEAEGG	VYDISNKR RMGLTEYDAVK	EMYDGI AELIKIEKSL	:	355		
Der_p_20	:	VACKYNLQVRGTAGEHTESVGG	VYDISNKR RMGLTEYQAVK	EMODGILELIKIEKSM	:	356		
Lit_v_2	:	VACKYNLQVRGTRGEHTEAEGG	IYDISNKR RMGLTEYQAVK	EMODGILELIKIEKEM	:	356		
Hom_g	:	VAAKESLQVRGTRGEHTEAEGG	IYDISNKR RMGLTEYQAVK	EMODGILELIKIEKEM	:	356		
		VA K5 LQVRGTrGEHTEaEGG6Y	DISNKR RMGLTE5 AVKeM	DGI ELIK6E 6				

Abb. 3-67: Alignment von Per a 9 mit weiteren Arginin-Kinasen aus Invertebraten.

Bei den gelb hinterlegten Sequenzabschnitten handelte es sich um die mittels ESI-Q-TOF bestimmten Peptidfragmente. Diese Fragmente lieferten eine 37%ige Sequenzabdeckung von Per a 9. Die Proteine wurden mit ClustalX 1.83 align und mit Hilfe von GeneDoc 2.6 ausgewertet. Diese Gruppe zeigte eine 74% bis 97% AS-Sequenzidentität. Per a 9 wies zur Arginin-Kinase von *Blattella germanica* eine 97%ige Sequenzidentität auf.

Für das Alignment wurden folgende Sequenzen verwendet: Per_a_9 = AAT77152 Arginin-Kinase aus *Periplaneta americana*, Bla_g = ABC86902, Arginin-Kinase aus *Blattella germanica*, Plo_i_1 = Q95PM9, Arginin-Kinase aus *Plodia interpunctella*, Der_p_20 = AAP57094, Arginin-Kinase aus *Dermatophagoides pteronyssinus*, Lit_v_2 = ABI98020, Arginin-Kinase aus *Litopenaeus vannamei*, Hom_g = CAA48654, Arginin-Kinase aus *Homarus gammarus*.

Eine Übersicht über die von GeneDoc ermittelten AS-Identitäten und -Ähnlichkeiten sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

	Per a 9	Bla g	Plo i 1	Der p 20	Lit v 2	Hom g
Per a 9	356 0 0	97% 98% 0%	87% 94% 0%	74% 85% 0%	82% 91% 0%	82% 91% 0%
Bla g	346 350 0	356 0 0	86% 93% 0%	74% 85% 0%	82% 91% 0%	81% 91% 0%
Plo i 1	313 336 1	308 333 1	355 0 0	75% 86% 0%	80% 91% 0%	81% 91% 0%
Der p 20	266 306 2	266 306 2	268 309 1	356 0 0	78% 88% 0%	75% 87% 0%
Lit v 2	296 327 2	293 327 2	288 326 1	280 316 0	356 0 0	91% 96% 0%
Hom g	293 326 2	291 325 2	291 327 1	268 313 0	324 342 0	356 0 0

Tabelle 3-7: Aminosäure-Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten aus dem Arginin-Kinase-Alignment (Abb. 3-67).

Die Auftragung entsprach der GeneDoc-Auswertung: jeweils die erste Zeile stellte den Anteil der identischen Aminosäuren dar, die zweite Zeile den Anteil der isofunktionellen Aminosäuren und die dritte Zeile jeweils den Anteil der Lücken im Alignment. Bei den grau hinterlegten Feldern wurden die Angaben in Form der Aminosäureanzahl und bei den weiß hinterlegten Zeilen in Prozent angegeben.

Innerhalb des dargestellten Alignments waren zahlreiche Sequenzabschnitte bei den Invertebraten Arginin-Kinasen konserviert, sodass diese Gruppe mit 74-97% eine sehr hohe AS-Sequenzidentität aufwies. Die höchste Übereinstimmung mit 97% Identität und 98% Ähnlichkeit zeigten dabei die Arginin-Kinasen der beiden Schabenspezies *Periplaneta americana* und *Blattella germanica*. Durch diese hohen Sequenzidentitäten muss mit Kreuzreaktionen zwischen den Arginin-Kinasen aus Invertebraten gerechnet werden (s. Abschnitt 4.2.3).

Die Sequenzanalyse von Per a 9 mit „Antheprot2000“ (Abschnitt 2.14.2) lieferte für das aus 356 AS-bestehende Protein ein errechnetes Molekulargewicht von 39.74 kDa, einen isoelektrischen Punkt von 5.87 und einen spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von 0.92 [l/(g*cm)]. Dieser Extinktionskoeffizient wurde als Grundlage für die Bestimmungen der Proteinkonzentrationen anhand von Absorptionmessungen von Per a 9 verwendet. Insgesamt stellten die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (13), Tryptophan (3) und

Phenylalanin (16) lediglich 8.9% der Gesamtaminosäuren (356) dar. Dieser Anteil entspricht dem eines durchschnittlichen Proteins [319].

3.4.2 Proteinausbeute

Mit der in Abschnitt 3.2 durchgeführten Reinigung der Schabenextrakte, konnte Per a 9 sowohl nach Protokoll 2 (Abschnitt 3.2.2) mit einer Ausbeute von 2.5 mg Per a 9 aus 40 ml Crude-Extrakt (CE, 39 mg/ml) als auch nach Protokoll 3 (Abschnitt 3.2.3) mit einer Proteinausbeute von 6.1 mg Per a 9 aus 18 ml CE isoliert werden. Somit wurde nach Protokoll 2 für Per a 9 eine Ausbeute von 0.16% (w/w) und nach Protokoll 3 eine Ausbeute von 0.87% (w/w) erreicht. Aufgrund der signifikant höheren Ausbeute ist zukünftig trotz der längeren Dauer die Isolierung von Per a 9 aus dem Crude-Extrakt nach Protokoll 3 zu empfehlen.

3.4.3 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht von denaturiertem Per a 9 wurde mittels SDS-PAGE mit 39 ± 1 kDa bestimmt (Abb. 3-68). Dieses deckte sich außerordentlich gut mit dem aus der Sequenz errechneten Molekulargewicht von 39.74 kDa.

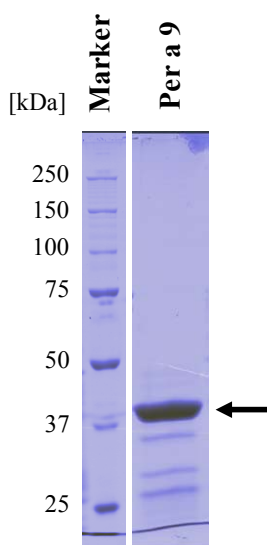


Abb. 3-68: Molekulargewichtsbestimmung von denaturiertem Per a 9 auf einer 7.5%igen SDS-PAGE.

Für die softwaregestützte Molekulargewichtsbestimmung wurde Quantity One verwendet. Auf dieser denaturierenden PAGE wurden $3.2 \mu\text{g}$ Per a 9 aufgetragen. Bei der mit einem Pfeil gekennzeichneten Proteinhauptbande handelte es sich um Per a 9 mit einem Molekulargewicht von 39 ± 1 kDa. Bei der zusätzlichen Proteinbande bei 27 kDa handelte es sich um proteolytisch gespaltenes Per a 9, welches ebenfalls massenspektrometrisch identifiziert wurde. Die Proteinbanden bei 35 kDa und 30 kDa könnten ebenfalls auf Per a 9-Fragmente oder eventuell auf Fremdproteine zurückzuführen sein.

Bei der zusätzlichen Proteinbande bei 27 kDa handelte es sich um proteolytisch gespaltenes Per a 9, welches ebenfalls massenspektrometrisch identifiziert wurde. Die zugehörigen Daten sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.2.4). Die Proteinbanden bei 35 kDa und 30 kDa könnten ebenfalls auf Per a 9-Fragmente oder eventuell auf Fremdproteine zurückzuführen sein (Abb. 3-68).

Für die Überprüfung der Oligomerisierung der Arginin-Kinase, wurde das native Molekulargewicht von Per a 9 im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt. Hierfür wurden 0.5 mg/ml Per a 9 in Schabenpuffer D bei vier Geschwindigkeiten (20000 rpm, 25000 rpm, 30000 rpm und 35000 rpm) und 20°C für je 24 h zentrifugiert. Wie im Abschnitt 2.8.2 dargelegt, wurden die Konzentrationsverläufe mit dem Global Fit-Algorithmus analysiert und ausgewertet. In Abb. 3-69 A wurden von einer Probenzelle („channel“) die Messdaten (Punkte) in Überlagerung mit den Fit-Daten (Linien) und in der Teilabbildung B die Abweichungen der Berechnungen von den Originaldaten („residuals“) dargestellt. Die Standardabweichung (σ) für diesen Fit betrug $9.0377 \cdot 10^{-3}$ und die Varianz (σ^2) $8.168 \cdot 10^{-5}$.

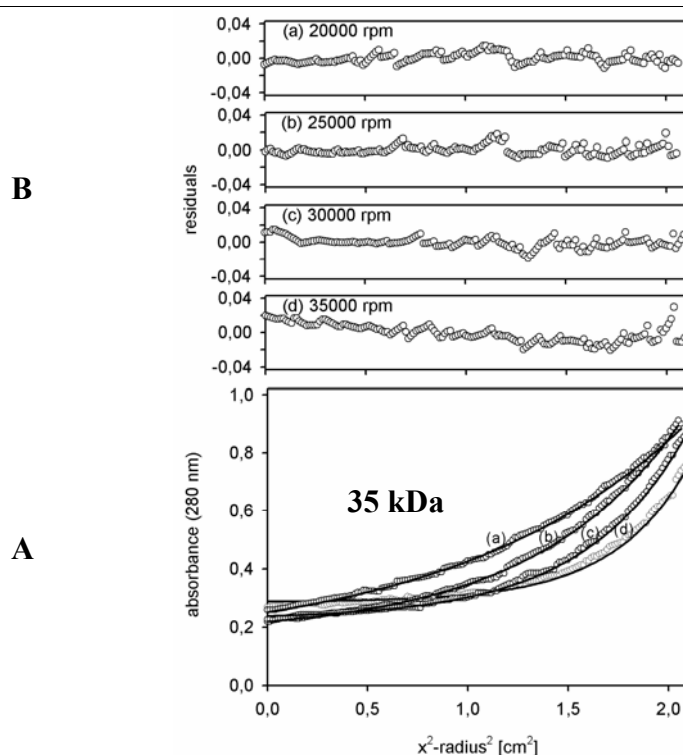


Abb. 3-69: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Per a 9 im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge, aufgenommen im Absorptionsmodus.

Per a 9 wurde in Schabenpuffer D für je 24 h bei 20000 rpm, 25000 rpm, 30000 rpm und 35000 rpm bei 20°C einem Gleichgewichtslauf unterzogen. Nach 24 h wurde die Absorptionsverteilung in der Zelle gemessen. Als Überprüfung für die Einstellung des Gleichgewichts wurden die Proben zuvor jeweils nach 23 h gemessen (Daten in der Abbildung nicht dargestellt). Die gemessenen Daten wurden mit dem Global Fit-Algorithmus der „UltraScan“-Software ausgewertet.

A) Dargestellt wurde die Absorption der Proben bei 280 nm in Abhängigkeit zum relativen Radius (x^2 -radius 2) bei (a) 20000 rpm, (b) 25000 rpm, (c) 30000 rpm, (d) 35000 rpm. Die Messdaten wurden als Punkte und der Fit als Linie dargestellt.

Die Originaldaten wurden durch die Simulation sehr gut beschrieben.

B) Dargestellt als „residuals“ wurde die Abweichung der Simulation von den Messdaten in Abhängigkeit zum relativen Radius. Die Standardabweichung (σ) für diesen Fit war $9.0377 \cdot 10^{-3}$ und die Varianz (σ^2) betrug $8.168 \cdot 10^{-5}$.

Diese Analyse ergab für Per a 9 ein natives Molekulargewicht von 35 kDa.

Diese Analyse ergab für Per a 9 ein natives Molekulargewicht von 35 kDa. In Ermangelung weiterer nativer Molekulargewichtsbestimmungen bzw. eines Referenzproteins mit bekanntem nativem Molekulargewicht, konnte für diese Bestimmung keine Standardabweichung angegeben werden. Allerdings ergab der Vergleich der Molekulargewichte von nativer und denaturierter Form sowie aus der Sequenz, dass das Molekulargewicht der nativen Form offenbar zu gering ermittelt wurde. Diese Abweichung war wahrscheinlich auf das Vorhandensein der kleineren Peptidfragmente in der Probe (Abb. 3-68) und der Annahme eines Einkomponentensystems beim Global Fit-Algorithmus zurückzuführen. Nichts desto Trotz belegten diese Versuche eindeutig, dass es sich bei der isolierten Arginin-Kinase um ein monomeres Protein handelte.

3.4.4 Proteingestalt

Um die Proteingestalt weiter charakterisieren zu können, wurden die Sedimentationseigenschaften in der analytischen Ultrazentrifuge (Abb. 3-70) und die Molekülgröße mittels dynamischer Lichtstreuung betrachtet (Abb. 3-71).

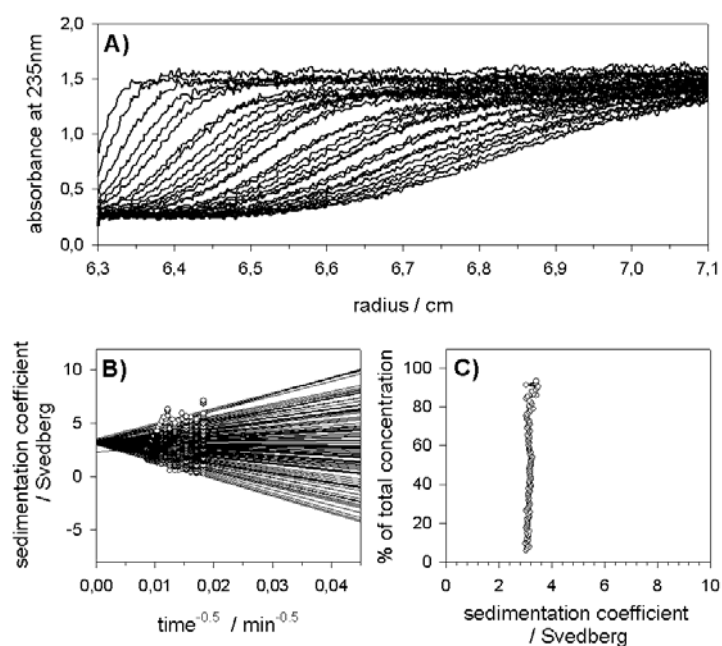


Abb. 3-70: Sedimentationslauf von Per a 9 (0.5 mg/ml) in Schabenpuffer D im Absorptionsmodus bei 235 nm, 42000 rpm und 20°C.

A) Dargestellt wurden die Rohdaten der einzelnen Sedimentationsmessungen von Per a 9. Die Sedimentationsrichtung war von links nach rechts. Mit fortschreitender Sedimentation war zu beobachten, dass die Sedimentationsfront aufgrund der stärker werdenden Rückdiffusion abflachte.

B) Dargestellt wurde die Extrapolation der aus den Rohdaten erhaltenen apparenten Sedimentationskoeffizienten nach der „enhanced van Holde-Weisheit“-Methode. Die Extrapolation ergab einen korrigierten Sedimentationskoeffizienten von 3 S ($S_{20,W}$).

C) Dargestellt wurde der Verteilungsplot der Sedimentationskoeffizienten von Per a 9. Der Graph ließ neben der eindeutigen Homogenität der Probe zusätzlich erkennen, dass für dieses Protein eine konzentrationsabhängige Sedimentation sowie eine Aggregation während der Sedimentation ausgeschlossen werden konnte.

Für die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurden 0.5 mg/ml Per a 9 in Schabepuffer D bei 42000 rpm und 20°C in der analytischen Ultrazentrifuge sedimentiert. Die Auswertung erfolgte nach der „enhanced van Holde-Weischet“-Methode. Die Messdaten, einschließlich Auswertung, sind in Abb. 3-70 dargestellt.

Insgesamt trat im Laufe der Sedimentation eine immer stärkere Rückdiffusion auf, die sich sowohl im Abflachen der Sedimentationsfronten als auch in der Spreizung des „Fächers“ im Extrapolationsplot bemerkbar machte (Abb. 3-70 A, B). Dennoch konnte der korrigierte Sedimentationskoeffizient ($S_{20,w}$) eindeutig mit 3 S bestimmt werden und der Verteilungsplot ließ zusätzlich den Rückschluss zu, dass eine monodisperse Probe vorlag, die weder ausgesprochen konzentrationsabhängig sedimentierte, noch während des Laufs aggregierte (Abb. 3-70 C).

Für die Bestimmung der Moleküldimensionen wurde in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) 0.5 mg/ml Per a 9 in Schabepuffer D im Messmodus „Size“ vermessen (Abb. 3-71).

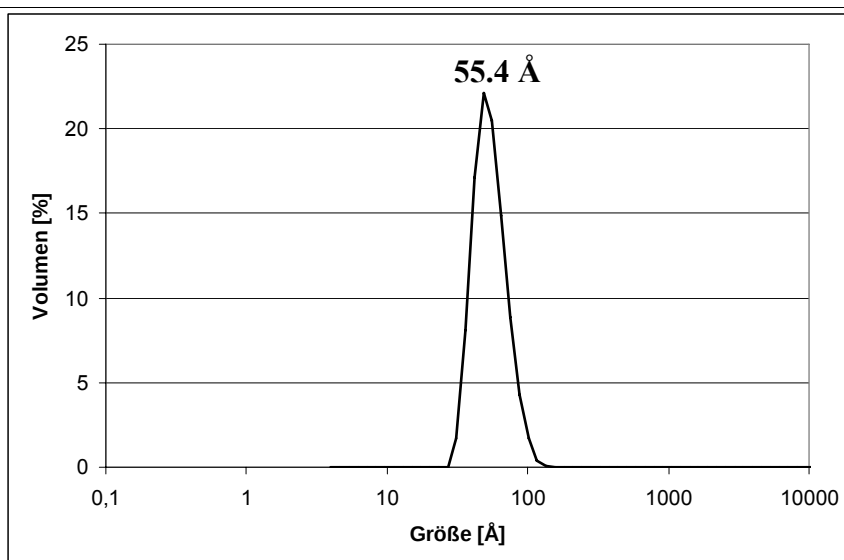


Abb. 3-71: Größenverteilung von Per a 9 in Abhängigkeit zum Volumen in der dynamischen Lichtstreuung.

Hierzu wurden 0.5 mg/ml Per a 9 in Schabepuffer D bei 20°C im Messtyp „Size“ vermessen und für die Auswertung die standardmäßige Viskosität von Wasser bei 20°C eingesetzt. Die Streudaten lieferten eine Größenverteilung in Abhängigkeit zur Menge von 31.2 Å bis 135 Å, dessen Durchschnittswert bei 55.4 Å lag.

Für die Auswertung wurde die Viskosität von Wasser bei 20°C berücksichtigt. Die Größenverteilung in Abhängigkeit zur Menge ergab dabei für Per a 9 eine Größenverteilung von 31.2 Å bis 135 Å mit einem durchschnittlichen Größendurchmesser von 55.4 Å (Abb. 3-71). Die einzelnen Details dieser Messung sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.4).

3.4.5 Disulfidbrücken

Aus der Sequenzanalyse von Per a 9 ging hervor, dass in dem Protein fünf Cysteine vorhanden waren. Um zu überprüfen, inwieweit diese Cysteine im Protein tatsächlich Disulfidbrücken ausbildeten, wurde reduziertes (+) und nicht-reduziertes (-) Per a 9 auf denaturierenden SDS-Gelen im Hinblick auf deren elektrophoretische Beweglichkeit analysiert (Abb. 3-72). Für die reduzierte Probe wurde dabei Denaturierungspuffer verwendet, wohingegen für die nichtreduzierte Probe der Anteil an β -Mercaptoethanol im Denaturierungspuffer durch Wasser ersetzt wurde.

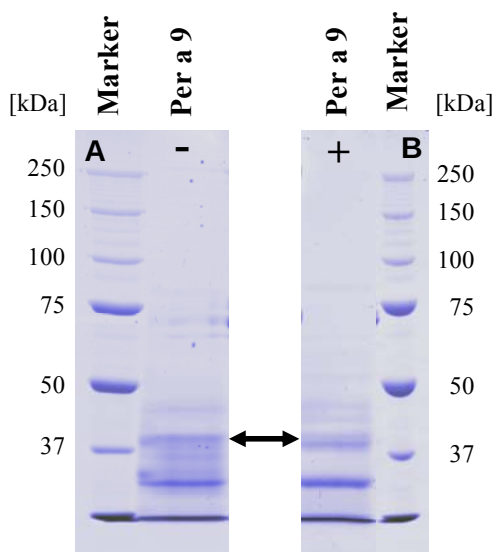


Abb. 3-72: Analyse von Disulfidbrücken bei Per a 9 auf einer 7.5%igen SDS-PAGE in nicht-reduzierter (-) und reduzierter (+) Form.

Die Proben wurden mit und ohne β -Mercaptoethanol versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Pro Bande wurden 50.7 μ g Per a 9 auf zwei getrennten Gelen aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit der Coomassie-Färbung.

A) Per a 9 in Abwesenheit von β -Mercaptoethanol.

B) Per a 9 in Gegenwart von β -Mercaptoethanol.

Per a 9 zeigte in Abhängigkeit zum Redoxzustand keinerlei Laufunterschied auf der SDS-PAGE. Somit bildeten die fünf Cysteine in Per a 9 erstaunlicher Weise keine intramolekularen Disulfidbrücken aus. Zusätzlich war auf beiden Gelen der für Per a 9 typische Lagerungseffekt in Form von mindestens einer zusätzlichen Proteinbande bei ca. 31 kDa zu beobachten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei um proteolytisch gespaltenes Per a 9.

Diese Gele zeigten, dass das Laufverhalten von Per a 9 auf der SDS-PAGE unabhängig vom Redoxzustand war (Abb. 3-72). Somit bilden die fünf Cysteine in Per a 9 erstaunlicher Weise keine intramolekularen Disulfidbrücken aus. Intermolekulare Disulfidbrücken konnten aufgrund der monomeren Struktur bereits im Vorfeld ausgeschlossen werden.

Zudem war auf diesen Gelen deutlich zu erkennen, dass Per a 9 auf beiden SDS-Gelen den gleichen Lagerungseffekt zeigte (Abb. 3-72). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass im Verlauf der Per a 9-Lagerung zur 39 kDa-Bande eine immer stärker werdende Proteinbande

bei ca. 31 kDa sowie weitere niedermolekulare Banden auftraten. Bei dieser Bande handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls um proteolytisch gespaltenes Per a 9, wie bereits zuvor für die 27 kDa-Bande gezeigt wurde (Abschnitt 8.2.4). Somit schienen Proteasen in der Lösung das Per a 9 sukzessive proteolytisch zu verdauen, wodurch auch die deutliche Diskrepanz zwischen aufgetragener Proteinmenge und Bandenstärke zu erklären war (Abb. 3-72).

3.4.6 Absorptionsspektren

Um zu überprüfen, ob an Per a 9 Cofaktoren gebunden hatten, wurde die Absorption von Per a 9 im UV/Vis-Spektrometer untersucht (Abb. 3-73).

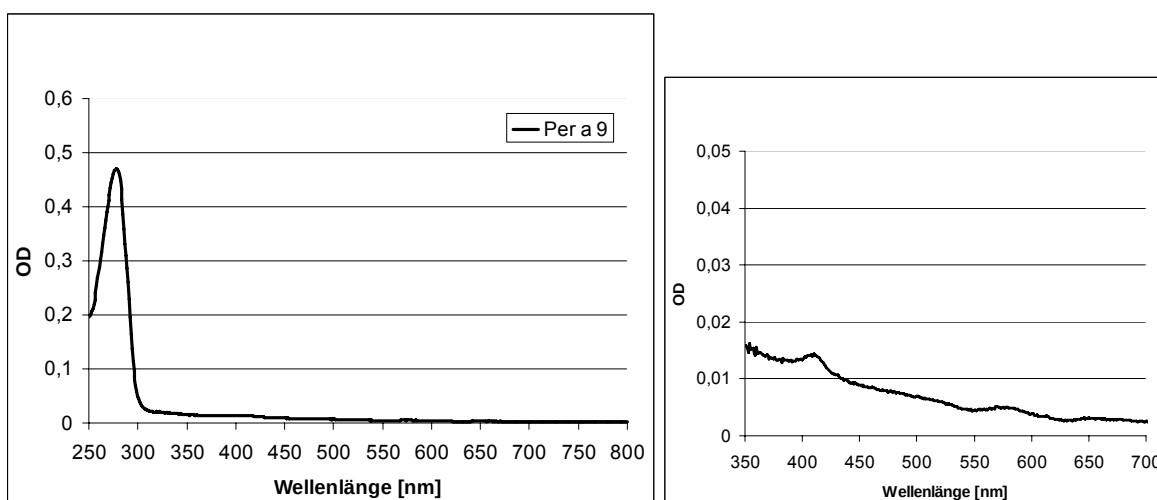


Abb. 3-73: Absorptionsspektrum von Per a 9 in Schabepuffer D.

Das von 250 nm bis 800 nm aufgenommene Per a 9 UV/Vis-Spektrum wurde gegen die Pufferabsorption korrigiert. Im rechten Spektrum wurde der Wellenlängenbereich von 350 nm bis 700 nm vergrößert dargestellt, um die zusätzlichen Absorptionsmaxima bei 408 nm und 575 nm hervorzuheben. Hierbei musste jedoch berücksichtigt werden, dass deren Absorption um 97% bzw. 99% geringer ist als die bei 280 nm. Da diese Maxima in der Literatur für Per a 9 allerdings nicht beschrieben wurde, wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei wahrscheinlich um die Absorption von Fremdstoffen handelte.

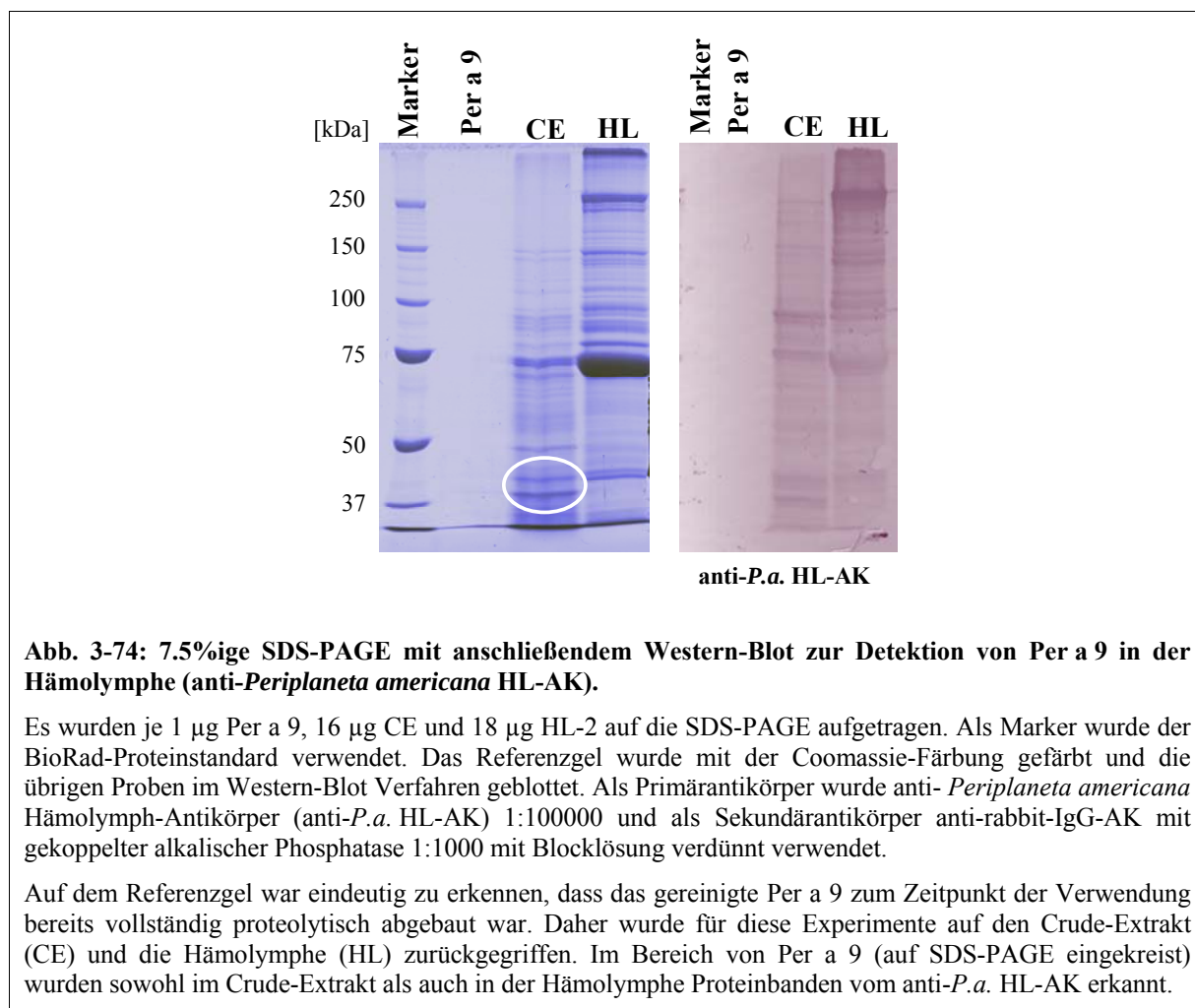
In diesen Absorptionsspektren wies Per a 9 das für aromatische Aminosäuren typische Absorptionsmaximum bei 278 nm auf (Abb. 3-72). Zusätzlich zu diesem ausgeprägten Peak wurden zwei, jedoch sehr schwach ausgeprägte Maxima bei 408 nm und 575 nm im Absorptionsspektrum beobachtet (Abb. 3-72 rechts). Diese Maxima traten unabhängig vom Reinigungsprotokoll mit Per a 9 auf und konnten nicht genauer definiert werden. Da diese Maxima in Zusammenhang mit Per a 9 in der Literatur allerdings nicht beschrieben wurden, handelte es sich dabei wahrscheinlich eher um eine Verunreinigung mit Fremdstoffen als um spezifisch an Per a 9 gebundene Cofaktoren.

3.4.7 Vorkommen in der Hämolymphe

In der Literatur wurde bisher lediglich die Reinigung von Per a 9 aus einem Crude-Extrakt beschrieben. Da in einem solchen Extrakt stets eine Vielzahl an Proteinen und Proteasen vorhanden sind, wäre eine Gewinnung von Per a 9 aus einem Hämolymphextrakt sinnvoll.

Um zu überprüfen, ob Per a 9 überhaupt in der Hämolymphe vertreten war, wurden Crude-Extrakt und Hämolymp-Extrakt im Western-Blot-Verfahren untersucht. Da es im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich war, polyklonale Antikörper gegen Per a 9 zu generieren, wurde in diesen Vorexperimenten die immunologische Detektion mittels anti-*Periplaneta americana* Hämolymp-Antikörper (anti-*P.a.* HL-AK) vorgenommen.

Hierzu wurden die Proben auf einer 7.5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend geblottet und über indirekte Antikörpermarkierung detektiert. Als Kontrolle der Proteinbanden wurden diese auf einem identischen Referenzgel aufgetragen und mit der Coomassie-Färbung angefärbt (Abb. 3-74).



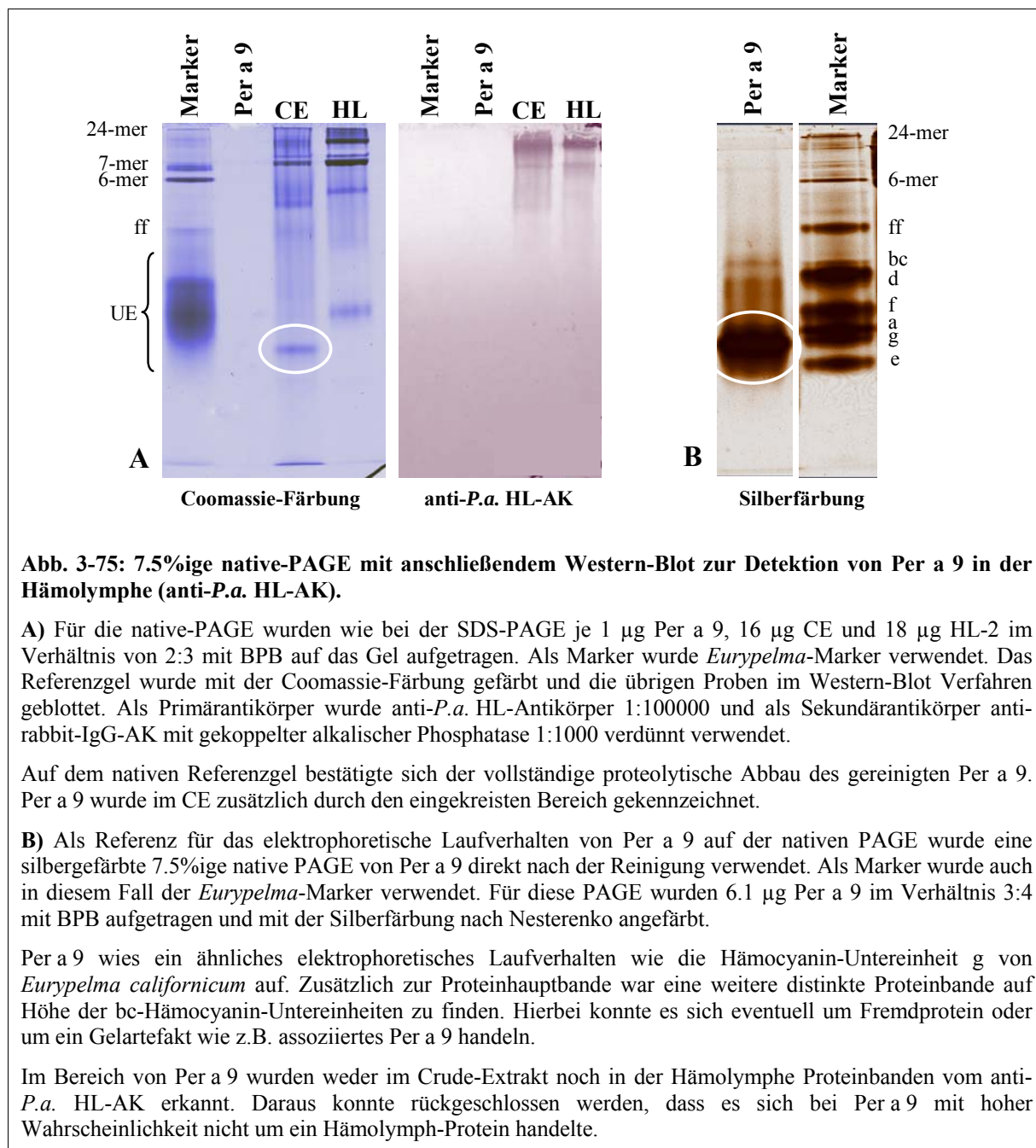
Das Referenzgel zeigte eindeutig, dass die Per a 9 Probe zum Zeitpunkt dieser Experimente bereits vollständig proteolytisch verdaut war. Offensichtlich war es über die Reinigungsprozeduren nicht gelungen, Proteasen aus dem Crude-Extrakt vollständig abzutrennen. Ein

Eintrag an Proteasen wäre auch von Außen möglich gewesen, war jedoch unter Berücksichtigung der übrigen intakt isolierten Proben weniger wahrscheinlich. Somit konnten diese Untersuchungen über das Vorkommen von Per a 9 in der Hämolymphe lediglich an Hämolymp- und Crude-Extrakten stattfinden, indem das Laufverhalten von Per a 9 auf SDS-Gelen und nativer PAGE berücksichtigt wurde.

Für eine eindeutige Zuordnung des Molekulargewichts auf dem Western-Blot von auf SDS-Gelen getrennten Proben wurden der BioRad-Proteinstandard nach der Ponceau S-Färbung manuell markiert und das Molekulargewicht der detektierten Proteinbanden mit Quantity One ausgewertet.

Daraus ergab sich, dass sowohl in der HL als auch im CE eine Proteinbande bei 39 kDa von den anti-*P.a.* HL-Antikörpern erkannt wurde (Abb. 3-74). Da jedoch ungereinigte Extrakte verwendet wurden, bei denen zu erwarten war, dass bei einem Molekulargewicht unterschiedliche Proteine vorhanden waren, konnte es sich bei dieser Reaktion auch um ein falsch-positives Ergebnis handeln. Daher wurde das gleiche Experiment mit nativ aufgetrennten Proben wiederholt (Abb. 3-75).

Da auch auf den nativen Gelen -wie bereits bei den SDS-Gelen beobachtet (Abb. 3-74)- die Per a 9-Probe zum Zeitpunkt der Verwendung proteolytisch verdaut war, wurde als Referenz für das elektrophoretische Laufverhalten von Per a 9 auf der nativen PAGE eine silbergefärbte native PAGE direkt nach der Aufreinigung von Per a 9 herangezogen. In Ermangelung eines geeigneten Proteinstandards wurde auch für Per a 9 auf den *Eurypelma*-Marker zurückgegriffen. Dieser ermöglichte keinerlei Aussage über die Oligomerisierung oder Eigenschaften von Per a 9, ermöglichte aber über den Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit auf den nativen Gelen eine eindeutige Zuordnung von Per a 9 in den Extrakten (Abb. 3-75, Kreis).



Auf dem Coomassie-gefärbten Referenzgel war eindeutig zu erkennen, dass die Per a 9-Bande lediglich im Crude-Extrakt angefärbt wurde (Abb. 3-75). Und auch der anti-*P.a.* HL-AK erkannte keine Bande auf Höhe der Per a 9-Proteine, weder in der HL noch im CE (Abb. 3-75). Das erfolgreiche Blotten der Per a 9-Bande wurde zuvor durch die Ponceau S-Färbung bestätigt (Abbildung nicht gezeigt). Somit handelte es sich bei der Bindung des anti-*P.a.* HL-AK im Western-Blot der denaturierten Proteine wahrscheinlich um ein falsch-positives Ergebnis (Abb. 3-75).

Diese Ergebnisse ließen den Rückschluss zu, dass es sich bei Per a 9 um ein Crude-Extrakt Protein handelte, da auch eine Detektion mit dem HL-spezifischen Antikörper nicht gelang. Somit ist ausgehend von einem Hämolymphe-Extrakt eine Per a 9-Reinigung nicht möglich.

Für eine endgültigen Bestätigung, dass Per a 9 auch nicht in sehr geringen Konzentrationen in der Hämolymphe vorhanden ist, sollte eine Analyse der mit (polyklonalen) anti-Per a 9-Antikörpern angeschlossen werden.

3.4.8 Ähnlichkeit zu Per a 3-Proteinen

In der allergologischen Praxis spielen Kreuzreaktionen von Allergenen eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden die Ähnlichkeiten -und damit eng verbunden- die Kreuzreaktionen zwischen Per a 9 und Per a 3-Proteinen untersucht (Abb. 3-76).

Hierzu wurden erneut Hämolymphe- und Crude-Extrakte in denaturierter (Abb. 3-76 A) und nativer Form (Abb. 3-76 B) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die Bindung zweier gegen die Per a 3-Isoformen gerichtete Antikörper (anti-Per a 3.03-AK und anti-P II-AK) im Western-Blot Verfahren analysiert (Abb. 3-76).

Die Bindung des anti-Per a 3.03-AK und des anti-P II-AK an die Per a 3-Isoformen wurde in Abb. 3-76 mit * gekennzeichnet und zeigte erwartungsgemäß die stärkste Bandenfärbung. Die Analyse dieser AK-Bindung an die Per a 3-Isoformen wurde in Abschnitt 3.3.2.6 ausführlich dargelegt. Bei den detektierten Proteinbanden bei 75 kDa in der Markerspur und in der Spur von Per a 9 handelte es sich wahrscheinlich um P II, welches aufgrund eines Gelartefaktes in die Nachbarbanden mit eingewandert war (Abb. 3-76 A, mit Pfeil gekennzeichnet). Zusätzlich zeigten diese Western-Blot-Experimente, dass beide Antikörper offensichtlich auch denaturierte Proteine in der Größenordnung von Per a 9 erkennen konnten (Abb. 3-76 A, mit Pfeil gekennzeichnet). Da zum Zeitpunkt dieser Versuche die gereinigte Per a 9 Probe vollständig proteolytisch verdaut war, konnte lediglich mit den Extrakten gearbeitet werden. Bei diesen bestand die Problematik, dass bei 39 kDa zusätzlich zu Per a 9 weitere Proteine vorhanden sein konnten.

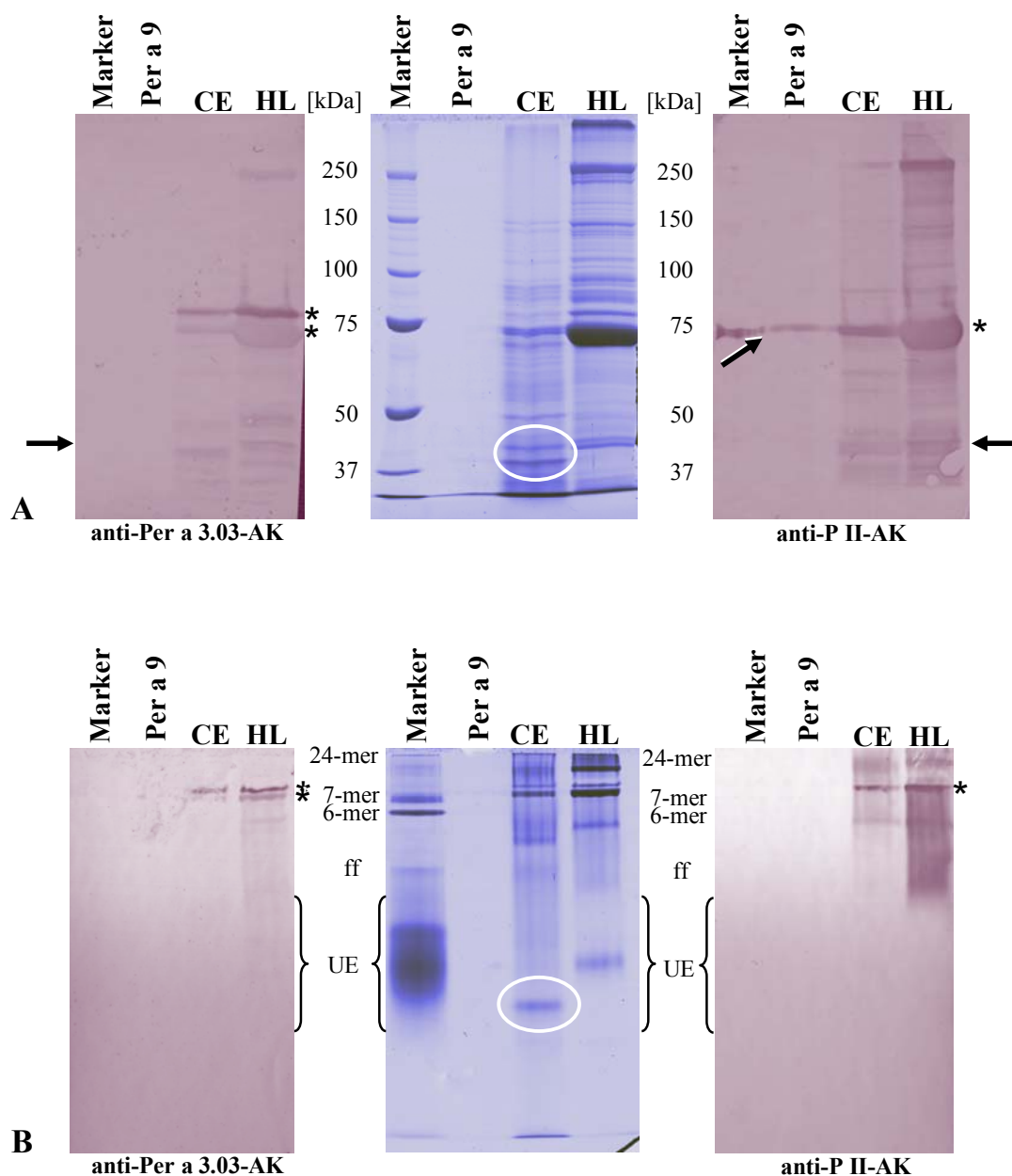


Abb. 3-76: SDS-PAGE (A) und native PAGE (B) mit anschließendem Western-Blot zur Detektion von Per a 9 in der Hämolymphe.

A) 7.5%ige SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot. Für die SDS-PAGE wurden je 1 µg Per a 9, 16 µg CE und 18 µg HL-2 auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der BioRad-Proteinstandard verwendet. Das Referenzgel wurde mit Coomassie gefärbt, die übrigen Proben im Western-Blot-Verfahren geblottet. Als Primärantikörper wurden anti-Per a 3.03-AK bzw. anti-P II-AK 1:100000 und als Sekundärantikörper anti-rabbit-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase 1:1000 verdünnt verwendet. Aufgrund eines Gelartefaktes musste P II in die Spuren von Per a 9 und dem Marker eingewandert sein, da dort eine deutliche anti-P II-AK-Bindung beobachtet wurde (mit Pfeil gekennzeichnet). Offensichtlich können beide AK auch denaturierte Proben in der Größenordnung von Per a 9 erkennen (mit Pfeilen gekennzeichnet).

B) 7.5%ige native PAGE (pH 8.8) mit anschließendem Western-Blot. Für die native PAGE wurden wie bei der SDS-PAGE je 1 µg Per a 9, 16 µg CE und 18 µg HL-2 im Verhältnis von 2:3 mit BPB auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde *Eurypelma*-Marker verwendet. Die Referenzgele wurden mit der Coomassie-Färbung gefärbt und die übrigen Proben im Western-Blot Verfahren geblottet. Als Primärantikörper wurden anti-Per a 3.03-AK bzw. anti-P II-AK 1:100000 und als Sekundärantikörper anti-rabbit-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase 1:1000 mit Blocklösung verdünnt verwendet.

Natives Per a 9 wurde weder vom anti-Per a 3.03-AK noch vom anti-P II-AK erkannt.

Wie erwartet, war auf beiden Gelen die deutlichste Bindung der anti-Per a 3-AK an die Per a 3-Isoformen zu beobachten (mit * gekennzeichnet). Auf den Referenzgelen war wie bereits zuvor zu erkennen, dass das gereinigte Per a 9 zum Zeitpunkt der Verwendung bereits vollständig proteolytisch abgebaut war. Im CE wurde Per a 9 zusätzlich eingekreist gekennzeichnet.

Die Bindung der anti-Per a 3-AK war aufgrund der verwendeten Extrakte an Stelle von gereinigtem Per a 9 nicht eindeutig und sollte daher mit frisch gereinigtem Per a 9 bzw. mit noch zu generierenden anti-Per a 9-AK wiederholt werden.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich daher wie zuvor bei der Detektion mit dem anti-*P.a.* HL-AK im Western-Blot der denaturierten Probe um eine falsch-positive Reaktion, da das Referenzgel eindeutig zeigte, dass bei einer AK-Erkennung von Per a 9 ein Signal höherer Quantität im Crude-Extrakt zu erwarten gewesen wäre als in der Hämolymphe. Bei den AK-Färbungen bei 39 kDa konnte jedoch zwischen CE und HL kein signifikant quantitativer Unterschied festgestellt werden (Abb. 3-76 A).

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass denaturiertes Per a 9 wahrscheinlich nicht von den anti-Per a 3-Antikörpern erkannt wurde und somit Per a 3 und Per a 9 auch keine gemeinsamen linearen Epitope aufwiesen. Zur Absicherung dieser Ergebnisse sollte jedoch ein Western-Blot mit frisch gereinigtem Per a 9 und/oder noch zu generierenden anti-Per a 9-Antikörpern durchgeführt werden.

In nativer Form wurde Per a 9 eindeutig weder vom anti-Per a 3.03-Antikörper noch vom anti-P II-Antikörper erkannt (Abb. 3-76 B). Somit stimmten bei Per a 3 und Per a 9 auch keine diskontinuierlichen Epitope überein, sodass klinisch-relevante Kreuzreaktionen bei den nativen und auch denaturierten Allergenen als unwahrscheinlich einzustufen sind.

3.4.9 Bestimmung der Leukotrienausschüttung durch Stimulation mit Per a 9

Ein wichtiger Punkt für die Einstufung eines Proteins als klinisch relevantes Allergen ist u.a. dessen Fähigkeit, die zweite Phase der Immunantwort einzuleiten, indem es rezeptor-gebundene IgE-Antikörper miteinander kreuzvernetzt und somit z.B. bei Basophilen die Freisetzung von Leukotrienen bewirken kann.

Die Leukotrienausschüttung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] an der Hautklinik des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz von Diplom-Biologin [REDACTED] bestimmt.

Dieser Test wurde an Leukocyten von einem per Radio-Allergen-Sorbent-Test (RAST) gegen *Periplaneta americana*-Extrakt positiv getesteten Probanden mit vier unterschiedlichen Per a 9-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 3-77).

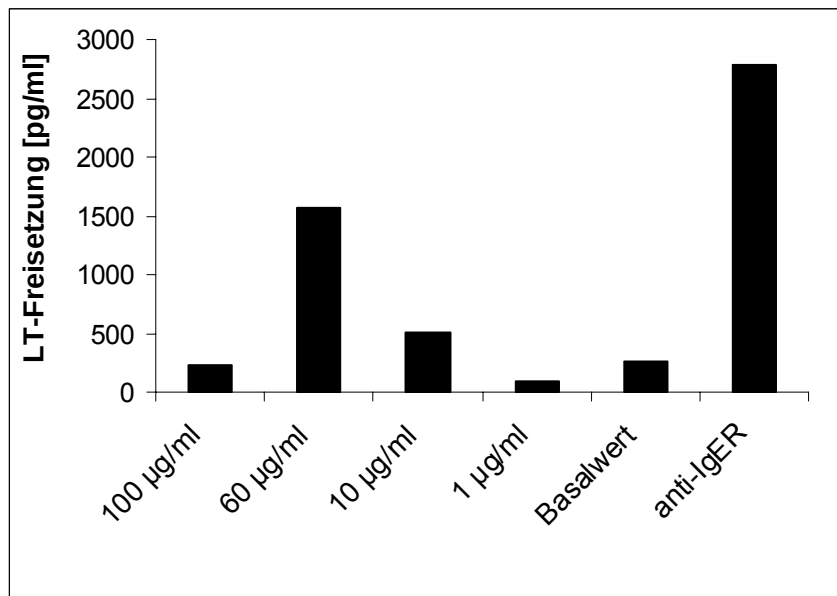


Abb. 3-77: Leukotrien (LT)-Ausschüttung bei einem gegen *Periplaneta americana* sensibilisierten Spender gegenüber Per a 9 in vier unterschiedlichen Konzentrationen.

50 µl Allergen wurden zu 200 µl Leukocytensuspension in einem IL-3 haltigen Stimulationspuffer zugegeben. Die Leukotrienfreisetzung wurde mit dem „CAST-2000 ELISA“ quantifiziert. Als Negativkontrolle diente IL-3-haltiger Stimulationspuffer und als Positivkontrolle anti-IgE-Rezeptor-Antikörper.

Bei einer Konzentration von 1 µg/ml Per a 9 lag die Leukotrien (LT)-Ausschüttung noch unterhalb des Basalwertes. Mit steigender Allergenkonzentration war jedoch ein Anstieg der Leukotrienausschüttung zu verzeichnen. Bei 100 µg/ml Per a 9 wurde eine für Basophile offensichtlich toxische Allergenkonzentration erreicht.

Diese Stichprobe deutete darauf hin, dass es sich bei Per a 9 tatsächlich um ein klinisch relevantes Allergen handelte.

3.4.10 Fazit der Per a 9-Charakterisierung

Bei Per a 9 handelt es sich um eine monomere Arginin-Kinase, die mit 39 kDa aus dem Crude-Extrakt von *Periplaneta americana* isoliert werden konnte. In einer ersten Stichprobe erwies Per a 9 sich als klinisch relevantes Allergen. Es hat offenbar keine linearen und/oder diskontinuierlichen Epitope mit Per a 3 gemeinsam, sodass nicht von Kreuzreaktionen zwischen diesen Allergenen auszugehen ist. Allerdings ist aufgrund der sehr hohen Sequenzidentitäten von Kreuzreaktionen innerhalb der Invertebraten-Arginin-Kinasen auszugehen.

4 DISKUSSION

Durch die ubiquitäre Verbreitung der Amerikanischen Schabe sowie der mit dem Menschen eng verknüpften Lebensweise spielen die Allergene von *Periplaneta americana* für den Menschen eine wichtige Rolle [95, 105]. In dieser Arbeit wurden mit Per a 3 und Per a 9 zwei Allergengruppen aus der Amerikanischen Schabe isoliert und charakterisiert.

Per a 9 ist vor allem aufgrund der Einstufung als Pan-Allergen ein wichtiger Faktor für Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Spezies, wohingegen Per a 3 aus mehreren Gründen ein sehr interessantes Allergen ist. Zum einen ist es das einzige bekannte Allergen aus der Klasse der Hexamerine und zum anderen zählt es durch seine hexamere Oligomerisierung auch zu den größten bekannten Allergenen. Um diesen Punkten gerecht zu werden, wird Per a 3 im Folgenden zunächst als oligomeres Allergen und anschließend in seiner Einstufung und Funktion als Hexamerin diskutiert. Ebenso wird die Zusammensetzung der P II-Oligomere erörtert. Nachfolgend wird auf die in den Extrakten beobachtete Diphenoloxidase-Aktivität eingegangen und abschließend die Ergebnisse der Charakterisierungen von Per a 9 im Kontext der Literatur betrachtet.

4.1 Per a 3

Für die immunologische und biochemische Charakterisierung der Per a 3-Isoformen war neben der Reinheit der Allergenproben eine hohe Proteinausbeute erforderlich. Daher wurden in dieser Arbeit ausgehend von Hämolymp- und Crude-Extrakten der Amerikanischen Schabe unterschiedliche Reinigungsprotokolle unter Berücksichtigung von Praktikabilität, Reinheit und Ausbeute für die Per a 3-Proteine entwickelt (Abschnitt 3.2). Ein wesentlicher Punkt war dabei die getrennte Isolierung verschiedener nativer Per a 3-Isoformen, wie sie in den Arbeiten von Wu und Mitarbeitern noch nicht stattgefunden hatte [108, 144].

Für die immunologische Charakterisierung war daher zum einen die Unterscheidung zwischen den Per a 3-Isoformen und zum anderen der Einfluss der hexameren Oligomerisierung der Per a 3-Proteine auf deren Immunogenität und Allergenität von besonderem Interesse. Diese Ergebnisse werden im nachfolgenden Abschnitt „Per a 3 in seiner Funktion als Allergen“ (Abschnitt 4.1.1) diskutiert.

Die biochemischen Eigenschaften von Per a 3 werden durch dessen Einstufung als Hexamerin in Zusammenhang mit der Funktion von Hexamerinen als Speicherproteine, sowie weiteren Funktionen, wie dem Einbau in die Cuticula, der Rolle bei der Immunabwehr oder als Transport-/Ligandenproteine in dem Abschnitt „Per a 3 in seiner Funktion als Hexamerin“ (Abschnitt 4.1.2) diskutiert. Die mögliche Zusammensetzung der P II-Oligomere wird abschließend erörtert.

4.1.1 Per a 3 in seiner Funktion als Allergen

Wie zu Beginn dieser Arbeit kurz erläutert, ist trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung bis heute die Frage ungeklärt, welche intrinsischen Eigenschaften ein Protein zu einem Allergen werden lassen [34]. Mit Stand 09.01.2008 waren in der offiziellen Allergendatenbank der WHO [www.allergen.org] ohne die Einbeziehung allergener Isoformen 586 Allergene hinterlegt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass diese Datenbank keinen Anspruch auf Vollständigkeit besitzt, wie u.a. das Fehlen von Per f 7 (Tropomyosin aus *Periplaneta fuliginosa*) zeigt [115]. Diese zahlreichen als Allergene identifizierten Proteine sind teilweise charakterisiert, jedoch nur von ca. 5% ist auch die Struktur bekannt. Strukturelle Gemeinsamkeiten dieser Allergene wurden bisher nicht festgestellt [34, 281, 306].

Allergene haben offenbar auch keine funktionellen Gemeinsamkeiten [34, 44, 306]. Lange Zeit galt als Schlüsselfunktion eines Allergens das Vorhandensein einer Enzymaktivität, wie sie z.B. viele Milben-Allergene aufweisen [42, 320, 321]. Das in diesem Zusammenhang am besten untersuchte Allergen ist Der p 1, eine Cystein-Protease, die sich aufgrund der enzymatischen Spaltung der Zell-Zell-Verbindungen („tight-junctions“) Zugang zum Bronchialepithel verschafft [1, 306, 322]. Doch weder für Per a 3 noch für zahlreiche andere potente Allergene wurde bisher eine Enzymaktivität nachgewiesen, sodass die Enzymhypothese verworfen werden musste [44, 95, 155].

Auch konnten für Allergene bisher weder ubiquitäre lineare noch ubiquitäre diskontinuierliche (konformationelle) Epitope ausgemacht werden [34, 306].

Bekannt ist, dass Allergene körperfremde Proteine sind, die nicht zwingend glykosyliert sein müssen und im Falle einer Glykosylierung auch kein allgemeingültiges (Glykosylierungs-) Muster aufweisen [34].

Als weitere wichtige Punkte für die Allergenität von Proteinen wird deren Größe und Stabilität diskutiert. Denn je größer und fremder ein Protein ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es beim Kontakt mit dem Menschen als fremd erkannt wird und eine Immunantwort auslöst [1].

Die Proteinstabilität kann bei einem Allergen zwei wichtige unterschiedliche Auswirkungen haben: ist ein Allergen gegenüber Proteolyse ausgesprochen stabil, so wird es in der eigentlichen Sensibilisierungsphase in den Lysosomen antigenpräsentierender Zellen (APC) nicht proteolytisch gespalten und kann dadurch auf den MHC Klasse II-Molekülen auch nicht effizient präsentiert werden. Ist ein Allergen jedoch hinsichtlich seiner Tertiär- und/oder Quartärstruktur nicht ausreichend stabil, könnte dies zum Verlust von Konformations-epitopen führen und darüber einen Einfluss auf die IgE-Kreuzvernetzung haben [323].

Ein weiterer interessanter Punkt für Allergene ist das Vorhandensein von allergenen Isoformen, wie sie insbesondere bei Majorallergenen beobachtet wurden [43]. Von Per a 3 sind mittlerweile vier sequenziell etwas unterschiedliche Klone [138, 143] sowie die in dieser Arbeit identifizierte Per a 3.03-Isoform bekannt. Die Klone sind offensichtlich zwei Per a 3-Isoformen zuzuordnen, von denen insbesondere die beiden Klone Per a 3.0202 (ehemals C13) und Per a 3.0203 (ehemals C28) einen starken Unterschied in der Allergenität zeigten (Tabelle 1-3). Diese führten die Autoren auf einen distinkten Aminosäureaustausch von Serin 409 (Per a 3.0202) gegen Prolin 332 (Per a 3.0203) zurück [143].

Da in meiner Arbeit mit Per a 3.03 eine neue Per a 3-Isoform isoliert werden konnte, wurde dessen Immunogenität erstmals bestimmt (Abschnitt 3.3.2.8) und wird im Folgenden im Kontext der Isoallergene betrachtet. Eine Bestimmung der Allergenität von Per a 3.03 war aufgrund der limitierten Proteinmenge in dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.1.1.1 Immunogenität und Allergenität der isolierten Per a 3-Isoformen

Bis vor kurzem existierten lediglich eine *in vitro* und eine *in vivo* Studie bezüglich der Immunreaktion auf partiell gereinigtes Per a 3 [138, 144]. Diese immunologische Charakterisierung konnte in enger Zusammenarbeit mit der [REDACTED] durch den Einsatz gereinigter Per a 3-Isoformen *in vitro* spezifiziert werden [19].

In der ersten *in vitro* Studie (1996) wurde die Cytokinproduktion und Proliferation von PBMCs auf eine Per a 3-haltige Proteinfraction untersucht [144]. Diese Proteinfraction wurde durch einen einzigen Reinigungsschritt aus Crude-Extrakt erhalten, der über eine G-150 SF-Größenausschlusssäule (SEC) aufgetrennt wurde [144]. Der Trennbereich dieser Größenausschlusssäule lag mit 5-150 kDa allerdings deutlich außerhalb der hexameren Per a 3-Isoformen (Abb. 3-31), sodass diese im Ausschlussvolumen der Säule zusammen mit sämtlichen Proteinen, die schwerer als 150 kDa waren eluierten. Hierzu konnte z.B. auch Vitellogenin zählen, ein hexamer Protein mit etwa 596 kDa, welches geschlechtsspezifisch und entwicklungsabhängig in Weibchen exprimiert wird. Es setzt sich aus 2x3 Unterheiten à 123 kDa, 118 kDa und 57 kDa zusammen [324]. Wahrscheinlich war im Per a 3-haltigen Eluat ebenfalls ein 450 kDa Lipopolysaccharid-Bindungsprotein aus der Hämolymphe der Amerikanischen Schabe vorhanden [325].

Die durch diese SEC erhaltene Per a 3-haltige Fraktion wurde von Wu und Lan als Cr-PI-Probe bezeichnet [108]. Diese war in der Lage *in vitro* bei PBMCs eine Proliferation sowie die Produktion von IL-4 zu induzieren [144]. Mittels Hauttests (Pick-Test) an Schabenallergikern wurde auch *in vivo* die allergene Relevanz der Cr-PI-Probe bestätigt [138]: von den gegen Crude-Extrakt der Amerikanischen Schabe im Prick-Test positiv getesteten Allergikern zeigten 82.6% (19/23) eine positive Hautreaktion. Bei genauerer Betrachtung dieser Cr-PI-Fraktion mittels 2D-Radioimmungelektrophorese (CRIE) wies

Cr-PI neun Präzipitationsbögen auf [108]. Da in diesem Test gepooltes humanes Serum mit radioaktivem Iod gelabeltem anti-human-IgE-Antikörper verwendet wurde, konnte daher auf neun in Cr-PI enthaltene Allergene zurückgeschlossen werden [108]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei nicht um neun allergene Per a 3-Isoformen, sondern vielmehr um zusätzliche in Cr-PI enthaltene Allergene. Somit konnte durch die rudimentär gereinigte Probe die in diesen Untersuchungen beobachtete Reaktion weder mit Sicherheit alleine auf Per a 3 zurückgeführt werden, noch wurden die Per a 3-Isoformen getrennt betrachtet.

In Ergänzung und zur Spezifizierung dieser Ergebnisse wurde in enger Zusammenarbeit mit der [REDACTED] von [REDACTED] eine weitere *in vitro* Studie durchgeführt, in der die gereinigten Isoformen Per a 3.03 und P II differenziert betrachtet wurden [19]. Hierbei wurde die Immunogenität von P II und erstmalig die von Per a 3.03 über Bestimmung der Proliferation und Cytokinproduktion von T-Helferzellen und die Cytokinproduktion von dendritischen Zellen (DC) bestimmt (Abschnitt 3.3.2.8).

Für die Bestimmung der Proliferation wurden allergenbeladene DC mit CD4⁺-T-Zellen inkubiert und der Einbau von ³[H]-Thymidin gemessen (Abb. 4-1).

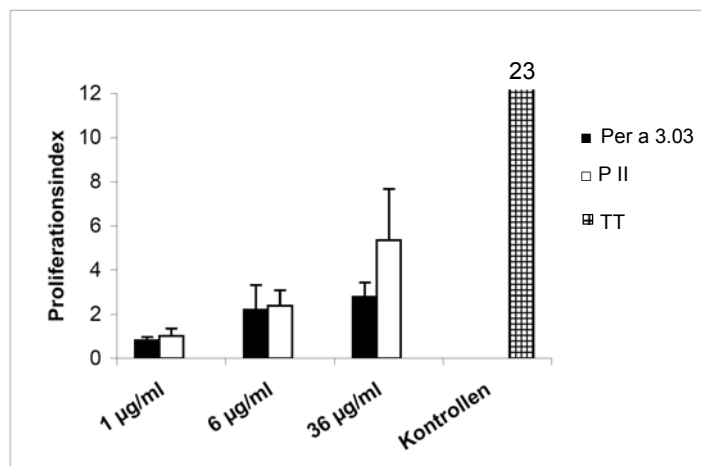


Abb. 4-1: Vergleich der Proliferationsinduktion durch die isolierten Per a 3-Isoformen [verändert nach 19].

Die allergenbeladenen dendritischen Zellen (DC) wurden mit autologen CD4⁺-T-Zellen inkubiert. Die Proliferation wurde nach fünf Tagen Kokultur über den Einbau von ³[H]-Thymidin bestimmt. Als Positivkontrolle diente 1 µg/ml Tetanustoxoid (TT) und zur Normierung als Negativkontrolle unbehandelte DC.

Bei einer Allergenkonzentration von 36 µg/ml induzierte P II eine fast doppelt so hohe Proliferation wie Per a 3.03 und schien somit ein stärkeres Immunogen zu sein als Per a 3.03.

Der Vergleich der Proliferationsindices ergab dabei, dass bei hohen Allergenkonzentrationen (36 µg/ml) der Proliferationsindex von P II fast doppelt so hoch war wie der von Per a 3.03. Bei niedrigeren Allergenkonzentrationen (1 µg/ml und 6 µg/ml) war dieser Unterschied nicht

mehr so deutlich ausgeprägt (Abb. 4-1). Somit waren beide Per a 3-Isoformen immunogen, wobei P II in diesen Experimenten immunogener zu sein schien als Per a 3.03.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Untersuchung der Cytokinproduktion von T-Helferzellen (IL-4, IL-5, IL-10 und IFN- γ) gemacht. Hierzu wurden CD4⁺-T-Zellen mit allergenbeladenen DC in Cokultur stimuliert und die sezernierten Cytokine im Überstand bestimmt. Bei niedrigen Allergenkonzentrationen konnte bei den Isoformen kein Unterschied in der Cytokinproduktion beobachtet werden, wohingegen bei hohen Allergenkonzentrationen P II eine deutlich höhere IL-4-Produktion induzierte als Per a 3.03. Auch war bei Per a 3.03 das IL-4/IFN- γ -Verhältnis geringer als bei P II [19].

Nicht ganz so eindeutig waren dagegen die Ergebnisse der Cytokinmessungen (IL-6 und IL-12p40) allergenbeladener DC: P II induzierte zwar sowohl bei niedrigen (1 μ g/ml) als auch hohen Allergenkonzentrationen (36 μ g/ml) in reifen DC viel stärker IL-6 und IL-12p40 als es bei Per a 3.03 zu beobachten war, jedoch konnte biologisch aktives IL-12p70 (Heterodimer bestehend aus IL-12p40 und IL-12-p35) weder im Zellkulturüberstand noch dessen Synthese nachgewiesen werden [19, 326, 327]. Dadurch, dass die Cytokinproduktion jedoch konzentrationsabhängig war, konnte nachgewiesen werden, dass die Per a 3-Isoformen nicht nur T-Helferzellen sondern auch dendritische Zellen durchaus beeinflussten [19].

Insgesamt zeigten diese Experimenten eindeutig, dass die Per a 3-Isoformen starke Immunogene sind, wobei P II offenbar ein höheres immunogenes Potential aufweist als Per a 3.03 [19].

Beim Polymorphismus von Allergenen ist durchaus interessant, welche Isoform tatsächlich eine Rolle bei der Allergenität dieser Proteine spielt [143]. Ein Vergleich der Allergenität der isolierten Per a 3-Isoformen fehlt bislang und konnte aufgrund der limitierten Per a 3.03-Menge in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Als möglicher Test zur Beurteilung dieser Allergenität könnte bei Per a 3.03, ebenso wie bereits für P II durchgeführt z.B. *in vitro* die Leukotrienausschüttung in einem Basophilen-Aktivierungstest bestimmt werden [19]. In diesem Test induzierte P II bei Allergikern sehr deutlich und auch konzentrationsabhängig die Freisetzung von Leukotrienen, sodass diese Probe als vollständiges Allergen anzusehen ist.

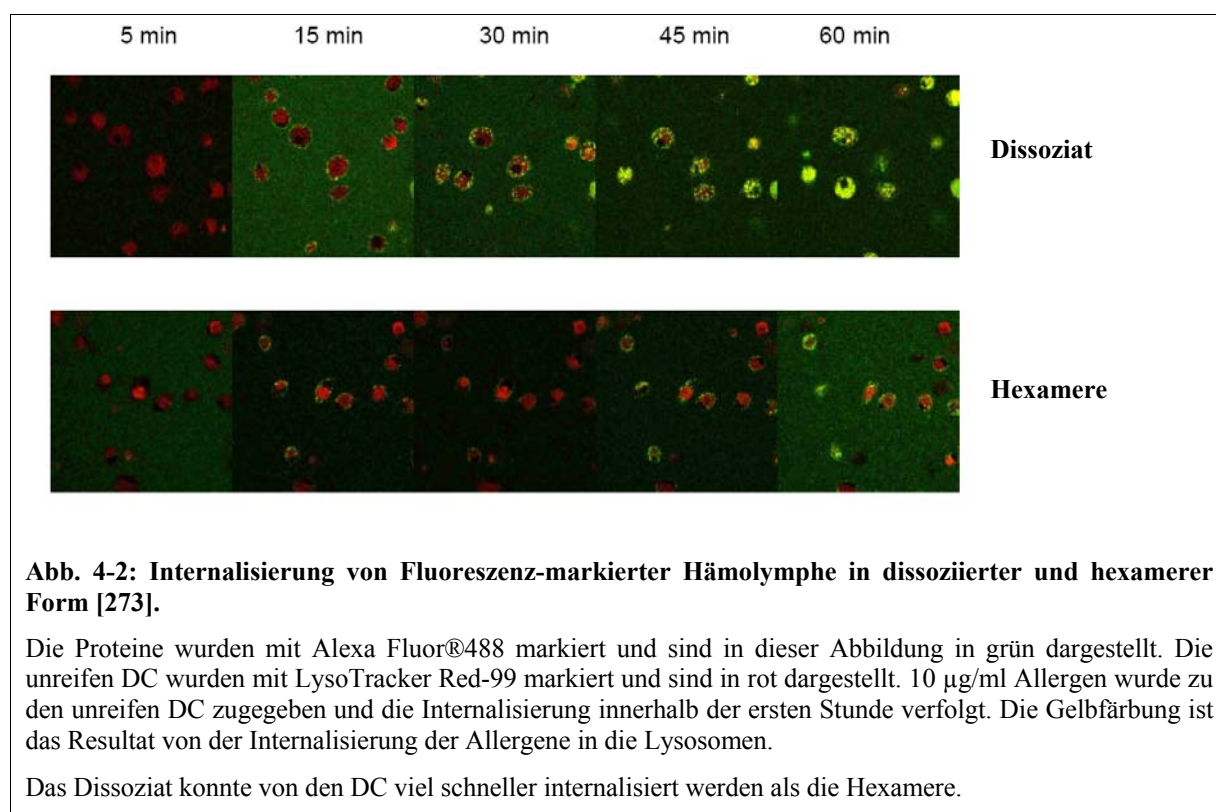
4.1.1.2 Einfluss der hexameren Oligomerisierung auf die Immunogenität und Allergenität der Per a 3-Isoformen

Da es sich *in vivo* bei den Per a 3-Isoformen um hexamere Proteine handelt, ist die Bestimmung des Einflusses der hexameren Oligomerisierung auf die Immunogenität und Allergenität der Per a 3-Isoformen ein sehr wichtiger Forschungsansatz. Dieser wurde in enger Zusammenarbeit mit der [REDACTED] von [REDACTED] in ihrer Diplomarbeit genauer verfolgt [19, 273]. Grundlage dieser Versuche war die Herstellung dissoziierter

Per a 3-Proben (Abschnitt 3.3.2.7), deren Reaktion mit der von nativen Proben verglichen wurde.

Im Fokus standen der Vergleich der Immunogenität über Bestimmung der Proliferation und des Cytokinmusters von T-Helferzellen sowie der Vergleich der Allergenität über Bestimmung der Leukotrienfreisetzung im Basophilen-Aktivierungstest [19, 273]. Im Hinblick auf die Antigenpräsentation wurde außerdem die Internalisierung der nativen bzw. dissoziierten Hämolymp- Proteine (hauptsächlich aus Per a 3-bestehend, als HL-Per a 3 bezeichnet) analysiert sowie die Stabilität von Per a 3 durch eine pH-Simulation des lysosomalen Abbauprozesses beurteilt.

Bei der Bestimmung der Proliferation der T-Helferzellen stellte sich heraus, dass die dissoziierte Probe bei gleicher Proteinkonzentration eine signifikant höhere Proliferation induzieren konnte als die native hexamere Probe [19, 273]. Mittels konfokaler Laserspektroskopie und Fluoreszenzmarkierung der Allergene konnte von Bellinghausen et al. (2008) eindeutig gezeigt werden, dass das Dissoziat nicht nur besser, sondern auch schneller als die Hexamere an die Membran unreifer DC bindet, internalisiert wird und auch in den Lysosomen wiederzufinden ist (Abb. 4-2) [273].



Ein Einfluss der Oligomerisierung der Per a 3-Proteine wurde zusätzlich zur T-Zell-Proliferation auch bei der Cytokin-Produktion der T-Helferzellen untersucht [273]. Hierzu wurden erneut CD4⁺-T-Zellen in Cokultur mit allergenbeladenen DC stimuliert und die sezernierten Cytokine im Überstand bestimmt. Ein deutlicher konzentrationsabhängiger

Anstieg der IFN- γ -Produktion -und somit eine Th1-Verschiebung- konnte bei dissoziiertem HL-Per a 3 verzeichnet werden, wohingegen durch hexameres HL-Per a 3 bei Allergikern die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-10 verstärkt sezerniert wurden. Dadurch wird eine Th2-Differenzierung und -Proliferation präferiert.

Somit hat die Quartärstruktur der Per a 3-Proteine einen deutlichen Einfluss auf die Art der induzierten Immunantwort [19, 273].

Die Quartärstruktur nimmt außerdem Einfluss auf die Allergenität der Per a 3-Proteine: im Basophilen-Aktivierungstest induzierten die Hexamere eine höhere Leukotrienausschüttung als das Dissoziat (Abb. 4-3). Somit sind die Per a 3-Proteine in hexamerer Form potentere Allergene als in dissoziierter Form [19, 273].

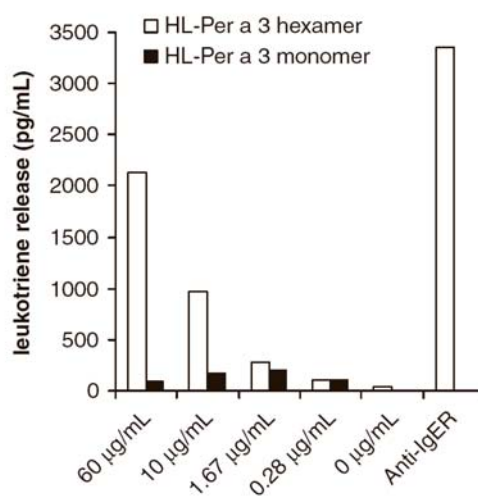


Abb. 4-3: Leukotrienausschüttung im Basophilen-Aktivierungstest nach Stimulation mit nativer bzw. dissoziierter Hämolymphe [273].

PBMCs von *Periplaneta americana*-sensibilisierten Spendern wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an nativer (Hexamer) und dissoziierter (Monomer) Per a 3-Hämolymphe stimuliert und die Leukotrienausschüttung mittels ELISA nach 40 Min. bestimmt.

Die hexameren Proben bewirken insbesondere bei hohen Konzentrationen eine höhere Leukotrienausschüttung als die dissoziierten monomeren Proben.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass dissoziiertes Per a 3 ein geeigneter Kandidat für eine Immuntherapie sein könnte und hexameres Per a 3 ein potenteres Allergen ist.

Auch in der Literatur wird -jedoch mit differierenden Ergebnissen- von einem Einfluss der Struktur (Primär- bis Quartärstruktur) auf die Immunogenität und Allergenität u.a. von Bet v 1 berichtet [z.B. 328, 329].

In einer Studie von Schöll et al. war lediglich dimeres und nicht monomeres Bet v 1 in der Lage eine positive Hautreaktion auszulösen, wodurch ausschließlich die dimere Bet v 1-Form

als Allergen wirkte [329]. Im Unterschied zu dieser Studie wurde für rekombinantes oligomeres Bet v 1 gezeigt, dass es eine Proliferation bei T-Helferzellen und PBMCs von Bet v 1-Allergikern auslöste und somit ein starkes Immunogen ist. Allerdings ist es nur ein schwaches Allergen, wie Reaktionen im Basophilen-Aktivierungstest und im Prick-Test an Patienten zeigten [330-334]. In diesem Zusammenhang schlussfolgerten die Autoren, dass die Oligomere eventuell aggregiert seien oder die IgE-Bindung für eine Kreuzvernetzung sterisch ungünstig sei.

Auch z.B. für Dau c 1 (aus der Möhre), Phl p 1 (aus dem Wiesenlieschgras), Der f 1/Der p 1 (aus Milben) und Der f 2/Der p 2 (aus Milben) wurde ein Einfluss der Struktur auf die Allergenität beobachtet. Dabei führte nicht nur eine Dissoziation, sondern insbesondere die Zerstörung der nativen Struktur zu einer verminderten Allergenität [318, 335-340].

Die Oligomerisierung eines Allergens kann offensichtlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Allergenität des Proteins haben: zum einen kann durch die Oligomerisierung die Multivalenz der Allergene erhöht werden, was die Kreuzvernetzung von IgE-AK begünstigt und somit die Allergenität erhöht. Zum anderen kann es durch die Oligomerisierung auch zu sterischen Behinderungen bei der Antikörper-Bindung kommen, sodass die Allergenität vermindert wird [329, 334].

Auch auf Ebene der Antigenpräsentation, respektive der T-Zell-Erkennung, wurde ein Einfluss der Quartärstruktur auf die Immunogenität beobachtet. So ist z.B. bei dimerem humanem Choriongonadotropin die T-Zell-Erkennung gegenüber der dissoziierten Form deutlich reduziert [341, 342]. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass auf Ebene der T-Zell-Erkennung aufgrund des Mechanismus der Antigenpräsentation lineare Epitope eine Rolle spielen, wohingegen bei der B-Zell-Erkennung sowohl lineare als auch konformationelle Epitope relevant sind [z.B. 43, 127, 343, 344]. Somit hat insbesondere die Struktur-Stabilität der Proteine einen wichtigen Einfluss auf deren Allergenität [136, 323].

Insgesamt belegen die bisherigen Studien durchaus einen Einfluss der Quartärstruktur auf die Immunogenität und auch Allergenität, liefern jedoch teilweise widersprüchliche Ergebnisse, sodass dringend auch bei weiteren multimeren Allergenen, wie z.B. Ara h 1 und Ara h 2 (aus der Erdnuss), der Einfluss der Quartärstruktur untersucht werden sollte.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint es daher nicht ausreichend, dass bei den immunologischen Studien von Wu und Mitarbeitern lediglich rekombinantes Per a 3 verwendet wurde, von dem zuvor weder die korrekte Faltung noch die hexamere Oligomerisierung überprüft wurde [138, 140, 142, 143]. Solche Kontrollen wären wichtig gewesen, da bei rekombinant hergestellten Proteinen weder die strukturelle noch die funktionelle Integrität vorausgesetzt werden kann [345].

Aus diesem Grund ist zu empfehlen, dass in nachfolgenden Experimenten zusätzlich zur Bestimmung der Allergenität von Per a 3.03 die strukturelle Integrität rekombinanter Per a 3-

Isoformen basierend auf den Ergebnissen der in dieser Arbeit und meiner Diplomarbeit durchgeführten biophysikalischen Charakterisierungen überprüft wird [148]. Solche rekombinanten Schabenallergene könnten insbesondere im Hinblick auf hypoallergene Mutanten eine wichtige Grundlage für die Behandlung der Schabenallergie, insbesondere einer sicheren Immuntherapie darstellen [44, 114, 346].

4.1.1.3 Bisherige Behandlungsmöglichkeiten

Die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten der Schabenallergie bestehen im Wesentlichen aus der Vermeidung von Allergenkontakt -was sich als äußerst schwierig erweisen kann- und der üblichen medikamentösen Behandlung der Allergie-Symptome z.B. mit Antihistaminika [95, 105, 347]. Für die Behandlung von Insektenstich-Allergien wird eine Immuntherapie schon seit vielen Jahren erfolgreich angewendet [348].

Über eine Immuntherapie bei schabenallergischen Asthmatikern berichten bisher zwei partiell erfolgsversprechende Studien von Kang et al. (1988) und Alonso et al. (1999). Dabei konnten u.a. eine Reduzierung der Symptome, die Bildung von spezifischen IgG-Antikörpern, sowie nach drei Jahren Therapie eine Reduzierung von IL-2 und IL-4 im Serum beobachtet werden [349, 350]. Eine Etablierung dieser Immuntherapie steht allerdings noch aus.

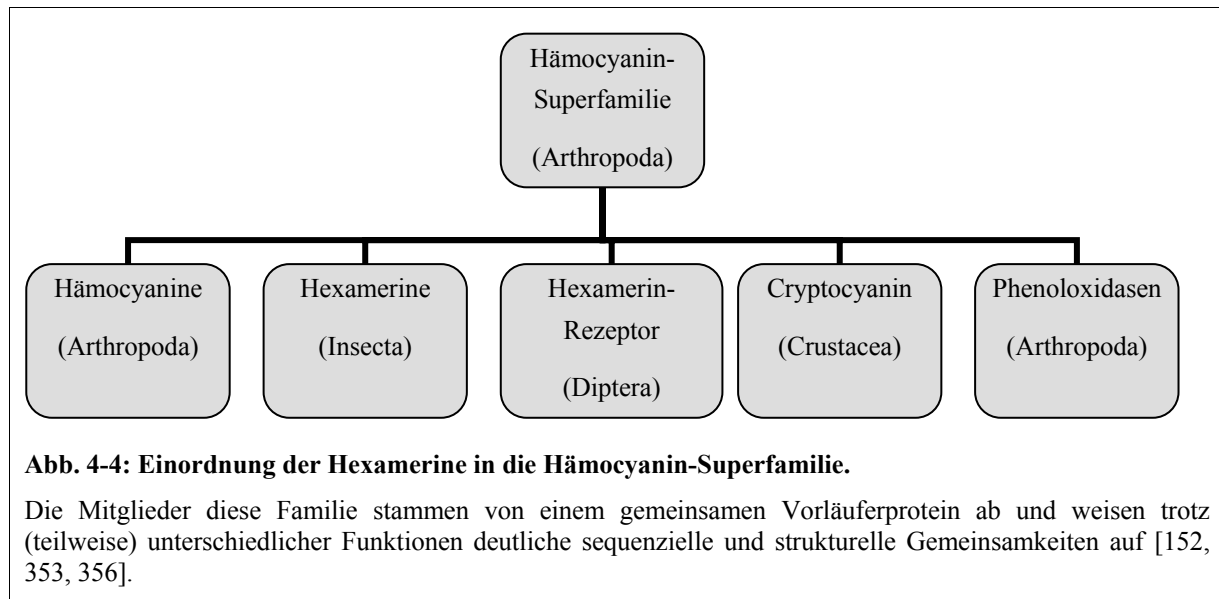
Um die Risiken einer spezifischen Immuntherapie möglichst gering zu halten, empfiehlt es sich, nicht auf kommerziell erhältliche Crude-Extrakte und somit Allergengemische zurückzugreifen, sondern die relevanten Allergene in gereinigter Form zu verwenden. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen würde sich dafür dissoziiertes Per a 3 empfehlen [19]. Neben der aufwändigen Reinigung aus einem nativen Extrakt heraus, wären hierbei ebenfalls rekombinante hypoallergene Varianten sinnvoll. Bei diesen kann durch gerichtete Mutationen die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks, auch bei Gabe hoher Allergendosen, deutlich reduziert werden [44, 136, 346].

4.1.2 Per a 3 in seiner Funktion als Hexamerin

In diesem Abschnitt werden die Per a 3-Allergene in Zusammenhang zu ihrer Proteinklasse im Kontext der Literatur diskutiert. Der Schwerpunkt liegt dabei zum einen auf der Proteinklasse der Hexamerine -und damit verbunden der Hämocyanin-Superfamilie- und zum anderen in den potentiellen Funktionen dieser Proteinklasse.

Die Einordnung der Per a 3-Proteine in die Familie der Hexamerine ist von Bedeutung, da zwischen sequenziell und strukturell ähnlichen Proteinen Kreuzreaktionen zu erwarten sind und bisher weder ein mit Per a 3-kreuzreagierendes Allergen, noch zusätzlich zu Per a 3 ein weiteres Allergen aus der Familie der Hexamerine bekannt ist. Die potentielle Funktion der Hexamerine ist von großem Interesse, da darüber das Vorhandensein und die Expression allergener Per a 3-Isoformen sowie deren Auftreten im Hausstaub erklärt werden könnten.

Unsere biochemischen und biophysikalischen Charakterisierungen der isolierten Per a 3-Isoformen [148, 292] ermöglichten die Zuordnung dieser Proteine in die Klasse der Hexamerine. Hexamerine sind zusammen mit den Hexamerin-Rezeptoren, Arthropoden-Hämocyaninen, Phenoloxidasen und Cryptocyaninen in der Hämocyanin-Superfamilie zusammengefasst (Abb. 4-4) [z.B. 152, 351]. Bei dieser handelt es sich um eine sehr komplexe Proteinfamilie, die bereits in zahlreichen Reviews u.a. im Hinblick auf Evolution, Sequenzhomologien, Funktion und Struktur ausführlich vorgestellt und diskutiert wurde [152, 153, 351-355].



Mitglieder dieser Familie stammen von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ab und weisen trotz (teilweise) unterschiedlichen Funktionen deutliche sequenzielle und strukturelle Gemeinsamkeiten auf [z.B. 147, 152, 353, 356]. Interessanter Weise ist trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten von den Mitgliedern dieser Superfamilie lediglich Per a 3 als Allergen klassifiziert. Auch klinisch relevante Kreuzreaktionen von Per a 3 mit Mitgliedern dieser Familie sind bisher nicht in der Literatur beschrieben. Lediglich vom Hämocyanin aus *Limulus polyphemus* ist bekannt, dass es als Hapten-Carrier-Protein ein potentes Antigen ist [357, 358]. Auch das Mollusken-Hämocyanin KLH aus der Schlüssellochschnecke *Magathura crenulata* findet als Hapten-Carrier-Protein Anwendung [359, 360]. Eine Besonderheit dieses Hämocyanins -welches allerdings nicht zur Hämocyanin-Superfamilie zählt- ist dessen starke immunstimulatorische Eigenschaft [361]. Bei KLH handelt es sich um ein Glykoprotein mit ca. 5%igem Zuckeranteil [362]. Ein Teil dieser Oligosaccharide ist kreuzreaktiv zu einem Epitop auf der Oberfläche von Blasentumoren, sodass KLH sogar medizinische Anwendung bei der Behandlung der oberflächlichen Harnblasenkarzinome findet [362-366]. Zu den Per a 3-Proteinen weist KLH mit 3% eine vernachlässigbar geringe Identität auf (Alignment nicht gezeigt), sodass nicht von sequenzbasierten Kreuzreaktionen zwischen diesen Proteinen auszugehen ist.

Insgesamt wurden außerhalb des Stammes der Arthropoden bisher keine Proteine identifiziert, die mit den Mitgliedern der Hämocyanin-Superfamilie eindeutige Sequenzidentitäten teilen [154, 351]. Da u.a. sequenzielle und/oder strukturelle Ähnlichkeiten die Basis für Kreuzreaktionen darstellen, ist für zukünftige Untersuchungen zu empfehlen, mit Per a 3-kreuzreagierende Proteine zunächst innerhalb der Hämocyanin-Superfamilie und dabei insbesondere bei den Hexamerine zu suchen (Abb. 4-4) [367-369].

In den folgenden Abschnitten wird die Familie der Hexamerine vorgestellt und schwerpunktmäßig die bisher identifizierten Hexamerine aus Schaben den Ergebnissen der Per a 3-Charakterisierung gegenübergestellt.

4.1.2.1 Die Familie der Hexamerine

Die Familie der Hexamerine umfasst miteinander verwandte Insekten-Hämolymp- Proteine, die nach ihrer nativen Zusammensetzung von sechs homologen oder heterologen Untereinheiten benannt sind, welche ein Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 85 kDa besitzen [150, 153, 154]. Diese Kriterien sind von den untersuchten Per a3-Proteinen mit deren hexameren Oligomerisierung und den Molekulargewichten der denaturierten Untereinheiten von 73 kDa bzw. 80 kDa eindeutig erfüllt (Abb. 3-31, Abb. 3-32).

Die bisher bekannten Hexamerine werden u.a. basierend auf ihrer Aminosäure-Zusammensetzung in vier Gruppen unterteilt: Arylphorine, die über 15% Tyrosin und Phenylalanin besitzen, weibchenspezifische Methionin-reiche Proteine, die über 4% Methionin besitzen sowie die Riboflavin-Bindungsproteine und Juvenil-Hormon-regulierte Proteine „juvenile hormone-suppressible proteins“, die beide in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung unauffällig sind (Abb. 4-5) [146, 153, 154, 222, 356, 370-376].

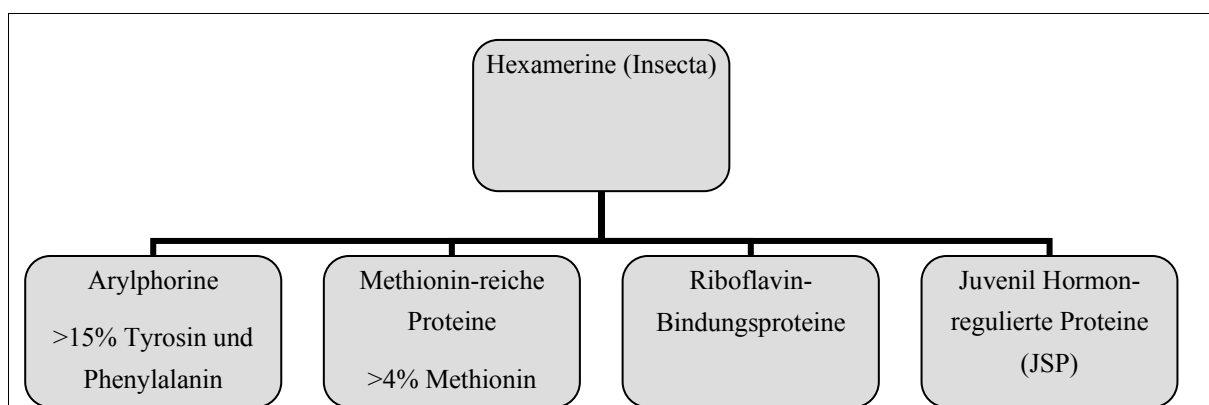


Abb. 4-5: Unterteilung der Hexamerin-Familie.

Die Hexamerine werden in vier Gruppen unterteilt, von denen die Arylphorine und Methionin-reiche-Proteine gegenüber den Riboflavin-Bindungsproteinen und den Juvenil-Hormon-regulierten Proteinen eine auffällige Aminosäure-Zusammensetzung aufweisen. Diese Gruppierung ist jedoch nicht stringent: in *Blaberus discoidalis* wurde ein Hexamerin identifiziert, welches sowohl ein Arylphorin ist als auch durch Juvenil-Hormone supprimiert werden kann [222].

Die in P II enthaltenden Isoformen Per a 3.01 und Per a 3.0201 weisen gemeinsam einen spezifischen Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280\text{nm}}=1.44 \text{ [l/(g*cm)]}$ auf und besitzen in ihrer Sequenz 16.6% bzw. 17.3% Tyrosin und Phenylalanin. Somit zählen sie innerhalb der Hexamerine eindeutig zu den Arylphorinen [138, 148].

Aufgrund des hohen spezifischen Extinktionskoeffizienten von Per a 3.03 bei 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}=1.65 \text{ [l/(g*cm)]}$) ist davon auszugehen, dass auch diese sequenziell unbekannte Isoform zahlreiche aromatische Aminosäuren besitzt und dadurch zu den Arylphorinen gezählt werden kann [148].

4.1.2.2 Konservierte Merkmale der Hexamerine

Da der hohe Anteil der aromatischen Aminosäuren ein namengebendes Charakteristikum der Arylphorine ist, ist darüber hinaus von Interesse, ob innerhalb dieser Gruppe z.B. die Position der Aromaten konserviert ist, bzw. weitere konservierte Merkmale innerhalb der Familie der Hexamerine anzutreffen sind.

Um zu überprüfen, ob innerhalb der Schaben-Arylphorine (-Hexamerine), respektive der Per a 3-Isoformen die Positionen dieser Aromaten konserviert sind, wurde ein Alignment der drei sequenziell bekannten Schaben-Hexamerine erstellt und die aromatischen Aminosäuren in gelb (Tyr, Y), blau (Trp, W) und grün (Phe, F) kenntlich gemacht (Abb. 4-6). Unter Berücksichtigung der hohen Sequenzidentitäten und der damit eng korrelierten ähnlichen Faltung von Hexamerinen und Hämocyaninen [283] ist in diesem Alignment zusätzlich die für Arthropoden-Hämocyanine charakteristische Domänenstruktur farbig in orange, blau und rot eingezeichnet (Abb. 4-6).

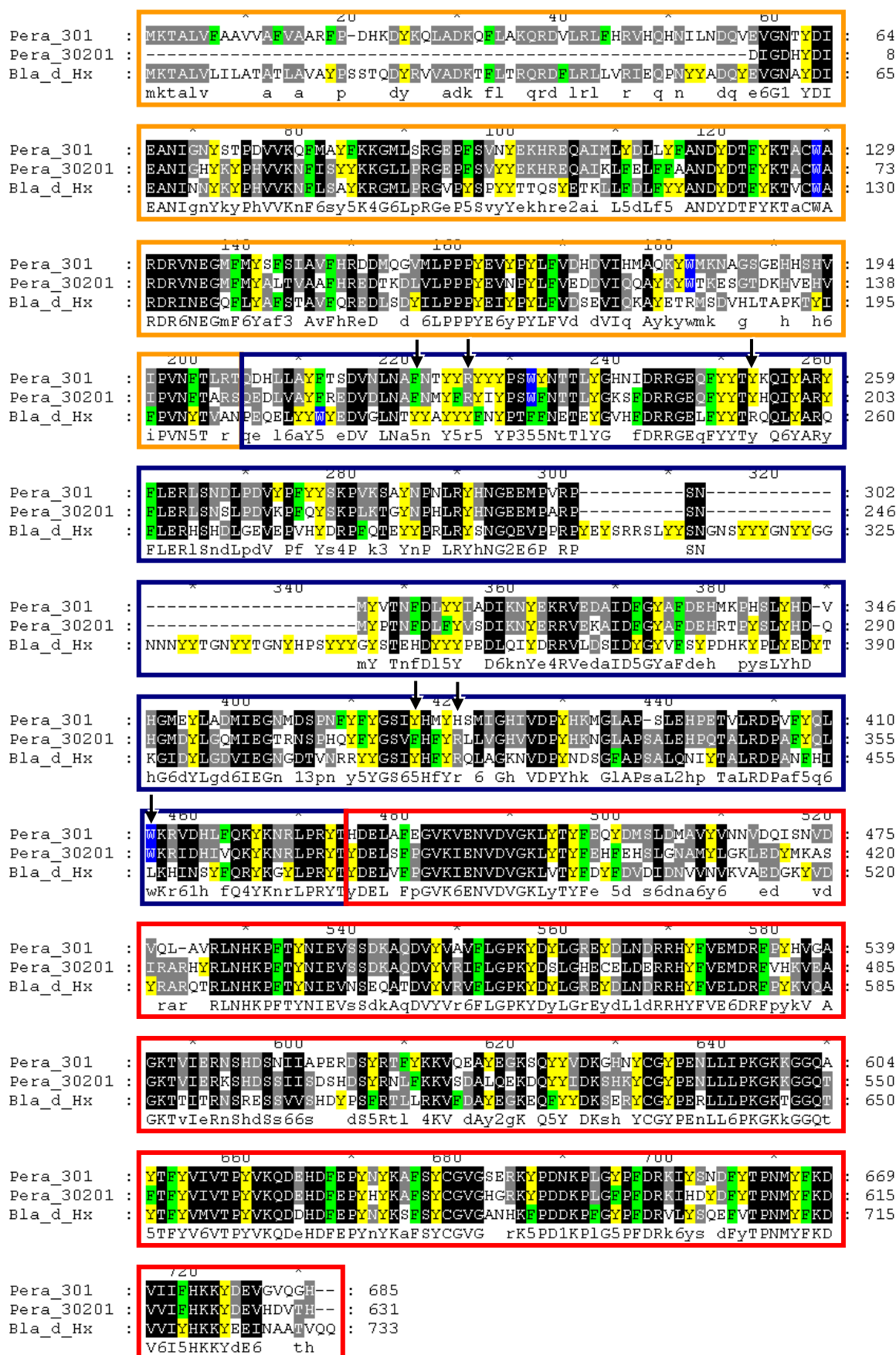


Abb. 4-6: Sequenzalignment der Per a 3 Isoformen mit dem Hexamerin aus *Blaberus discoidalis*.

Die Proteinsequenzen wurden inklusive Signalpeptid mit ClustalX 1.83 align und mit Hilfe von GeneDoc 2.6 ausgewertet. Die aromatischen Aminosäuren sind farblich hinterlegt und die aus dem Hämocyanin bekannte

Domänenstruktur in orange (1. Domäne), blau (2. Domäne) und rot (3. Domäne) gekennzeichnet. Der im Hexamerin von *Blaberus discoidalis* vorhandene Einschub in der zweiten Domäne liegt in der Tertiärstruktur wahrscheinlich an der Proteinoberfläche [377]. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der Histidine, die bei Hämocyaninen das aktive Zentrum koordinieren. Für das Alignment wurden folgende Sequenzen verwendet: Pera_301= korrigierte Per a 3.01-Sequenz, Pera_30201= Per a 3.0201= AAB 09632, Bla_d_Hx= AAA 74579.

Eine Übersicht über die AS-Sequenz-Identitäten und -Ähnlichkeiten des Alignments gibt Tabelle 4-1.

	Per a 3.01	Per a 3.0201	Bla d Hx
Per a 3.01	685 0 0	65% 77% 8%	52% 68% 6%
Per a 3.0201	452 535 58	631 0 0	49% 65% 13%
Bla d Hx	387 504 48	364 478 102	733 0 0

Tabelle 4-1: Aminosäure-Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten aus dem Schaben-Hexamerin-Alignment (Abb. 4-6).

Die Auftragung entspricht der GeneDoc-Auswertung: jeweils die erste Zeile gibt die Identitäten der Aminosäuren an, die zweite Zeile den Anteil der isofunktionellen Aminosäuren und die dritte Zeile jeweils den Anteil der Lücken im Alignment. Bei den grau hinterlegten Feldern sind die Angaben in Form der Aminosäureanzahl und bei den weiß hinterlegten Zeilen in Prozent angegeben.

Wie in der Literatur für Hexamerine beschrieben, ist auch bei diesem Alignment eine Häufung der Aromaten in der zweiten Domäne (blau) zu beobachten, die allerdings im Vergleich zur dritten Domäne (rot) nicht stark ausgeprägt ist [222]. Auffällig ist allerdings, dass in der dritten Domäne die aromatischen Aminosäuren stärker konserviert zu sein scheinen als in den beiden anderen Domänen (Abb. 4-6). Ob dies in Zusammenhang zu der besonderen Struktur der dritten Domäne steht, die sich bei Arthropoden-Hämocyaninen aus einem siebensträngigem antiparallelem β -Faltblatt zusammensetzt [352] und damit der Faltungsstruktur von Immunglobulinen (IgG) ähnelt [378], bleibt zu überprüfen.

Im Hinblick auf die Funktion der Hämocyanine als Sauerstofftransportproteine ist zudem die zweite Domäne von Interesse. Diese weist bei Hämocyaninen ein vier- α -Helix-Bündel auf, welches die sechs Histidine beinhaltet, die das aktive dinucleäre Kupfer-Zentrum koordinieren [226, 285, 352, 379, 380].

Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten in der Hämocyanin-Superfamilie sind innerhalb der Hexamerine die meisten dieser sechs Histidine nicht konserviert [353, 356, 381-384].

Dies gilt auch für die Per a 3-Isoformen und das Hexamerin von *Blaberus discoidalis* (Bla d Hx). Bei diesen sind fünf (Per a 3.01) bzw. alle sechs der zur Kupfer-Koordination benötigten Histidine substituiert. Im Alignment in Abb. 4-6 sind die Positionen dieser Austausche mit Pfeilen gekennzeichnet.

Durch diese Substitutionen haben Hexamerine die Fähigkeit verloren Sauerstoff zu binden [151]. Auch für die nicht vollständig sequenziell bekannte Per a 3-Isoform Per a 3.03 konnte über Absorptionsmessungen bei 340 nm bestätigt werden, dass in diesem Protein kein oxygeniertes Kupfer-Zentrum vorhanden ist (Abschnitt 3.3.2.5).

Bei der Hexamerin-Familie ist insgesamt die Variabilität auf Sequenzebene deutlich höher als innerhalb der funktionell festgelegten Hämocyanine [150]. Bis auf die hexamere Struktur scheinen weder bei den Hexamerinen, noch innerhalb der Arylphorine stringent konservierte Merkmale vorhanden zu sein. Offenbar war die Erhaltung der hexameren Struktur während der Evolution der Hexamerine die einzige Limitierung [151]. Das mit der Oligomerisierung einhergehende Molekulargewicht von ca. 500 kDa ermöglicht es den Hexamerinen dem schnellen Turnover kleinerer Proteine zu entgehen und auf diese Weise ohne große Veränderungen des osmotischen Druckes eine große Anzahl an Aminosäuren zu speichern [153].

4.1.2.3 Hexamerine in der Unterordnung der Schaben

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die für diese Arbeit interessanten/relevanten Hexamerine kurz vorgestellt, wobei insbesondere im Hinblick auf eventuelle Kreuzreaktionen die Hexamerine aus der Unterordnung der Schaben (Blattodea) von besonderem Interesse sind. Anschließend werden möglichen Funktionen von Per a 3 im Kontext der Literatur diskutiert.

Bereits seit vielen Jahrzehnten wird intensiv an Hexamerinen aus Insekten geforscht, wobei auf diesem Gebiet zunächst eine breit gestreute Nomenklatur verwendet wurde, die u.a. nach dem Vorschlag von Telfer und Kunkel homogenisiert und vereinfacht wurde [153].

Die allerersten Hexamerine wurden als Larvale-Serum-Proteine (LSP) bezeichnet und in Larven aus der Ordnung der Diptera gefunden [385]. Später wurden diese Proteine auch bei den Lepidoptera und inzwischen in allen bisher untersuchten Insektenspezies gefunden [151, 386]. Insbesondere bei hemimetabolen Insekten wie den Schaben sind die Informationen allerdings noch sehr lückenhaft. Bis jetzt konnten Hexamerine in sechs Spezies der Unterordnung Blattodea identifiziert werden: der Amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*), der Deutschen Schabe (*Blattella germanica*), der Orientalischen Schabe (*Blatta orientalis*), der Australischen Schabe (*Periplaneta australasica*), der Braunbandschabe (*Supella longipalpa*) sowie der Südamerikanischen Schabe (*Blaberus discoidalis*) [222, 387-389]. An dieser Stelle ist erneut festzuhalten, dass bis auf Per a 3 bisher keines dieser Hexamerine als Allergen identifiziert wurde.

Die Ergebnisse der zum Teil noch lückenhaften biochemischen und –physikalischen Charakterisierung dieser Hexamerine sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Spezies	Mr-nativ	Mr-UE	S-Wert	Anteil an aromatischen AS	Referenzen
<i>Periplaneta americana</i>	512 kDa	80 kDa	19 S		148
	465 kDa	73 kDa	17 S	16.8% Tyr + Phe + Trp (Per a 3.01), 16.5% Tyr + Phe + Trp (Per a 3.0201)	138 148
<i>Blattella germanica</i>	476 kDa (370 kDa)	80 kDa (73 kDa)	19 S (17 S)	15.4% Tyr + Phe	389 (390)
<i>Blatta orientalis</i>	507.9 bis 519.3 kDa	88.1 kDa 84 kDa	18 S	25.1% Tyr + Phe + Trp,	388, 391
<i>Periplaneta australisae</i>			16 S		387
<i>Supella longipalpa</i>			16 S		387
<i>Blaberus discoidalis</i>		86.1 kDa		21% Tyr + Phe	222

Tabelle 4-2: Identifizierte und teilweise charakterisierte Hexamerine aus verschiedenen Schabenspezies. Die eingeklammerten Werte wurden der eingeklammerten Referenz entnommen. Bis auf Per a 3 ist keines dieser Hexamerine als Allergen klassifiziert [105].

Bekannt ist, dass alle diese Proteine Hexamerine sind. Ob sie allerdings alle wie Per a 3 Arylphorine sind oder eventuell den anderen Hexamergruppen (Abb. 4-5) zuzuweisen sind, wurde für *Periplaneta fuliginosa* und *Supella longipalpa* noch nicht untersucht. Das Hexamerin aus *Blattella germanica* wurde als Arylphorin identifiziert [389, 390] und wird von Alexandra Beusch in unserem Institut charakterisiert. Bei ersten Untersuchungen wurden auch Kreuzreaktion von polyklonalen anti-P II-AK mit diesem Hexamerin aus *Blattella germanica* und mit einem Protein -wahrscheinlich ebenfalls das Hexamerin- aus dem Crude-Extrakt von *Blatta orientalis* beobachtet [390]. Weitere Kreuzreaktionen dieses Hexamerins wurden in der Literatur mit Ouchterlony-Tests mit zahlreichen anderen Extraktproteinen aus der Ordnung der Dictyoptera beschrieben [387]. Diese kreuzreagierenden Proteine wurden allerdings nicht weiter charakterisiert.

Neben der lückenhaften biophysikalischen Charakterisierung sind die Hexamerine aus den Schaben auch funktionell noch nicht umfassend untersucht, sodass in den folgenden Abschnitten, in denen die möglichen Funktionen der Hexamerine näher erläutert werden, soweit

möglich der Forschungsstand der Schaben-Hexamerine berücksichtigt wurde. Ansonsten wurde auf den Wissenstand von Hexamerinen aus anderen Ordnungen zurückgegriffen.

Die Funktion dieser Proteingruppe ist von großem Interesse, da über das Vorhandensein und die Expression allergener Per a 3-Isoformen deren Auftreten im Hausstaub und die Allergenexposition bei Patienten zu erklären sind.

4.1.2.4 Allergene Hexamerine als Speicherproteine?

Wie bereits erläutert, wurden die ersten Hexamerine als Larven-spezifische Proteine identifiziert. Als primäre Funktion dieser Hexamerine wird bis heute die Verwendung als Speicherproteine angesehen. D.h. sie werden vom Insekten-Fettkörper synthetisiert, akkumulieren in außergewöhnlich hohen Mengen in der Hämolymphe und dem Fettkörper und dienen während der Metamorphose als Energielieferant und als Quelle für Aminosäuren [z.B. 147, 153, 222, 392-399]. Obwohl hemimetabole Insekten kein Puppenstadium durchschreiten sind auch für diese Tiere Speicherproteine von hoher Wichtigkeit, da sie kurz vor bis nach der Häutung die Nahrungsaufnahme einstellen [147, 388].

Insgesamt sind in Insekten offensichtlich verschiedene Serumproteine des Hexamerin-Typs vertreten: Larven-spezifische Hexamerine, die entwicklungsabhängig exprimiert werden und zum anderen Hexamerine, die auch weiterhin in adulten Tieren vorhanden sind [387, 389, 400]. Das Auftreten dieser unterschiedlich exprimierten Hexamerine wird im Folgenden kurz erläutert und in Zusammenhang zu den isolierten Per a 3-Isoformen Per a 3.03 und P II gebracht.

Larven-spezifische Hexamerine

Bei Schaben wie z.B. *Blatta orientalis* wurde gezeigt, dass die Hexamerine vor der Häutung die größte Proteinmasse in der Schabenhämolymphe darstellen, von denen einige bereits kurz nach der Häutung in der Hämolymphe kaum noch nachgewiesen werden können [387, 400]. Solche Larven-spezifischen Proteine wurden auch bei *Periplaneta americana* und *P. australasiense* beschrieben [387]. Innerhalb der Ordnung der Dictyoptera sind solche Speicherproteine deutlich kreuzreagierende Antigene [387].

Bei Per a 3.03 könnte es sich eventuell in *Periplaneta americana* um ein solches Larven-spezifisches Protein handeln: diese Per a 3-Isoform war anteilmäßig gegenüber P II und gegenüber der ersten verwendeten Hämolymphecharge in deutlich reduzierter Menge im Extrakt vorhanden, was auf eine stadienspezifische Expression hinweisen könnte (Abschnitt 3.1.2); allerdings wäre auch eine geschlechtsspezifische Expression denkbar.

Um diese Theorie zu überprüfen, sollte der Per a 3.03-Gehalt über SDS-PAGE und/oder Western-Blot mit anti-Per a 3.03-Antikörpern bei einzelnen Individuen stadien- und geschlechtsspezifisch überprüft werden. Diese Ergebnisse würden nicht nur zur Aufklärung

der Funktion dieses Hexamerins beitragen, sondern wären auch ein wichtiger Bestandteil im Hinblick auf das Spektrum der Allergenexposition.

Generell ein wichtiger Punkt vor allem der bei *Periplaneta americana* durchgeführten entwicklungsabhängigen Untersuchungen ist das Vorhandensein von Vitellogenin in der Schabenhämolymphe, welches bereits in Zusammenhang mit der von Wu et al. aufgereinigten Cr-PI-Fraktion angesprochen wurde (Abschnitt 4.1.1). Vitellogenin ist ein stark entwicklungsabhängiges Protein, welches weibchenspezifisch während der Vitellogenese exprimiert wird [324, 389, 401]. Dessen natives Molekulargewicht von 596 kDa ist dem der Hexamerine sehr ähnlich [324], sodass insbesondere bei älteren Studien ohne Sequenznachweis oder spezifische Antikörper-Detektion nicht auszuschließen ist, dass bei den beobachteten stadienspezifischen Effekten eventuell Vitellogenin mit einbezogen wurde.

Generell sind Vitellogenine und Hexamerine in ihrer Sequenz deutlich zu unterscheiden. Bei *Periplaneta americana* sind bisher zwei unterschiedliche Vitellogenine bekannt (Vitellogenin 1 und 2) [227, 228], die zu den Per a 3-Proteinen lediglich zu 2% bzw. 5% identisch sind und nur 8% bzw. 12% isofunktionelle Aminosäuren aufweisen (Alignment nicht gezeigt). Diese Vitellogenine enthalten mit 6% bis 10% auch nur einen geringen Anteil an aromatischen Aminosäuren. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass einzelne Aminosäuren der Hexamerine zum Aufbau der Vitellogenine herangezogen werden und darüber eine Assoziation von Hexamerinen, Reproduktion und Vitellogenese gegeben sein kann [402].

Hexamerine in adulten Tieren

Zusätzlich zu diesen stark entwicklungsabhängigen Hexamerinen wurden bei Dipteren z.B. bei der Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* ein Hexamerin identifiziert, welches in der Hämolymphe auch mindestens bis ins frühe adulte Stadium vorhanden bleibt [403]. Ähnliche Ergebnisse sind auch aus der Ordnung der Hymenoptera bei Ameisen bekannt [404, 405]. Auch in der Unterordnung der Blattodea wurde bei *Blattella germanica* und *Blatta orientalis* explizit von einem Hämolymp-Prottein berichtet, welches in nicht zu vernachlässigenden Mengen in adulten Individuen noch bis einen Monat nach der letzten Häutung nachgewiesen werden konnte [387, 389, 400].

Der hohe Proteinanteil von P II in dem Hämolymp-Extrakt von *Periplaneta americana*, der sich aus der Hämolymphe verschiedenen Entwicklungsstadien von Weibchen und Männchen zusammensetzte, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass in *P. americana* mit P II offensichtlich ein Hexamerin im adulten Stadium existiert. Zu P II homologe Proteine könnten ebenfalls in *Blattella germanica* und *Blatta orientalis* vorhanden sein: in ersten Western-Blot-Experimenten wurde eine spezifische Bindung der polyklonalen anti-P II-AK an Proteine aus den Crude-Extrakt der beiden Spezies beobachtet [390]. Umso erstaunlicher ist es, dass bisher kein zum Per a 3-homologes Allergen identifiziert wurde.

Da für Per a 3 erst kürzlich nachgewiesen wurde, dass es auch mit den Fäkalien der Amerikanischen Schabe ausgeschieden wird [53], würden durch das Vorhandensein unterschiedlich exprimierter Hexamerine, Per a 3-Allergene entwicklungsunabhängig ausgeschieden werden, in den Hausstaub gelangen und zu einer stetigen Allergenexposition des Patienten mit beitragen.

Im Hinblick auf die Terminologie ist aufgrund der offensichtlich unterschiedlichen Hexamerin-Typen zu empfehlen, dass der klassische Begriff von Speicherproteinen: Synthese vom Fettkörper, Entlassung in die Hämolymphe und Reabsorption in den Fettkörper auch nur für solche Proteine verwendet wird, die diesen Weg nachweislich beschreiten. [z.B. 153, 374, 375, 395, 404-406]. Demzufolge sind die Per a 3-Isoformen eindeutig Arylphorine und auch Hexamerine. Ob diese Isoformen allerdings auch im klassischen Sinn Speicherproteine sind, muss experimentell noch bestätigt werden.

Zusätzlich zur Rolle als Speicherprotein werden für Hexamerine in Insekten weitere mögliche Funktionen beschrieben [z.B. 147, 393, 407, 408]. Von diesen werden in den folgenden Abschnitten die Funktion als Transport- bzw. Liganden-Bindungsprotein sowie die Beteiligung an der humoralen Immunabwehr und dem Aufbau der Cuticula diskutiert und mögliche Nachweismethoden für Per a 3 angeschnitten. Insbesondere der Einbau von Per a 3 in die Cuticula wäre ein entscheidender Faktor im Hinblick auf die Allergenexposition der Patienten.

4.1.2.5 Rolle als Transport- bzw. Ligandenbindungsprotein

Eine mögliche Funktion der Hexamerine wird im Transport- bzw. bei der Bindung von Liganden vermutet. Einige Hexamerine wie z.B. aus der Motte *Hyalophora cecropia* können kleine organische Metabolite wie Riboflavin oder Biliverdin mit hoher Affinität binden [409, 410]. Eventuell können Hexamerine auch als Transporter für Phenole oder cuticuläre Proteine dienen, die zur Hypodermis transportiert und für die Polymerisation und Bräunung der Cuticula benötigt werden [381, 387, 411, 412]. Die exakte physiologische Rolle dieser Stoffgruppe insbesondere der Interaktionen mit Riboflavin und Biliverdin, ist jedoch noch unsicher [409, 410].

Auch bei den Per a 3-Proteinen könnte eine ähnliche Funktion vermutet werden: je nach Reinigungsprozedur wurde in den Absorptionsspektren der Per a 3-Proteine eine Absorption bei ca. 340 nm beobachtet (Abschnitt 3.3.2.5), die nicht wie bei den Hämocyaninen auf ein oxygeniertes Kupferzentrum, sondern eventuell auf gebundenes Riboflavin hinweisen könnte [291]. Dieses absorbiert bei 266 nm, 350 nm und 440 nm. Die charakteristische Absorption von Biliverdin liegt bei ca. 380 nm und 680 nm. Ob Per a 3 tatsächlich in der Lage ist solche organischen Metabolite zu binden, könnte mittels isothermer Titrationskalorimetrie unter Zugabe der Metabolite überprüft werden. In Anbetracht der limitierten Per a 3-Menge konnte dieser Versuch jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

4.1.2.6 Rolle bei der Immunabwehr

Zusätzlich zur Funktion als Speicher- und Transportproteine wird für Hexamerine ebenfalls eine Beteiligung bei der Immunabwehr diskutiert. Bei der Immunabwehr von Insekten kann zwischen einer zellulären Reaktion in Form von Phagocytose und einer humoralen Reaktion unterschieden werden [413]. Für die humorale Reaktion ist das grundlegende antibakterielle Agens bei Insekten und allgemein der Arthropoden das Lysozym, welches bei den Insekten zuerst von Cappellato und Narpozzi 1960 entdeckt wurde [413, 414]. Außerdem stehen für die humorale Reaktion weitere antibakterielle Peptide zur Diskussion [415].

Von Mitgliedern der Hämocyanin-Familie ist u.a. bei *Pennaeus vannamei* und *P. stylirostris* bekannt, dass in der Hämolymphe antifungale Peptide unterschiedlichen Molekulargewichts vorhanden sind, die eine 95%ige bis 100%ige Sequenzidentität zur C-terminalen Domäne (dritte Domäne) des Hämocyanins aufweisen [416, 417] [415]. Diese Fragmente waren in der Hämolymphe verstärkt durch eine mikrobielle Infektion induzierbar (Abb. 4-7) [417].

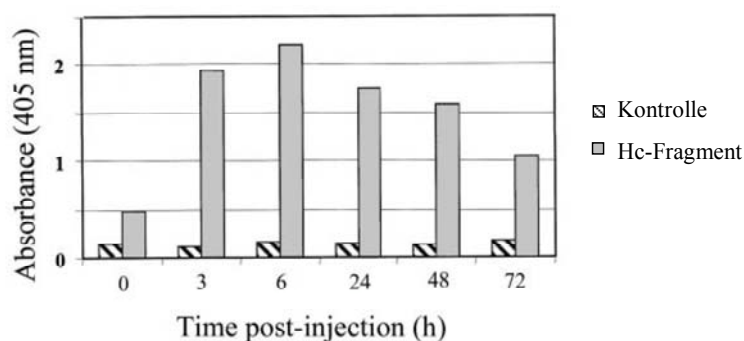


Abb. 4-7: Konzentrationsanstieg des C-terminalen Fragments von Hämocyanin in der Hämolymphe von *Pennaeus vannamei* nach mikrobieller Injektion [417]. Die mikrobielle Infektion führte nach 6 Tagen zu einem maximalen Anstieg des C-terminalen Fragments von Hämocyanin in der Hämolymphe der Tiere.

Vom Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* ist ebenfalls bekannt, dass die erste Domäne der Untereinheit a offenbar als 45 kDa-Peptid abgespalten werden kann und eventuell in die Immunabwehr der Arthropoden involviert sein könnte [418]. Weitere diesbezügliche Untersuchungen stehen allerdings auch dort noch aus.

Auch bei Per a 3 konnte auf SDS-Gelen bei Per a 3.03 und P II unter nicht näher bestimmten Bedingungen eine solche Bande bei ca. 45 kDa beobachtet werden, die ebenfalls vom anti-Per a 3.03- bzw. anti-P II-Antikörpern erkannt wurde (Abb. 3-41). Diese Bande wurde in dieser Arbeit nicht weiter identifiziert, sollte jedoch, um die Rolle von Per a 3 bei der Immunabwehr der Schaben näher beleuchten zu können, als potentiell antimikrobielles Peptid z.B. durch Wachstumshemmung und Hemmhofbildung diverser Pathogene im Lochplattentest untersucht werden. Ein ähnliches Experiment wurde bereits von Dorothea Nillius in unserem Institut mit fragmentiertem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* durch-

geführt, blieb jedoch -eventuell aufgrund der Probenkonzentration oder aufgrund der verwendeten Pathogene- negativ [415].

Ebenfalls bei *Periplaneta americana* wurde beobachtet, dass durch die Immunisierung mit Bienengift in der Hämolymphe ein 600 kDa-Protein (nativ) induziert wurde. Zusätzlich zu einer hoch exprimierten Proteinbande bei 102 kDa wurde dabei auf der SDS-PAGE ebenfalls durch das Bienengift induzierte Banden bei 80 kDa und 45 kDa beobachtet [419]. Aufgrund des nativen Molekulargewichts von etwa 600 kDa sowie der 80 kDa-Proteinbande des denaturierten Proteins könnte es sich bei diesem induzierten Protein um Per a 3 (respektive Per a 3.03) gehandelt haben (Abb. 3-31).

Somit weisen verschiedene Indizien darauf hin, dass die Per a 3-Allergene in *Periplaneta americana* an der humoralen Immunantwort beteiligt sein könnten.

Insgesamt wird trotz der noch lückenhaften Datenlagen die Beteiligung an der Immunabwehr in Arthropoden als mögliche funktionelle Verbindung zwischen den Mitgliedern der Hämocyanin-Superfamilie diskutiert [351].

4.1.2.7 Rolle als Strukturproteine: Einbau in die Cuticula

Eine weitere mögliche Funktion von Hexamerinen könnte beim Einbau in die Cuticula als sogenannte Strukturproteine zu finden sein. Da Insekten sich in ihrer Entwicklung immer wieder häuten, könnten allergene Hexamerine über die Exuvien und den Zerfall der Tiere im Hausstaub akkumulieren.

Um den Einbau dieser Proteine in die Cuticula besser nachvollziehen zu können, wird im Folgenden zunächst der Aufbau der Insektencuticula und anschließend deren Zusammensetzung erläutert.

Bei der Insekten-Cuticula sind verschiedene Schichten zu unterscheiden: die Endo-, Exo- und Epicuticula (Abb. 4-8). Die Hauptbestandteile dieser Schichten werden zum Teil von der darunter liegenden Epidermis synthetisiert [420].

Die Endocuticula ist nicht sklerotisiert und enthält im Wesentlichen das Polysaccharid Chitin sowie Hydratwasser und Proteine. Die Exocuticula enthält ebenfalls Chitin und Proteine, jedoch zusätzlich auch Diphenole, wie z.B. N-Acetyldopamin (NADA), die über oxidative Polymerisation zur Sklerotisierung und auch zur Bräunung dieser Schicht beitragen [421, 422]. Diesen Schichten aufliegend befindet sich die Epicuticula, die zum Großteil aus Lipiden und Phenolen besteht (Abb. 4-8) [420, 423].

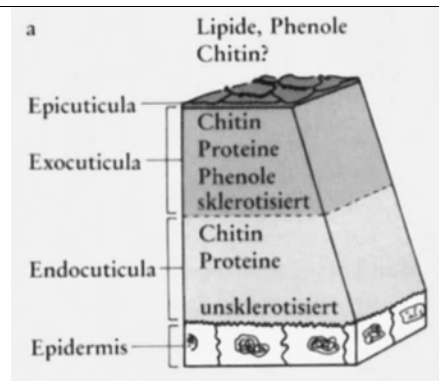


Abb. 4-8: Schematischer Aufbau der Insektencuticula, bei der die Endo-, Exo- und Epicuticula unterschieden werden können [420]. Die Hauptbestandteile dieser Schichten werden zum Teil von darunter liegenden Epidermis synthetisiert [420].

Von besonderem Interesse in der Insekten-Cuticula sind in Zusammenhang zu den Per a 3-Allergenen die Proteine, die in die Cuticula eingebaut und über Phenoxidasen mit Diphenolen kreuzvernetzt werden können („Cross-linking“). Diese partielle enzymatisch-gesteuerte Reaktion wird als Chinongerbung bezeichnet. Sie wurde erstmals von Pryor 1940 formuliert und wurde inzwischen vielfach modifiziert [424, 425].

U.a. bei *Periplaneta americana* wurde bereits in den frühen 70iger Jahren festgestellt, dass die in die Cuticula eingebauten Proteine ursprünglich aus der Hämolymphe stammten [411, 426-430]. Fox und Seed hatten bei *Periplaneta americana* als erste mindestens zwei solcher Hämolymphe-Proteine gefunden, die sogar mit unveränderten antigenen Determinanten in die Cuticula eingebaut wurden. Eine genauere Identifizierung dieser Proteine als über Immundiffusion hatten die Autoren jedoch nicht vorgenommen [411].

Einen weiteren Hinweis auf den Einbau von Hämolymphe-Proteinen in die Cuticula lieferte bei *Periplaneta americana* die Beobachtung, dass sich der Proteingehalt und die Protein-Zusammensetzung in Abhängigkeit zu den Häutungszyklen verändert [411]. Bei *Blatta orientalis* konnte von Kunkel and Lawler demonstriert werden, dass die Hexamerinkonzentration zwei Tage vor der Häutung maximal ansteigt. Zu diesem Zeitpunkt findet vermutlich ebenfalls die Exo- und Endocuticula-Synthese statt [387, 431-433]. Da *Periplaneta americana* wie *Blatta orientalis* ebenfalls zur Familie der Blattidae zählt, könnte die Synthese der Per a 3-Proteine -zumindest einer der isolierten Isoformen- ähnlich entwicklungsabhängig stattfinden. Eine ähnliche Hypothese wurde für die Per a 3-Proteine bereits in dem Abschnitt 4.1.2.4 formuliert.

Ein weiterer Punkt, der für die mögliche Involvierung der Per a 3-Proteine bei den Sklerotierungsprozessen in der Cuticula spricht, ist deren hoher Anteil an Tyrosinen (10.5.% bzw. 10.8%) [138]. Tyrosine, die an der Proteinoberfläche lokalisiert sind, können über Hydroxylierung und Oxidation direkt kovalent miteinander verknüpft werden oder auch über niedermolekulare phenolische Verbindungen (die zu *ortho*-Diochinonen oxidiert werden) miteinander verbrückt werden [434]. Dass Hexamerine durchaus z.B. von Tyrosinasen effizient

kreuzvernetzt werden können, konnte durch *in vitro* Studien eindeutig gezeigt werden [435, 436]. Als weiteres Indiz dafür, dass auch die Per a 3-Allergene kreuzvernetzt werden können ist die Beobachtung der 250 kDa großen Proteinbande auf SDS-Gelen, die von anti-P II-AK erkannt wurde und ebenfalls massenspektrometrisch eindeutig als P II identifiziert werden konnte (Abb. 3-35, Abb. 3-41). Diese Bande blieb trotz der denaturierenden Bedingungen auf den SDS-Gelen nachweisbar.

Der Einbau von Hexamerinen in die Cuticula erfolgt ohne proteolytische Spaltung, wie *in vivo* eindeutig bei *Calliphora vicina* gezeigt wurde [396, 437]. Da dieses Hexamerin lediglich vom Fettkörper synthetisiert wird, mussten diese in die Cuticula eingebauten Hexamerine aus der Hämolymphe stammen und wurden nicht z.B. von der Epidermis neu synthetisiert [438, 439].

Auch von anderen Mitgliedern der Hämocyanin-Superfamilie sind ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Kreuzvernetzung und dem Vorkommen in der Cuticula bekannt [381].

Das Hämocyanin von *Penaeus japonicus* wurde in der Endo- und Exocuticula der Tiere nachgewiesen [440]. Und auch das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* konnte nicht nur aus der Spinnen-Cuticula extrahiert werden, sondern die Hämocyanin-Untereinheiten konnten sogar in Gegenwart phenolischer Substanzen und einer Tyrosinase quervernetzt werden (Abb. 4-9) [434, 441].

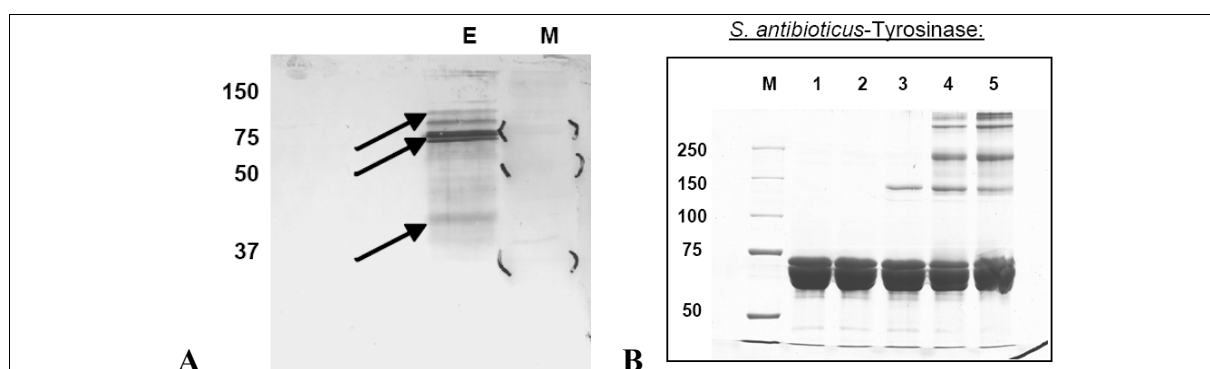


Abb. 4-9: Nachweis (A) von Hämocyanin (Hc) in der Cuticula von *Eurypelma californicum* und (B) der Quervernetzung von Hämocyanin durch Tyrosinasen [434].

A) Western Blot der extrahierten Proteine aus Exuvien von *Eurypelma californicum*. Als primärer AK wurden institutseigene polyklonale AK gegen dissoziiertes *Eurypelma*-Hämocyanin verwendet. E= Ringer-Extrakt (konzentriert), M= BioRad-Proteinstandard. Die Pfeile markieren die detektierten Hämocyanin (Hc)-Banden. Die Molekulargewichte des Markers sind in kDa angegeben.

Aus den Exuvien konnten Hämocyanin bzw. Fragmente von Hc extrahiert werden [434].

B) 7.5%ige SDS-PAGE von über eine Tyrosinase kreuzvernetzte Hämocyanine. M= BioRad-Proteinstandard, 1= Hc (frisch), 2= Hc (inkubiert), 3= Hc + Tyrosinase, 4= Hc + Tyrosinase + 33 µM L-Tyrosin, 5= Hc + Tyrosinase + 33 µM L-Tyrosin + 33 µM L-DOPA.

In Gegenwart der Tyrosinase kann Hämocyanin zu höher molekularen Proteinbanden kreuzvernetzt werden. Die Proteinbanden bei 140 kDa in den Spuren 3, 4 und 5 wurde eindeutig dimerem Hämocyanin zugeordnet. Bei den hochmolekularen Banden von über 150 kDa könnte es sich um weitere Hämocyanin-Aggregate gehandelt haben [434].

Beim Cryptocyanin aus *Cancer magister* konnten Terwillger et al. in beeindruckender Weise zeigen, dass dieses Protein in deutlicher Abhängigkeit zu den Häutungszyklen in der Hämolymphe akkumulierte. Kurz vor der Häutung wurde es aus der Hämolymphe depletiert und gelangte über die Epidermis in die Endocuticula, wo es über Antikörper nachweisbar war [442]. Kurz nach der Häutung war es auch noch in der Exocuticula nachweisbar, wurde später aber offenbar, im Unterschied zum Hexamerin aus *Calliphora vicina* derart proteolytisch gespalten, dass die antigenen Determinanten zerstört wurden, sodass der Nachweisantikörper nicht mehr binden konnte [396, 437, 442].

Auch für die Per a 3-Proteine wäre es interessant ähnlich angelegte Experimente über eine mögliche Kreuzvernetzung und den Nachweis der Per a 3-Isoformen in der Cuticula durchzuführen. Der Einbau von intaktem Per a 3 in die Schabencuticula wäre ein gravierender Faktor im Hinblick auf die Allergenexposition. Da sich die Amerikanische Schabe bis zur adulten Lebensform bis zu 14 mal häutet [443], könnten die Allergene aufgrund der Exuvien auch noch nach der Schabenbekämpfung nachhaltig im Hausstaub akkumulieren.

Zusammenfassend gibt es für die Per a 3-Isoformen verstärkt Hinweise darauf, dass sie als Strukturproteine in die Cuticula eingebaut werden und auch proteolytisch gespalten als antimikrobielle Peptide bei der humoralen Immunabwehr in der Schabe eine Rolle spielen könnten. Mit Per a 3.03 könnte möglicherweise ein entwicklungsabhängiges Hexamerin und mit P II ein Hexamerin adulter Stadien in *Periplaneta americana* als allergene Isoformen vertreten sein. Der experimentelle Nachweis dieser Indizien steht noch aus.

4.1.3 Zusammensetzung von P II

Als zentrales Ergebnis dieser Arbeit stellten sich die massenspektrometrischen Ergebnisse der isolierten Per a 3-Isoformen heraus (Abschnitt 3.3.2.1). Die ursprünglich gewählten Proteinbezeichnungen waren dadurch nicht optimal und wurden basierend auf den massenspektrometrischen Ergebnissen mit der Bezeichnung Per a 3.03 und P II aktualisiert. Eine Übersicht der verwendeten und veralteten Bezeichnungen gibt Tabelle 4-3.

aktuelle Bezeichnung	zusätzliche in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung	Zusammensetzung	interne veraltete Bezeichnung	Referenzen
Per a 3.03	80kDa-Per a 3-Isoform	Neue, sequenziell unbekannte Isoform	Per a 3.1	Abschnitt 3.3.2.1, 148
P II	73kDa-Per a 3-Isoform	Per a 3.01 (C12) Per a 3.0301 (C20)	Per a 3.2	148
Cr-PI	---	Alle Proteine im CE von <i>Periplaneta americana</i> > 150 kDa	---	108

Tabelle 4-3: Aktuelle Bezeichnungen der Per a 3-Isoformen und Per a 3-haltigen Extrakte inklusive deren Zusammensetzung.

Obwohl die massenspektrometrischen Daten eindeutig belegten, dass sich P II aus den zwei sequenziell bekannten Isoformen Per a 3.01 und Per a 3.0201 zusammensetzte, ließen sie keinen Rückschluss auf die Verhältnisse dieser Isoformen in P II zu. Theoretisch möglich wären daher, wie bereits in den Ergebnissen kurz angesprochen, drei prinzipiell unterschiedliche Zusammensetzungen von P II:

1. heterogenes Gemisch aus homogenen Per a 3-Hexameren (6 und 6):
hexameres (6x) Per a 3.01 und hexameres (6x) Per a 3.0201,
2. homogenes Gemisch aus heterogenen Per a 3-Hexameren (3+3 oder n+m):
z.B. 2x Per a 3.01 + 4x Per a 3.0201 oder z.B. 3x Per a 3.01 + 3x Per a 3.0201,
3. heterogenes Gemisch aus heterogenen Per a 3-Hexameren (n+m und m+n):
z.B. 3x Per a 3.01 + 3x Per a 3.0201 und z.B. 2x Per a 3.01 + 4x Per a 3.0201.

Weder auf der SDS-PAGE, noch in der Größenausschlusschromatographie, noch in Sedimentationsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge war es möglich, die genaue P II-Zusammensetzung der nativen Hexamere zu analysieren (Abschnitt 3.3), bzw. die einzelnen Komponenten getrennt von einander zu beobachten, obwohl die in P II enthaltenden Isoformen in rekombinanter (monomerer) Form auf der SDS-PAGE ein um 5 kDa unterschiedliches Molekulargewicht aufwiesen: Per a 3.01 78 kDa und Per a 3.0201 72 kDa [142]. Diese Differenz zu dem Molekulargewicht der P II-Probe auf der SDS-PAGE (73 ± 1 kDa) könnte auf unterschiedliche Glykosylierungen zurückgeführt werden, die bei einer SDS-PAGE zu einer verringerten Mobilität führen und somit ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht ergeben [444]. Ausgehend von der Sequenz besitzen Per a 3.01 und Per a 3.0201 je zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen; da die rekombinanten Proteine jedoch in *Escherichia coli* exprimiert wurden, waren diese bei der Molekulargewichtsbestimmung auf der SDS-PAGE nicht glykosyliert [138, 445].

In wieweit die in dieser Arbeit isolierten Per a 3-Isoformen tatsächlich glykosyliert sind ist nicht bekannt. Bei einer ersten Detektion mit Concanavalin A und einer Avidin-Peroxidase wurden im Lektinblot im CE und der HL (Auftrennung mittels SDS-PAGE) zahlreiche glykosylierte Banden beobachtet, die nicht deutlich differenziert werden konnten (Experiment nicht gezeigt). Dadurch war eine Zuordnung zu den Per a 3-Isoformen nicht eindeutig möglich und sollte daher mit den gereinigten Isoformen erneut überprüft werden.

Eine partielle Differenzierung der in P II enthaltenen Isoformen gelang allerdings sowohl mittels IEF als auch mittels 2D-Immunelektrophorese (Abschnitt 3.3.2.2, 3.3.2.6).

Bei der IEF konnten in der nativen P II-Probe zwei Banden unterschieden werden, die einen etwas unterschiedlichen pHi von 6.4 und 6.5 aufwiesen (Abb. 3-37). Da es sich bei dieser Probe um native Proben handelte und von den Per a 3-Proteinen auch nicht bekannt ist, dass

sie auf Polyacrylamid-Gelen dissoziieren, musste diese Doppelbande auf zwei unterschiedlich geladene Hexamere zurückgeführt werden. Somit ist 2. auszuschließen, dass sich P II aus einem homogenen Gemisch aus heterogenen Per a 3-Hexameren zusammensetzt.

Ebenfalls in der 2D-Immungelektrophorese konnte bestätigt werden dass 2. auszuschließen war (Abschnitt 3.3.2.6): die gereinigte P II-Isoform trennte sich bereits in der ersten Dimension auf, sodass in der zweiten Dimension sowohl mit dem anti-Per a 3.03-AK, als auch mit dem anti-P II-AK je zwei Präzipitationsbögen unterschieden werden konnten (Abb. 3-44, Immungel 7 und 8).

Diese Präzipitationsbögen unterschieden sich deutlich in ihrer Ausprägung (Höhe), sodass entweder davon ausgegangen werden musste, dass die in P II enthaltenen Isoformen in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen in P II vorhanden waren oder deutlich differierende Oberflächenepitope aufweisen mussten. Diese Fragestellung konnte jedoch durch diesen Versuch nicht eindeutig beantwortet werden.

Ein weiteres Indiz auf die unterschiedliche P II Zusammensetzung lieferten die Stabilitäts-experimente gegenüber unterschiedlichen pH-Werten (Abschnitt 3.3.2.7). Dort konnte mit zunehmender Inkubationszeit beobachtet werden, dass die typische hexamere P II-Bande zwar auf dem Coomassie-gefärbten Gel angefärbt wurde, jedoch die Bindung des anti-Per a 3.03-AK mit zunehmender Inkubationszeit deutlich geringer wurde. Diese Beobachtung war besonders gut in der Probe bei pH 3.5 nach einer Woche Inkubation zu erkennen (Abb. 3-56).

Unter Einbeziehung der Bindung des anti-Per a 3.03-AK in der 2D-Immungelektrophorese (Abb. 3-44, Immungel 7) ließ diese Beobachtung den Rückschluss zu, dass dieser Antikörper offenbar lediglich an eine der P II-Isoformen gut binden kann und zwar an die, die gegenüber Protonen eine geringere Stabilität aufwies. Die P II-Isoform, die auf dem Coomassie-gefärbten Gel weiterhin gut als Hexamer zu beobachten war, könnte Peak 2 des Immungel 7 (Abb. 3-44) entsprechen und weist die höhere pH-Stabilität auf. Bei Heterohexameren, bestehend aus Per a 3.01- und Per a 3.0201-Untereinheiten wären weder eine so deutlich unterschiedliche AK-Bindung (Kreuzreaktivitäten) noch pH-Stabilitäten zu erwarten gewesen. Somit waren 2. und 3. auszuschließen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse liegt daher die Schlussfolgerung nahe, dass in P II das unter 1. erläuterte heterogene Gemisch aus homogenen Per a 3-Hexameren enthalten ist, welches mit den eingesetzten Reinigungsprotokollen voneinander nicht separiert werden konnten. Damit sind die Per a 3-Proteine typische Hexamerine, deren Mitglieder überwiegend aus Homohexameren bestehen [153].

In homohexameren Homologie-Modellen der in P II enthaltenen Isoformen wurden die linearen allergenen Epitope (bei Per a 3.01 identifiziert [140]) lokalisiert. Die homohexamere Struktur führt zu repetitiven Epitopen, die die allergene Potenz der Per a 3-Proteine erhöhen

können, wie die Untersuchungen von Hexameren und Dissoziat u.a. im Basophilen-Aktivierungstest ebenfalls bestätigten (Abschnitt 3.3.2.8).

4.1.4 Phenoloxidase-Aktivität

Wie bereits angesprochen, werden für die enzymatische Kreuzvernetzung der Proteine in der Cuticula Phenoloxidasen und Phenole benötigt. Diese beiden Substanzen spielen ebenfalls bei der Immunabwehr der Insekten eine Rolle. Die Funktion und das Vorkommen solcher Phenoloxidasen in der Amerikanischen Schabe werden im Folgenden kurz erläutert und in Zusammenhang zu der in den Extrakten gemessenen Diphenoloxidase-Aktivität diskutiert.

In Insekten, wie in der Amerikanischen Schabe, kommen mindestens zwei unterschiedliche Phenoloxidasen vor: zum einen eine Phenoloxidase, die als Prophenoloxidase hauptsächlich in der Hämolymphe, respektive der Hämocyten der Tiere auftritt [290] und zum anderen eine Laccase, die in der linken Collateraldrüse bei *Periplaneta americana* identifiziert wurde [446]. Offenbar sind beide Enzyme u.a. ebenfalls in der Cuticula vorhanden und sind dort an den Sklerotisierungsprozessen, wie sie in Abschnitt 4.1.2.7 vorgestellt wurden, maßgeblich beteiligt [287, 288, 447-451].

Erstere ist eine Phenoloxidase, genauer spezifiziert eine Diphenoloxidase (Catecholoxidase), die nachweislich Diphenole zu *ortho*-Chinonen umsetzen kann. Die entstandenen Chinone können sowohl enzymatisch als auch nichtenzymatisch weiter zu Melanin polymerisieren [270, 452, 453]. Eindringende Mikroorganismen und Parasiten können durch Aktivierung dieser Phenoloxidase z.B. in ein Melaninnetz eingekapselt und unschädlich gemacht werden (Abb. 4-10) [415, 454].

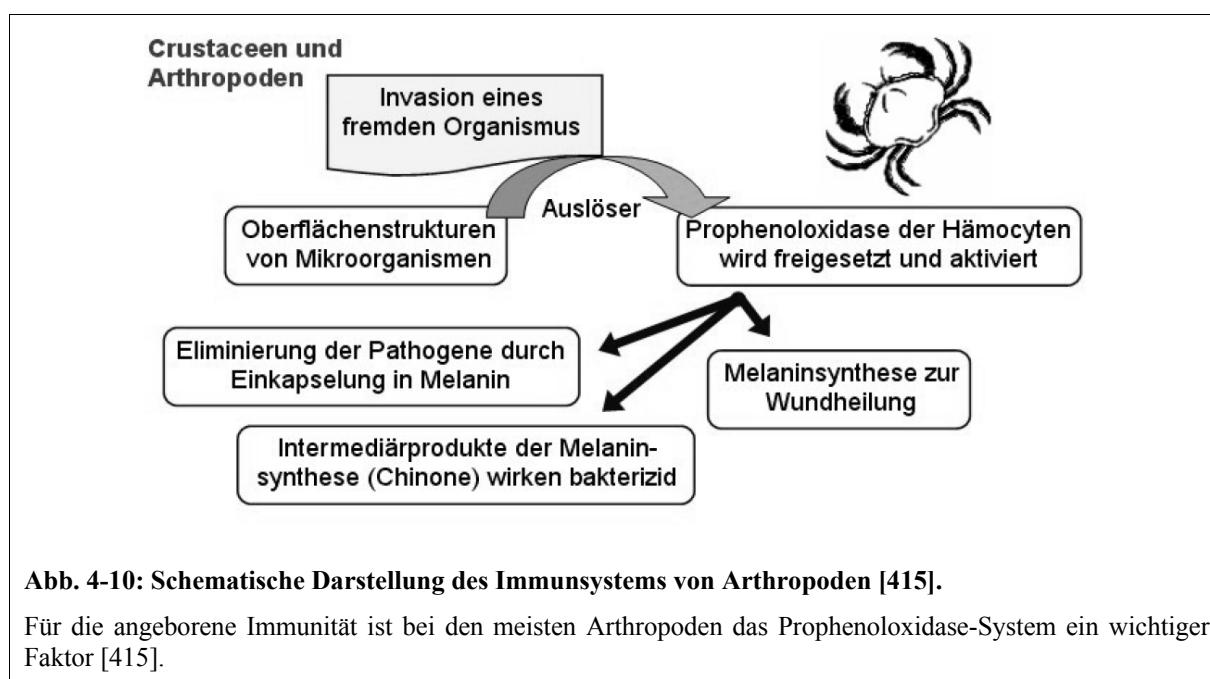


Abb. 4-10: Schematische Darstellung des Immunsystems von Arthropoden [415].

Für die angeborene Immunität ist bei den meisten Arthropoden das Prophenoloxidase-System ein wichtiger Faktor [415].

Somit ist diese Diphenoloxidase ein zusätzlicher und wichtiger Bestandteil der in Abschnitt 4.1.2.6 erläuterten Immunabwehr von Insekten. Ebenso wie z.B. bei den Hämocyaninen von *Eurypelma californicum* und *Limulus polyphemus* kann die Aktivierung dieser Catecholoxidase mittels SDS, Trypsin oder Chymotrypsin erfolgen [270-272, 290, 455]. Inhibiert werden kann diese Phenoloxidase -ebenso wie die der Crustaceen und Cheliceraten- durch Phenylthioharnstoff (PTU) [229-231, 269, 440, 456-458].

Die Diphenoloxidase ist bei der Amerikanischen Schabe nachweislich an der Sklerotisierung der Ootheken, bei der Immunabwehr gegen eindringende Mikroorganismen und beim Wundverschluss beteiligt [231, 289]. Auch die Verwendung von Insektiziden verursacht eine erhöhte Melanisierungsrate in der Schabenhämolymphe [459].

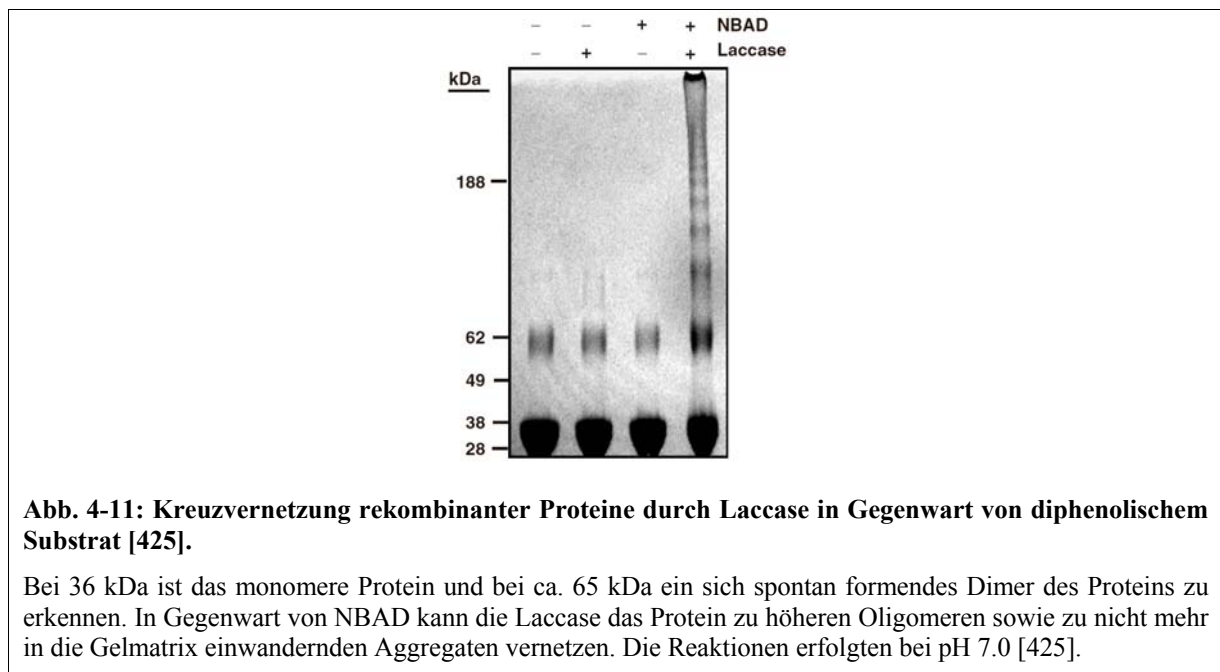
Zweites Enzym ist eine Laccase, die in der Amerikanischen Schabe bereits 1960 von Whitehead et al. identifiziert wurde [446]. Diese unterscheidet sich u.a. von der Phenoloxidase dadurch, dass sie eine weniger starke Substratspezifität aufweist und zusätzlich zu *ortho*-Diphenolen auch *para*-Diphenole umsetzen kann [460]. Außerdem wird sie nicht durch PTU inhibiert und ist laut dieser Studie nicht in der Lage L-Tyrosin umzusetzen [446]. Bei Laccasen aus Pilzen ist beschrieben, dass sie ebenfalls Monophenole wie z.B. Tyrosin umsetzen können [461].

In meiner Arbeit konnte sowohl in der Hämolymphe als auch im Crude-Extrakt durch den Umsatz von Dopamin eine Diphenoloxidase-Aktivität bei *Periplaneta americana* nachgewiesen werden. Wobei im Crude-Extrakt interessanter Weise diese Aktivität nur nach einer gelchromatographischen Trennung beobachtet werden konnte; eine Monophenoloxidase-Aktivität konnte in keinem der Extrakte nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.1.6). Die beobachtete Aktivität war weder durch das Einfrieren und Auftauen der Extrakte noch durch die Zugabe von SDS beeinflusst, wie es für die Phenoloxidase aus *P. americana* beschrieben ist [231]. Eine Inhibition durch das im Hämolymphe- und Crude-Extrakt-Puffer enthaltene PTU wurde auch nicht beobachtet.

Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei der in den Extrakten beobachteten Aktivität um die einer Laccase gehandelt haben muss. Diese Aktivität war keinesfalls auf die Per a 3-Allergene zurückzuführen, da u.a. in diesen Proteinen die für das aktive Zentrum benötigten Histidine fehlen.

Bisher wurde in der Literatur lediglich von Laccasen in der Insektencuticula, der Epidermis, dem Mitteldarm, den Malpighischen Gefäßen und dem Fettkörper berichtet [287, 425, 449, 462, 463]. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Aktivität in der Schabenhämolymphe (Abschnitt 3.1.1.6,) stadien- und/oder geschlechtsspezifisch ist, oder ob die Aktivität z.B. auf Verunreinigungen des Hämolympheextraktes mit Fettkörper-Zellen zurückgeführt werden muss, sollte die Aktivität der Hämolymphe individualisierter Tiere z.B. im Dot-Blot überprüft werden.

Um zu verifizieren, ob die beobachtete Aktivität tatsächlich auf eine Laccase zurückgeführt werden kann, sollte in nachfolgenden Experimenten z.B. der Umsatz von *para*-Diphenolen, wie z.B. Hydrochinon und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd durch Hämolymp- und Crude-Extrakt der Amerikanischen Schabe getestet werden. Interessant wären ebenfalls die Untersuchungen, ob diese Laccase ebenso wie Phenoloxidasen in der Lage sein kann, in Gegenwart von Diphenolen die Per a 3-Proteine miteinander quer zu vernetzen. Erste Studien mit einer Laccase aus *Manduca sexta* weisen darauf hin, dass dieses Enzym *in vitro* durch Zugabe von N-Acetylcatecholamin (NBAD) durchaus in der Lage ist rekombinant hergestellte cuticuläre Proteine zu oligomerisieren und sogar zu polymerisieren (Abb. 4-11) [425].



Zusammenfassend scheint es bei *Periplaneta americana* eine eng verknüpfte Assoziation von kreuzvernetztem Per a 3, Phenoloxidase-Aktivität, Immunantwort und dem Aufbau der Cuticula zu geben.

4.2 Per a 9

Bei der Arginin-Kinase Per a 9 aus *Periplaneta americana* handelt es sich um ein sehr potentes Majorallergen, welches aus dem Crude-Extrakt der Amerikanischen Schaben isoliert werden konnte (Abschnitt 3.2). Dieses Proteine war bereits sequenziell bekannt und auch biochemisch teilweise charakterisiert [198, 214]. Die neu gewonnenen Ergebnisse werden auf Grundlage dieser Untersuchungen sowie im Zusammenhang zu anderen Arginin-Kinasen im Folgenden analysiert.

4.2.1 Reinigung und Proteinausbeute

Bereits Brown et al. isolierten u.a. unter Verwendung zweier chromatographischer Schritte (Größenausschluss- und Anionenaustauscher-Chromatographie) mit einer Ausbeute von 5.79% (w/w) eine sehr aktive Arginin-Kinase aus einem *P. americana*-Crude-Extrakt [214]. In meiner Arbeit konnte ich ebenfalls ausgehend von einem Crude-Extrakt, Per a 9 mit einer maximalen Ausbeute von 0.87% (w/w) isolieren. Bei dieser Reinigung war gegenüber Brown et al. die Reihenfolge der chromatographischen Schritte getauscht (erst Anionenaustauscher- und anschließend Größenausschlusschromatographie) [214].

Trotz der deutlich geringeren Ausbeute gegenüber der bereits publizierten Methode, bestand der Vorteil des verwendeten Reinigungsprotokolls darin, dass damit gleichzeitig zwei Majorallergene der Amerikanischen Schabe und zwar Per a 9 und Per a 3 isoliert werden konnten (Abschnitt 3.2). Eine solche parallele Gewinnung könnte insbesondere für die pharmazeutische Allergengewinnung interessant sein.

Auf diese Weise wurde eine monomere Arginin-Kinase isoliert, die auf der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 39 ± 1 kDa und in nativer Form im Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von 35 kDa aufwies (Abb. 3-68). Beide Massenbestimmungen lagen in der Größenordnung von dem von Brown et al. über SDS-PAGE und Gelfiltration ermittelten Molekulargewicht von 43 kDa [214] und sind auch mit dem aus der Sequenz errechneten Molekulargewicht von 39.7 kDa vergleichbar (Abschnitt 3.4.3). Die etwas niedrigere Molekulargewichtsbestimmung von Per a 9 im Gleichgewichtslauf musste auf das Vorhandensein kleinerer Peptidfragmente zurückgeführt werden. Diese Peptidfragmente wurden durch längere Lagerungszeit in zunehmender Konzentration beobachtet und massenspektrometrisch eindeutig als Per a 9-Fragmente identifiziert (Abschnitt 3.4.1). Die offensichtlich in der Per a 9-Probe enthaltenen Proteasen führten nach langer Lagerung bei 4°C zum vollständigen Abbau von Per a 9, sodass dieses auf Polyacrylamid-Gelen nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3-74, Abb. 3-75).

Um eine Lagerung von intaktem Per a 9 zu gewährleisten sollte das Protein zukünftig bei tieferen Temperaturen gelagert oder dem isolierten Protein zusätzlich Protease-Inhibitoren zugesetzt werden.

4.2.2 Disulfidverbrückung und strukturelle Merkmale

Die Konformation und Stabilität von Allergenen ist ein wichtiger Faktor für Konformationseptiope und damit verbunden für die Bindung von IgE-Antikörpern. Da Disulfidbrücken sich auf die native Struktur stabilisierend auswirken [297], wird im Folgenden genauer auf die Ausbildung von Disulfidbrücken bei Per a 9 eingegangen.

Wie bereits eingangs erläutert ist die komplette Primärstruktur von Per a 9 bekannt [212]. In dieser Sequenz sind fünf Cysteine vorhanden, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden könnten. Zur Überprüfung, in wieweit diese Cysteine in Per a 9 auch tatsächlich Disulfidbrücken ausbilden, wurde das elektrophoretische Laufverhalten von reduziertem (mit β -Mercaptoethanol) und nicht-reduziertem (ohne β -Mercaptoethanol) Per a 9 auf einer SDS-PAGE verglichen (Abb. 3-72). Da zwischen den Proben erstaunlicherweise kein Laufunterschied festgestellt wurde, konnte rückgeschlossen werden, dass bei Per a 9 keine intramolekularen Disulfidbrücken ausgebildet sind. Allerdings steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu der Veröffentlichung von Brown et al., die bei Per a 9 lediglich eine und nicht fünf Sulfhydrylgruppen detektierten und somit von zwei Disulfidbrücken auszugehen war [214]. Da die Autoren dem Protein jedoch bei der Extraktgewinnung β -Mercaptoethanol zugesetzt hatten, ist bereits das Ergebnis dieser publizierten Untersuchung widersprüchlich: durch den Einsatz von β -Mercaptoethanol hätten alle Disulfidbrücken reduziert und fünf Sulfhydrylgruppen nachgewiesen werden müssen.

Aufgrund der offensichtlich widersprüchlichen und auch überraschenden Ergebnisse ist es sinnvoll, theoretisch ausgebildete Disulfidbrücken durch die Position der Cysteine in der Tertiärstruktur der Arginin-Kinase zu überprüfen. Allerdings ist weder von Per a 9, noch von der Arginin-Kinase aus *Blattella germanica*, noch von anderen allergenen Arginin-Kinasen die Tertiärstruktur bekannt. Eine strukturell bekannte Arginin-Kinase aus Arthropoden ist die aus *Limulus polyphemus* [211, 225, 464].

Um zu überprüfen, in wieweit diese Arginin-Kinase mit den Arginin-Kinasen aus den Schaben sequenziell ähnlich ist und darüber eine strukturelle Ähnlichkeit impliziert werden kann [283], werden zunächst die sequenziellen Ähnlichkeiten (Abb. 4-12) und anschließend die strukturellen Eigenschaften (Abb. 4-13) beleuchtet. Besonderes Augenmerk liegt hierbei u.a. auf der Position der Cysteine. Diese sind im Sequenzalignment in blau, grün und gelb eingefärbt (Abb. 4-12).

		*	20	*	40	*	
Per_a_9	:	MVDA	AVLEKLEAGFAKL	-AASDSKSLLKKYL	LTKEVFDNLKTKKTP	PSFGST	: 49
Bla_g	:	MVDA	AVLEKLEAGFAKL	-AASDSKSLLRKYL	LTKEVFDNLKTKKTP	TEFGST	: 49
Lim_p_A	:	MVDQ	ATLDKLEAGFKKLQ	EASD	CKSLLKKHLTKD	VFDSIKNKKTG-MGAT	: 49
		MVDa	AvLeKLEAGFaKL	aASDsKSLL4KyL	TKeVFDn6KtKKTp	fGsT	
		60	*	80	*	100	
Per_a_9	:	LLDVIQSGLENHDS	GVGIYAPDAEAY	AVFADLFDPIIE	DYHGGFKKTDKH		: 99
Bla_g	:	LLDVIQSGLENHDS	GVGIYAPDAEAY	TVFADLFDPIIE	DYHGGFKKTDKH		: 99
Lim_p_A	:	LLDVIQSGVENLD	SGVGIYAPDAES	YRTFEGPLFDPIID	DYHGGFKLTDKH		: 99
		LLDVIQSG6ENh	DSGVGIYAPDAEaY	vFadLFDPIIE	DYHGGFKkTDKH		
		*	120	*	140	*	
Per_a_9	:	PPKDWGDVDTLGN	LDPAGEYIISTRVRC	CGRSMQGYPFNP	CLTEAQYKEME		: 149
Bla_g	:	PPKDWGDVDTLGN	LDPAGEYIISTRVRC	CGRSMQGYPFNP	CLTEAQYKEME		: 149
Lim_p_A	:	PPKQWGDINTLVGL	DPAGQFIISTRVRC	CGRSLQGYPFNP	CLTAEQYKEME		: 149
		PPKdWGD61TLgn	LDPAG25IISTRVRC	GRS6QGYPFNPCL	TaEQYKEME		
		160	*	180	*	200	
Per_a_9	:	DKVSSTLSGLEA	EELKGQFYPLTGMTKEV	QQKLIDDHFLFKEG	DREFLQAN		: 199
Bla_g	:	DKVSSTLSGLEA	EELKGQFYPLTGMTKEV	QQKLIDDHFLFKEG	DREFLQHAN		: 199
Lim_p_A	:	EKVSSTLSMEDEL	KGTYYPLTGMSKAT	QQQLIDDHFLFKEG	DREFLQTAN		: 199
		dKVSSTLSg6E	ELKGq5YPLTGM3Kev	QQkLIDDHFLFKEG	DREFLQ AN		
		*	220	*	240	*	
Per_a_9	:	ACRFWPTGRGIYH	NDAKTFLVWCNEED	HRLRIISMQMGGDL	GQVYRRLVTA		: 249
Bla_g	:	ACRFWPTGRGIYH	NDAKTFLVWCNEED	HRLRIISMQMGGDL	GQVYRRLVTA		: 249
Lim_p_A	:	ACRYWPTGRGIFH	NDAKTFLVWVNEED	HRLRIISMQKGGDL	KTVYKRLVTA		: 249
		ACR5WPTGRGI5H	NDAKTFLVWCNEED	HRLRIISMQmGGDL	gqVY4RLVTA		
		260	*	280	*	300	
Per_a_9	:	VNDIEKRIPFSHDD	RLGFLTECPTNLGTT	VRASVHIKVPKLAAD	KAKLEE		: 299
Bla_g	:	VNDIEKRVPFSHDD	RLGFLTECPTNLGTT	VRASVRIKVPKLAAD	KKKLEE		: 299
Lim_p_A	:	VDNIESKLPFSHDD	RFGLTECPTNLGTT	MRASVHIQLPKLAKDR	KVLED		: 299
		V11IEk46PF	SHDDRLGFLTECPTNLGTT	6RASVhIk6PKLAa	D4kkLEe		
		*	320	*	340	*	
Per_a_9	:	VAGKYNLQVRGTR	GEHTEAEGGVYDISN	KRRMGLTEYDAVK	EMNDGIAEL		: 349
Bla_g	:	VAGKYNLQVRGTR	GEHTEAEGGVYDISN	KRRMGLTEYDAVK	GMNDGIAEL		: 349
Lim_p_A	:	IASKFNLQVRGTR	GEHTESEGGVYDISN	KRRGLTEYQAVRE	MODGILEM		: 349
		6AgK5NLQVRGTR	GEHTEaEGGVYDISN	KRR6GLTEYdAV	4eMnDGIAe6		
Per_a_9	:	IKLESSL-					: 356
Bla_g	:	IKIESSL-					: 356
Lim_p_A	:	IKMEKAAA					: 357
		IK6Essl					

Abb. 4-12: Sequenzalignment von Per a 9 mit den Arginin-Kinasen aus *Blattella germanica* (Bla g) und *Limulus polyphemus* (Lim p A).

Die Proteine wurden mit ClustalX 1.83 align und mit Hilfe von GeneDoc 2.6 ausgewertet. In blau dargestellt sind die in der Sequenz konservierten Cysteine. Das fünfte Cystein bei *Limulus polyphemus* ist in gelb dargestellt, die fünften Cysteine aus den Schaben Arginin-Kinasen in grün. Diese Gruppe besitzt zueinander eine 76-97% Sequenzidentität und 87-98% isofunktionelle AS. Für das Alignment wurden folgende Sequenzen verwendet: Per_a_9= AAT77152 Arginin-Kinase aus *Periplaneta americana*, Bla_g= ABC86902 Arginin-Kinase aus *Blattella germanica* und Lim_p_A= 1M15A Arginin-Kinase aus *Limulus polyphemus*.

Eine Übersicht über die AS-Sequenz-Identitäten und –Ähnlichkeiten in dem Alignment gibt Tabelle 4-4.

	Per a 9	Bla g	Lim p A
Per a 9	356	97%	77%
	0	98%	88%
	0	0%	0%
Bla g	346	356	76%
	350	0	87%
	0	0	0%
Lim p A	274	274	357
	316	315	0
	3	3	0

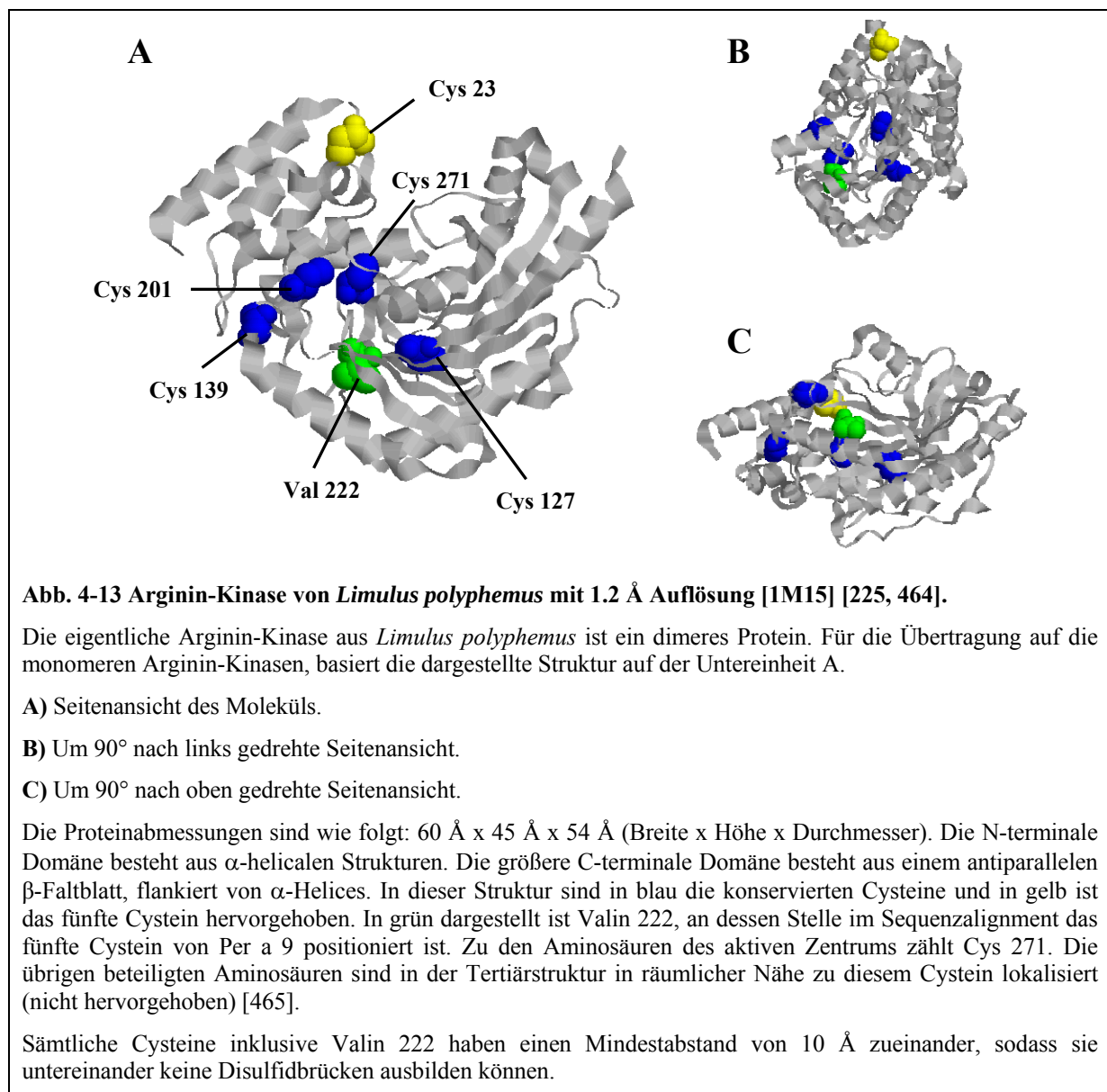
Tabelle 4-4: Aminosäure-Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten aus dem Arginin-Kinase-Alignment (Abb. 4-12).

Die Auftragsung entspricht der GeneDoc-Auswertung: jeweils die erste Zeile gibt die Identitäten der Aminosäuren an, die zweite Zeile den Anteil der isofunktionellen Aminosäuren und die dritte Zeile jeweils den Anteil der Lücken im Alignment. Bei den grau hinterlegten Feldern sind die Angaben in Form der Aminosäureanzahl und bei den weiß hinterlegten Zeilen in Prozent angeben.

Die Arginin-Kinasen aus *Periplaneta americana* (Per a 9) und *Blattella germanica* (Bla g) weisen zueinander mit 97% eine sehr hohe Sequenzidentität auf (Tabelle 4-4). In der Primärsequenz dieser Arginin-Kinasen scheinen vier der fünf Cysteine konserviert zu sein. Diese sind im Alignment blau hinterlegt (Abb. 4-12). Das in gelb eingefärbte Cystein ist bei den Arginin-Kinasen aus den Schaben nicht vorhanden. Diese besitzen stattdessen ein Cystein, welches im Alignment an Stelle von Valin 222 der *Limulus polyphemus* Arginin-Kinase positioniert ist und im Sequenzalignment sowie der Struktur in grün hervorgehoben ist (Abb. 4-12, Abb. 4-13).

Aufgrund der 76%igen bzw. 77%igen Identität der Arginin-Kinase aus *L. polyphemus* (Lim p A) zu den Schaben-Arginin-Kinasen sowie den vier konservierten Cysteinen, ist zu erwarten, dass Per a 9 und die Arginin-Kinase aus *B. germanica* eine ähnliche Struktur besitzen wie die Arginin-Kinase aus *Limulus polyphemus* (Abb. 4-13). Daher können strukturelle Eigenschaften von Per a 9 anhand dieser Röntgenstruktur diskutiert werden.

Durch diese Röntgenstruktur können die Dimensionen dieser Arginin-Kinase mit 60 Å x 45 Å x 54 Å (Breite x Höhe x Durchmesser) bestimmt werden.



Strukturell können bei dieser Arginin-Kinase zwei Domänen unterschieden werden. Die N-terminale Domäne besteht aus α -helicalen Strukturen und die größere C-terminale Domäne besteht aus einem antiparallelen β -Faltblatt, flankiert von α -Helices, wobei die Cysteine in beiden Domänen vertreten sind [211]. Je nach Literatur findet sich für die Ausbildung einer Disulfidbrücke ein Maximalabstand der C_{α} -Atome von 4.6 Å bis 6 Å, der nicht überschritten werden darf [466-468]. In dieser Struktur sind jedoch alle diese Cysteine -auch unter Berücksichtigung des an Stelle von Valin 222 in Schaben vorhandenen Cysteins- mindestens 10 Å von einander entfernt und somit nicht in der Lage Disulfidbrücken auszubilden.

Somit bestätigt diese Struktur nicht nur die in dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten, demnach bei Per a 9 keine Disulfidbrücken ausgebildet sind, sondern zusätzlich die mittels DLS erhaltenen Moleküldimensionen von Per a 9 von durchschnittlich 55.4 Å (Abschnitt 3.4).

4.2.3 Kreuzreaktionen innerhalb der Arginin-Kinasen

Ein wichtiger Punkt für Kreuzreaktionen, auch für die immunologische Relevanz der Per a 9 Arginin-Kinase ist deren Oligomerisierung. Denn bisher wurde lediglich von Kreuzreaktionen zwischen monomeren und nicht von monomeren mit dimeren Arginin-Kinasen berichtet [210, 214]. Ob in *Periplaneta americana* lediglich monomere Arginin-Kinasen vorkommen, oder ob diese Beobachtung lediglich durch die Reinigungsprozedur mittels Größenausschlusschromatographie auch bei Brown et al. bedingt war [214], ließe sich z.B. über Western-Blot Analysen von nativ aufgetrenntem Crude-Extrakt mit polyklonalen anti-Per a 9-Antikörpern klären. Dies war jedoch im Rahmen meiner Arbeit nicht mehr möglich.

In Anbetracht dessen, dass Per a 9 von IgE von 80-100% der untersuchten schabenallergischen Patienten erkannt wurde [218] und außerdem in der Lage ist, eine Leukotrien-ausschüttung zu induzieren (Abb. 3-77) sollten weiterführende Experimente darauf abzielen, die Kreuzreaktionen zwischen den Schaben-Arginin-Kinasen zu charakterisieren, sowie das allergene Potential der Arginin-Kinase aus *Blattella germanica* zu bestimmen. Es ist davon auszugehen, dass bei einer 97%igen Sequenzidentität und 98%iger Ähnlichkeit die Allergengruppe der Arginin-Kinasen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit eine weitere kreuzreaktive Gruppe zwischen den Schabenspezies *P. americana* und *B. germanica* darstellt. Eine experimentelle Bestätigung dieser Kreuzreaktion steht noch aus. Allerdings wurden in IgE-Inhibitiostests bereits Kreuzreaktionen mit anderen Arginin-Kinasen verschiedener Invertebraten-Spezies (Arginin-Kinase aus *Blattella germanica*, Der p 20 aus *Dermatophagoides pteronyssinus*, Pen m 2 aus *Penaeus monodon*, Plo i 1 aus *Plodia interpunctella*) nachgewiesen [199, 216, 217].

Die Allergenität der Arginin-Kinasen wurde zusätzlich zum Leukotrientest mit Per a 9 außerdem anhand von Plo i 1 im Basophilen-Aktivierungstest und *in vivo* in einer Spätphasen-Hautreaktion eindeutig nachgewiesen [199].

Aufgrund der weiten Verbreitung der Arginin-Kinasen sowie den untersuchten Kreuzreaktionen, wird inzwischen ebenso wie bei der Tropomyosin-Familie davon ausgegangen, dass Arginin-Kinasen Invertebraten-Pan-Allergene sind und auf diese Weise eine weitere Verbindung zwischen Aeroallergenen und Lebensmittelallergenen darstellen [5, 199, 469].

Zusammenfassend handelt es sich bei den allergenen Arginin-Kinasen um Invertebraten-Pan-Allergene, die aufgrund ihrer essentiellen Funktion in den Tieren neben der Beteiligung an Kreuzreaktionen zusätzlich einen interessanten Ansatzpunkt für die Bekämpfung von Schaben bieten können [469].

5 ZUSAMMENFASSUNG

Allergien haben in den letzten Jahrzehnten dramatisch an Häufigkeit zugenommen und stellen weltweit eines der größten gesundheitlichen Probleme moderner Gesellschaften dar. Neben dem hohen ökonomischen Verlust und der Belastung des Gesundheitssystems stellen die allergischen Erkrankungen für die Patienten auch einen hohen Leidensdruck dar. Trotz Kenntnis von über 580 Allergenen ist bisher nicht bekannt, was ein Allergen tatsächlich zum Allergen macht. Die Behandlung von Allergien erfolgt bisher durch die Vermeidung von Allergenkontakt oder in der Regel über die Behandlung der Symptome z.B. durch Antihistaminika. Nur für wenige konnte bisher auch eine spezifische Immuntherapie etabliert werden. Um die Risiken einer Immuntherapie möglichst gering zu halten, empfiehlt es sich, auf gereinigte Allergene zurückzugreifen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Per a 3 und Per a 9 zwei Majorallergene aus der Amerikanischen Schabe isoliert und charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es sich bei Per a 9 um eine monomere Arginin-Kinase mit allergenem Potential handelte. Aufgrund der weiten Verbreitung der Arginin-Kinasen, den hohen Sequenzidentitäten zu weiteren Invertebraten-Arginin-Kinasen und den bisher bekannten Kreuzreaktionen sind diese Proteine aus Invertebraten als Pan-Allergene einzustufen. Aufgrund ihrer essentiellen Funktion in den Tieren könnten diese Allergene außerdem einen interessanten Ansatzpunkt für die Bekämpfung von Schaben bieten.

Bei der Isolation der Per a 3-Allergene wurde eine neue, bisher sequenziell unbekannte Isoform identifiziert, die in dieser Arbeit als Per a 3.03 bezeichnet wurde. Von Per a 3.03 konnte erstmalig die Immunogenität bestimmt werden. Zwei weitere Per a 3-Isoformen (Per a 3.01 und Per a 3.0201) konnten nicht vollständig voneinander separiert werden und wurden als ein mit P II bezeichnetes Gemisch charakterisiert. Dieses wirkte sowohl immunogen als auch allergen und ist somit als vollständiges Allergen anzusehen.

Die Besonderheit der Per a 3-Allergene liegt zum einen darin, dass bisher keine kreuz-reagierenden Allergene bekannt sind und zum anderen, dass es sich um -hinsichtlich Temperatur, Harnstoff und Hydrolyse- sehr stabile hexamere Proteine handelt. Zudem sind sie in ihrer nativen hexameren Oligomerisierung stärkere Allergene und in dissoziierter Form könnten sie geeignete Kandidaten für eine Immuntherapie sein.

Proteinbiochemisch sind die Per a 3-Allergene als Hexamerine einzustufen. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern verstärkt Hinweise darauf, dass sie als Strukturproteine in die Cuticula eingebaut werden und auch proteolytisch gespalten als antimikrobielle Peptide bei der humoralen Immunabwehr in Schaben eine Rolle spielen könnten. Insbesondere der Einbau von Per a 3 in die Schabencuticula wäre ein gravierender Faktor im Hinblick auf die Allergenexposition. Mit Per a 3.03 könnte möglicherweise ein entwicklungsabhängiges Hexamerin und mit P II ein Hexamerin adulter Stadien als allergene Isoform in *Periplaneta americana* vertreten sein. Der endgültige experimentelle Nachweis dieser Hinweise steht noch aus.

6 LITERATUR

1. JANEWAY, C., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. (2002): *Immunologie* (Heidelberg; Berlin, Spektrum, Akad. Verl.).
2. PIRQUET, C. V. (1906): Allergie, *Münch Med Wschr*, 30, 1457-1458.
3. SALOGA, J., KLIMEK, L., BUHL, R., MANN, W. & KNOP, J. (2006): *Allergologie-Handbuch - Grundlagen und klinische Praxis* (Stuttgart, Schattauer).
4. DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ALLERGOLOGIE UND KLINISCHE IMMUNOLOGIE, ÄRZTEVERBAND DEUTSCHER ALLERGOLOGEN, DEUTSCHE AKADEMIE FÜR ALLERGOLOGIE UND UMWELTMEDIZIN (2004): *Weißbuch: Allergie in Deutschland* (München, Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG).
5. JEONG, K. Y., HONGB, C. S. & YONG, T. S. (2006): Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy of allergic disorders, with emphasis on cockroach allergy, *Curr Protein Pept Sci*, 7, 57-71.
6. ALLERGY, U. I. O. (1997): Allergic diseases as a public health problem, *European Allergy White Paper*.
7. PEARCE, N., PEKKANEN, J. & BEASLEY, R. (1999): How much asthma is really attributable to atopy?, *Thorax*, 54, 268-72.
8. ROMANET-MANENT, S., CHARPIN, D., MAGNAN, A., LANTEAUME, A. & VERVLOET, D. (2002): Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference?, *Allergy*, 57, 607-13.
9. WAHN, U. & WICHMANN, H. E. (2000): *Spezialbericht Allergien* (Stuttgart, Methler-Poeschel).
10. WAHN, U. (2007): Anaphylaxis: why is it still costing our lives?, Paper presented at the EAACI, Goteborg, Sweden.
11. COOMBS, R. R. A. & GELL, P. G. H. (1963): *Clinical aspects of immunology* (Philadelphia, Davis).
12. FST-FORSCHUNGSZENTRUM Allergische Erkrankungen- Entstehung, Formen, Krankheitsbilder, Fachinformationsdienst Lebenswissenschaften Umwelt und Gesundheit.
13. KAY, A. B. (1997): *Concepts of allergy and hypersensitivity* (Kay, A.B.).
14. MEKORI, Y. A. (1996): Introduction to allergic diseases, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 36 Suppl, S1-18.
15. SCHUBERT, S. (2003): *Charakterisierung und Isolierung von Allergenen der Tomate (Lycopersicon lycopersicum (L.) Karst. ex Farw.)*, Institut für Biochemie- & Lebensmittelchemie des Fachbereichs Chemie (Hamburg, Universität Hamburg).
16. JOHANSSON, S. G., HOURIHANE, J. O., BOUSQUET, J., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C., DREBORG, S., HAAHTELA, T., KOWALSKI, M. L., MYGIND, N., RING, J., VAN CAUWENBERGE, P., VAN HAGE-HAMSTEN, M. & WUTHRICH, B. (2001): A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 56, 813-24.
17. SALLUSTO, F., CELLA, M., DANIELI, C. & LANZAVECCHIA, A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med*, 182, 389-400.
18. BRYANT, P. & PLOEGH, H. (2004): Class II MHC peptide loading by the professionals, *Curr Opin Immunol*, 16, 96-102.
19. HÄRINGER, B. (2006): *Untersuchung der Immunogenität und Allergenität des Schabenallergens Per a 3 unter besonderer Berücksichtigung seiner Quartärstruktur und seiner Isoformen*, Hautklinik, Klinikum (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
20. O'HEHIR, R. E., GARMAN, R. D., GREENSTEIN, J. L. & LAMB, J. R. (1991): The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens, *Annu Rev Immunol*, 9, 67-95.
21. BUUS, S., SETTE, A. & GREY, H. M. (1987): The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia, *Immunol Rev*, 98, 115-41.
22. VALENTA, R. (2002): The future of antigen-specific immunotherapy of allergy, *Nat Rev Immunol*, 2, 446-53.
23. CHAN, S. L., ONG, S. T., ONG, S. Y., CHEW, F. T. & MOK, Y. K. (2006): Nuclear magnetic resonance structure-based epitope mapping and modulation of dust mite group 13 allergen as a hypoallergen, *J Immunol*, 176, 4852-60.

24. LICHTENSTEIN, L. M. (1993): Allergy and the immune system, *Sci Am*, 269, 116-24.
25. VERCELLI, D., JABARA, H. H., ARAI, K. & GEHA, R. S. (1989): Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens, *J Exp Med*, 169, 1295-307.
26. LANZAVECCHIA, A. (1985): Antigen-specific interaction between T and B cells, *Nature*, 314, 537-9.
27. NOELLE, R. J., ROY, M., SHEPHERD, D. M., STAMENKOVIC, I., LEDBETTER, J. A. & ARUFFO, A. (1992): A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 6550-4.
28. ETZIONI, A. & OCHS, H. D. (2004): The hyper IgM syndrome--an evolving story, *Pediatr Res*, 56, 519-25.
29. ERDOS, M., DURANDY, A. & MARODI, L. (2005): Genetically acquired class-switch recombination defects: the multi-faced hyper-IgM syndrome, *Immunol Lett*, 97, 1-6.
30. ROTH, L., DAUNDERER, M. & KORMANN, K. (1988): *Giftpflanzen-Pflanzengifte: Vorkommen-Wirkung-Therapie/ Allergische und phytotoxische Reaktionen* (Landsberg, Ecomed Verlagsgesellschaft mbH).
31. DVORAK, A. M., SCHULMAN, E. S., PETERS, S. P., MACGLASHAN, D. W., JR., NEWBALL, H. H., SCHLEIMER, R. P. & LICHTENSTEIN, L. M. (1985): Immunoglobulin E-mediated degranulation of isolated human lung mast cells, *Lab Invest*, 53, 45-56.
32. TURNER, H. & KINET, J. P. (1999): Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI, *Nature*, 402, B24-30.
33. SUTTON, B. J. & GOULD, H. J. (1993): The human IgE network, *Nature*, 366, 421-8.
34. BREDEHORST, R. & DAVID, K. (2001): What establishes a protein as an allergen?, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 756, 33-40.
35. GLEICH, G. J. (2000): Mechanisms of eosinophil-associated inflammation, *J Allergy Clin Immunol*, 105, 651-63.
36. KAY, A. B. (2001): Allergy and allergic diseases. First of two parts, *N Engl J Med*, 344, 30-7.
37. LIU, A. H. & MURPHY, J. R. (2003): Hygiene hypothesis: fact or fiction?, *J Allergy Clin Immunol*, 111, 471-8.
38. ALM, J. S., SWARTZ, J., LILJA, G., SCHEYNIUS, A. & PERSHAGEN, G. (1999): Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle, *Lancet*, 353, 1485-8.
39. ROMAGNANI, S. (2004): Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance, *J Allergy Clin Immunol*, 113, 395-400.
40. MARTINEZ, F. D. (2001): The coming-of-age of the hygiene hypothesis, *Respir Res*, 2, 129-32.
41. POMÉS, A. (2002): Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity, *Allergy*, 57, 673-9.
42. POMÉS, A., CHAPMAN, M. D., VAILES, L. D., BLUNDELL, T. L. & DHANARAJ, V. (2002): Cockroach allergen Bla g 2: structure, function, and implications for allergic sensitization, *Am J Respir Crit Care Med*, 165, 391-7.
43. DEPPE, U. (2002): *Untersuchungen zur Charakterisierung und Standardisierung von Allergenextrakten aus Milbenkulturen*, Paderborn, Universität Paderborn).
44. POMÉS, A. & CHAPMAN, M. D. (2001): Can knowledge of the molecular structure of allergens improve immunotherapy?, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 549-54.
45. FAN, Y., GORE, J. C., REDDING, K. O., VAILES, L. D., CHAPMAN, M. D. & SCHAL, C. (2005): Tissue localization and regulation by juvenile hormone of human allergen Bla g 4 from the German cockroach, *Blattella germanica* (L.), *Insect Mol Biol*, 14, 45-53.
46. DE BLAY, F., SANCHEZ, J., HEDELIN, G., PEREZ-INFANTE, A., VEROT, A., CHAPMAN, M. & PAULI, G. (1997): Dust and airborne exposure to allergens derived from cockroach (*Blattella germanica*) in low-cost public housing in Strasbourg (France), *J Allergy Clin Immunol*, 99, 107-12.
47. DE LUCCA, S. D., TAYLOR, D. J., O'MEARA, T. J., JONES, A. S. & TOVEY, E. R. (1999): Measurement and characterization of cockroach allergens detected during normal domestic activity, *J Allergy Clin Immunol*, 104, 672-80.
48. SANDERS, G., BURGE, H., MUILENBERG, M. & SOLOMON, W. (1985): Detection of cockroach antigen in commercial house dust (HD) extracts by ELISA inhibition, *J Allergy Clin Immunol*, 75, 146.

49. PANZANI, R. C. (1994): Inhalant allergy to arthropods (to the exclusion of mites) (Part I), *Allergol Immunopathol (Madr)*, 22, 28-38.
50. EGGLESTON, P. A. & ARRUDA, L. K. (2001): Ecology and elimination of cockroaches and allergens in the home, *J Allergy Clin Immunol*, 107, S422-9.
51. BERNTON, H. S. & BROWN, H. (1969): Insect allergy: the allergenic potentials of the cockroach, *South Med J*, 62, 1207-10.
52. HELM, R. M., BURKS, W., WILLIAMS, L. W., MILNE, D. E. & BRENNER, R. J. (1993): Identification of cockroach aeroallergens from living cultures of German or American cockroaches, *Int Arch Allergy Immunol*, 101, 359-63.
53. WU, H. Q., LIU, Z. G., GAO, B., LI, M., RAN, P. X. & XING, M. (2007): Localization of Per a 3 allergen in the gut and faecal pellets of the American cockroach (*Periplaneta americana*), *Int J Immunogenet*, 34, 347-51.
54. BERNTON, H. S. & BROWN, H. (1970): Cockroach allergy: age of onset of skin reactivity, *Ann Allergy*, 28, 420-2.
55. BENAÏM-PINTO, C., FEINBERG, A. R. & FEINBERG, S. M. (1956): Asthma and rhinitis from insect allergens. I. Clinical importance, *J Allergy*, 27, 437-44.
56. BERNTON, H. S. & BROWN, H. (1964): Insect Allergy--Preliminary Studies of the Cockroach, *J Allergy Clin Immunol*, 35, 506-13.
57. BERNTON, H. S., MCMAHON, T. F. & BROWN, H. (1972): Cockroach asthma, *Br J Dis Chest*, 66, 61-6.
58. COHN, R. D., ARBES, S. J. J., JARAMILLO, R., REID, L. H. & ZELDIN, D. C. (2006): National prevalence and exposure risk for cockroach allergen in U.S. households, *Environ Health Perspect*, 114, 522-6.
59. PLATTS-MILLS, T. A., WARD, G. W. J., SPORIK, R., GELBER, L. E., CHAPMAN, M. D. & HEYMANN, P. W. (1991): Epidemiology of the relationship between exposure to indoor allergens and asthma, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94, 339-45.
60. ARRUDA, L. K. & CHAPMAN, M. D. (2001): The role of cockroach allergens in asthma, *Curr Opin Pulm Med*, 7, 14-9.
61. EGGLESTON, P. A., ROSENSTREICH, D., LYNN, H., GERGEN, P., BAKER, D., KATTAN, M., MORTIMER, K. M., MITCHELL, H., OWNBY, D., SLAVIN, R. & MALVEAUX, F. (1998): Relationship of indoor allergen exposure to skin test sensitivity in inner-city children with asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 102, 563-70.
62. MENDOZA, J. & SNYDER, R. D. (1970): Cockroach sensitivity in children with bronchial asthma, *Ann Allergy*, 28, 159-63.
63. WOOLCOCK, A. J. (1991): Worldwide trends in asthma morbidity and mortality. Explanation of trends, *Bull Int Union Tuberc Lung Dis*, 66, 85-9.
64. CHAPMAN, M. D., VAILES, L. D. & ARRUDA, L. K. (1996): *Cockroach allergens and their role in asthma* (Oxford, UK, Blackwell Sciences Ltd).
65. HUSS, K., NAUMANN, P. L., MASON, P. J., NANDA, J. P., HUSS, R. W., SMITH, C. M. & HAMILTON, R. G. (2001): Asthma severity, atopic status, allergen exposure and quality of life in elderly persons, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 86, 524-30.
66. ARRUDA, L. K., VAILES, L. D., FERRIANI, V. P., SANTOS, A. B., POMÉS, A. & CHAPMAN, M. D. (2001): Cockroach allergens and asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 107, 419-28.
67. GORE, J. C. & SCHAL, C. (2007): Cockroach allergen biology and mitigation in the indoor environment, *Annu Rev Entomol*, 52, 439-63.
68. SARPONG, S. B., HAMILTON, R. G., EGGLESTON, P. A. & ADKINSON, N. F., JR. (1996): Socioeconomic status and race as risk factors for cockroach allergen exposure and sensitization in children with asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 97, 1393-401.
69. PLATTS-MILLS, T. A., VERVLOET, D., THOMAS, W. R., AALBERSE, R. C. & CHAPMAN, M. D. (1997): Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop, *J Allergy Clin Immunol*, 100, S2-24.
70. ROSENSTREICH, D. L., EGGLESTON, P., KATTAN, M. & AL, E. (1997): The Role Of Cockroach Allergy And Exposure To Exposure To Cockroach Allegen In Causing Morbidity Among Inner-City Children With Asthma, *The New England Journal of Medicine*, 336, 1356-1363.
71. DÖHRING, E. (1973): Schlußbericht über die Erhebung zum Vorkommen von Schaben in der Bundesrepublik Deutschland, *Der praktische Schädlingsbekämpfer*, 25, 47-59.

72. DÖHRING, E. (1971): Vorläufige Ergebnisse einer Erhebung über Schabenbefall in der Bundesrepublik Deutschland, *Der praktische Schädlingsbekämpfer*, 23, 91-94.
73. DÖHRING, E. (1972): Vorkommen und Verbreitung von Schaben in der Bundesrepublik Deutschland, *Der praktische Schädlingsbekämpfer*, 24, 29-35.
74. WEIDNER (1972): Schabenaufreten und Schabenbekämpfung von 100 Jahren, 1972.
75. MIELKE, U. & SCHUSCHKE, G. (1972): [Successful cockroach control in a large hospital using a reproduction biology oriented system bound by contract], *Z Gesamte Hyg*, 18, 325-7.
76. MIELKE, U. & SCHMITT, J. A. (1976): [Occurrence and control of cockroaches in bakeries], *Z Gesamte Hyg*, 22, 860-2.
77. SOMMER, S. H. (1979): [Cockroach infestation and organization of cockroach control in the county of Schwerin], *Z Gesamte Hyg*, 25, 236-9.
78. ENGELBRECHT, H. & BUSKE, M. (1983): [A model of cockroach control in a large area. II. Occurrence and distribution of *Blattella germanica* and *Blatta orientalis* in the district of Potsdam (GDR)--an infestation analysis], *Angew Parasitol*, 24, 27-39.
79. STEINBRINK, H. (1987): [Occurrence, distribution and control of cockroaches in the East German district of Rostock], *Angew Parasitol*, 28, 53-8.
80. DETTMAR, T. (2005): Kakerlaken-Plage bei Damme, *Morgenpost Berlin*
81. LNI (2005): Kampf den Kakerlaken in Damme., *Die Welt*.
82. KRÖGER, C. (2005): Kakerlaken plagen den Schweinegürtel: Dammes Ställe und Wohnhäuser stecken voller Ungeziefer / Stadt bestellt jetzt Kammerjäger, *Bremer Tageszeitung*
83. KUNERT, M. (2005): KAKERLAKE *Berliner Zeitung* (Berlin).
84. BISCHOFF, K. (2005): Besuch von der Deponie *Berliner Zeitung* (Berlin).
85. STROHMAIER, B. (2005): Kakerlaken mögen Plattenbauten. *Berliner Zeitung* (Berlin).
86. BISCHOFF, K. (2005): Das große Krabbeln. *Berliner Zeitung* (Berlin).
87. KLEMP, M. (2005): Tütü-Tata, die Kakerlaken sind da. *Berliner Kurier* (Berlin).
88. BISCHOFF, K. (2005): Kakerlaken-Plage erreicht Bernauer Wohngebiet. *Berliner Zeitung* (Berlin).
89. FAHLBUSCH, B., HEINRICH, J., GROSS, I., JAGER, L., RICHTER, K. & WICHMANN, H. E. (1999): Allergens in house-dust samples in Germany: results of an East-West German comparison, *Allergy*, 54, 1215-22.
90. KANG, B. & SULIT, N. (1978): A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house dust antigens, *Ann Allergy*, 41, 333-6.
91. HIRSCH, T., STAPPENBECK, C., NEUMEISTER, V., WEILAND, S. K., VON MUTIUS, E., KEIL, U. & LEUPOLD, W. (2000): Exposure and allergic sensitization to cockroach allergen in East Germany, *Clin Exp Allergy*, 30, 529-37.
92. FLINDT, R. (1988): *Biologie in Zahlen* (Stuttgart, Gustav Fischer Verlag).
93. KOEHLER, P., PATTERSON, R. & BRENNER, R. (1990): *Handbook of pest control: the behaviour, life history and control of household pests*. (Mallis, A).
94. LIEWALD, J. F. (2001): *Neuropeptide und die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels im Fettkörper der Argentinischen Schabe (Blattella dubica)*, Fachbereich Biologie (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
95. HELM, R. M. & POMÉS, A. (2004): Cockroach and other inhalant insect allergens, *Clin Allergy Immunol*, 18, 271-96.
96. MIELKE, U. (2001): Nachweis der Australischen Schabe (*Periplaneta australasiae* [Fabricius, 1775]) in Sachsen-Anhalt, *Anz. Schädlingskunde/ J. Pest Science*, 74, 111-112.
97. [HTTP://BUNDESRECHT.JURIS.DE/IFSG](http://BUNDESRECHT.JURIS.DE/IFSG) Infektionsschutzgesetz.
98. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-75.
99. PETERSON, G. L. (1979): Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Anal Biochem*, 100, 201-20.
100. FAZEKAS DE ST. GROTH, S., WEBSTER, R. G. & DATYNER, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of

- proteins on electrophoretic strips, *Biochim Biophys Acta*, 71, 377-391.
101. UMWELTBUNDESAMT (2001): Richtlinien für die amtliche Prüfung von Mitteln und Verfahren auf Wirksamkeit zur Bekämpfung tierischer Schädlinge gemäß § 18 Infektionsschutzgesetz.
 102. FREISE, J. (2005): persönliche Mitteilung (Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)).
 103. WEIDNER, H. (1938): Der Geradflügler (Orthopteroidea und Blatoidea) Mitteldeutschlands., *Z. Naturwissensch. Halle*, 92, 123-181.
 104. ROTH, L. & WILLIS, E. (1957): The medical and veterinary importance of cockroaches, *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 134, 1-147.
 105. KATIAL, R. K. (2003): Cockroach allergy, *Immunol Allergy Clin North Am*, 23, 483-99.
 106. FUCHS, M. E. A. (1972): Zur epidemiologischen Bedeutung von Schaben als Vektoren von Krankheitserregern, *Der praktische Schädlingsbekämpfer*, 24, 35-38.
 107. LAN, J. L., LEE, D. T., WU, C. H., CHANG, C. P. & YEH, C. L. (1988): Cockroach hypersensitivity: preliminary study of allergic cockroach asthma in Taiwan, *J Allergy Clin Immunol*, 82, 736-740.
 108. WU, C. H. & LAN, J. L. (1988): Cockroach hypersensitivity: isolation and partial characterization of major allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 82, 727-735.
 109. STANKUS, R. P., HORNER, W. E. & LEHRER, S. B. (1990): Identification and characterization of important cockroach allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 86, 781-7.
 110. RICHMAN, P. G., KHAN, H. A., TURKELTAUB, P. C., MALVEAUX, F. J. & BAER, H. (1984): The important sources of German cockroach allergens as determined by RAST analyses, *J Allergy Clin Immunol*, 73, 590-5.
 111. STANKUS, R. P. & O'NEIL, C. E. (1988): Antigenic/allergenic characterization of American and German cockroach extracts, *J Allergy Clin Immunol*, 81, 563-70.
 112. SCHOU, C., LIND, P., FERNANDEZ-CALDAS, E., LOCKEY, R. F. & LOWENSTEIN, H. (1990): Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach, *J Allergy Clin Immunol*, 86, 935-46.
 113. HELM, R. M., SQUILLACE, D. L., JONES, R. T. & BRENNER, R. J. (1990): Shared allergenic activity in Asian (*Blattella asahinai*), German (*Blattella germanica*), American (*Periplaneta americana*), and Oriental (*Blatta orientalis*) cockroach species, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 92, 154-61.
 114. WU, C. H. & LEE, M. F. (2005): Molecular characteristics of cockroach allergens, *Cell Mol Immunol*, 2, 177-80.
 115. JEONG, K. Y., HWANG, H., LEE, J., LEE, I. Y., KIM, D. S., HONG, C. S., REE, H. I. & YONG, T. S. (2004): Allergenic characterization of tropomyosin from the dusky brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*, *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 680-5.
 116. CZERWINSKI, E. W., MIDORO-HORIUTI, T., WHITE, M. A., BROOKS, E. G. & GOLDBLUM, R. M. (2005): Crystal structure of Jun a 1, the major cedar pollen allergen from *Juniperus ashei*, reveals a parallel beta-helical core, *J Biol Chem*, 280, 3740-6.
 117. GREGOIRE, C., TAVARES, G. A., LORENZO, H. K., DANDEU, J. P., DAVID, B. & ALZARI, P. M. (1999): Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the major horse allergen Equ c 1, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55, 880-2.
 118. LASCOMBE, M. B., GREGOIRE, C., PONCET, P., TAVARES, G. A., ROSINSKI-CHUPIN, I., RABILLON, J., GOUBRAN-BOTROS, H., MAZIE, J. C., DAVID, B. & ALZARI, P. M. (2000): Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes, *J Biol Chem*, 275, 21572-7.
 119. MENO, K., THORSTED, P. B., IPSEN, H., KRISTENSEN, O., LARSEN, J. N., SPANGFORT, M. D., GAJHEDE, M. & LUND, K. (2005): The crystal structure of recombinant proDer p 1, a major house dust mite proteolytic allergen, *J Immunol*, 175, 3835-45.
 120. TREVINO, M. A., GARCIA-MAYORAL, M. F., BARRAL, P., VILLALBA, M., SANTORO, J., RICO, M., RODRIGUEZ, R. & BRUIX, M. (2004): NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen, *J Biol Chem*, 279, 39035-41.
 121. SCHOU, C., FERNANDEZ-CALDAS, E., LOCKEY, R. F. & LOWENSTEIN, H. (1991): Environmental assay for cockroach allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 87, 828-34.

122. TWAROG, F. J., PICONE, F. J., STRUNK, R. S., SO, J. & COLTEN, H. R. (1977): Immediate hypersensitivity to cockroach. Isolation and purification of the major antigens, *J Allergy Clin Immunol*, 59, 154-60.
123. POMÉS, A., MELEN, E., VAILES, L. D., RETIEF, J. D., ARRUDA, L. K. & CHAPMAN, M. D. (1998): Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from German and American cockroach, *J Biol Chem*, 273, 30801-7.
124. HELM, R., COCKRELL, G., STANLEY, J. S., BRENNER, R. J., BURKS, W. & BANNON, G. A. (1996): Isolation and characterization of a clone encoding a major allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE-mediated cockroach hypersensitivity, *J Allergy Clin Immunol*, 98, 172-80.
125. WU, C. H., WANG, N. M., LEE, M. F. & LUO, S. F. (1998): Cloning of the American cockroach Cr-P11 allergens: Evidence for the existence of cross-reactive allergens between species, *J Allergy Clin Immunol*, 101, 832-840.
126. TSAI, W. J., LIU, C. H., CHEN, S. T. & YANG, C. Y. (2003): Identification of the antigenic determinants of the American cockroach allergen Per a 1 by error-prone PCR, *J Immunol Methods*, 276, 163-74.
127. WU, C. H., LEE, M. F., YANG, J. S. & TSENG, C. Y. (2002): IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen, *Mol Immunol*, 39, 459-64.
128. GORE, J. C. & SCHAL, C. (2004): Gene expression and tissue distribution of the major human allergen Bla g 1 in the German cockroach, *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae), *J Med Entomol*, 41, 953-60.
129. GORE, J. C. & SCHAL, C. (2005): Expression, production and excretion of Bla g 1, a major human allergen, in relation to food intake in the German cockroach, *Blattella germanica*, *Med Vet Entomol*, 19, 127-34.
130. ZHANG, Y. C., PERZANOWSKI, M. S. & CHEW, G. L. (2005): Sub-lethal exposure of cockroaches to boric acid pesticide contributes to increased Bla g 2 excretion, *Allergy*, 60, 965-8.
131. PAN, Q., WANG, S., SHANG, H. & CHEW, F. T. (2005): Identification and Characterization of Per a 2, the Bla g 2 Allergen Homologue from American Cockroach (*Periplaneta americana*), *J Allergy Clin Immunol*, 117, Abstract 450.
132. CHEW, F., SHANG, H. & PAN, Q. (2006): Cloning of group 2 allergen, aspartic protease precursor from American cockroach, *Periplaneta americana*, unpublished, AAX33727.
133. ARRUDA, L. K., VAILES, L. D., MANN, B. J., SHANNON, J., FOX, J. W., VEDVICK, T. S., HAYDEN, M. L. & CHAPMAN, M. D. (1995): Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases, *J Biol Chem*, 270, 19563-8.
134. WUNSCHMANN, S., GUSTCHINA, A., CHAPMAN, M. D. & POMÉS, A. (2005): Cockroach allergen Bla g 2: an unusual aspartic proteinase, *J Allergy Clin Immunol*, 116, 140-5.
135. ARBES, S. J., JR., SEVER, M., MEHTA, J., GORE, J. C., SCHAL, C., VAUGHN, B., MITCHELL, H. & ZELDIN, D. C. (2004): Abatement of cockroach allergens (Bla g 1 and Bla g 2) in low-income, urban housing: month 12 continuation results, *J Allergy Clin Immunol*, 113, 109-14.
136. GUSTCHINA, A., LI, M., WUNSCHMANN, S., CHAPMAN, M. D., POMÉS, A. & WLODAWER, A. (2005): Crystal Structure of Cockroach Allergen Bla g 2, an Unusual Zinc Binding Aspartic Protease with a Novel Mode of Self-inhibition, *J Mol Biol*, 348, 433-44.
137. POLLART, S. M., MULLINS, D. E., VAILES, L. D., HAYDEN, M. L., PLATTS-MILLS, T. A., SUTHERLAND, W. M. & CHAPMAN, M. D. (1991): Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies, *J Allergy Clin Immunol*, 87, 511-21.
138. WU, C. H., MEY, F. L., S.C., L. & LUO, S. F. (1996): Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-P11 allergens. Homology with insect hemolymph proteins, *J Biol Chem*, 271, 17937-17943.
139. WU, C. H., LEE, M. F. & YIN, S. C. (1993): Isolation and in vitro translation of messenger RNA from the American cockroach, *Clin Exp Allergy*, 23, 493-7.
140. WU, C. H., LEE, M. F. & TSENG, C. Y. (2003): IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 3 allergen, *Allergy*, 58, 986-92.
141. WANG, N. M., LEE, M. F. & WU, C. H. (1999): Immunologic characterization of a recombinant American cockroach (*Periplaneta americana*) Per a 1 (Cr-P11) allergen, *Allergy*, 54, 119-127.
142. WU, C. H., LEE, M. F. & LIAO, S.-C. (1995): Isolation and preliminary characterization of

- cDNA encoding American cockroach allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 96, 352-359.
143. WU, C. H., LEE, M. F., WANG, N. M. & LUO, S. F. (1997): Sequencing and immunochemical characterization of the American cockroach Per a 3 (Cr-PI) isoallergenic variants, *Mol Immunol*, 34, 1-8.
 144. JENG, K. C., LIU, M. T., WU, C. H., WONG, D. W. & LAN, J. L. (1996): American cockroach Cr-PI allergen induces lymphocyte proliferation and cytokine production in atopic patients, *Clin Exp Allergy*, 26, 349-56.
 145. YANG, C. Y., WU, J. D. & WU, C. H. (2000): Sequence analysis of the first complete cDNA clone encoding an American cockroach Per a 1 allergen, *Biochim Biophys Acta*, 1517, 153-158.
 146. TELFER, W. H., KEIM, P. S. & LAW, J. H. (1983): Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: comparisons with calliphorin and manducin., *Insect Biochem*, 13, 601-613.
 147. BURMESTER, T. (1999): Evolution and function of the insect hexamerins, *Eur J Biochem*, 96, 213-235.
 148. LAFARGUE, B. (2003): *Isolierung und Charakterisierung der allergenen Per a 3-Isoformen von Periplaneta americana*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
 149. TERWILLIGER, N. B. & RYAN, M. C. (2006): Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidasen from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans, *Biol Bull*, 210, 38-50.
 150. SANCHEZ-BORGES, M., CAPRILES-HULETT, A., CABALLERO-FONSECA, F. & FERNANDEZ-CALDAS, E. (2003): Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 90, 664-8.
 151. BURMESTER, T. & SCHELLER, K. (1996): Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor, *J Mol Evol*, 42, 713-28.
 152. BURMESTER, T. (2001): Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily, *Mol Biol Evol*, 18, 184-95.
 153. TELFER, W. H. & KUNKEL, J. G. (1991): The function and evolution of insect storage hexamers, *Annu. Rev. Entomol.*, 36, 205-228.
 154. KOROSHKINA, S. E., GORDADZE, A. V., YORK, J. L. & BENES, H. (1997): Mosquito hexamerins: characterization during larval development, *Insect Mol Biol*, 6, 11-21.
 155. ARRUDA, L. K., VAILES, L. D., HAYDEN, M. L., BENJAMIN, D. C. & CHAPMAN, M. D. (1995): Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses, *J Biol Chem*, 270, 31196-201.
 156. VAILES, L. D., KINTER, M. T., ARRUDA, L. K. & CHAPMAN, M. D. (1998): High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*, *J Allergy Clin Immunol*, 101, 274-80.
 157. CHEW, F., SHANG, H. & PAN, Q. (2006): Cloning of group 4 allergen, calycin from American cockroach, *Periplaneta americana*, unpublished, AAX33728.
 158. WWW.JENNER.AC.UK The Calycin Protein Superfamily.
 159. SALINAS, A. E. & WONG, M. G. (1999): Glutathione S-transferases--a review, *Curr Med Chem*, 6, 279-309.
 160. RUSHMORE, T. H. & PICKETT, C. B. (1993): Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications, *J Biol Chem*, 268, 11475-8.
 161. WILCE, M. C. & PARKER, M. W. (1994): Structure and function of glutathione S-transferases, *Biochim Biophys Acta*, 1205, 1-18.
 162. PICKETT, C. B. & LU, A. Y. (1989): Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function, *Annu Rev Biochem*, 58, 743-64.
 163. USUI, K. & FUKAMI, J.-I. (1977): Insect glutathione S-transferases: Separation of transferases from fat bodies of American cockroaches active on organophosphorus triesters, *Perstic. Biochem. Physiol.*, 7, 249-260.
 164. ENAYATI, A. A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. (2005): Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Mol Biol*, 14, 3-8.
 165. AGIANIAN, B., TUCKER, P. A., SCHOUTEN, A., LEONARD, K., BULLARD, B. & GROS, P. (2003): Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products, *J Mol Biol*, 326, 151-65.
 166. ARRUDA, L. K., VAILES, L. D., PLATTS-MILLS, T. A., HAYDEN, M. L. & CHAPMAN, M. D.

- (1997): Induction of IgE antibody responses by glutathione S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*), *J Biol Chem*, 272, 20907-12.
167. TOUNG, Y.-P. S., HSIEH, T.-S. & TU, C.-P. D. (1989): *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
 168. TANG, A. H. & TU, C. P. (1994): Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21, *J Biol Chem*, 269, 27876-84.
 169. BOARD, P., RUSSELL, R. J., MARANO, R. J. & OAKESHOTT, J. G. (1994): Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*), *Biochem J*, 299 (Pt 2), 425-30.
 170. SYVANEN, M., ZHOU, Z. H. & WANG, J. Y. (1994): Glutathione transferase gene family from the housefly *Musca domestica*, *Mol Gen Genet*, 245, 25-31.
 171. FOURNIER, D., BRIDE, J. M., POIRIE, M., BERGE, J. B. & PLAPP, F. W., JR. (1992): Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides, *J Biol Chem*, 267, 1840-5.
 172. BEALL, C., FYRBERG, C., SONG, S. & FYRBERG, E. (1992): Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase, *Biochem Genet*, 30, 515-27.
 173. SNYDER, M. J., WALDING, J. K. & FEYEREISEN, R. (1995): Glutathione S-transferases from larval *Manduca sexta* midgut: sequence of two cDNAs and enzyme induction, *Insect Biochem Mol Biol*, 25, 455-65.
 174. FRANCIOSA, H. & BERGÉ, J. B. (1995): Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families, *Insect Biochem Mol Biol*, 25, 311-7.
 175. RANSON, H., ROSSITER, L., ORTELLI, F., JENSEN, B., WANG, X., ROTH, C. W., COLLINS, F. H. & HEMINGWAY, J. (2001): Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*, *Biochem J*, 359, 295-304.
 176. BOARD, P. G., COGGAN, M., WILCE, M. C. & PARKER, M. W. (1995): Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases, *Biochem J*, 311 (Pt 1), 247-50.
 177. MA, B. & CHANG, F. N. (2007): Purification and cloning of a Delta class glutathione S-transferase displaying high peroxidase activity isolated from the German cockroach *Blattella germanica*, *Febs J*.
 178. YU, S. J. & HUANG, S. W. (2000): Purification and characterization of glutathione S-transferases from the German cockroach, *Blattella germanica*, *Pestic Biochem Physiol*, 67, 36-45.
 179. CHEW, F., SHANG, H. & PAN, Q. (2006): Cloning of group 5 allergen, GST homolog allergen from American cockroach, *Periplaneta americana*, *unpublished*, AAX33729.
 180. HUANG, C. H., LIEW, L. M., MAH, K. W., KUO, I. C., LEE, B. W. & CHUA, K. Y. (2006): Characterization of glutathione S-transferase from dust mite, Der p 8 and its immunoglobulin E cross-reactivity with cockroach glutathione S-transferase, *Clin Exp Allergy*, 36, 369-76.
 181. AALBERSE, R. C., AKKERDAAS, J. & VAN REE, R. (2001): Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens, *Allergy*, 56, 478-90.
 182. HINDLEY, J., WUNSCHMANN, S., SATINOVER, S. M., WOODFOLK, J. A., CHEW, F. T., CHAPMAN, M. D. & POMES, A. (2006): Bla g 6: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence, *J Allergy Clin Immunol*, 117, 1389-95.
 183. CHEW, F., SHANG, H. & PAN, Q. (2006): Direct Submission (Per a 6 allergen), *unpublished*, AAX33730.
 184. CHAPMAN, M. D. (2004): Allergen nomenclature, *Clin Allergy Immunol*, 18, 51-64.
 185. KING, T. P., HOFFMAN, D., LOWENSTEIN, H., MARSH, D. G., PLATTS-MILLS, T. A. & THOMAS, W. (1995): Allergen nomenclature, *Allergy*, 50, 765-74.
 186. ISHIKAWA, M., ISHIDA, M., SHIMAKURA, K., NAGASHIMA, Y. & SHIOMI, K. (1998): Purification and IgE-binding epitopes of a major allergen in the gastropod *Turbo cornutus*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 1337-43.
 187. LEUNG, P. S. & CHU, K. H. (2001): cDNA cloning and molecular identification of the major oyster allergen from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Clin Exp Allergy*, 31, 1287-94.

188. JEONG, K. Y., LEE, J., LEE, I. Y., REE, H. I., HONG, C. S. & YONG, T. S. (2003): Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin, *Allergy*, 58, 1059-63.
189. SANTOS, A. B., CHAPMAN, M. D., AALBERSE, R. C., VAILES, L. D., FERRIANI, V. P., OLIVER, C., RIZZO, M. C., NASPITZ, C. K. & ARRUDA, L. K. (1999): Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 104, 329-37.
190. ASTURIAS, J. A., GOMEZ-BAYON, N., ARILLA, M. C., MARTINEZ, A., PALACIOS, R., SANCHEZ-GASCON, F. & MARTINEZ, J. (1999): Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen, *J Immunol*, 162, 4342-8.
191. BALDO, B. A. & PANZANI, R. C. (1988): Detection of IgE antibodies to a wide range of insect species in subjects with suspected inhalant allergies to insects, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 85, 278-87.
192. MARTINEZ, A., MARTINEZ, J., PALACIOS, R. & PANZANI, R. (1997): Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts, *Allergol Immunopathol (Madr)*, 25, 118-26.
193. LEUNG, P. S., CHOW, W. K., DUFFEY, S., KWAN, H. S., GERSHWIN, M. E. & CHU, K. H. (1996): IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen, *J Allergy Clin Immunol*, 98, 954-61.
194. REESE, G., AYUSO, R. & LEHRER, S. B. (1999): Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen, *Int Arch Allergy Immunol*, 119, 247-58.
195. WITTEMAN, A. M., VAN DEN OUDENRIJN, S., VAN LEEUWEN, J., AKKERDAAS, J., VAN DER ZEE, J. S. & AALBERSE, R. C. (1995): IgE antibodies reactive with silverfish, cockroach and chironomid are frequently found in mite-positive allergic patients, *Int Arch Allergy Immunol*, 108, 165-9.
196. AYUSO, R., REESE, G., LEONG-KEE, S., PLANTE, M. & LEHRER, S. B. (2002): Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins, *Int Arch Allergy Immunol*, 129, 38-48.
197. HINDLEY, J. & POMÉS, A. (2006): Bla g 8: A Calcium Binding German Cockroach Allergen, *Unpublished*, ABD47458.
198. BROWN, A. E. & GROSSMAN, S. H. (2004): The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*), *Arch Insect Biochem Physiol*, 57, 166-77.
199. BINDER, M., MAHLER, V., HAYEK, B., SPERR, W. R., SCHOLLER, M., PROZELL, S., WIEDERMANN, G., VALENT, P., VALENTA, R. & DUCHENE, M. (2001): Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen, *J Immunol*, 167, 5470-7.
200. WYSS, M., MAUGHAN, D. & WALLIMANN, T. (1995): Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man, *Biochem J*, 309 (Pt 1), 255-61.
201. DUMAS, C. & CAMONIS, J. (1993): Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle, *J Biol Chem*, 268, 21599-605.
202. ROSENTHAL, G. A., DAHLMAN, D. L. & ROBINSON, G. W. (1977): L-Arginine kinase from tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). Purification, properties, and interaction with L-canavanine, *J Biol Chem*, 252, 3679-83.
203. OUELLET, M. & SHOUBRIDGE, E. A. (1992): Phosphocreatine-dependent protein phosphorylation in rat skeletal muscle, *Biochem J*, 284 (Pt 1), 115-22.
204. BESSMAN, S. P. & GEIGER, P. J. (1981): Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle, *Science*, 211, 448-52.
205. WATTS, D. C. (1973): *Creatine kinase (adenosine 5'-triphosphate:creatinephosphotransferase)* (New York: Academic Press).
206. YOKOTA, K., YAZAWA, Y. & NAKAMURA, S. (1944): Purification and molecular cloning of arginine kinase from tail muscle of crayfish *Procambarus clarkii*, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, 70, 48.
207. FURUKOHRI, T., OKAMOTO, S. & SUZUKI, T. (1994): Evolution of phosphagen kinase (III). Amino acid sequence of arginine kinase from

- the shrimp *Penaeus japonicus*, *Zoolog Sci*, 11, 229-34.
208. GINDLING, H. L., ROSENTHAL, G. A. & DAHLMAN, D. L. (1995): Purification of L-arginine kinase from the tobacco budworm, *Heliothis virescens* [Noctuidae] and its function in L-canavanine detoxification, *Insect Biochem Mol Biol*, 25, 933-938.
 209. SMITH, E. & MORRISON, J. F. (1971): Effect of substrate analogues on the kinetics of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate: arginine phosphotransferase, *J Biol Chem*, 246, 7764-72.
 210. MORELAND, B., WATTS, D. C. & VIRDEN, R. (1967): Phosphagen kinases and evolution in the echinodermata, *Nature*, 214, 458-62.
 211. ZHOU, G., SOMASUNDARAM, T., BLANC, E., PARTHASARATHY, G., ELLINGTON, W. R. & CHAPMAN, M. S. (1998): Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8449-54.
 212. BI, X. Z. & CHEW, F. T. (2006): Molecular characterization of American cockroach (*Periplaneta americana*) arginine kinase, a cross-reactive allergen, *Unpublished_AAT77152*.
 213. LIN, T. & CHOW, L. (2006): Direct Submission (Arginine Kinase).
 214. BROWN, A. E., FRANCE, R. M. & GROSSMAN, S. H. (2004): Purification and characterization of arginine kinase from the American cockroach (*Periplaneta americana*), *Arch Insect Biochem Physiol*, 56, 51-60.
 215. GARCIA-OROZCO, K. D., AISPURO-HERNANDEZ, E., YEPIZ-PLASCENCIA, G. M. & SOTELO-MUNDO, R. R. (2006): Molecular and immunological characterization of arginine kinase, an allergen from *Litopenaeus vannamei*, *unpublished*.
 216. HALES, B. J., MARTIN, A. C., PEARCE, L. J., LAING, I. A., HAYDEN, C. M., GOLDBLATT, J., LE SOUEF, P. N. & THOMAS, W. R. (2006): IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease, *J Allergy Clin Immunol*, 118, 361-7.
 217. YU, C. J., LIN, Y. F., CHIANG, B. L. & CHOW, L. P. (2003): Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2, *J Immunol*, 170, 445-53.
 218. SOOKRUNG, N., CHAICUMPA, W., TUNGTRONGCHITR, A., VICHYANOND, P., BUNNAG, C., RAMASOOT, P., TONGTAW, P., SAKOLVAREE, Y. & TAPCHASRI, P. (2006): *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies, *Environ Health Perspect*, 114, 875-80.
 219. BHALLA, P. L., SWOBODA, I. & SINGH, M. B. (2001): Reduction in allergenicity of grass pollen by genetic engineering, *Int Arch Allergy Immunol*, 124, 51-4.
 220. PATTERSON, M. L. & SLATER, J. E. (2002): Characterization and comparison of commercially available German and American cockroach allergen extracts, *Clin Exp Allergy*, 32, 721-727.
 221. KRIEGER, E., KORAIMANN, G. & VRIEND, G. (2002): Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field, *Proteins*, 47, 393-402.
 222. JAMROZ, R. C., BEINTEMA, J. J., STAM, W. T. & BRADFIELD, J. Y. (1996): Aromatic Hexamerin Subunit from Adult Female Cockroaches (*Blaberus discoidalis*): Molecular Cloning, Suppression by Juvenile Hormone, and Evolutionary Perspectives, *J. Insect Physiol.*, 42, 115-124.
 223. JAMROZ, R. C., BEINTEMA, J. J., STAM, W. T. & BRADFIELD, J. Y. (1995): Hexamerin precursor, direct submission.
 224. BI, X. Z., ONG, S. T. & CHEW, F. T. (2003): Identification, cloning, and expression of the arginine kinase, a putative pan-allergen from house dust mite, via expressed sequence tagging, peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry., *unpublished*.
 225. ZHOU, G., PARTHASARATHY, G., SOMASUNDARAM, T., ABLES, A., ROY, L., STRONG, S. J., ELLINGTON, W. R. & CHAPMAN, M. S. (1997): Expression, purification from inclusion bodies, and crystal characterization of a transition state analog complex of arginine kinase: a model for studying phosphagen kinases, *Protein Sci*, 6, 444-9.
 226. VOLBEDA, A. & HOL, W. G. (1989): Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution, *J Mol Biol*, 209, 249-79.
 227. TUFAIL, M., LEE, J. M., HATAKEYAMA, M., OISHI, K. & TAKEDA, M. (2000): Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach,

- Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses, *Arch Insect Biochem Physiol*, 45, 37-46.
228. TUFAIL, M., HATAKEYAMA, M., TAKEDA, M. & LEE, J. M. (2001): *Periplaneta americana* vitellogenin-2 (Vg-2), not published, BAB 32673.
 229. DECKER, H. & TUCZEK, F. (2000): Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism, *Trends Biochem Sci*, 25, 392-7.
 230. KLABUNDE, T., EICKEN, C., SACCHETTINI, J. C. & KREBS, B. (1998): Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center, *Nat Struct Biol*, 5, 1084-90.
 231. SUGUMARAN, M. & NELLAIAPPAN, K. (1990): On the latency and nature of phenoloxidase present in the left colleterial gland of the cockroach *Periplaneta americana*, *Arch Insect Biochem Physiol*, 15, 165-81.
 232. SEE, Y. & JACKOWSKI, G. (1995): *Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Electrophoresis*. (New York, Oxford University Press).
 233. LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-5.
 234. HAMES, B. (1981): *Gelelectrophoresis of Proteins: a Practical Approach* (Oxford, IRL Press Ltd.).
 235. SERVA (www.serva.de): *Bedienungsanleitung*.
 236. LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. (2004): *Der Experimentator: Immunologie* (München, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag).
 237. HOLTZHAUER, M. (1996): *Methoden in der Proteinanalytik* (Berlin; Heidelberg, Springer-Verlag).
 238. WEEKE, B. (1973): Crossed immunoelectrophoresis, *Scand J Immunol Suppl*, 1, 47-56.
 239. LAURELL, C. B. (1965): Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis, *Anal Biochem*, 10, 358-61.
 240. NESTERENKO, M. V., TILLEY, M. & UPTON, S. J. (1994): A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels, *J Biochem Biophys Methods*, 28, 239-42.
 241. POEHLING, H. & HEUHOFF, V. (1981): Visualisation of proteins with a silver stain: a critical analysis., *Electrophoresis*, 2, 141-147.
 242. REHM, H. (2006): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (München, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag).
 243. FERNANDEZ-PATRON, C., CALERO, M., COLLAZO, P. R., GARCIA, J. R., MADRAZO, J., MUSACCHIO, A., SORIANO, F., ESTRADA, R., FRANK, R., CASTELLANOS-SERRA, L. R. & ET AL. (1995): Protein reverse staining: high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels, *Anal Biochem*, 224, 203-11.
 244. NELLAIAPPAN, K. & VINAYAKAM, A. (1993): A method for demonstrating prophenoloxidase after electrophoresis, *Biotech Histochem*, 68, 193-5.
 245. 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, 203-9.
 246. TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
 247. BLAKE, M. S., JOHNSTON, K. H., RUSSELL-JONES, G. J. & GOTSCHLICH, E. C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots, *Anal Biochem*, 136, 175-9.
 248. PIERCE_BIOTECHNOLOGY_INC. The Lowry Method.
 249. LOTTSPEICH, F. & ZORBAS, H. (1998): *Bioanalytik* (Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
 250. SENGUPTA, S. & CHATTOPADHYAY, M. K. (1993): Lowry's method of protein estimation: some more insights, *J Pharm Pharmacol*, 45, 80.
 251. CREIGHTON, T. E. (1984): *Chemical nature of polypeptides in: Proteins*.
 252. BIO-RAD *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, www.bio-rad.com).
 253. BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-54.

254. COMPTON, S. J. & JONES, C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem*, 151, 369-74.
255. MALVERN (2005): Zetasizer Nano Series User Manual, Man0317.
256. EINSTEIN, A. (1905): Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen., *Annalen der Physik*, 549-560.
257. WASCHBÜSCH, D. (2004): *Charakterisierung von Hämocyaninen und Untersuchung der Proteinstabilität des Hämocyanins des Kaiserskorpions Pandinus imperator mit hydrodynamischen Methoden.*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
258. SVEDBERG, T. (1929): Mass and size of protein molecules., *Nature*, 123, 871.
259. HARPAZ, Y., GERSTEIN, M. & CHOTHIA, C. (1994): Volume changes on protein folding, *Structure*, 2, 641-9.
260. VAN HOLDE, K. & WEISCHET, W. (1978): Boundary analysis of sedimentation velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes, *Biopolymers*, 17, 1387-1403.
261. DEMELER, B. & SABER, H. (1998): Determination of molecular parameters by fitting sedimentation data to finite-element solutions of the Lamm equation, *Biophys J*, 74, 444-54.
262. DEMELER, B., SABER, H. & HANSEN, J. C. (1997): Identification and interpretation of complexity in sedimentation velocity boundaries, *Biophys J*, 72, 397-407.
263. HANSEN, J. C., LEBOWITZ, J. & DEMELER, B. (1994): Analytical ultracentrifugation of complex macromolecular systems, *Biochemistry*, 33, 13155-63.
264. JOHNSON, M. L., CORREIA, J. J., YPHANTIS, D. A. & HALVORSON, H. R. (1981): Analysis of data from the analytical ultracentrifuge by nonlinear least-squares techniques, *Biophys J*, 36, 575-88.
265. DECKER, H., SCHWEIKARDT, T. & TUCZEK, F. (2006): The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?, *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 4546-50.
266. HERLINGER, E., JAMESON, R. & LINERT, W. (1995): Spontaneous Autooxidation of Dopamine, *J. Chem. Soc. Perkin Transact.*, 2, 259-263.
267. WINDER, A. J. & HARRIS, H. (1991): New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase, *Eur J Biochem*, 198, 317-26.
268. PIFFERI, P. G. & BALDASSARI, L. (1973): A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone, *Anal Biochem*, 52, 325-35.
269. JAENICKE, E. (2002): *Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen*, Institut für Molekulare Biophysik (Johannes Gutenberg-Universität).
270. SANCHEZ-FERRER, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCIA-CANOVAS, F. & GARCIA-CARMONA, F. (1995): Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim Biophys Acta*, 1247, 1-11.
271. DECKER, H., RYAN, M., JAENICKE, E. & TERWILLIGER, N. (2001): SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*, *J Biol Chem*, 276, 17796-9.
272. DECKER, H. & RIMKE, T. (1998): Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity, *J Biol Chem*, 273, 25889-92.
273. BELLINGHAUSEN, I., HÄRINGER, B., LAFARGUE, B., STRAND, D., KÖNIG, B., DECKER, H. & SALOGA, J. (2008): Comparison of the immunogenicity and allergenicity of the monomeric and hexameric structure of the cockroach major allergen Per a 3, *Clin Exp Allergy*, 38, 539-548.
274. PIERKES, M., BELLINGHAUSEN, I., HULTSCH, T., METZ, G., KNOP, J. & SALOGA, J. (1999): Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells, *J Allergy Clin Immunol*, 103, 326-32.
275. DELEAGE, G., CLERC, F. F., ROUX, B. & GAUTHERON, D. C. (1988): ANTHEPROT: a package for protein sequence analysis using a microcomputer, *Comput Appl Biosci*, 4, 351-6.
276. DELEAGE, G., CLERC, F. F. & ROUX, B. (1989): ANTHEPROT: IBM PC and Apple Macintosh versions, *Comput Appl Biosci*, 5, 159-60.

277. DELEAGE, G., COMBET, C., BLANCHET, C. & GEURJON, C. (2001): ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities, *Comput Biol Med*, 31, 259-67.
278. THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res*, 25, 4876-82.
279. NICHOLAS, K. B., NICHOLAS, H. B. & DEERFILED II, D. W. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNET NEWS*, 4, 1-4.
280. PARKER, J. M., GUO, D. & HODGES, R. S. (1986): New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites, *Biochemistry*, 25, 5425-32.
281. AALBERSE, R. C. (2000): Structural biology of allergens, *J Allergy Clin Immunol*, 106, 228-38.
282. SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993): Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J Mol Biol*, 234, 779-815.
283. CHOTHIA, C. & LESK, A. M. (1986): The relation between the divergence of sequence and structure in proteins, *Embo J*, 5, 823-6.
284. FISER, A. & SALI, A. (2003): Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models, *Methods Enzymol*, 374, 461-91.
285. HAZES, B., MAGNUS, K. A., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J., DAUTER, Z., KALK, K. H. & HOL, W. G. (1993): Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation, *Protein Sci*, 2, 597-619.
286. SUDHA, V. T., SRIVASTAVA, D., ARORA, N., GAUR, S. N. & SINGH, B. P. (2007): Stability of protease-rich *Periplaneta americana* allergen extract during storage: formulating preservatives to enhance shelf life, *J Clin Immunol*, 27, 294-301.
287. BARRETT, F. M. (1987): Characterization of phenoloxidases from larval cuticle of *Sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species., *Canadian Journal of Zoology*, 65, 1158-1166.
288. SUGUMARAN, M., GIGLIO, L., KUNDZICZ, H., SAUL, S. & SEMENSI, V. (1992): Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*, *Arch Insect Biochem Physiol*, 19, 271-83.
289. VOLKMANN, A. (1991): Localization of phenoloxidase in the midgut of *Periplaneta americana* parasitized by larvae of *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala), *Parasitol Res*, 77, 616-21.
290. THANGARAJ, T., SUBRAMANIAM, S., VINAYAKAM, A. & ARUCHAMI, M. (1992): Prophenoloxidase activation in the hemolymph of American cockroach, *Periplaneta americana*, *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 100, 79-82.
291. SALVATO, B. & BELTRAMINI, M. (1987): Hemocyanins: Molecular Structure and Reactivity of the Binuclear Copper Site, *Life Chemistry Reports*, 5, 249-275.
292. CIRAK, S. (2000): *Isolierung und Charakterisierung des Schabenallergens Per a 3*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
293. WEIß, J. (2001): *Ionenchromatographie* (Weinheim, WILEY-VCH).
294. JAMROZ, R. C., GASDASKA, J. R., BRADFIELD, J. Y. & LAW, J. H. (1993): Transferrin in a cockroach: molecular cloning, characterization, and suppression by juvenile hormone, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1320-4.
295. KING, T. P., HOFFMAN, D., LOWENSTEIN, H., MARSH, D. G., PLATTS-MILLS, T. A. & THOMAS, W. (1994): Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, *Int Arch Allergy Immunol*, 105, 224-33.
296. WU, C. H., HSIEH, M. J., HUANG, J. H. & LUO, S. F. (1996): Identification of low molecular weight allergens of American cockroach and production of monoclonal antibodies, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 76, 195-203.
297. MATSUMURA, M. & MATTHEWS, B. W. (1989): Control of enzyme activity by an engineered disulfide bond, *Science*, 243, 792-4.
298. CREIGHTON, T. E. (1995): Disulphide bonds between cysteine residues, in: Creighton, T. E. (Ed.) *Protein structure a practical approach* (Oxford, IRL Press).
299. STÖCKER, W., RAEDER, U., BIJHOLT, M. M. C., WICHTERTJES, T., VAN BRUGGEN, E. F. J. & MARKL, J. (1988): The quaternary structure of four crustacean 2x6 hemocyanins:

- immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits., *J. Comp. Physiol. B* 158, 271-289.
300. HOLLECKER, M. (1995): Counting integral numbers of residues by chemical modification., in: Creighton, T. E. (Ed.) *Protein structure a practical approach* (Oxford, IRL Press).
 301. JAENICKE, E. & DECKER, H. (2003): Tyrosinases from crustaceans form hexamers, *Biochem J*, 371, 515-23.
 302. AALBERSE, R. C. (2007): Assessment of allergen cross-reactivity, *Clin Mol Allergy*, 5, 2.
 303. REPORT OF A JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON ALLERGENICITY OF FOODS DERIVED FROM BIOTECHNOLOGY (2001): Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
 304. VALENTA, R. & KRAFT, D. (2001): Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation, *Immunol Rev*, 179, 119-27.
 305. MOTHES, N., VALENTA, R. & SPITZAUER, S. (2006): Allergy testing: the role of recombinant allergens, *Clin Chem Lab Med*, 44, 125-32.
 306. BUFE, A. (1998): The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases?, *Int Arch Allergy Immunol*, 117, 215-9.
 307. MARKL, J., MARKL, A., SCHARTAU, W. & LINZEN, B. (1979): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I (Chelicerata)., *J Comp Physiol B*, 130, 283-292.
 308. ANCSIN, J. B. & WYATT, G. R. (1996): Purification and Characterization of Two Storage Proteins from *Locusta migratoria* showing Distinct Developmental and Hormonal Regulation., *Insect Biochem. Molec. Biol*, 26, 501-510.
 309. CAPURRO MDE, L., MARINOTTI, O., FARAH, C. S., JAMES, A. A. & DE BIANCHI, A. G. (1997): The nonvitellogenic female protein of *Musca domestica* is an adult-specific hexamerin, *Insect Mol Biol*, 6, 97-104.
 310. DECKER, H., SCHMID, R., MARKL, J. & LINZEN, B. (1980): Hemocyanins in spiders, XII. Dissociation and reassociation of Eurypelma hemocyanin, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 361, 1707-17.
 311. MARKL, J., BURMESTER, T., DECKER, H., SAVEL-NIEMANN, A., HARRIS, J. R., SULING, M., NAUMANN, U. & SCHELLER, K. (1992): Quaternary and subunit structure of *Calliphora arylphorin* as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin, *J Comp Physiol [B]*, 162, 665-80.
 312. BIJLHOLT, M. M., VAN BRUGGEN, E. F. & BONAVENTURA, J. (1979): Dissociation and reassembly of *Limulus polyphemus* hemocyanin, *Eur J Biochem*, 95, 399-405.
 313. BRÖMME, D., SCHIERHORN, A., KIRSCHKE, H., WIEDERANDERS, B., BARTH, A., FITTKAU, S. & DEMUTH, H.-U. (1989): Potent and selective inactivation of cysteine proteinases with N-peptidyl-O-acyl hydroxylamines, *Biochem J*, 263, 861-866.
 314. BARRETT, A. J. (1970): Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver, *Biochem J*, 117, 601-7.
 315. JAMESON, B. A. & WOLF, H. (1988): The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, *Comput Appl Biosci*, 4, 181-6.
 316. PELLEQUER, J. L., WESTHOF, E. & VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1991): Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures., in: Langone, J. J. (Ed.) *Methods in Enzymology*, pp. 179-201 (New York, Academic Press).
 317. DAVIS, P. J., SMALES, C. M. & JAMES, D. C. (2001): How can thermal processing modify the antigenicity of proteins?, *Allergy*, 56 Suppl 67, 56-60.
 318. SMITH, A. M., CHAPMAN, M. D., TAKETOMI, E. A., PLATTS-MILLS, T. A. & SUNG, S. S. (1998): Recombinant allergens for immunotherapy: a Der p 2 variant with reduced IgE reactivity retains T-cell epitopes, *J Allergy Clin Immunol*, 101, 423-5.
 319. VOET, D. & VOET, J. (1995): *Biochemistry* (New York, John Wiley & Sons, Inc.).
 320. TOVEY, E. R., JOHNSON, M. C., ROCHE, A. L., COBON, G. S. & BALDO, B. A. (1989): Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen, *J Exp Med*, 170, 1457-62.
 321. SHAKIB, F., SCHULZ, O. & SEWELL, H. (1998): A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by

- Der p 1 enhances allergenicity, *Immunol Today*, 19, 313-6.
322. HERBERT, C. A., KING, C. M., RING, P. C., HOLGATE, S. T., STEWART, G. A., THOMPSON, P. J. & ROBINSON, C. (1995): Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p 1, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 12, 369-78.
 323. DAVIS, P. J. & WILLIAMS, S. C. (1998): Protein modification by thermal processing, *Allergy*, 53, 102-5.
 324. SAMS, G. R., BELL, W. J. & WEAVER, R. F. (1980): Vitellogenin: its structure, synthesis and processing in the cockroach *Periplaneta americana*, *Biochim Biophys Acta*, 609, 121-35.
 325. JOMORI, T., KUBO, T. & NATORI, S. (1990): Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*, *Eur J Biochem*, 190, 201-6.
 326. TRINCHIERI, G. (1993): Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells, *Immunol Today*, 14, 335-8.
 327. D'ANDREA, A., RENGARAJU, M., VALIANTE, N. M., CHEHIMI, J., KUBIN, M., ASTE, M., CHAN, S. H., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., NICKBARG, E. & ET AL. (1992): Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells, *J Exp Med*, 176, 1387-98.
 328. HERMELING, S., CROMMELIN, D. J., SCHELLEKENS, H. & JISKOOT, W. (2004): Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins, *Pharm Res*, 21, 897-903.
 329. SCHÖLL, I., KALKURA, N., SHEDZIANKOVA, Y., BERGMANN, A., VERDINO, P., KNITTELFELDER, R., KOPP, T., HANTUSCH, B., BETZEL, C., DIERKS, K., SCHEINER, O., BOLTZ-NITULESCU, G., KELLER, W. & JENSEN-JAROLIM, E. (2005): Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice, *J Immunol*, 175, 6645-50.
 330. VRTALA, S., HIRTENLEHNER, K., SUSANI, M., AKDIS, M., KUSSEBI, F., AKDIS, C. A., BLASER, K., HUFNAGL, P., BINDER, B. R., POLITOU, A., PASTORE, A., VANGELISTA, L., SPERR, W. R., SEMPER, H., VALENT, P., EBNER, C., KRAFT, D. & VALENTA, R. (2001): Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1, *Faseb J*, 15, 2045-7.
 331. VRTALA, S., HIRTENLEHNER, K., SUSANI, M., HUFNAGL, P., BINDER, B. R., VANGELISTA, L., PASTORE, A., SPERR, W. R., VALENT, P., EBNER, C., KRAFT, D. & VALENTA, R. (1999): Genetic engineering of recombinant hypoallergenic oligomers of the major birch pollen allergen, Bet v 1: candidates for specific immunotherapy, *Int Arch Allergy Immunol*, 118, 218-9.
 332. NOPP, A., HALLDEN, G., LUNDAHL, J., JOHANSSON, E., VRTALA, S., VALENTA, R., GRONNEBERG, R. & VAN HAGE-HAMSTEN, M. (2000): Comparison of inflammatory responses to genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen bet v 1 and to recombinant bet v 1 wild type in skin chamber fluids collected from birch pollen-allergic patients, *J Allergy Clin Immunol*, 106, 101-9.
 333. PAULI, G., PUROHIT, A., OSTER, J. P., DE BLAY, F., VRTALA, S., NIEDERBERGER, V., KRAFT, D. & VALENTA, R. (2000): Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives with rBet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing: results obtained in a French population, *Clin Exp Allergy*, 30, 1076-84.
 334. VAN HAGE-HAMSTEN, M., KRONQVIST, M., ZETTERSTROM, O., JOHANSSON, E., NIEDERBERGER, V., VRTALA, S., GRONLUND, H., GRONNEBERG, R. & VALENTA, R. (1999): Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season, *J Allergy Clin Immunol*, 104, 969-77.
 335. KOREMATSU, S., TANAKA, Y., HOSOI, S., KOYANAGI, S., YOKOTA, T., MIKAMI, B. & MINATO, N. (2000): C8/119S mutation of major mite allergen Der f-2 leads to degenerate secondary structure and molecular polymerization and induces potent and exclusive Th1 cell differentiation, *J Immunol*, 165, 2895-902.
 336. REESE, G., BALLMER-WEBER, B. K., WANGORSCH, A., RANDOW, S. & VIETHS, S. (2007): Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines, *J Allergy Clin Immunol*, 119, 944-51.
 337. BALL, T., EDSTROM, W., MAUCH, L., SCHMITT, J., LEISTLER, B., FIEBIG, H., SPERR, W. R., HAUSWIRTH, A. W., VALENT, P., KRAFT, D.,

- ALMO, S. C. & VALENTA, R. (2005): Gain of structure and IgE epitopes by eukaryotic expression of the major Timothy grass pollen allergen, *Phl p 1*, *Febs J*, 272, 217-27.
338. WESTRITSCHNIG, K., FOCKE, M., VERDINO, P., GOESSLER, W., KELLER, W., TWARDOSZ, A., MARI, A., HORAK, F., WIEDERMANN, U., HARTL, A., THALHAMER, J., SPERR, W. R., VALENT, P. & VALENTA, R. (2004): Generation of an allergy vaccine by disruption of the three-dimensional structure of the cross-reactive calcium-binding allergen, *Phl p 7*, *J Immunol*, 172, 5684-92.
 339. LOMBARDERO, M., HEYMANN, P. W., PLATTS-MILLS, T. A., FOX, J. W. & CHAPMAN, M. D. (1990): Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II Dermatophagoides spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies, *J Immunol*, 144, 1353-60.
 340. TAKAI, T., YOKOTA, T., YASUE, M., NISHIYAMA, C., YUUKI, T., MORI, A., OKUDAIRA, H. & OKUMURA, Y. (1997): Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy, *Nat Biotechnol*, 15, 754-8.
 341. ROUAS, N., CHRISTOPHE, S., HOUSSEAU, F., BELLET, D., GUILLET, J. G. & BIDART, J. M. (1993): Influence of protein-quaternary structure on antigen processing, *J Immunol*, 150, 782-92.
 342. JANSSEN, R., WAUBEN, M. H. & TOMMASSEN, J. (1996): Quaternary structure of a carrier protein influences antigenicity and immunogenicity of an inserted T cell determinant, *Int Immunol*, 8, 829-36.
 343. AKDIS, C. A. & BLASER, K. (2000): Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens, *Int Arch Allergy Immunol*, 121, 261-9.
 344. LIEBERS, V., SANDER, I., VAN KAMPEN, V., RAULF-HEIMSOOTH, M., ROZYNEK, P. & BAUR, X. (1996): Overview on denominated allergens, *Clin Exp Allergy*, 26, 494-516.
 345. LEHMANN, K. (2003): *Molekulare Grundlagen der Erdnussallergie: Rekombinante Darstellung, biochemische und biophysikalische Charakterisierung und Struktur der Erdnussallergie Ara h 2 und Ara h 6*, Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften (Bayreuth, Universität Bayreuth).
 346. CHAPMAN, M. D., SMITH, A. M., VAILES, L. D., ARRUDA, L. K., DHANARAJ, V. & POMÉS, A. (2000): Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease, *J Allergy Clin Immunol*, 106, 409-18.
 347. EGGLESTON, P. A. & BUSH, R. K. (2001): Environmental allergen avoidance: an overview, *J Allergy Clin Immunol*, 107, S403-5.
 348. HAYE, R. & DOSEN, L. K. (2005): Insect sting allergy. A study from 1980 to 2003 of patients who started treatment with venom immunotherapy between 1980 and 1998, *Clin Mol Allergy*, 3, 12.
 349. KANG, B. C., JOHNSON, J., MORGAN, C. & CHANG, J. L. (1988): The role of immunotherapy in cockroach asthma, *J Asthma*, 25, 205-18.
 350. ALONSO, A., ALBONICO, J. F., MOUCHIAN, K., SCAVINI, L. M., IRANETA, S. G. & PIONETTI, C. H. (1999): Immunological changes during cockroach immunotherapy, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 9, 299-304.
 351. BURMESTER, T. (2002): Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins, *J Comp Physiol [B]*, 172, 95-107.
 352. DECKER, H., JAENICKE, E., HELLMANN, N., LIEB, B., MEISSNER, U. & MARKL, J. (2007): Recent insights in the structure, function and evolution of hemocyanins, *Integr. Comp. Biol.*, 47, 631-644.
 353. BEINTEMA, J. J., STAM, W. T., HAZES, B. & SMIDT, M. P. (1994): Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins), *Mol Biol Evol*, 11, 493-503.
 354. DECKER, H. (2005): Copper Proteins with dinuclear active sites, in: Scott, R. (Ed.) *Encyclopedia of inorganic chemistry* (Wiley).
 355. VAN HOLDE, K. E., MILLER, K. I. & DECKER, H. (2001): Hemocyanins and invertebrate evolution, *J Biol Chem*, 276, 15563-6.
 356. BURMESTER, T., MASSEY, H. C., JR., ZAKHARKIN, S. O. & BENES, H. (1998): The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects, *J Mol Evol*, 47, 93-108.
 357. KILLIE, J. E. & JOGENSEN, T. O. (1994): Immunoregulation in fish. I: Intramolecular-induced suppression of antibody responses to haptenated protein antigens studied in Atlantic salmon (*Salmo salar* L), *Dev Comp Immunol*, 18, 123-36.
 358. PRESS, J. L. & KLINMAN, N. R. (1974): Frequency of hapten-specific B cells in neonatal

- and adult murine spleens, *Eur J Immunol*, 4, 155-9.
359. BÜCHLER, K. D. (2004): *Strategien zur biochemischen Isolierung einzelner funktioneller Domänen des Hämocyanins der großen Schlüssellochschnecke Megathura crenulata (KLH)*, Institut für Zoologie (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).
 360. NAYLOR, P. H., SZTEIN, M. B., WADA, S., MAURER, S., HOLTERMAN, D., KIRKLEY, J. E., NAYLOR, C. W., ZOOK, B. C., HITZELBERG, R. A., GIBBS, C. J., JR. & ET AL. (1991): Preclinical and clinical studies on immunogenicity and safety of the HIV-1 p17-based synthetic peptide AIDS vaccine--HGP-30-KLH, *Int J Immunopharmacol*, 13 Suppl 1, 117-27.
 361. SWANSON, M. A. & SCHWARTZ, R. S. (1967): Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence, *N Engl J Med*, 277, 163-70.
 362. MARKL, J., LIEB, B., GEBAUER, W., ALTENHEIN, B., MEISSNER, U. & HARRIS, J. R. (2001): Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and htH, *J Cancer Res Clin Oncol*, 127 Suppl 2, R3-9.
 363. FLAMM, J., BUCHER, A., HOLTL, W. & ALBRECHT, W. (1990): Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial, *J Urol*, 144, 260-3.
 364. JURINCIC, C. D., ENGELMANN, U., GASCH, J. & KLIPPEL, K. F. (1988): Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study, *J Urol*, 139, 723-6.
 365. SARGENT, E. R. & WILLIAMS, R. D. (1992): Immunotherapeutic alternatives in superficial bladder cancer. Interferon, interleukin-2, and keyhole-limpet hemocyanin, *Urol Clin North Am*, 19, 581-9.
 366. OLSSON, C. A., CHUTE, R. & RAO, C. N. (1974): Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate, *J Urol*, 111, 173-6.
 367. AALBERSE, R. C. (2006): Structural features of allergenic molecules, *Chem Immunol Allergy*, 91, 134-46.
 368. AALBERSE, R. C. & STADLER, B. M. (2006): In silico predictability of allergenicity: from amino acid sequence via 3-D structure to allergenicity, *Mol Nutr Food Res*, 50, 625-7.
 369. AALBERSE, R. C. & STAPEL, S. O. (2001): Structure of food allergens in relation to allergenicity, *Pediatr Allergy Immunol*, 12 Suppl 14, 10-4.
 370. MEMMEL, N. A., TREWITT, P. M., GRZELAK, K., RAJARATNAM, V. S. & KUMARAN, A. K. (1994): Nucleotide sequence, structure and developmental regulation of LHP82, a juvenile hormone-suppressible hexamerin gene from the waxmoth, *Galleria mellonella*, *Insect Biochem Mol Biol*, 24, 133-44.
 371. KANOST, M. R., BOGUSKI, M. S., FREEMAN, M., GORDON, J. I., WYATT, G. R. & WELLS, M. A. (1988): Primary structure of apolipophorin-III from the migratory locust, *Locusta migratoria*. Potential amphipathic structures and molecular evolution of an insect apolipoprotein, *J Biol Chem*, 263, 10568-73.
 372. JONES, G., BROWN, N., MANCZAK, M., HIREMATH, S. & KAFATOS, F. C. (1990): Molecular cloning, regulation, and complete sequence of a hemocyanin-related, juvenile hormone-suppressible protein from insect hemolymph, *J Biol Chem*, 265, 8596-602.
 373. JONES, G., MANCZAK, M., WOZNIAK, M. & KO'RRATI, R. (1993): Characterization of two major isoforms of juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera), *Biochim Biophys Acta*, 1161, 235-43.
 374. BURMESTER, T. & SCHELLER, K. (1992): Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22, 211-220.
 375. KANOST, M. R., KAWOoya, J. K., LAW, J. H., RYAN, R. O., VAN HEUSDEN, M. C. & ZIEGLER, R. (1990): Insect hemolymph proteins, *Adv. Insect. Physiol.*, 22, 299-396.
 376. CORPUZ, L. M., CHOI, H., MUTHUKRISHNAN, S. & KRAMER, K. J. (1991): Sequences of two cDNAs and expression of the genes encoding methionine-rich proteins of *Manduca sexta*, *Insect Biochem Mol Biol*, 21, 265-276.
 377. DE HAAS, F. & VAN BRUGGEN, E. F. (1994): The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. A tentative mechanism for cooperative behavior, *J Mol Biol*, 237, 464-78.
 378. HAZES, B. & HOL, W. G. (1992): Comparison of the hemocyanin beta-barrel with other Greek key beta-barrels: possible importance of the "beta-zipper" in protein structure and folding, *Proteins*, 12, 278-98.

379. MAGNUS, K. A., HAZES, B., TON-THAT, H., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. & HOL, W. G. (1994): Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences, *Proteins*, 19, 302-9.
380. LINZEN, B., SOETER, N. M., RIGGS, A. F., SCHNEIDER, H. J., SCHARTAU, W., MOORE, M. D., YOKOTA, E., BEHRENS, P. Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T. & ET AL. (1985): The structure of arthropod hemocyanins, *Science*, 229, 519-24.
381. TERWILLIGER, N. B. (1999): Hemolymph Proteins and Molting in Crustaceans and Insects., *Amer. Zool.*, 39, 589-599.
382. TERWILLIGER, N. B., DANGOTT, L. & RYAN, M. (1999): Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 2013-8.
383. JAMROZ, R., BEINTEMA, J. J., STAM, W. T. & BRADFIELD, J. Y. (1996): Aromatic hexamerin subunit from adult female cockroaches (*Blaberus discoidales*): Molecular cloning, suppression by juvenile hormone, and evolutionary perspectives, *J Insect Physiol*, 42, 115-124.
384. WILLOTT, E., WANG, X. Y. & WELLS, M. A. (1989): cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. Homology to arthropod hemocyanins, *J Biol Chem*, 264, 19052-9.
385. MUNN, E. A. & GREVILLE, G. D. (1967): A major protein constituent of pupae of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. , *Biochem. J*, 102.
386. TOJO, S., NAGATA, M. & KOBAYASHI, M. (1980): Storage proteins in the silkworm *Bombyx mori*., *Insect Biochem Mol Biol*, 10, 289-303.
387. KUNKEL, J. G. & LAWLER, D. M. (1974): Larval-specific serum protein in the order Dictyoptera I. Immunologic characterization in larval *Blattella germanica* and cross-reaction throughout the order, *Comp Biochem Physiol B*, 47, 697-710.
388. DUHAMEL, R. C. & KUNKEL, J. G. (1983): Cockroach larval-specific protein, a tyrosine-rich serum protein, *J Biol Chem*, 258, 14461-5.
389. KUNKEL, J. G. & PAN, M. L. (1976): Selectivity of yolk protein uptake: comparison of vitellogenins of two insects, *J Insect Physiol*, 22, 809-18.
390. BEUSCH, A. (2006): *Isolierung und Charakterisierung von Hexamerin der Deutschen Schabe (Blattella germanica)*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität).
391. DAYHOFF, M. O. (1976): The origin and evolution of protein superfamilies, *Fed Proc*, 35, 2132-8.
392. MARTINEZ, T., BURMESTER, T., VEENSTRA, J. A. & WHEELER, D. (2000): Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*, *Insect Mol Biol*, 9, 427-31.
393. HAHN, D. A. & WHEELER, D. E. (2003): Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*, *J Insect Physiol*, 49, 1189-97.
394. BURMESTER, T. & SCHELLER, K. (1999): Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport, *Naturwissenschaften*, 86, 468-74.
395. HAUNERLAND, N. H. (1996): Insect storage proteins: gene families and receptors, *Insect Biochem Mol Biol*, 26, 755-65.
396. LEVENBOOK, L. & BAUER, A. (1984): The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*., *Insect Biochem*, 14, 77-86.
397. DEKORT, C. & KOOPMANSCHAP, A. (1987): Isolation and characterization of the larval hemolymph protein in *Locusta migratoria*, *Arch. Insect Biochem Physiol*, 4, 191-203.
398. SCHELLER, K., FISCHER, B. & SCHENKEL, H. (1990): Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*., in: Hagedorn, H. H., Hildebrand, J. G., Kidwell, M. G. & Law J.H. (Eds.) *Molecular Insect Science*., pp. 155-162 (New York, Plenum Press).
399. MUNN, E. A. & GREVILLE, G. D. (1969): Soluble protein of developing *Calliphora erythrocephala*, particularly calliphorin, and similar proteins in other insects., *J. Insect Physiol.*, 15, 1935-1950.
400. DUHAMEL, R. C. & KUNKEL, J. G. (1978): A molting rhythm for serum proteins of the cockroach, *Blatta orientalis*, *Comp Biochem Physiol B*, 60, 333-7.

401. KUNKEL, J. G. & NORDIN, J. H. (1985): Yolk Proteins., in: Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry And Pharmacology*, pp. 83-111 (Pergamon Press).
402. HUNT, J. H., BUCK, N. A. & WHEELER, D. E. (2003): Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults, *J Insect Physiol*, 49, 785-94.
403. CHRYSANTHIS, G., KALIAFAS, A. D. & MINTZAS, A. C. (1994): Biosynthesis and tissue distribution of four major larval serum proteins during development of *Ceratitis capitata* (Diptera). *Insect Biochem Mol Biol*, 24, 811-818.
404. WHEELER, D. E. & MARTINEZ, T. (1995): Storage proteins in ants (Hymenoptera:Formicidae), *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 112, 15-9.
405. DANTY, E., ARNOLD, G., BURMESTER, T., HUET, J. C., HUET, D., PERNOLLET, J. C. & MASSON, C. (1998): Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*, *Insect Biochem Mol Biol*, 28, 387-97.
406. FARIA, F. S., GARCIA, E. S. & S., G. (1994): Synthesis of a Haemolymph Hexamerin by the Fat Body and Testis of *Rhodnius prolixus*, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24, 59-67.
407. PAN, M. L. & TELFER, W. H. (1996): Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths, *Arch Insect Biochem Physiol*, 33, 149-62.
408. PAN, M. L. & TELFER, W. H. (2001): Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation, *J Insect Sci*, 1, 2.
409. MIURA, K., NAKAGAWA, M., CHINZEI, Y., SHINODA, T., NAGAO, E. & NUMATA, H. (1994): Structural and functional studies on biliverdin-associated cyanoprotein from the bean bug, *Riptortus clavatus*, *Zoolog Sci*, 11, 537-45.
410. MAGEE, J., KRAYNACK, N., MASSEY, H. C., JR. & TELFER, W. H. (1994): Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*, *Arch Insect Biochem Physiol*, 25, 137-57.
411. FOX, F. & SEED, J. (1972): Cuticle sclerotization by the American cockroach: immunochemical evidence for the incorporation of blood proteins into the cuticle., *J. Insect Physiol.*, 18, 2065-2070.
412. KOEPPE, J. K. & MILLS, R. R. (1972): Hormonal control of tanning by the American Cockroach: Probable bursicon mediated translocation of protein-bound phenols., *J Insect Physiol*, 18, 465-469.
413. MOHRIG, W. & MESSNER, B. (1968): Immunreaktion bei Insekten, *Zoologisches Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
414. CAPPELLATO, M. & NARPOZZI, A. (1960): [Aspecific immunity factors in the hemolymph of Bombyx mori.], *Boll Ist Sieroter Milan*, 39, 40-73.
415. NILLIUS, D. (2007): *Aktivierung von Hämocyanin zur Tyrosinase*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).
416. DECKER, H. & JAENICKE, E. (2004): Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins, *Dev Comp Immunol*, 28, 673-87.
417. DESTOUMIEUX-GARZON, D., SAULNIER, D., GARNIER, J., JOUFFREY, C., BULET, P. & BACHERE, E. (2001): Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge, *J Biol Chem*, 276, 47070-7.
418. NILLIUS, D. (2002): *Zum Immunsystem der Cheliceraten Eurypelma californicum und Pandinus imperator*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).
419. GEORGE, J. F., KARP, R. D., RELLAHAN, B. L. & LESSARD, J. L. (1987): Alteration of the protein composition in the haemolymph of American cockroaches immunized with soluble proteins, *Immunology*, 62, 505-9.
420. PETER, M. G. (1993): Die molekulare Architektur des Exoskeletts von Insekten, *Chemie in unserer Zeit*, 27.
421. KARLSON, P. & SEKERIS, C. E. (1962): N-Acetyldopamine as sclerotizing agent of the insect cuticle, *Nature (London)*, 195, 183-184.
422. CZAPLA, T. H., HOPKINS, T. L. & KRAMER, K. J. (1990): Catecholamines and related o-diphenols in cockroach hemolymph and cuticle during sclerotization and melanization: comparative studies on the order Dictyoptera, *J Comp Physiol [B]*, 160, 175-81.

423. TRIM, A. R. (1941): Studies in the chemistry of the insect cuticle: I. Some general observations on certain arthropod cuticles with special reference to the characterization of the proteins, *Biochem J*, 35, 1088-98.
424. PRYOR, M. G. M. (1940): On the hardening of the cuticle of insects., *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, 128, 393-407.
425. SUDERMAN, R. J., DITTMER, N. T., KANOST, M. R. & KRAMER, K. J. (2006): Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols, *Insect Biochem Mol Biol*, 36, 353-65.
426. FOX, F. R. & MILLS, R. R. (1969): Changes in haemolymph and cuticle proteins during the moulting process in the American cockroach, *Comp Biochem Physiol*, 29, 1187-1195.
427. HACKMAN, R. H. (1953): Chemistry of insect cuticle. III. Hardening and darkening of the cuticle, *Biochem J*, 54, 371-7.
428. HACKMAN, R. H. (1953): Chemistry of insect cuticle. II. The water-insoluble proteins of the cuticle of *Aphodius howitti* Hope (Coleoptera), *Biochem J*, 54, 367-70.
429. HACKMAN, R. H. (1953): Chemistry of insect cuticle. I. The water-soluble proteins, *Biochem J*, 54, 362-7.
430. LUDWIG, D. (1954): Changes in distribution of nitrogen in blood of Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman) during growth and metamorphosis., *Physiol. Zool.*, 27, 325-334.
431. LOCKE, M. (1970): The molt/intermolt cycle in the epidermis and other tissues of an insect *Calpodes ethlius*., *Tissue & Cell*, 2, 197-223.
432. LOCKE, M. (1969): The localization of a peroxidase associated with hard cuticle formation in an insect, *Calpodes ethlius* Stoll, Lepidoptera, Hesperidae., *Tissues & Cell*, 1, 555-574.
433. KUNKEL, J. G. (1968): *Controls of development in cockroaches.*, Cleveland, Ohio, Case-Western Reserve University).
434. SALZBRUNN, U. K. (2007): *Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus Streptomyces antibioticus*, Institut für Molekulare Biophysik (Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).
435. PETER, M. G. & SCHELLER, K. (1991): Arylphorins and the integument., in: Retnakaran, A. & Ninnington, K. (Eds.) *The Physiology of Insect Epidermis.*, pp. 115-124 (Melbourne, CSIRO Publications).
436. GRÜN, L. & PETER, M. G. (1983): Selective crosslinking of tyrosine-rich larval serum proteins and of soluble *Manduca sexta* cuticle proteins by nascent N-acetyldopamine-quinone and N-alpha-alanyl dopamine-quinone, in: Scheller, K. (Ed.) *The Larval Serum Proteins of Insects: Function, Biosynthesis, Genetic.*, pp. 102-115 (Stuttgart, New York, Thieme).
437. SCHELLER, K., ZIMMERMANN, H.-P. & SEKERIS, C. E. (1980): Calliphorin, a protein involved in the cuticle formation of the blowfly, *Calliphora vicina*, *Z Naturforsch [C]*, 35, 387-389.
438. KÖNIG, M., AGRAWAL, O. P., SCHENKEL, H. & SCHELLER, K. (1986): Incorporation of calliphorin into the cuticle of the developing blowfly, *Calliphora vicina*., *Roux's Arch Dev Biol*, 195, 296-301.
439. SCHENKEL, H. & SCHELLER, K. (1986): Stage- and tissue specific expression of the genes encoding calliphorin, the major larval serum protein of *Calliphora vicina*. 195:29~295, *Roux's Arch Dev Biol*, 195, 290-295.
440. ADACHI, K., ENDO, H., WATANABE, T., NISHIOKA, T. & HIRATA, T. (2005): Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization, *Pigment Cell Res*, 18, 136-43.
441. PAUL, R., BERGNER, B., PFEFFER-SEIDL, A., DECKER, H., EFINGER, R. & STORZ, H. (1994): Gas Transport in the Haemolymph of Arachnids - Oxygen Transport and the Physiological Role of Haemocyanin, *J Exp Biol*, 188, 25-46.
442. TERWILLIGER, N. B., RYAN, M. C. & TOWLE, D. (2005): Evolution of novel functions: cryptocyanin helps build new exoskeleton in *Cancer magister*, *J Exp Biol*, 208, 2467-74.
443. BELL, W. J. & ADIYODI, K. G. (1981): *The American cockroach.* (London, Chapman and Hall).
444. DUNN, M. J. (1993): *Gel electrophoresis: Proteins.* (BIOS Scientific Publishers Limited).
445. WACKER, M., LINTON, D., HITCHEN, P. G., NITA-LAZAR, M., HASLAM, S. M., NORTH, S. J., PANICO, M., MORRIS, H. R., DELL, A., WREN, B. W. & AEBI, M. (2002): N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*, *Science*, 298, 1790-3.

446. WHITEHEAD, D. L., BRUNET, P. C. & KENT, P. W. (1960): Specificity in vitro of a phenoloxidase system from *Periplaneta americana* (L.), *Nature*, 185, 610.
447. YAMAZAKI, H. I. (1972): Cuticular phenoloxidase from the silkworm, *Bombyx mori*: properties, solubilization, and purification., *Insect Biochemistry*, 2, 431-444.
448. ASHIDA, M. & YAMAZAKI, Y. H. (1990): *Biochemistry of phenoloxidase system in insects. With special reference to its activation* (Japan Sci. Soc. Press, Tokio/Springer, Berlin).
449. HATTORI, M., KONISHI, H., TAMURA, Y., KONNO, K. & SOGAWA, K. (2005): Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, *J Insect Physiol*, 51, 1359-65.
450. KAWABATA, T., YASUHARA, Y., OCHIAI, M., MATSUURA, S. & ASHIDA, M. (1995): Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7774-8.
451. TAKLE, G. B. & LACKIE, A. M. (1986): Chemokinetic behaviour of insect haemocytes in vitro, *J Cell Sci*, 85, 85-94.
452. KOBAYASHI, T., VIEIRA, W. D., POTTERF, B., SAKAI, C., IMOKAWA, G. & HEARING, V. J. (1995): Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis, *J Cell Sci*, 108 (Pt 6), 2301-9.
453. RILEY, P. A. (1997): Melanin, *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 1235-9.
454. SÖDERHÄLL, K. (1982): Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review, *Dev Comp Immunol*, 6, 601-11.
455. ADACHI, K., HIRATA, T., NISHIOKA, T. & SAKAGUCHI, M. (2003): Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 134, 135-41.
456. ROMPEL, A., FISCHER, H., MEIWES, D., BULDT-KARENTZOPOULOS, K., DILLINGER, R., TUCZEK, F., WITZEL, H. & KREBS, B. (1999): Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin, *J Biol Inorg Chem*, 4, 56-63.
457. KADOTA, K., SATOH, E., OCHIAI, M., INOUE, N., TSUJI, N., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., MIKAMI, T., CLAVERIA, F. G. & FUJISAKI, K. (2002): Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*, *Parasitol Res*, 88, 781-4.
458. BRACK, A., HELLMANN, N. & DECKER, H. (2008): Kinetic properties of hexameric tyrosinase from the crustacean *Palinurus elephas*, *Photochemistry and Photobiology*, accepted.
459. FISHER, C. W. & BRADY, U. E. (1980): Increased rate of melanization in hemolymph of American cockroaches (*Periplaneta americana*) and house crickets (*Acheta domesticus*) intoxicated by insecticides, *Experientia*, 36, 93-4.
460. ARAKANE, Y., MUTHUKRISHNAN, S., BEEMAN, R. W., KANOST, M. R. & KRAMER, K. J. (2005): Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11337-42.
461. MATTINEN, M. L., KRUIIS, K., BUCHERT, J., NIELSEN, J. H., ANDERSEN, H. J. & STEFFENSEN, C. L. (2005): Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides, *Febs J*, 272, 3640-50.
462. DITTMER, N. T., SUDERMAN, R. J., JIANG, H., ZHU, Y. C., GORMAN, M. J., KRAMER, K. J. & KANOST, M. R. (2004): Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, *Insect Biochem Mol Biol*, 34, 29-41.
463. THOMAS, B. R., YONEKURA, M., MORGAN, T. D., CZAPLA, T. H., HOPKINS, T. L. & KRAMER, K. J. (1989): A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*., *Insect Biochemistry*, 19, 611-622.
464. YOUSEF, M. S., FABIOLA, F., GATTIS, J. L., SOMASUNDARAM, T. & CHAPMAN, M. S. (2002): Refinement of the arginine kinase transition-state analogue complex at 1.2 Å resolution: mechanistic insights, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58, 2009-17.
465. SUZUKI, T., KAWASAKI, Y. & FURUKOHRI, T. (1997): Evolution of phosphagen kinase. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*, *Biochem J*, 328 (Pt 1), 301-6.

466. WEDEMEYER, W. J., WELKER, E., NARAYAN, M. & SCHERAGA, H. A. (2000): Disulfide bonds and protein folding, *Biochemistry*, 39, 4207-16.
467. CAREAGA, C. L. & FALKE, J. J. (1992): Structure and dynamics of *Escherichia coli* chemosensory receptors. Engineered sulfhydryl studies, *Biophys J*, 62, 209-16; discussion 217-9.
468. CAREAGA, C. L. & FALKE, J. J. (1992): Thermal motions of surface alpha-helices in the D-galactose chemosensory receptor. Detection by disulfide trapping, *J Mol Biol*, 226, 1219-35.
469. SIEGBAHN, P. E. (2004): The catalytic cycle of catechol oxidase, *J Biol Inorg Chem*, 9, 577-90.
470. VAN GYSEL, D., GOVAERE, E., DOLI, E. & DE BAETS, F. (2006): Cockroach sensitisation in Belgian children, *Eur J Pediatr*.
471. GECHIEVA, G. & RANCHOV, G. (1994): Development and evaluation of *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* resistance to dichlorvos in Bulgaria, *Appl Parasitol*, 35, 32-5.
472. HARMANCI, E., METINTAS, M., ALATAS, F., ERGINEL, S. & MUTLU, S. (2000): Low prevalence of allergy to cockroach and latex in asthmatic patients in Eskisehir (Anatolia), Turkey, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 10, 162-5.
473. KLUNKER, R. (1977): [Studies on the ability of the German cockroach *Blattella germanica* L. to slip through narrow cracks], *Z Gesamte Hyg*, 23, 919-22.
474. VATER, G. (1979): [German cockroaches (*Blattella germanica*) in a refrigerator], *Angew Parasitol*, 20, 147-54.
475. KLUNKER, R. (1990): [The appearance of insecticide resistance in *Blattella germanica* in the German Democratic Republic], *Angew Parasitol*, 31, 79-93.
476. FISCHER, A. B. & EIKMANN, T. (1996): Improper use of an insecticide at a kindergarten, *Toxicol Lett*, 88, 359-64.
477. STEINBRINK, H. (1985): [Possibilities for controlling cockroaches in their hiding places], *Angew Parasitol*, 26, 91-5.
478. RAUKAS-KIVIOJA, A., RAUKAS, E., LOIT, H. M., KIVILOOG, J., RONMARK, E., LARSSON, K. & LUNDBACK, B. (2003): Allergic sensitization among adults in Tallinn, Estonia, *Clin Exp Allergy*, 33, 1342-8.
479. RAUKAS-KIVIOJA, A., RAUKAS, E. S., MEREN, M., LOIT, H. M., RONMARK, E. & LUNDBACK, B. (2007): Allergic sensitization to common airborne allergens among adults in Estonia, *Int Arch Allergy Immunol*, 142, 247-54.
480. DUBUS, J. C., GUERRA, M. T. & BODIOLU, A. C. (2001): Cockroach allergy and asthma, *Allergy*, 56, 351-2.
481. REMES, S. T., KOSKELA, H. O., IIVANAINEN, K. & PEKKANEN, J. (2005): Allergen-specific sensitization in asthma and allergic diseases in children: the study on farmers' and non-farmers' children, *Clin Exp Allergy*, 35, 160-6.
482. CUSTOVIC, A., FLETCHER, A., PICKERING, C. A., FRANCIS, H. C., GREEN, R., SMITH, A., CHAPMAN, M. & WOODCOCK, A. (1998): Domestic allergens in public places III: house dust mite, cat, dog and cockroach allergens in British hospitals, *Clin Exp Allergy*, 28, 53-9.
483. ALEXANDER, J. B., NEWTON, J. & CROWE, G. A. (1991): Distribution of Oriental and German cockroaches, *Blatta orientalis* and *Blattella germanica* (Dictyoptera), in the United Kingdom, *Med Vet Entomol*, 5, 395-402.
484. RIARIO-SFORZA, G. G., DELLA TORRE, F., ANTONICELLI, L., BONIFAZI, F., GIORDANO, T., D'AMATO, G., LICCARDI, G., BETTINI, P. & INCORVAIA, C. (1997): Sensitization to cockroach in Italy: a multicentric study, *Allergy Asthma Proc*, 18, 23-8.
485. PERONI, D. G., ALFONSI, L., RESS, M., MILANESI, E., PIACENTINI, G. L. & BONER, A. L. (2003): Low rate of cockroach sensitivity in Italian pre-school children, *Allergy*, 58, 531.
486. LICCARDI, G., RUSSO, M., D'AMATO, M., GRANATA, F. P., DE NAPOLI, A. & D'AMATO, G. (1998): Sensitization to cockroach allergens in a sample from the urban population living in Naples (southern Italy), *J Investig Allergol Clin Immunol*, 8, 245-8.
487. LICCARDI, G., NOSCHESI, P., SALZILLO, A., MORANDI, M., CALDERARO, F., D'AMATO, M. & D'AMATO, G. (1996): [Allergic rhinitis due to cockroach antigenic components. An emerging pathology?], *Recenti Prog Med*, 87, 208-12.
488. PERUZZI, M., DE LUCA, M., NOVEMBRE, E., DE MARTINO, M. & VIERUCCI, A. (1999): Incidence of cockroach allergy in atopic Italian children, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 83, 167-71.
489. MACAN, J., PLAVEC, D., KANCELJAK, B. & MILKOVIC-KRAUS, S. (2003): Exposure levels and skin reactivity to German cockroach

- (*Blattella germanica*) in Croatia, *Croat Med J*, 44, 756-60.
490. VAN WIJNEN, J. H., VERHOEFF, A. P., MULDER-FOLKERTS, D. K., BRACHEL, H. J. & SCHOU, C. (1997): Cockroach allergen in house dust, *Allergy*, 52, 460-4.
 491. LOEDRUP CARLSEN, K. (2003): Cockroach sensitivity in Norway, *Allergy*, 58, 820.
 492. LODRUP CARLSEN, K. C., CARLSEN, K. H., BUCHMANN, M. S., WIKSTROM, J. & MEHL, R. (2002): Cockroach sensitivity in Norway: a previously unidentified problem?, *Allergy*, 57, 529-33.
 493. BERZHETS, B. M., PETROVA, N. S., BARASHKINA, O. F., EFREMEKO, II, DOTSENKO, E. A. & PRISHCHEPA, I. M. (2001): [Role of cockroaches *Blatella germanica* in the development of atopic bronchial asthma], *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 43-6.
 494. GERBAZIEVA, V. B., ZHIROVA, S. N. & SVERANOVSKAIA, V. V. (1999): [Increased sensitivity to cockroaches of the species *Blattella germanica* in patients with allergic diseases], *Patol Fiziol Eksp Ter*, 11-4.
 495. STYPULKOWSKA-MISIUREWICZ, H., PANCER, K. W., GLINIEWICZ, A., MIKULAK, E., LAUDY, A., PODSIADLO, B. & RABCZENKO, D. (2006): [Synantropic cockroaches (*Blattella germanica* L.) in hospital environment--microbiological hazard for patients and hospital infections risk assessment], *Przegl Epidemiol*, 60, 609-16.
 496. RACEWICZ, M. (1986): [Sensitivity of *Blattella germanica* (L.) from the Polish merchant navy ships to carbamate compounds], *Wiad Parazytol*, 32, 543-5.
 497. KACZMAREK, J., KUPCZYK, M., KUPRYS, I., BOCHENSKA-MARCINIAK, M. & KUNA, P. (2005): [Cockroach hypersensitivity in children suffering from perennial allergic rhinitis], *Pol Merkur Lekarski*, 18, 400-3.
 498. GLINIEWICZ, A., KRZEMINSKA, A. & SAWICKA, B. (1996): [Susceptibility of cockroaches *Blattella germanica* L. collected from hospitals to selected pyrethroid and carbamate insecticides], *Rocz Panstw Zakl Hig*, 47, 333-41.
 499. CZAJKA, E., PANCER, K., KOCHMAN, M., GLINIEWICZ, A., SAWICKA, B., RABCZENKO, D. & STYPULKOWSKA-MISIUREWICZ, H. (2003): [Characteristics of bacteria isolated from body surface of German cockroaches caught in hospitals], *Przegl Epidemiol*, 57, 655-62.
 500. STELMACH, I., BRZOZOWSKA, A., JERZYNSKA, J., PODSIADLOWICZ-BORZECKA, M., BOBROWSKA, M., MAJAK, P. & KUNA, P. (2000): [Hypersensitivity to cockroach allergen among children with bronchial asthma living in the Lodz district], *Pol Merkuriusz Lek*, 9, 657-61.
 501. ROMANSKI, B., BRODA, S., DZIEDZICZKO, A., PAWLIK, K., WILEWSKA-KLUBO, T., WOJTANOWSKI, I. & ZBIKOWSKA, M. (1978): [Allergy to house dust in patients with asthma. IV. Positive skin test reactions to antigens of cockroaches in patients with housedust-induced asthma], *Pol Arch Med Wewn*, 59, 641-6.
 502. ROMANSKI, B., DZIEDZICZKO, A., PAWLIK-MISKIEWICZ, K., WILEWSKA-KLUBO, T. & ZBIKOWSKA-GOTZ, M. (1981): Allergy to cockroach antigens in asthmatic patients, *Allergol Immunopathol (Madr)*, 9, 427-32.
 503. STELMACH, I., JERZYNSKA, J., STELMACH, W., MAJAK, P., CHEW, G., GORSKI, P. & KUNA, P. (2002): Cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in Polish children with asthma, *Allergy*, 57, 701-5.
 504. CUESTA, C., PLACIDO, J. L., DELGADO, L., MIRANDA, M., MOREIRA SILVA, J. P., CASTELBRANCO, M. G. & VAZ, M. (1995): [Cockroach allergy: a study of its prevalence using skin tests with commercial extracts], *Allergol Immunopathol (Madr)*, 23, 295-300.
 505. KIM, J. L., ELFMAN, L., MI, Y., JOHANSSON, M., SMEDJE, G. & NORBACK, D. (2005): Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment, *Indoor Air*, 15, 170-82.
 506. MUNIR, A. K., BJORKSTEN, B., EINARSSON, R., SCHOU, C., EKSTRAND-TOBIN, A., WARNER, A. & KJELLMAN, N. I. (1994): Cat (Fel d I), dog (Can f I), and cockroach allergens in homes of asthmatic children from three climatic zones in Sweden, *Allergy*, 49, 508-16.
 507. KIM, J. L. (2005): Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment, *Indoor Air*, 15, 170-182.
 508. MOSIMANN, B., PEITREQUIN, R., BLANC, C. & PECOUD, A. (1992): [Allergy to cockroaches in a Swiss population with asthma and chronic rhinitis], *Schweiz Med Wochenschr*, 122, 1245-8.
 509. SASTRE, J., IBANEZ, M. D., LOMBARDERO, M., LASO, M. T. & LEHRER, S. (1996): Allergy to cockroaches in patients with asthma and rhinitis in an urban area (Madrid), *Allergy*, 51, 582-6.

510. MORALES HERNANDEZ, A., LOPEZ GARCIA, A., GALINDO GARCIA, A., PAZ MARTINEZ, D. & PAPAQUI TAPIA, S. (2000): [Correlation between *Blatella germanica* and *Periplaneta americana* in allergic patients], *Rev Alerg Mex*, 47, 154-6.
511. POLA, J., VALDIVIESO, R., ZAPATA, C., QUIRCE, S., HINOJOSA, M. & LOSADA, E. (1988): Specific bronchial challenge in cockroach asthma, *Allergol Immunopathol (Madr)*, 16, 171-3.
512. PASCUAL, C. Y., CRESPO, J. F., SAN MARTIN, S., ORNIA, N., ORTEGA, N., CABALLERO, T., MUNOZ-PEREIRA, M. & MARTIN-ESTEBAN, M. (1997): Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids, *Allergy*, 52, 514-20.
513. ARMENTIA, A., MARTINEZ, A., CASTRODEZA, R., MARTINEZ, J., JIMENO, A., MENDEZ, J. & STOLLE, R. (1997): Occupational allergic disease in cereal workers by stored grain pests, *J Asthma*, 34, 369-78.
514. YAZICIOGLU, M., ONER, N., CELTIK, C., OKUTAN, O. & PALA, O. (2004): Sensitization to common allergens, especially pollens, among children with respiratory allergy in the Trakya region of Turkey, *Asian Pac J Allergy Immunol*, 22, 183-90.
515. UZEL, A., CAPAN, N., CANBAKAN, S., YURDAKUL, A. S. & DURSUN, B. (2005): Evaluation of the relationship between cockroach sensitivity and house-dust-mite sensitivity in Turkish asthmatic patients, *Respir Med*, 99, 1032-7.
516. MIMIOGLU, M. M. & SAHIN, I. (1976): [A parasitological study of cockroaches (*Blattidae*)], *Mikrobiyol Bul*, 10, 17-25.
517. GRUNESER, S., ATICI, A., CENGIZLER, I. & N, A. (1996): Inhalant allergens: as a cause of respiratory allergy in east Mediterranean area, Turkey., *Allergol Immunopathol (Madr)*, 3, 116-9.
518. YILMAZ, A., TUNCER, A., SEKEREL, B. E., ADALIOGLU, G. & SARAÇLAR, Y. (2004): Cockroach allergy in a group of Turkish children with respiratory allergies, *Turk J Pediatr*, 46, 344-9.
519. MUNGAN, D., CELIK, G., SIN, B., BAVBEK, S., DEMIREL, Y. & MISIRLIGIL, Z. (1998): Characteristic features of cockroach hypersensitivity in Turkish asthmatic patients, *Allergy*, 53, 870-3.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
anti- <i>P.a.</i> HL-AK	anti- <i>Periplaneta americana</i> Hämolymp-Antikörper
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AK	Antikörper
APC, APZ	„antigen presenting cell“, Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
AS-Identität	Aminosäure-Sequenzidentität
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge
Barbital	5,5-Diethylbarbitursäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat-p-toluidinsalz
BPB	Nativer Probenpuffer, Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CAST	„cellular antigen stimulation test“
CE	Crude-Extrakt, (Schaben)mazerat, Ganzkörperextrakt
D	Probe aus meiner Diplomarbeit
DC	Dendritische Zelle
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPACHINON	4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon
DP	Denaturierungspuffer
ϵ	Spezifischer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ESI-Q-TOF	“electrospray ionization-quadrupole time-of-flight”
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FWHM	“full width at half maximum“, Halbwertsbreite
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GST	Glutathion S-Transferase
Hc	Hämocyanin
Hc. <i>A.a.</i> / Hc <i>P.e.</i>	<i>Astacus</i> -Marker / <i>Palinurus</i> -Marker
HL	Hämolymphe
HL-1, HL-2	Hämolymphe der ersten bzw. zweiten Charge
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauscher-Chromatographie
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

Abkürzung	Bezeichnung
kDa	Kilo-Dalton
LCMSMS	Flüssigkeitchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Spektren
L-DOPA	L-3,4 Dihydroxyphenylalanin
LSP	Larvale-Serum-Proteine
LT	Leukotrien
MBTH	Besthorn's Hydrazon; 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
MHC-II	„major histocompatibility complex-II“, Haupthistokompatibilitätskomplex
mind.	mindestens
Mr	Molekulargewicht
n	Anzahl der Elemente in der Stichprobe
NBAD	N-Acetylcatecholamin
NBT	p-Nitrobluetetrazolium
OD	Optische Dichte
<i>P.a.</i>	<i>Periplaneta americana</i> / Amerikanische Schabe
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“, mononukleäre Zelle aus dem peripheren Blut
PBS	„Phosphate buffered saline“
pHi	Isoelektrischer Punkt
PTU	N- Phenylthioharnstoff
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„Revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SEC	„Size-exclusion chromatography“ Größenausschlusschromatographie
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“, Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th0-Zelle	T-Helferzelle Typ 0
Th1-Zelle	T-Helferzelle Typ 1
Th2-Zelle	T-Helferzelle Typ 2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
TT	Tetanustoxoid
UE	Untereinheiten

8 ANHANG

8.1 Referenzen zu Abb. 1-4 Schabenverbreitung und –Allergie

Land	Referenzen
Belgien	470
Bulgarien	471, 472
Deutschland	71-79, 89, 91, 473-477
Estland	478, 479
Frankreich	46, 480
Finnland	481
Großbritannien	482, 483
Italien	484-488
Kroatien	489
Niederlande	490
Norwegen	491, 492
Russland	493, 494
Polen	495-503
Portugal	504
Schweden	505-507
Schweiz	508
Spanien	509-513
Türkei	472, 514-519

Tabelle 8-1: Referenzen zur Schabenverbreitung in Abb. 1-4.

8.2 Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von [REDACTED] aus dem Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

8.2.1 Per a 3.03 nach Protokoll 3

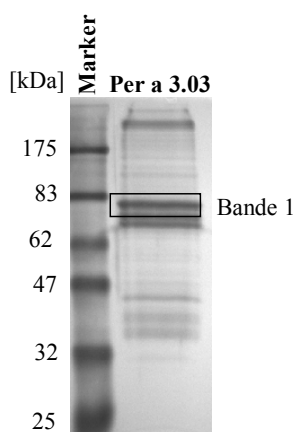
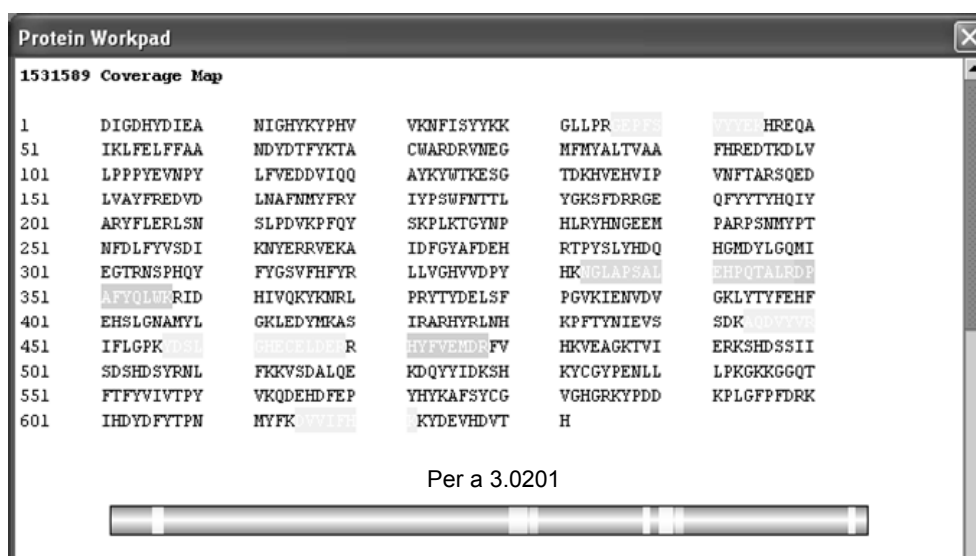
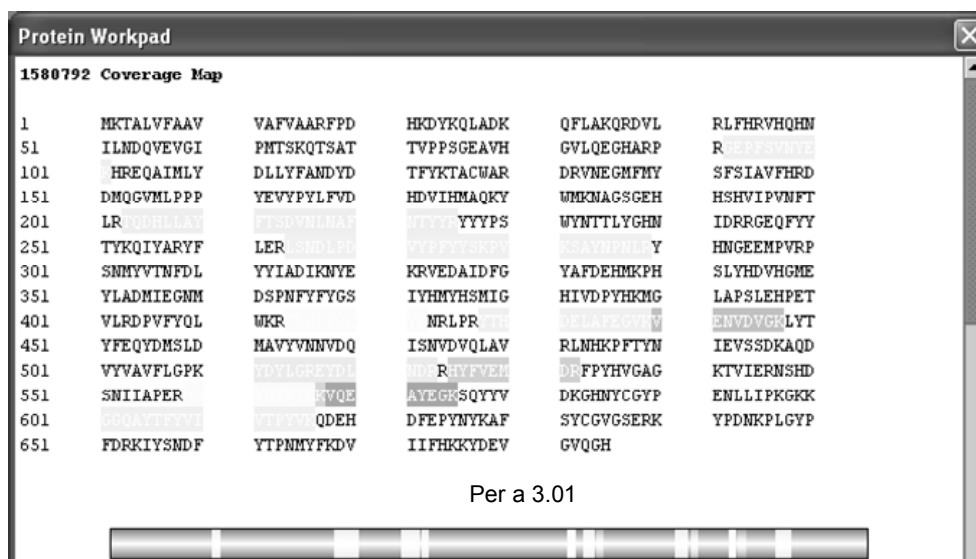


Abb. 8-1: Zink-gefärbte 10%ige SDS-PAGE. Die mittels ESI-Q-TOF analysierte Per a 3.03-Bande ist gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in nachfolgenden „Coverage Maps“ dargestellt.

Bande 1



8.2.2 Per a 3.03 aus der Diplomarbeit

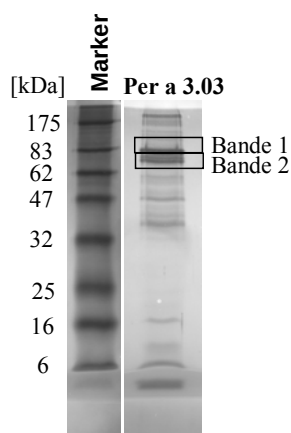
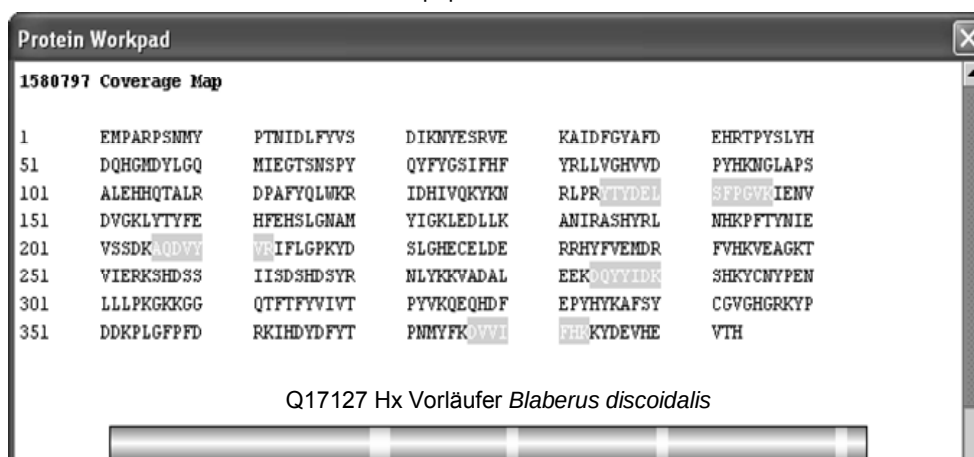


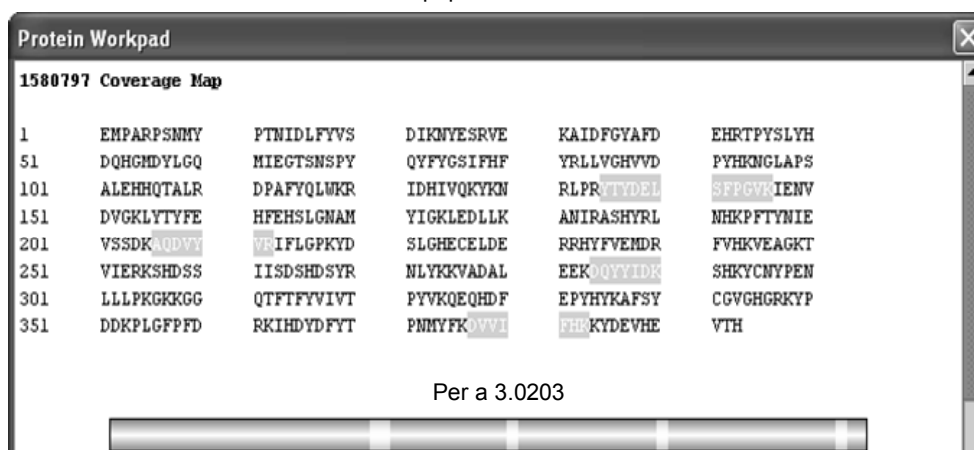
Abb. 8-2: Zink-gefärbte 10%ige SDS-PAGE. Die mittels ESI-Q-TOF beiden analysierten Per a 3.03-Banden sind gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in nachfolgenden „Coverage Maps“ dargestellt.

Bande 1

7 peptides detected

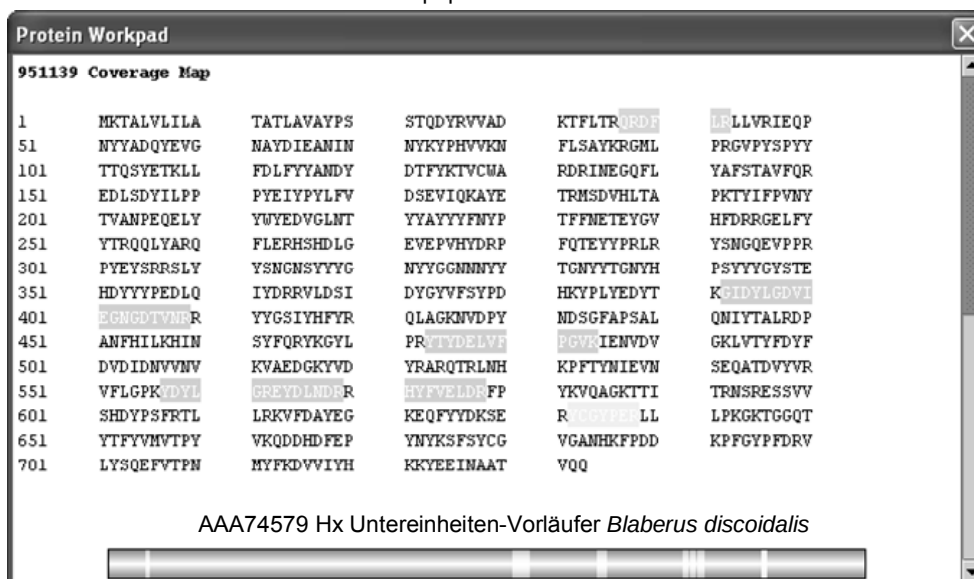


4 peptides detected



Bande 2

7 peptides detected



8.2.3 P II nach Protokoll 2

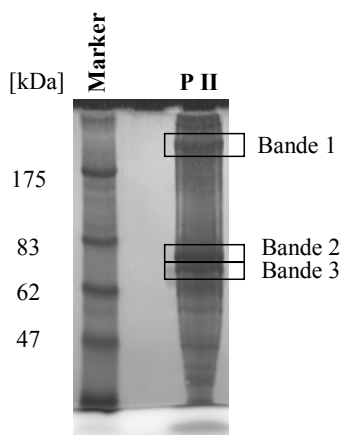
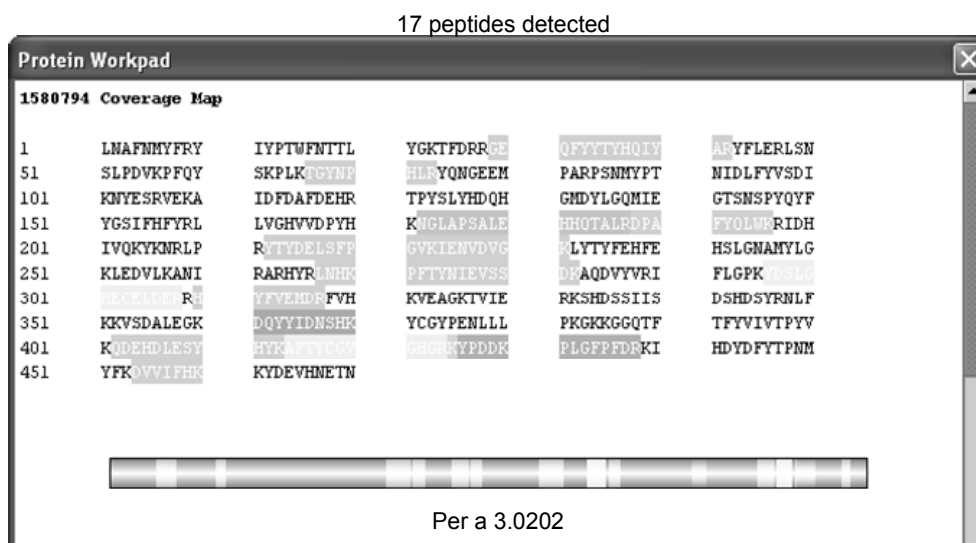
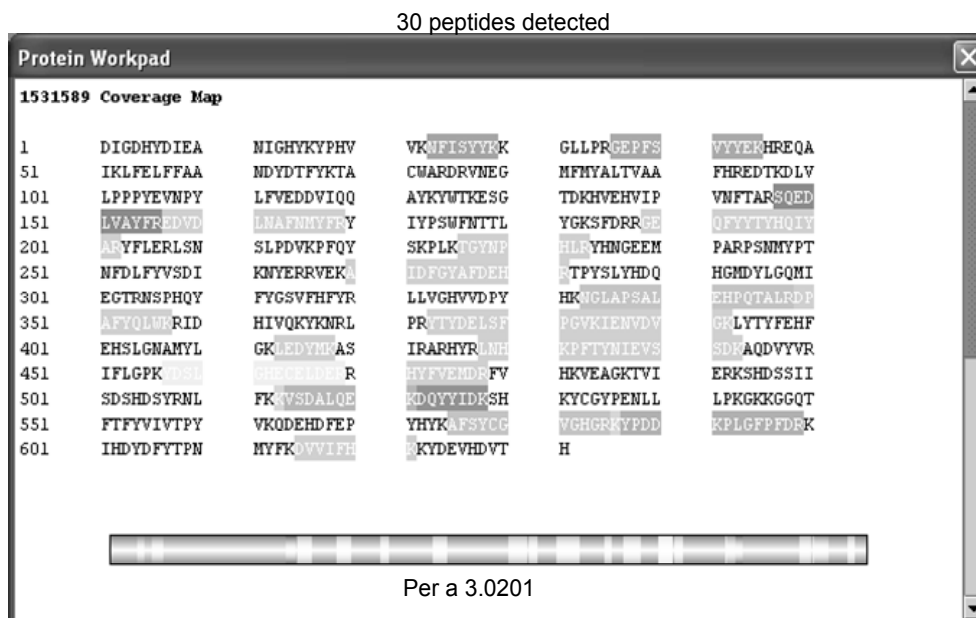
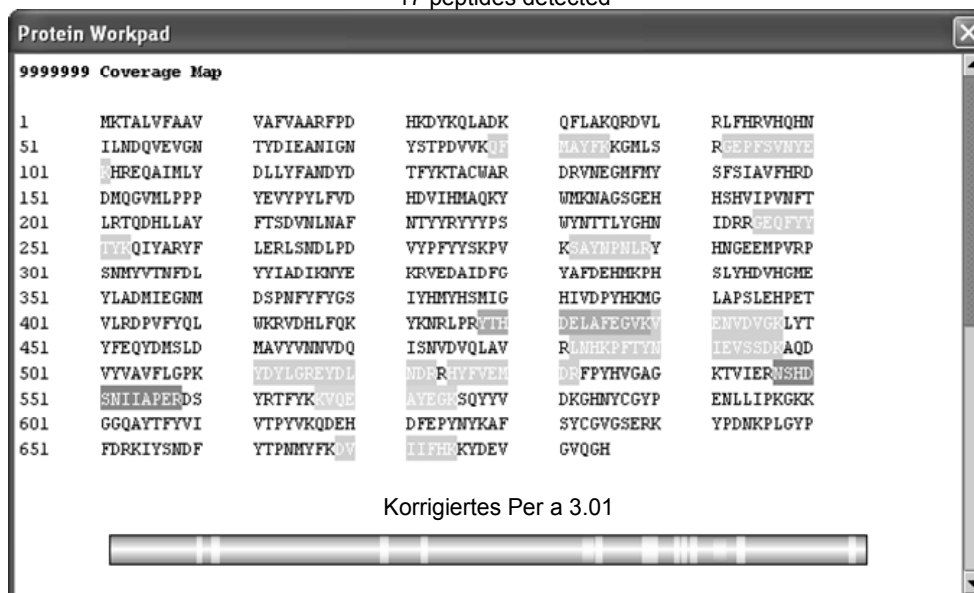


Abb. 8-3: Zink-gefärbte 8%ige SDS-PAGE. Die mittels ESI-Q-TOF analysierten P II-Banden sind gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in nachfolgenden „Coverage Maps“ dargestellt.

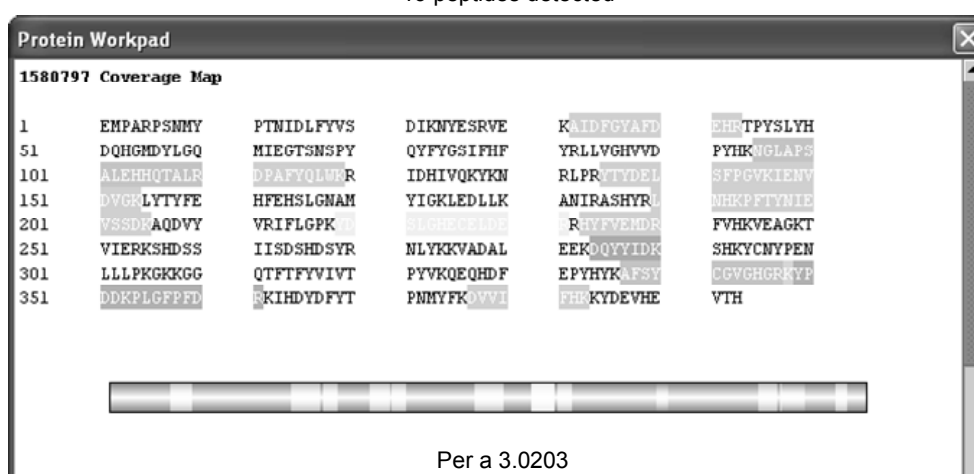
Bande 1



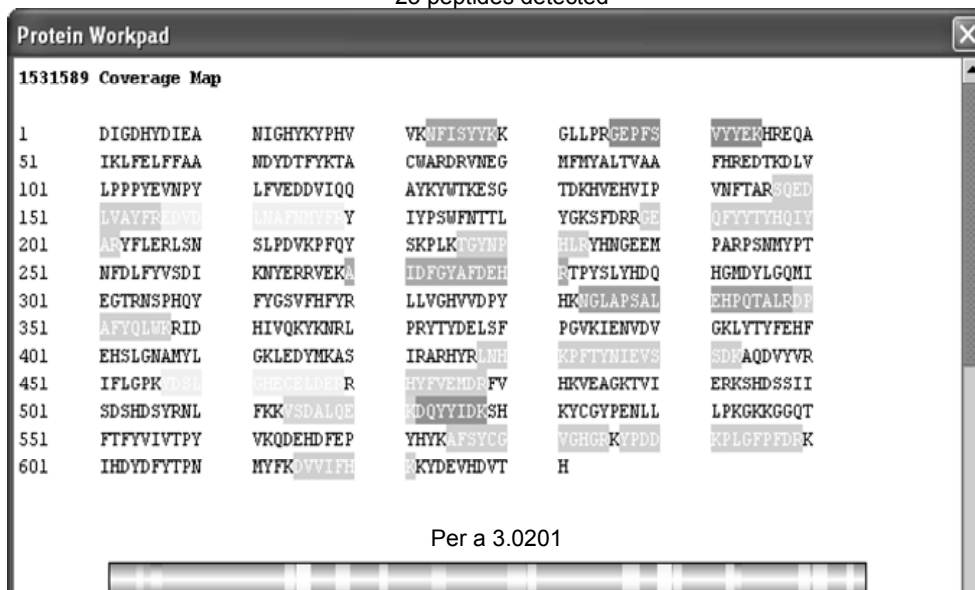
17 peptides detected



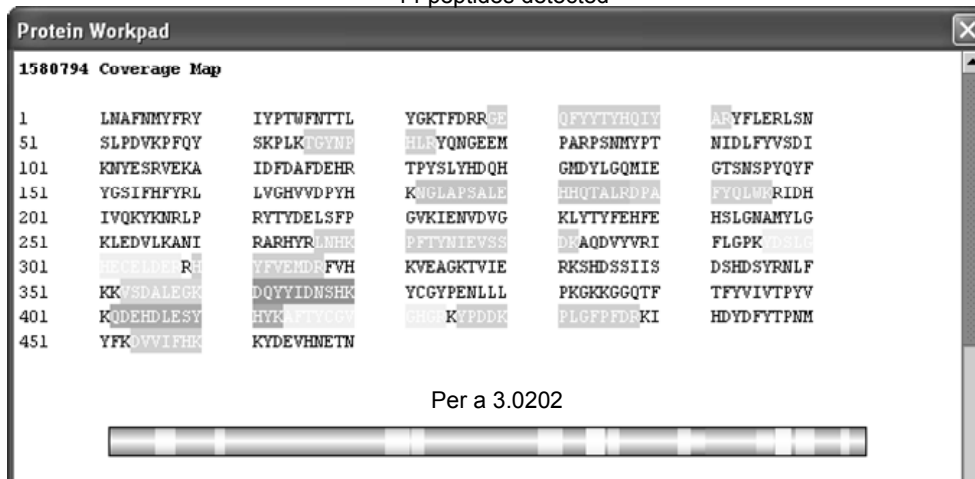
16 peptides detected

Bande 2

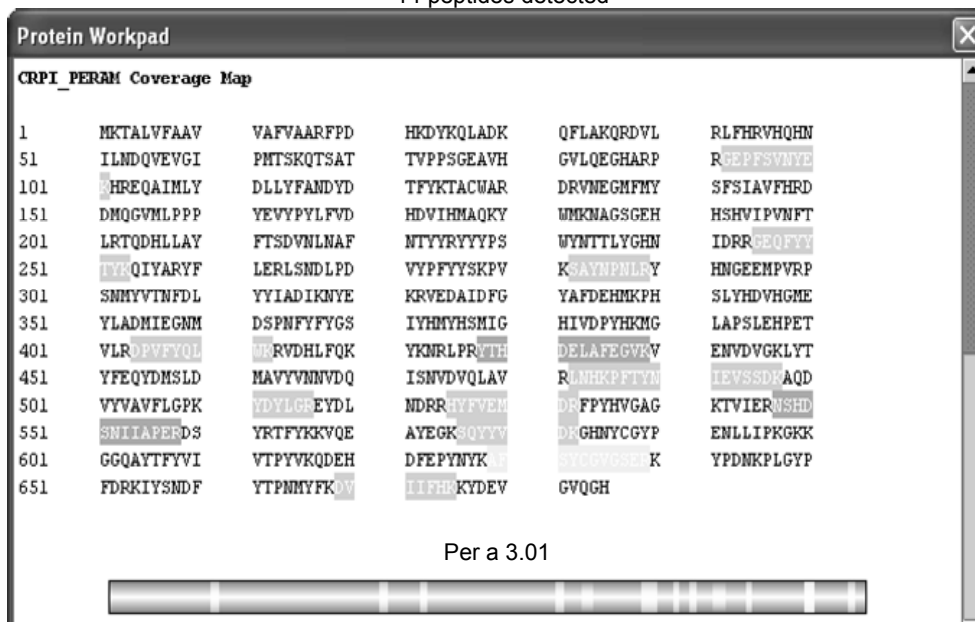
25 peptides detected



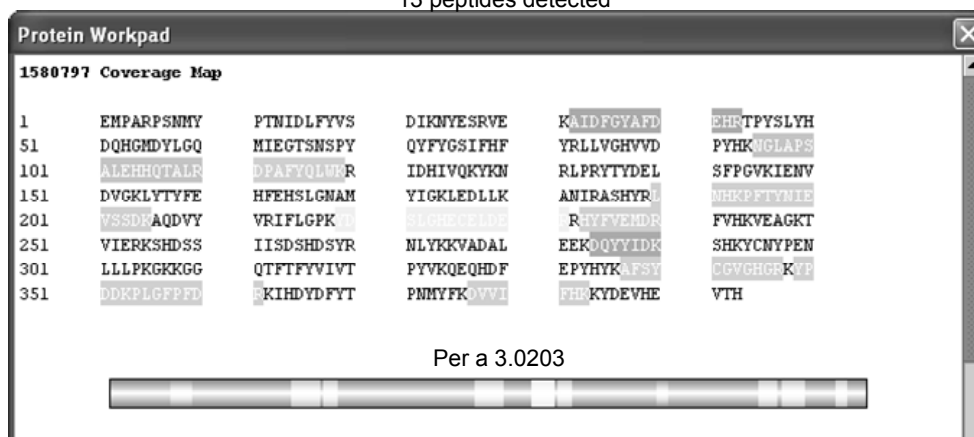
14 peptides detected



14 peptides detected

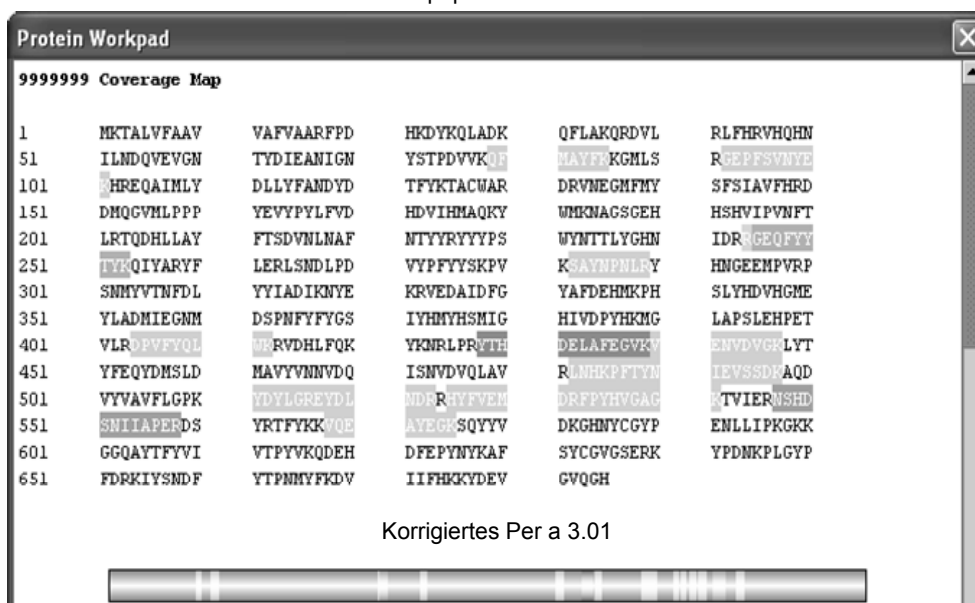


13 peptides detected

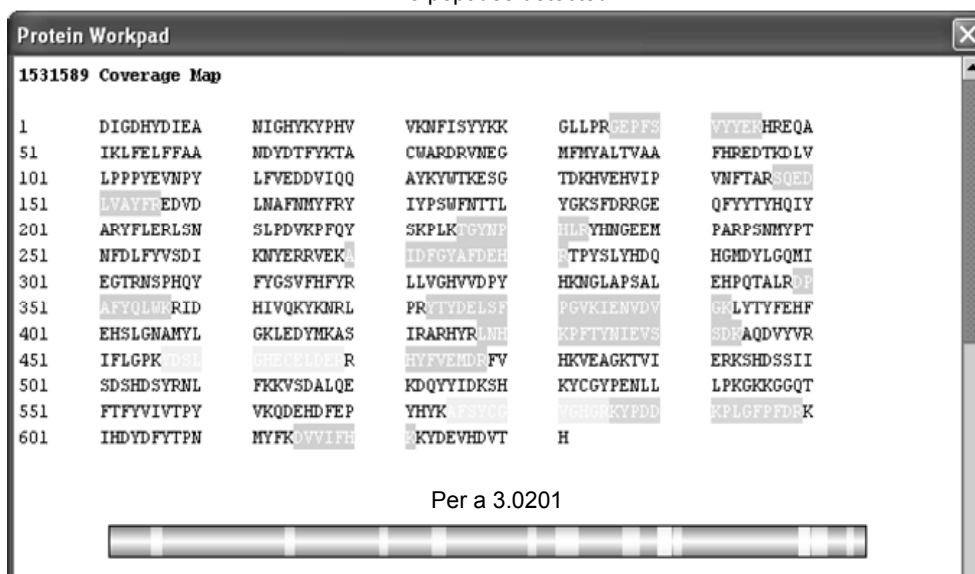


Bande 3

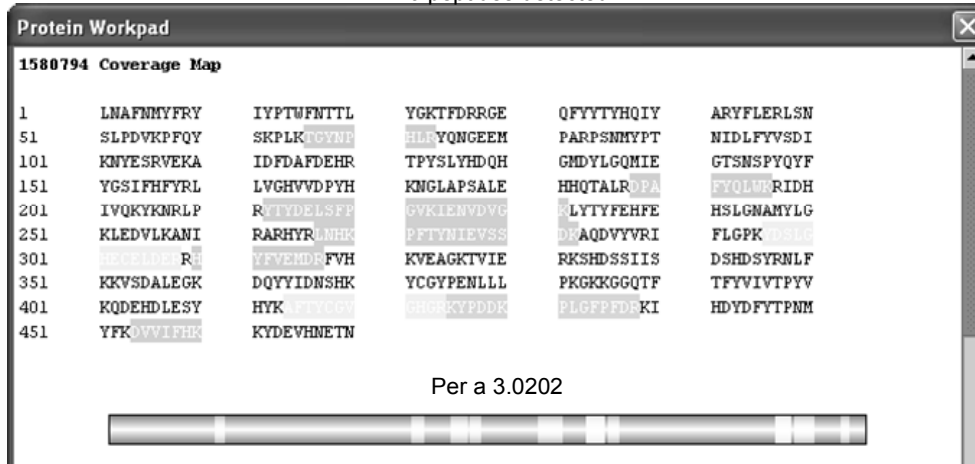
19 peptides detected



13 peptides detected



10 peptides detected



8.2.4 Per a 9 nach Protokoll 2

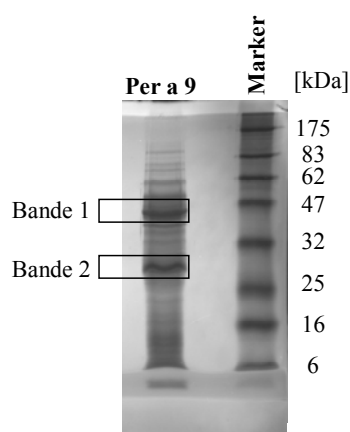
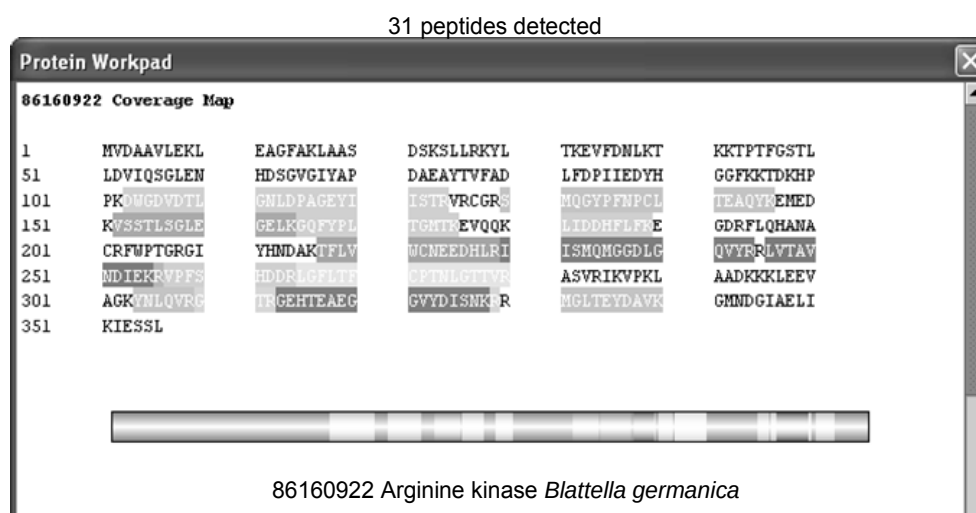
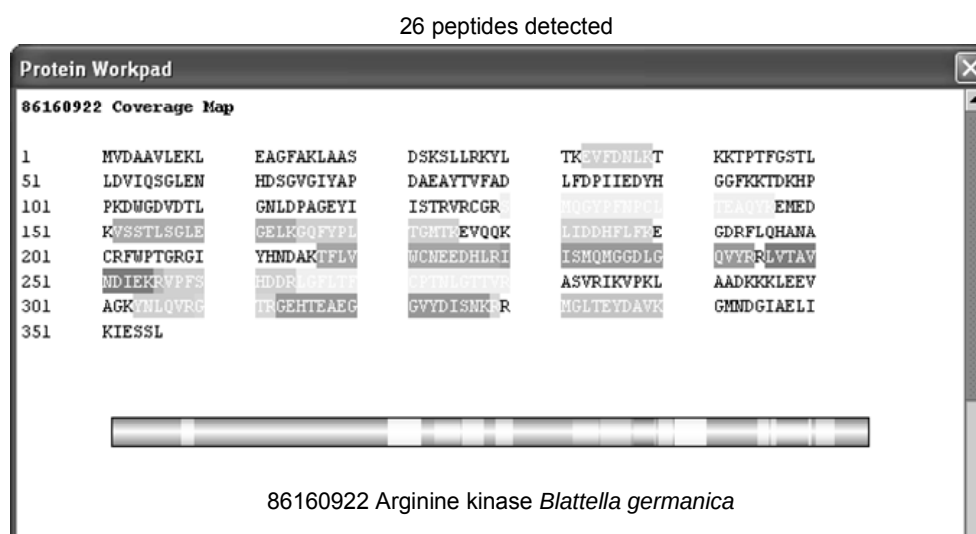


Abb. 8-4: Zink-gefärbte 10%ige SDS-PAGE. Die mittels ESI-Q-TOF analysierten Per a 9-Banden sind mit 1 und 2 gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in nachfolgenden „Coverage Maps“ dargestellt.

Bande 1



Bande 2



8.2.5 Per a 9 nach Protokoll 3

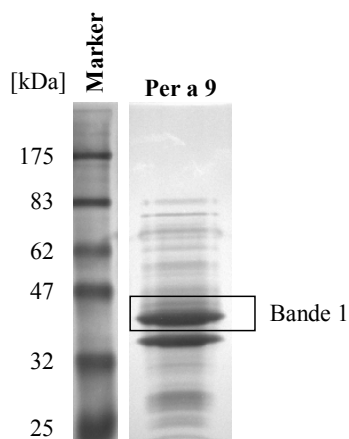
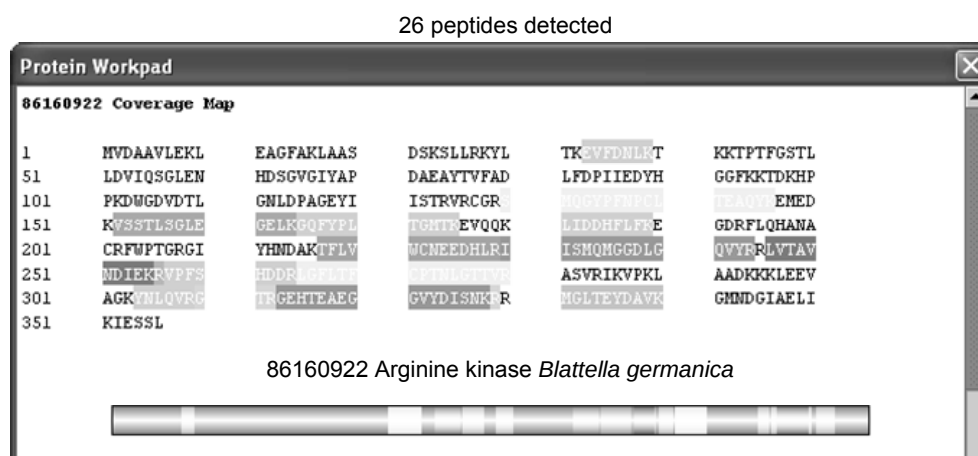


Abb. 8-5: Zink gefärbtes 10%ige SDS-PAGE. Die mittels ESI-Q-TOF analysierte Per a 9-Bande ist gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in der nachfolgenden „Coverage Map“ dargestellt.

Bande 1



8.3 Korrektur der Per a 3.01-Sequenz: komplettes Alignment

```

      *           20           *           40           *           60
Per_a_3_01 : MKTALVFAAVVAFVAARF PDHKDYKQLADKQFLAKQRDVLRLFHRVHQHNI LNDQVEVGI : 60
k_Pera3_01 : MKTALVFAAVVAFVAARF PDHKDYKQLADKQFLAKQRDVLRLFHRVHQHNI LNDQVEVGN : 60
      MKTALVFAAVVAFVAARF PDHKDYKQLADKQFLAKQRDVLRLFHRVHQHNI LNDQVEVGI

      *           80           *           100          *           120
Per_a_3_01 : PMTSKQTSATTVPESGSAVHGVLQEGHARERGE PF SVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD : 120
k_Pera3_01 : TYDIEANIGNYSTEDVVKQFMAYFKKGMLSRGE PF SVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD : 120
      P                               RGE PF SVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYD

      *           140          *           160          *           180
Per_a_3_01 : TFYKTACWARDRVNEGFMFYSFSIAVFHRDDMQGVMLPPPVEVYPYLFVDHVDVIHMAQKY : 180
k_Pera3_01 : TFYKTACWARDRVNEGFMFYSFSIAVFHRDDMQGVMLPPPVEVYPYLFVDHVDVIHMAQKY : 180
      TFYKTACWARDRVNEGFMFYSFSIAVFHRDDMQGVMLPPPVEVYPYLFVDHVDVIHMAQKY

      *           200          *           220          *           240
Per_a_3_01 : WMKNAGSGEHHSHVIVPNFTLRTQDHLLAYETSDVNLNAFNTYYRYYYPSWYNTTLYGHN : 240
k_Pera3_01 : WMKNAGSGEHHSHVIVPNFTLRTQDHLLAYETSDVNLNAFNTYYRYYYPSWYNTTLYGHN : 240
      WMKNAGSGEHHSHVIVPNFTLRTQDHLLAYETSDVNLNAFNTYYRYYYPSWYNTTLYGHN

      *           260          *           280          *           300
Per_a_3_01 : IDRRGEQFYTYKQIYARYFLERLSNDLPDVYPFYYSKPVKSAYNPNLRYHNGEEMPVRP : 300
k_Pera3_01 : IDRRGEQFYTYKQIYARYFLERLSNDLPDVYPFYYSKPVKSAYNPNLRYHNGEEMPVRP : 300
      IDRRGEQFYTYKQIYARYFLERLSNDLPDVYPFYYSKPVKSAYNPNLRYHNGEEMPVRP

      *           320          *           340          *           360
Per_a_3_01 : SNMYVTNFDLYYIADIKNYEKRVEDAIDFGYAFDEHMKPHSLYHDVHGMEYLADMIEGNM : 360
k_Pera3_01 : SNMYVTNFDLYYIADIKNYEKRVEDAIDFGYAFDEHMKPHSLYHDVHGMEYLADMIEGNM : 360
      SNMYVTNFDLYYIADIKNYEKRVEDAIDFGYAFDEHMKPHSLYHDVHGMEYLADMIEGNM

      *           380          *           400          *           420
Per_a_3_01 : DSPNFYFYGSIYHMYHSMIGHIVDPYHKMGLAPSLHEHPETVLRDPVFYQLWKRVDHLFQK : 420
k_Pera3_01 : DSPNFYFYGSIYHMYHSMIGHIVDPYHKMGLAPSLHEHPETVLRDPVFYQLWKRVDHLFQK : 420
      DSPNFYFYGSIYHMYHSMIGHIVDPYHKMGLAPSLHEHPETVLRDPVFYQLWKRVDHLFQK

      *           440          *           460          *           480
Per_a_3_01 : YKNRLPRYTHDELA FEGVKVENVDVGKLYTYFEQYDMSLDMAVYVNNVDQISNVDVQLAV : 480
k_Pera3_01 : YKNRLPRYTHDELA FEGVKVENVDVGKLYTYFEQYDMSLDMAVYVNNVDQISNVDVQLAV : 480
      YKNRLPRYTHDELA FEGVKVENVDVGKLYTYFEQYDMSLDMAVYVNNVDQISNVDVQLAV

      *           500          *           520          *           540
Per_a_3_01 : RLNHKPFYTYNIEVSSDKAQDVYVAVFLGPKYDYLGREYDLNDRRHYFVEMDRF PYHVGAG : 540
k_Pera3_01 : RLNHKPFYTYNIEVSSDKAQDVYVAVFLGPKYDYLGREYDLNDRRHYFVEMDRF PYHVGAG : 540
      RLNHKPFYTYNIEVSSDKAQDVYVAVFLGPKYDYLGREYDLNDRRHYFVEMDRF PYHVGAG

      *           560          *           580          *           600
Per_a_3_01 : KTVIERNSHDSNIIAPERDSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDKGHNYCGYPENLLIPKGKK : 600
k_Pera3_01 : KTVIERNSHDSNIIAPERDSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDKGHNYCGYPENLLIPKGKK : 600
      KTVIERNSHDSNIIAPERDSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDKGHNYCGYPENLLIPKGKK

      *           620          *           640          *           660
Per_a_3_01 : GGQAYTFYVIVTPYVKQDEHDFEPYNYKAFSYCGVGSEKYPDNKPLGYPFDRKIYSNDF : 660
k_Pera3_01 : GGQAYTFYVIVTPYVKQDEHDFEPYNYKAFSYCGVGSEKYPDNKPLGYPFDRKIYSNDF : 660
      GGQAYTFYVIVTPYVKQDEHDFEPYNYKAFSYCGVGSEKYPDNKPLGYPFDRKIYSNDF

      *           680
Per_a_3_01 : YTPNMYFKDVIIIFHKKYDEVGVOGH : 685
k_Pera3_01 : YTPNMYFKDVIIIFHKKYDEVGVOGH : 685
      YTPNMYFKDVIIIFHKKYDEVGVOGH

```

Abb. 8-6: Komplettes Alignment von Abb. 3-62 der veröffentlichten und korrigierten Per a 3.01-Sequenz.

8.4 Ergebnisse DLS von Per a 9

Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: 38 kDa ua

SOP Name: Manual measurement settings

General Notes: restliche isolierte Proteine aus Periplaneta americana

File Name: 06-05-07_Pera_Proteine... **Dispersant Name:** Water

Record Number: 6

Dispersant RI: 1.330

Material RI: 1.45

Viscosity (cP): 1.0031

Material Absorbtion: 0.00

Measurement Date and Time: Thursday, July 06, 2006 3...

System

Temperature (°C): 20.0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 175.3

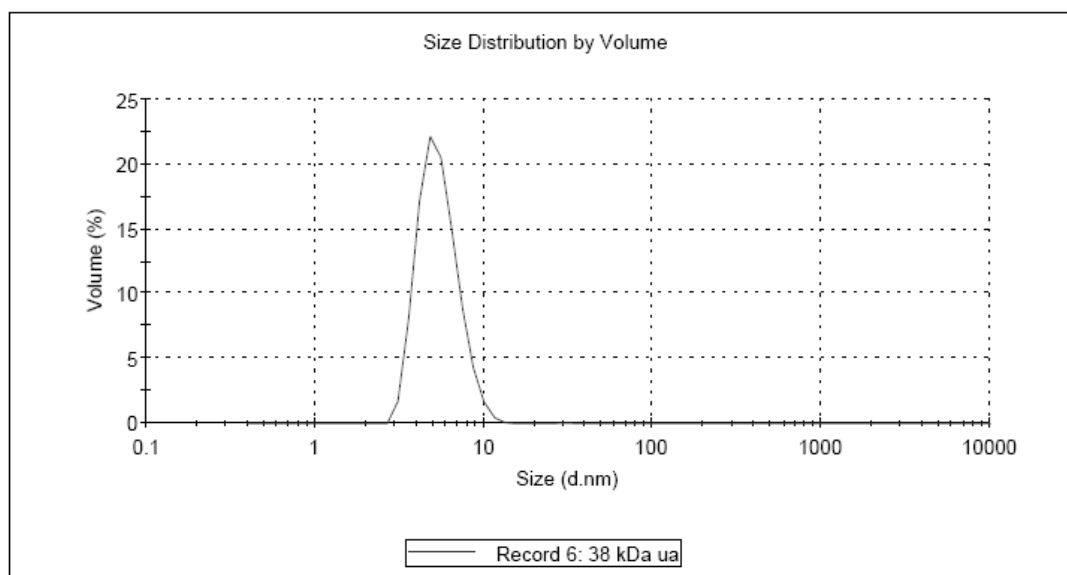
Measurement Position (mm): 4.20

Cell Description: Low volume glass cuvette (...)

Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 26.4	Peak 1: 529	0.0	266
Pdl: 0.756	Peak 2: 5.54	99.9	1.52
Intercept: 0.827	Peak 3: 3980	0.0	1110





Size Statistics Report by Volume

Sample Details

Sample Name: 38 kDa ua

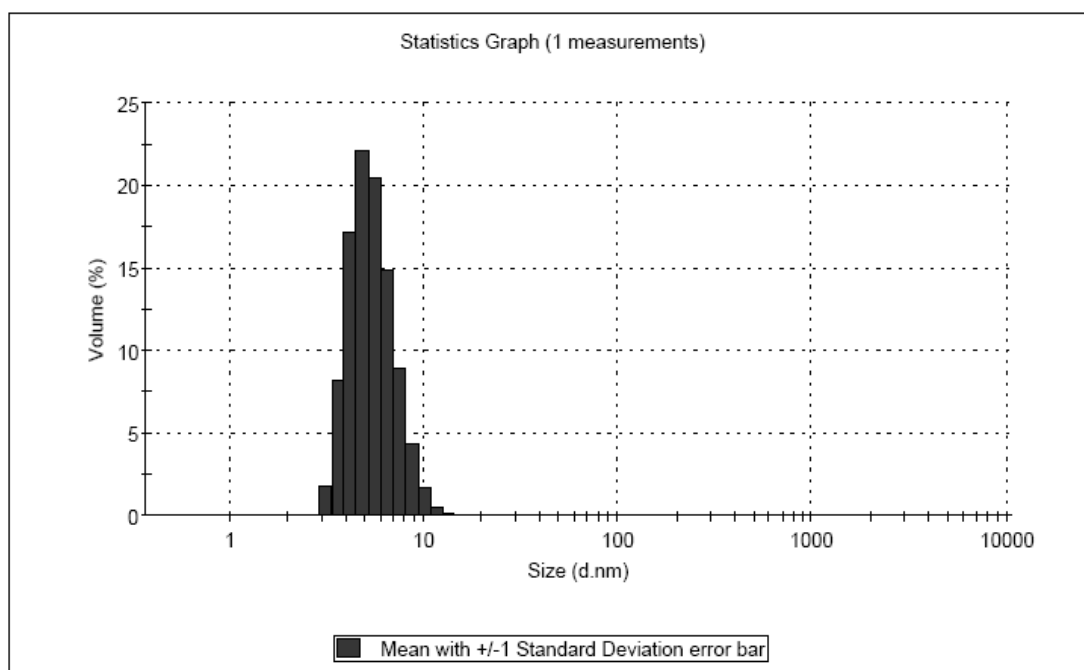
File Name: 06-05-07_Pera_Proteine_Rest.dts

SOP Name: Manual measurement settings

Measurement Date and Time: Thursday, July 06, 2006 3:22:58 PM

Z-Average (nm): 26.40993	Derived Count Rate (kcps): 175.2659448...
Standard Deviation (nm): 0	Standard Deviation (kcp...): 0
%Std Deviation: 0	%Std Deviation: 0
Variance: 0	Variance: 0

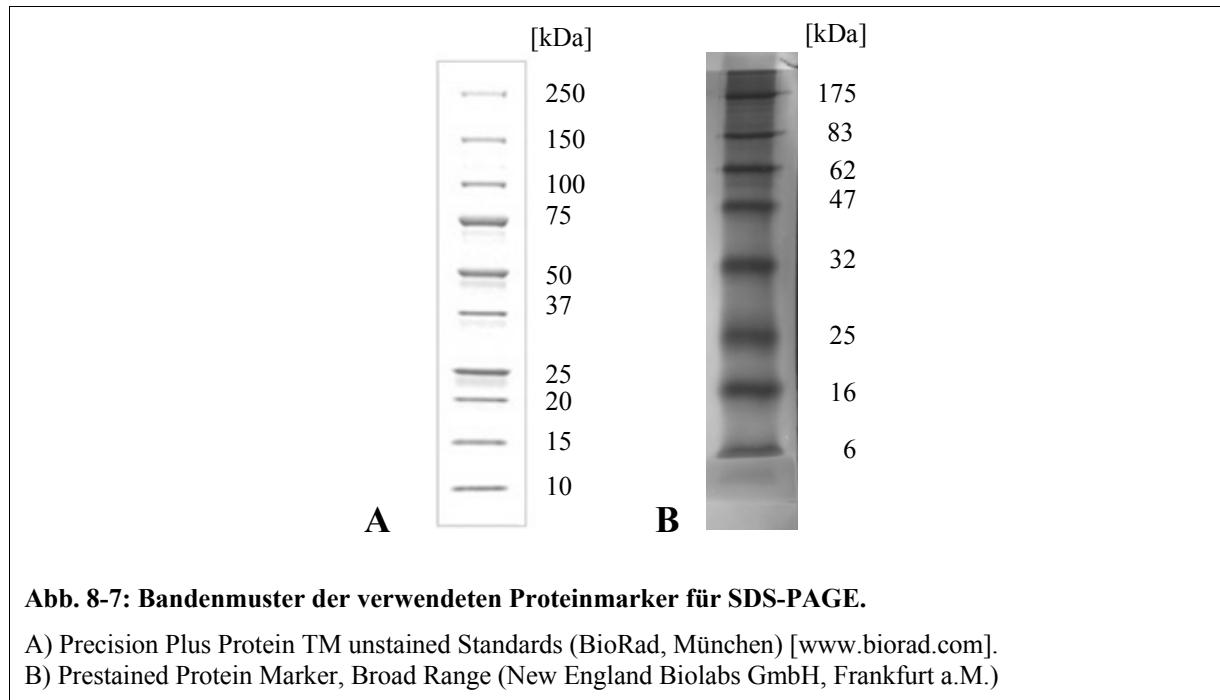
Size d.nm	Mean Volume %	Std Dev Volume %	Size d.nm	Mean Volume %	Std Dev Volume %	Size d.nm	Mean Volume %	Std Dev Volume %	Size d.nm	Mean Volume %	Std Dev Volume %
0.400	0.0		5.61	20.5		78.8	0.0		1110	0.0	
0.463	0.0		6.50	14.9		91.3	0.0		1280	0.0	
0.536	0.0		7.53	8.9		106	0.0		1480	0.0	
0.621	0.0		8.72	4.3		122	0.0		1720	0.0	
0.719	0.0		10.1	1.7		142	0.0		1990	0.0	
0.833	0.0		11.7	0.4		164	0.0		2300	0.0	
0.965	0.0		13.5	0.1		190	0.0		2670	0.0	
1.12	0.0		15.7	0.0		220	0.0		3090	0.0	
1.29	0.0		18.2	0.0		255	0.0		3580	0.0	
1.50	0.0		21.0	0.0		295	0.0		4150	0.0	
1.74	0.0		24.4	0.0		342	0.0		4800	0.0	
2.01	0.0		28.2	0.0		396	0.0		5560	0.0	
2.33	0.0		32.7	0.0		459	0.0		6440	0.0	
2.70	0.0		37.8	0.0		531	0.0		7460	0.0	
3.12	1.7		43.8	0.0		615	0.0		8630	0.0	
3.62	8.1		50.7	0.0		712	0.0		1.00e4	0.0	
4.19	17.1		58.8	0.0		825	0.0				
4.85	22.1		68.1	0.0		955	0.0				



8.5 Verwendete Markerproteine/ Proteinstandards

8.5.1 SDS-PAGE

Für SDS-Gele wurden folgende zwei Proteinmarker entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt (Abb. 8-7).



8.5.2 Native PAGE

Für native Gele wurden drei unterschiedliche Hämocyane aus unserem Institutsbestand verwendet. Der „*Eurypelma*-Marker“ bestand aus frisch gezapfter Hämolymphe von *Eurypelma californicum*, die für 10 Min. bei 22000g abzentrifugiert, 1:10 mit Dissoziationspuffer D versetzt und für sieben Tage bei 4°C inkubiert wurde. Abschließend wurde das Dissoziat im Verhältnis 3:4 mit nativem Probenpuffer versetzt.

Der „*Palinurus*-Marker“ bestand aus andissoziiertem Hämocyanin von *Palinurus elephas*. Hierzu wurde das 6-mere Hämocyanin mit Dissoziationspuffer D versetzt und für mindestens sieben Tage bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde das Dissoziat im Verhältnis 3:4 mit nativem Probenpuffer versetzt.

Der „*Astacus*-Marker“ bestand aus einem andissoziierten Gemisch aus 12-merem und 6-merem Hämocyanin aus *Astacus astacus* und wurde wie die übrigen Hämocyanin-Marker hergestellt.

Das aufgetragene Markervolumen wurde je nach Hämolymphe- bzw. Hämocyanincharge angepasst. Je nach Lagerungsdauer andissoziierten Referenz-Hämocyane veränderten sich untereinander die Bandenverhältnisse. Die jeweiligen optimalen Laufprofile sind in Abb. 8-8 dargestellt.

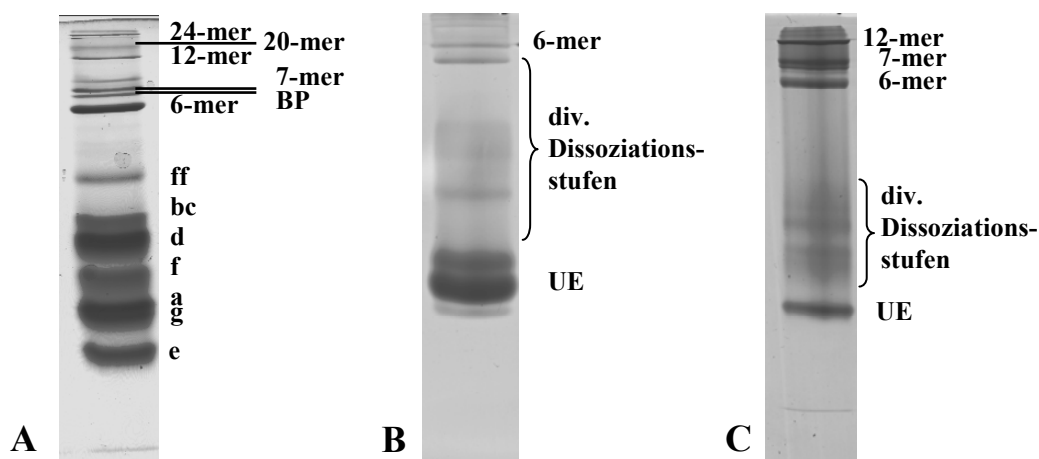


Abb. 8-8: Bandenmuster der Referenz-Hämocyane auf 7.5%iger nativer PAGE. Der Trenngelpuffer hatte einen pH von 8.8. Die Banden wurden mit der Coomassie-Färbung angefärbt.

A) andissoziierte *Eurypelma californicum* Hämolymphe („*Eurypelma*-Marker“)

B) andissoziiertes *Palinurus elephas* Hämocyanin („*Palinurus* Marker“ oder Hc *P.e.*)

C) andissoziiertes *Astacus astacus* Hämocyanin („*Astacus*-Marker“ oder Hc *A.a.*)

8.5.3 IEF

Für die isoelektrische Fokussierung wurde der SERVA Liquid Mix IEF Proteinstandard 3-10 (SERVA, Heidelberg) entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Abb. 8-9).

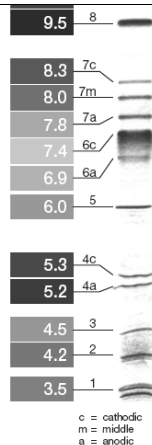


Abb. 8-9: SERVA Liquid Mix IEF Proteinstandard 3-10 (SERVA, Heidelberg) [235].

8.6 Färbungen

Für alle Proteinfärbungen wurden die Gele mäßig mit Hilfe eines Schüttlers bewegt.

8.6.1 Silberfärbung

Inkubationsdauer Minigel	Lösung	Zusammensetzung
mind. 5 Min. (auch über Nacht möglich)	Fixierlösung	120 ml Aceton, 3.0 g Trichlor-essigsäure, 36 µl Formaldehyd, 120 ml H ₂ O
3 x 5 sek	Wasser	
5 Min.	Wasser	
5 Min.	Aceton-Lösung	120 ml Aceton, 120 ml Wasser
1 Min.	Enhancer	40 mg Natriumthiosulfatpentahydrat
3 x 5 sek	Wasser	
8 Min.	Färbelösung (immer frisch ansetzen)	0.16 mg Silbernitrat, 222 µl Formaldehyd, 60 ml H ₂ O
2 x 5 sek	Wasser	
bis Banden sichtbar	Entwickler	4.8 mg Natriumcarbonat, 36 µl Formaldehyd, 10 mg Natriumthiosulfatpentahydrat, 240 ml H ₂ O
mind. 5 Min.	Stopp-Lösung	2.4 ml Essigsäure, 237.6 ml H ₂ O

Tabelle 8-2: Ablauf der Silberfärbung nach Nesterenko mit Modifikation einiger Inkubationsschritte [240].

8.6.2 Zinkfärbung

Inkubationsdauer Minigel	Lösung	Zusammensetzung
30-60 sek.	Waschen	Wasser
5-15 Min.		200 mM Imidazol, 0.1% (w/v) SDS
15-60 sek, bis Hintergrund weiß	Färben	200 mM Zinksulfat
3x 5 sek	Waschen	Wasser

Tabelle 8-3: Ablauf der Zinkfärbung nach 243.

8.6.3 Coomassie-Färbung

Zeit	Lösung	Zusammensetzung
mind. 20 Min.	Färbelösung	2 g Coomassie R 250, 500 ml Methanol, 400 ml H ₂ O, 100 ml Essigsäure
kurz schwenken	Wasser	
Gel beobachten	Entfärberlösung	800 ml Methanol, 200 ml Essigsäure, 1000 ml H ₂ O

Tabelle 8-4: Durchführung der Coomassie-Färbung.

8.6.4 SERVA Violet 17-Färbung

Zeit	Lösung	Zusammensetzung
20 Min.	Fixierlösung	20% (w/v) Trichloressigsäure
1 Min.	Wasser	
10 Min.	Färbelösung: 100 ml Stammlösung 1 und 100 ml Stammlösung 2 direkt vor Gebrauch mischen	Stammlösung 1: 500 mg SERVA Violet 17 Pulver in 250 ml H ₂ O Stammlösung 2: 20% (w/v) Phosphorsäure
10 Min. (bis Hinter- grund klar ist)	Entfärberlösung	3 % (w/v) Phosphorsäure
2 x 5 Min.	Wasser	
Gel beobachten	Im warmen Luftstrom oder bei Raumtemperatur trocknen	

Tabelle 8-5: Durchführung der SERVA-Violet 17-Färbung [235].

8.6.5 Aktivitätsfärbung

Zeit	Lösung	Zusammensetzung
mind. 15 Min.	Waschpuffer	Phosphatpuffer A
mind. 30 Min. für Dopamin-Färbung	Färbelösung	Phosphatpuffer A, 1 mM Dopamin, 0.3 mM MBTH in H ₂ O

Tabelle 8-6: Aktivitätsfärbung in der nativen PAGE in Anlehnung an Nellaiappan [244].

8.7 Antikörperchargen

Alle Antikörper wurden in Kaninchen gezogen und von der Firma Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld) bezogen.

AK-Name	Antigen	Zuchttier	Datum
anti-Per a 3.03-AK	Per a 3.03 aus <i>Periplaneta americana</i>	Kaninchen	2005
anti-P II-AK	P II aus <i>Periplaneta americana</i>	Kaninchen	1999
anti- <i>P.a.</i> HL-AK	Unbehandelte Hämolymphe aus <i>Periplaneta americana</i>	Kaninchen	1999

Tabelle 8-7: Verwendete Antikörper.

8.8 Aufreinigungsprotokolle

8.8.1 Protokoll 1: Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX)

Säule: Bio-Scale Q2-Säule (BioRad, München)

Temperatur: 4°C

Probenvolumen: 1 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	3.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer A	1.0
3.0		UV-Baseline		
3.0	1.5	Probeninjektion	100% Schabenpuffer A	1.0
4.5	10.0	Isocratic flow	100% Schabenpuffer A	1.0
14.5	25.0	Linearer Gradient	0-45% Elutions-schabenpuffer A	1.0
39.5	6.0	Isocratic flow	100% Elutions-schabenpuffer A	1.0
45.5	6.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer A	1.0
51.5	Protokollende			
1.0-40.0	Proteinfraktionierung à 1 ml			

Tabelle 8-8: Reinigungsprotokoll: IEX, Bio-Scale Q2, linearer Gradient.

8.8.2 Protokoll 1: Größenausschlusschromatographie (SEC)

Säule: S-300 (16/60, Pharmacia, Erlangen)

Temperatur: 4°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	1.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer C	0.5
1.0		UV-Baseline		0.5
1.0	3.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer C	0.5
4.0	130.0	Elution	100% Schabenpuffer C	0.5
134.0	Protokollende			
36.0-120.0	Proteinfraktionierung à 3 ml			

Tabelle 8-9: Reinigungsprotokoll: SEC, S 300 (16/60).

8.8.3 Protokoll 2: IEX

Säule: Uno Q12 (BioRad, München)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	11.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer B	3.0
11.0	1.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer B	1.0
12.0		UV-Baseline		
12.0	4.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer B	1.0
16.0	36.0	Isocratic flow	100% Schabenpuffer B	1.0
52.0	24.0	Linearer Gradient	0-8% Elutions-schabenpuffer B	1.0
76.0	24.0	Isocratic flow	92% Schabenpuffer B 8% Elutionsschabenpuffer B	1.0
100.0	24.0	Linearer Gradient	8-15% Elutionsschabenpuffer B	1.0
124.0	24.0	Isocratic flow	85% Schabenpuffer B 15% Elutionsschabenpuffer B	1.0
148.0	24.0	Linearer Gradient	15-50% Elutionsschabenpuffer B	1.0
178.0	30.0	Isocratic Flow	100% Elutionsschabenpuffer B	5.0
208.0	60.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer B	5.0
268.0	Protokollende			
13.0-201.0	Proteinfraktionierung à 3 ml			

Tabelle 8-10: Reinigungsprotokoll: IEX, UnoQ-12, Stufengradient.

8.8.4 Protokoll 2: SEC

Säule: S-300 (16/60, Pharmacia, Erlangen)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	1.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer D	0.5
1.0		UV-Baseline		
1.0	4.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer D	0.5
5.0	160.0	Proteinelution	100% Schabenpuffer D	0.5
165.0	Protokollende			
36.0-156.0	Proteinfraktionierung à 3 ml			

Tabelle 8-11: Reinigungsprotokoll: SEC, S-300 (16/60).

8.8.5 Protokoll 3: IEX

Säule: Uno Q12 (BioRad, München)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	12.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer B	1.0
12.0		UV-Baseline		
12.0	6.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer B	1.0
18.0	36.0	Isocratic flow	100% Schabenpuffer B	1.0
54.0	150.0	Linearer Gradient	0-20% Elutionsschabenpuffer B	1.0
204.0	24.0	Linearer Gradient	20-100% Elutionsschabenpuffer B	1.0
228.0	30.0	Isocratic flow	100% Elutionsschabenpuffer B	5.0
258.0	60.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer	5.0
318.0	Protokollende			
16.5-290.0	Proteinfraktionierung à 5 ml			

Tabelle 8-12: Reinigungsprotokoll: IEX, Uno Q12, linearer Gradient.

8.8.6 Protokoll 3: SEC

Säule: S-300 (26/60, Pharmacia, Erlangen)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	1.3	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer D	1.3
1.3		UV-Baseline		
1.3	4.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer D	1.3
5.3	640.0	Proteinelution	100% Schabenpuffer D	1.3
645.3	Protokollende			
150.0-645.3	Proteinfraktionierung à 4 ml			

Tabelle 8-13: Reinigungsprotokoll: SEC, S-300 26/60 für Peak 2-Probe.

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/ Min.]
0.0	1.3	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer D	1.3
1.3		UV-Baseline		
1.3	4.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer D	1.3
5.3	640.0	Proteinelution	100% Schabenpuffer D	1.3
645.3	Protokollende			
78.0-550.0	Proteinfraktionierung à 4 ml			

Tabelle 8-14: Reinigungsprotokoll: SEC, S-300 26/60 für Peak 3-Probe.

8.8.7 Größenausschlusschromatographie der Extrakte

Säule: S-300 (16/60, Pharmacia, Erlangen)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 2 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	2.0	Säulenäquilibration	100% Schabenpuffer D	0.5
2.0	4.0	Probeninjektion	100% Schabenpuffer D	0.5
6.0	294.0	Proteinelution	100% Schabenpuffer D	0.5
300.0	Protokollende			
20.0-300.0	Proteinfraktionierung à 3 ml			

Tabelle 8-15: Reinigungsprotokoll: SEC, S-300 16/60 für Extrakte.

8.8.8 Größenausschlusschromatographie des P II-Dissoziats

Säule: S-200 (16/60, Pharmacia, Erlangen)

Temperatur: 20°C

Probenvolumen: 5 ml

Gesamt-Volumen [ml]	Volumen [ml]		Lösung	Flussrate [ml/Min.]
0.0	2.0	Säulenäquilibration	Dissoziationspuffer B	0.5
2.0		UV Baseline		
2.0	10.0	Probeninjektion	Dissoziationspuffer B	0.5
12.0	135.0	Proteinelution	Dissoziationspuffer B	0.5
147.0	Protokollende			
20.0-147.0	Proteinfraktionierung à 1ml			

Tabelle 8-16: Reinigungsprotokoll: SEC, S-200 16/60 für P II-Dissoziat.

8.9 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen und Beiträge

8.9.1 Publikation

Bellinghausen, I; Häringer, B.; Lafargue, B.; Strand, D.; König, B.; Decker, H.; Saloga, J.: Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 3, 539-548

8.9.2 Kongressbeiträge

Lafargue, B., Jaenicke, E., Decker, H.: Structure and function of Per a 3-allergen from the cockroach *Periplaneta americana*. *XIII international Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins (IO2BiP)*, Mainz, 07.09.2003- 12.09.2003. Abstract und Poster

Lafargue, B., Jaenicke, E., Schweikardt, T., Decker, H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach; *97.Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, Rostock 31.05.2004-04.06.2004. Abstract und Poster

Lafargue, B., Jaenicke, E., Schweikardt, T., Decker, H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach.; *International Symposium on Animal Physiology: Proteins in Adaptation and Evolution*, Greifswald 03.06.2004- 05.06.2004. Abstract und Poster

Lafargue, B., Jaenicke, E., Cirak, S., Schweikardt, T., Decker, H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach. *17. Mainzer Allergie-Workshop*, Mainz, 11.05.2005- 12.05.2005. Poster

Lafargue, B., Jaenicke, E., Schweikardt, T., Decker, H.: Characterization of allergenic epitopes of Per a 3-allergens of the American cockroach *Periplaneta americana*. *19. World Allergy Organization Congress*, München, 26.06.2005-01.07.2005. Abstract und Poster

Lafargue, B., Decker, H.: Identifizierung und physiko-chemische Charakterisierung allergener Proteine aus dem Crude-Extrakt sowie der Hämolymphe der Amerikanischen Schabe. *18. Mainzer Allergie-Workshop*, Mainz, 10.03.2006-11.03.2006. Abstract und Vortrag

Beusch, A., Lafargue, B., Decker, H.: Physikochemische Charakterisierung eines neuen potentiellen Allergens Bla g 3 aus der Deutschen Schabe *Blattella germanica*. *18. Mainzer Allergie-Workshop*, Mainz, 10.03.2006-11.03.2006. Abstract und Poster

Lafargue, B., Decker, H.: Per a 3 - a specific sensor for the cockroach allergy to *Periplaneta americana*? *25. Kongress der European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, Wien, Österreich, 10.06.2006-14.06.2006. Abstract und Poster

Lafargue, B., Schweikardt, T., Decker, H.: Identification and localization of antigenic and allergenic epitopes of Per a 3, a major allergen of the American cockroach. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik*, Mainz, 24.06.2006-27.06.2006. Abstract und Poster

Beusch, A., Lafargue, B., Decker, H.: Physicochemical comparison of the allergen Per a 3 from *Periplaneta americana* with its cross-reactive protein Bla Hx from *Blattella germanica*. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik*, Mainz, 24.06.2006-27.06.2006. Abstract und Poster

Bellinghausen, I., Häringer, B., Lafargue, B., König, B., Decker, H., Knop, J., Saloga, J.: Study of the immunogenicity and allergenicity of the cockroach allergen Per a 3 with special regard to its quaternary hexameric structure. *24. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Forschung*, Freiburg, 08.03.-10.03.2007. Abstract und Vortrag

Bellinghausen, I., Häringer, B., Lafargue, B., König, B., Decker, H., Knop, J., Saloga, J.: Analyse der Immunogenität und Allergenität des Schabenmajorallergens Per a 3 unter besonderer Berücksichtigung seiner hexameren Quartärstruktur. 19. *Mainzer Allergie-Workshop*, Mainz, 16.03.2007-17.03.2007. Abstract und Vortrag

Lafargue, B., Schweikardt, T., Decker, H: Identification and localization of antigenic and allergenic epitopes of Per a 3, a major allergen of the American cockroach. 19. *Mainzer Allergie-Workshop*, Mainz, 16.03.2007-17.03.2007. Abstract und Poster

Bellinghausen, I., Häringer, B., Lafargue, B., König, B., Decker, H., Knop, J., Saloga, J.: Comparison of the immunogenicity and allergenicity of the monomeric and hexameric structure of the cockroach major allergen Per a 3. 26. *Kongress der European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, Göteborg, Schweden, 09.06.2007-13.06.2007. Abstract und Vortrag

Lafargue, B., Tenzer, T.; Schild, H.; Decker, H: Biophysical characterization of arginine kinase (Per a 9), a new pan-allergen of the American cockroach. 26. *Kongress der European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, Göteborg, Schweden, 09.06.2007-13.06.2007. Abstract und Poster