

# **Molekulare Grundlagen der Erdnussallergie:**

**Rekombinante Darstellung, biochemische und biophysikalische  
Charakterisierung und Struktur der Erdnussallergene Ara h 2  
und Ara h 6**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Biologie, Chemie und  
Geowissenschaften der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

**Katrin Lehmann**

aus Annaberg-Buchholz

Bayreuth, 2003



Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2000 bis Juli 2003 am Lehrstuhl Biopolymere unter Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Promotionsgesuch eingereicht am	08.07.2003
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums	13.11.2003
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Paul Rösch
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Ortwin Meyer



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Prävalenz allergischer Erkrankungen.....	1
1.2 Molekulare Mechanismen der allergischen Reaktion.....	1
1.3 Allergene – Initiatoren der allergischen Reaktion.....	4
1.4 Nahrungsmittelallergien.....	6
1.4.1 Allgemeine Eigenschaften.....	6
1.4.2 Allergene aus Nahrungsmitteln.....	6
1.4.3 Kreuzallergien .....	7
1.4.3.1 Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien.....	8
1.4.3.2 Pollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien.....	8
1.4.3.3 Kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten.....	9
1.4.4 2S Albumine – Panallergene in Pflanzensamen.....	10
1.5 Die Erdnussallergie.....	12
1.5.1 Allergenspektrum der Erdnuss.....	12
1.5.1.1 Das Vicilin Ara h 1.....	13
1.5.1.2 Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 – 2S Albumine der Erdnuss .....	14
1.5.1.3 Das Glycinin Ara h 3.....	15
1.5.1.4 Sonstige Erdnussallergene.....	16
1.5.2 Kreuzreaktivität.....	16
1.5.3 Therapiemöglichkeiten .....	17
1.6 Strukturelle Eigenschaften von Allergenen.....	18
1.6.1 Primärstruktur und posttranslationale Modifikationen.....	19
1.6.2 Dreidimensionale Allergenstrukturen.....	19
<b>2 Ziele.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Materialien und Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.1 Geräte und Chemikalien.....	26
3.2 Bakterienstämme.....	29
3.3 Plasmide.....	30
3.4 Nukleotide und Oligonukleotide.....	30
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	31
3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	31
3.5.2 Reinigung und Fällung von DNA.....	32
3.5.2.1 Butanolfällung.....	32
3.5.2.2 Reinigung von DNA über Silikagelmembranen.....	32
3.5.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
3.5.3 Modifikation von DNA.....	32
3.5.3.1 Restriktion.....	32
3.5.3.2 Dephosphorylierung von 5'-überhängenden Enden.....	33
3.5.3.3 Ligation.....	33
3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.5.4.1 PCR mit Linker-Primern.....	34
3.5.4.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Landt.....	34
3.5.4.3 Kolonie-PCR.....	35
3.5.4.4 DNA-Sequenzierung.....	35
3.5.5 Transformation von Bakterien.....	36
3.5.5.1 CaCl <sub>2</sub> -Transformation.....	36
3.5.5.2 Elektrottransformation (Elektroporation).....	36

3.6 Mikrobiologische und präparative Arbeitsmethoden.....	37
3.6.1 Kultivierung von Biomasse.....	37
3.6.1.1 Kulturmedien.....	37
3.6.1.2 Herstellung von Dauerkulturen.....	38
3.6.1.3 Kultivierung.....	38
3.6.2 Herstellung zellfreier Extrakte.....	39
3.6.2.1 Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
3.6.2.2 Herstellung von Erdnussextrakten.....	40
3.6.3 Proteinreinigung.....	40
3.6.3.1 Metallionen-Affinitätschromatographie an TALON-Superflow.....	40
3.6.3.2 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.....	41
3.6.3.3 Größenausschlusschromatographie.....	41
3.6.3.4 Umkehrphasenchromatographie.....	42
3.6.4 Proteolytische Reaktionen.....	42
3.7 Analytische Methoden.....	43
3.7.1 Elektrophoresen.....	43
3.7.1.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	43
3.7.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.7.2 Western-Blotting .....	44
3.7.2.1 Proteintransfer.....	44
3.7.2.2 Immundetektion.....	45
3.7.3 Aminoternale Ansequenzierung.....	46
3.7.4 Massenspektrometrie.....	46
3.7.5 Nachweis freier SH-Gruppen.....	47
3.7.6 Deglykosylierungsreaktionen.....	47
3.8 Spektroskopische Verfahren.....	47
3.8.1 UV/VIS-Spektroskopie.....	47
3.8.1.1 Absorptionsmessungen.....	47
3.8.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte.....	48
3.8.1.3 Quantitative Proteinbestimmung.....	48
3.8.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	49
3.8.2 Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie.....	49
3.9 NMR-Spektroskopie.....	50
3.9.1 Probenvorbereitung.....	50
3.9.2 Geräte und Messbedingungen.....	50
3.9.3 Prozessierung der NMR-Spektren.....	53
3.9.4 Auswertung der NMR Daten.....	53
3.9.4.1 Zuordnung der Resonanzen.....	53
3.9.4.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart.....	55
3.9.4.3 Bestimmung von Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen.....	55
3.9.4.4 Beschränkung der Diederwinkel durch J-Kopplungskonstanten.....	56
3.9.5 Strukturberechnung.....	56
3.9.6 Strukturanalyse.....	58
3.10 Erstellen des Strukturmodells von Ara h 2.....	58

## **4 Ergebnisse.....59**

4.1 Reinigung und Charakterisierung von nAra h 2 aus Erdnuss.....	59
4.1.1 Extraktion und Reinigung von Ara h 2.....	59
4.1.1.1 Optimierung der Extraktionsbedingungen.....	59
4.1.1.2 Reinigung von nAra h 2 aus Erdnussextrakt .....	60
4.1.2 Biochemische Charakterisierung von nAra h 2.....	64
4.1.2.1 Aminoternale Ansequenzierung von Erdnussproteinen.....	64
4.1.2.2 Nachweis der Identität von nAra h 2 als Protein ohne Kohlenhydratanteil....	68

4.1.2.3 IgE-Bindung von nAra h 2.....	70
4.1.3 Strukturelle Untersuchungen von nAra h 2 aus Erdnuss.....	71
4.2 Heterologe Darstellung und Charakterisierung von Ara h 2.....	72
4.2.1 Klonierung verschiedener Ara h 2-Expressionssysteme .....	73
4.2.1.1 Umwandlung von Ara h 2.02 zu Ara h 2.....	74
4.2.1.2 Konstruktion des Anhang-freien Ara h 2-Expressionssystems.....	77
4.2.1.3 Konstruktion der Thioredoxin-Ara h 2-Expressionssysteme.....	78
4.2.2 Expression und Reinigung von Ara h 2.....	79
4.2.2.1 Optimierung der Expressionsrate und Aufschlusseffektivität.....	79
4.2.2.2 Spaltung von Thioredoxin-Ara h 2-Fusionsprotein durch Proteasen.....	82
4.2.2.3 Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von rAra h 2 .....	84
4.3 Vergleichende Untersuchungen von heterolog exprimiertem und natürlichem Ara h 2 .....	87
4.3.1 Immunologische Eigenschaften.....	87
4.3.2 Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen.....	88
4.3.3 Disulfidverbrückung.....	90
4.4 NMR-Spektroskopie an rAra h 2.....	93
4.5 Heterologe Darstellung und Charakterisierung von Ara h 6.....	95
4.5.1 Konstruktion des Thioredoxin-Ara h 6-Expressionssystems.....	96
4.5.2 Bakterielle Expression und Reinigung von Ara h 6.....	96
4.5.3 NMR-Spektroskopie an heterologem Ara h 6.....	99
4.6 Untersuchungen zur Stabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6.....	100
4.6.1 Thermische Stabilität der Erdnussallergene Ara h 6 und Ara h 2.....	101
4.6.2 Proteasestabilität.....	103
4.6.2.1 Nachweis von proteaseresistenten Proteinregionen.....	103
4.6.2.2 Charakterisierung der Primärstruktur der proteaseresistenten Ara h 2- und Ara h 6 Fragmente.....	106
4.6.2.3 Präparation von tryptisch und chymotryptisch verdautem Ara h 2 und Ara h 6 für NMR-spektroskopische Untersuchungen.....	109
4.6.2.4 Immunologische Eigenschaften von prAra h 2 und prAra h 6.....	112
4.6.2.5 NMR spektroskopische Charakterisierung der proteaseresistenten Fragmente prAra h 2 und prAra h 6.....	113
4.7 Strukturbestimmung von prAra h 6.....	117
4.7.1 NMR-Probe.....	117
4.7.2 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen.....	117
4.7.2.1 Die Identifizierung von Spinsystemen.....	118
4.7.2.2 Aliphatische Seitenketten.....	122
4.7.3 Analyse der Sekundärstruktur auf Grundlage der chemischen Verschiebungen..	126
4.7.4 Experimentelle Strukturinformation.....	127
4.7.4.1 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J_{\text{HN H}\alpha}$ Kopplungskonstanten....	127
4.7.4.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken.....	128
4.7.4.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen.....	128
4.7.5 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE - Nachweis flexibler Proteinbereiche.....	131
4.7.6 Das Muster der Disulfidverbrückung von Ara h 6.....	134
4.7.7 Berechnung der Tertiärstruktur.....	135
4.8 Die Homologie basierte Modellierung der Ara h 2 Tertiärstruktur.....	140
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>141</b>
5.1 Eigenschaften des natürlichen Ara h 2 - einem Hauptallergen der Erdnuss .....	141
5.2 Ein <i>E. coli</i> basiertes Protokoll zur rekombinanten Darstellung der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 für strukturbiologische Untersuchungen.....	145
5.3 Molekulare Stabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6.....	149
5.4 Die dreidimensionale Struktur eines Erdnussallergens vom 2S Albumintyp.....	154

5.4.1 Die Eignung von Ara h 2, Ara h 6 und ihrer prozessierten Varianten für die NMR basierte Strukturaufklärung.....	154
5.4.2 Die Struktur von prAra h 6.....	156
5.5 Epitope - konformationell oder linear?.....	157
5.6 Ara h 6 im Vergleich mit verwandten Proteinstrukturen.....	159
5.7 Struktur-Funktions Beziehungen.....	164
5.8 Die dreidimensionale Struktur - eine Determinante für Allergenizität?.....	165
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>167</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>170</b>
<b>8 Abkürzungen.....</b>	<b>173</b>
<b>9 Literatur.....</b>	<b>175</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>203</b>
10.1 Nukleinsäuresequenzen.....	203
10.2 Chemische Verschiebungen.....	208
10.3 Experimentelle Randbedingungen.....	215
10.3.1 Abstandsbeschränkungen aus NOESY Spektren.....	215
10.3.2 Beschränkung der Diederwinkel aus J-Kopplungskonstanten.....	222
10.3.3 Abstandsbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken.....	223
10.4 X-PLOR Protokolle.....	224

# 1 Einleitung

## 1.1 Prävalenz allergischer Erkrankungen

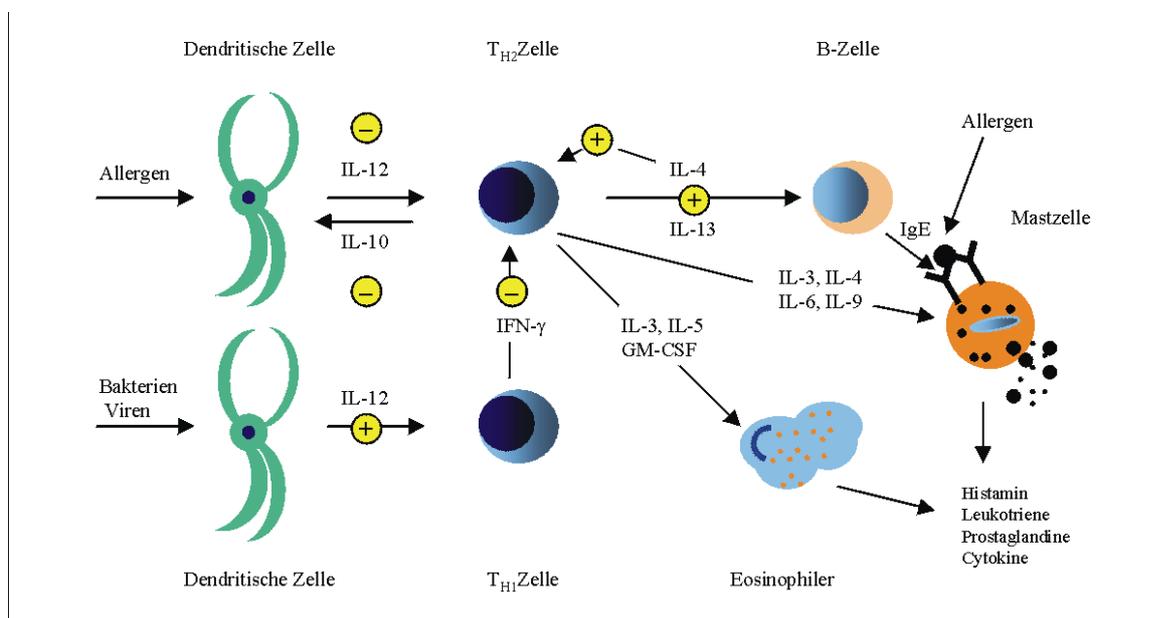
Atopische Erkrankungen wie Asthma, Rhinitis, Ekzeme und Nahrungsmittelallergien sind in den letzten Jahrzehnten verstärkt in das Bewusstsein der Öffentlichkeit getreten. Während der vergangenen drei Jahrzehnte kam es zu einer beträchtlichen Zunahme der Prävalenz dieser Erkrankungen in den Industrienationen. Heute gehören sie international zu den häufigsten chronischen Gesundheitsstörungen und sind damit zu einem beträchtlichen ökonomischen Problem geworden. Nach epidemiologischen Studien leidet in Ländern wie Großbritannien und Australien eins von vier Kindern unter 14 Jahren an Asthma und eins von fünf an Ekzemen (Beasley *et al.* 1998). Es wird geschätzt, dass rund die Hälfte der westlichen Bevölkerung eine Sensibilisierung zu einem oder mehreren Allergenen aufweist (Holgate 1999). Als Ursachen für die stark unterschiedliche Prävalenz von Allergien in den Industrienationen und in Entwicklungsländern werden verschiedene Faktoren diskutiert. Neben Umweltfaktoren wie einer erhöhten Allergenexposition, Umweltverschmutzung und Veränderungen in den Ernährungsgewohnheiten (von Mutius *et al.* 1994, Bodner *et al.* 1998, Krämer *et al.* 1998, Ball *et al.* 2000) scheint die Abnahme von Infektionen im Kindesalter und die damit verringerte Stimulierung des Immunsystems mit der Zunahme von atopischen Erkrankung zu korrelieren (Holt 1996, Matricardi *et al.* 1997, Matricardi *et al.* 2000).

## 1.2 Molekulare Mechanismen der allergischen Reaktion

Der Begriff „Allergie“ wurde von Clemens Pirquet 1906 als Beschreibung für eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus eingeführt. Heute versteht man unter einer Allergie eine Überempfindlichkeitsreaktion des Organismus, welche mit der Überproduktion bestimmter Antikörper wie Immunglobulin E einhergeht. Die Pathomechanismen von Allergien werden nach Coombs und Gell in folgende vier Typen eingeteilt: die IgE vermittelte Soforttypreaktionen (Typ I), die cytotoxischen Reaktionen (Typ II), die Immunkomplexreaktionen (Typ III) sowie die zellvermittelten Spättypreaktionen (Typ IV) (Mygind 2000). Bei Nahrungsmittelallergien ist ausschließlich der IgE vermittelte Soforttyp (Typ I) eindeutig gesichert (Bruijnzeel-Koomen *et al.* 1995). Die Symptome einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I reichen von milden Beschwerden wie

Hautausschlag (Urtikaria), Niesen, Hypersekretion der Nase, Nasenpolypen, Juckreiz über Asthma bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen im Fall eines anaphylaktischen Schocks. Obwohl all diese Symptome eindeutig mit einem Krankheitsgeschehen assoziiert werden können, leiten sie sich von Mechanismen ab, die ursprünglich eine Schutzfunktion für den Organismus darstellten. So dient die IgE-vermittelte Immunantwort der Abwehr von unreifen Parasiten wie beispielsweise *Schistosomula* oder kann eine Gewebsverletzung durch adulte Formen limitieren (Gounni *et al.* 1994, Jankovic *et al.* 1996).

Eine allergische Reaktion ist durch eine Polarisierung der T-Lymphozytenantwort und durch eine verstärkte Sekretion bestimmter Zytokine, welche an der Regulation der Immunglobulin E-(IgE)-Produktion beteiligt sind, gekennzeichnet (Abb. 1.1). Die Kommunikation zwischen Allergen und T-Zellen wird über antigenpräsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen realisiert. Antigenpräsentierende Zellen internalisieren Allergenmoleküle und präsentieren diese auf ihrer Oberfläche im Komplex mit Klasse-II-Haupthistokompatibilitäts-Komplex-(MHC-Klasse-II)-Molekülen den CD4+-T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen).



**Abb. 1.1: Postulierte zelluläre und molekulare Mechanismen der allergischen Reaktion.**

Die Differenzierung des  $T_{H2}$  Phänotyps und die damit verbundene Sekretion von Typ 2 Zytokinen wird durch lösliche Mediatoren und Wechselwirkungen zwischen dendritischen Zellen und naiven CD4+-T-Zellen vermittelt. Die  $T_{H2}$  Polarisation kann effektiv durch den Ablauf des  $T_{H1}$  Weges und der damit verbundenen IFN- $\gamma$ -Produktion unterdrückt werden. Der Kontakt des kindlichen Organismus zu Bakterien und Viren scheint den  $T_{H1}$  Weg auf Kosten der  $T_{H2}$  Polarisation zu verstärken und damit vor Allergien zu schützen (Holgate 1999).

T-Helferzellen werden entsprechend ihres divergenten Zytokinmusters in 2 Subtypen untergliedert. T<sub>H1</sub>-Zellen sekretieren Interleukin (IL)-2, Interferon (INF)- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Lymphotoxin (LT) und andere Zytokine. T<sub>H2</sub>-Zellen weisen ein separates und funktionell völlig verschiedenes Zytokinrepertoire auf, welches IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 beinhaltet. Typ 1 Zytokine koordinieren die Mechanismen der humoralen und zellvermittelten Immunität gegen intrazelluläre Pathogene. Typ 2 Zytokine vermitteln Immunität gegen große extrazelluläre Pathogene wie beispielsweise Helminthen (Locksley 1994). Allergenspezifische T-Zellen zeigen nach Aktivierung ebenfalls ein Zytokinmuster vom Typ 2 (Wierenga *et al.* 1990, Kapsenberg *et al.* 1991, Parronchi *et al.* 1991). Dementsprechend sind T<sub>H2</sub>-Zellen direkt in die Entwicklung einer allergischen Reaktion involviert. Neben der Aktivierung der IgE-Synthese sind sie in die Initiation und die Aufrechterhaltung allergischer Entzündungsprozesse einbezogen. IL-4 ist der bedeutendste Mediator für die IgE-Synthese (Finkelman *et al.* 1988, Pene *et al.* 1988). Humane und murine B-Zellen synthetisieren IgE-Antikörper ebenso nach einem IL-13-Signal (Minty *et al.* 1993, Punnonen *et al.* 1993, Emson *et al.* 1998). Die Bindung dieser Zytokine an ihre entsprechenden Rezeptoren setzt eine Signalkaskade in Gang, welche letztlich über die Translokation von STAT6 zum Zellkern zur Initiation der Transkription der IgE-VorläufermRNA und damit zum Klassenwechsel in Richtung IgE-Antikörper führt (Hou *et al.* 1994). Die Bindung des CD40-Antigens, einem Oberflächenrezeptor der B-Zellen, an seinen Liganden (CD40L) auf der aktivierten T-Zelle stellt ein weiteres die IgE-Antwort verstärkend modulierendes Signal dar (Kawabe *et al.* 1994). Der nukleäre Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) scheint die CD40-abhängige Transkription der  $\epsilon$ -Ketten zu initiieren und wirkt damit synergistisch zu STAT6 (Iciek *et al.* 1997, Linehan *et al.* 1998, Warren *et al.* 1999). Mitglieder der C/EBP-Familie und das B-Zell-spezifische Aktivatorprotein (BSAP) wurden als weitere  $\epsilon$ -spezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben, ihre Relevanz *in vivo* ist jedoch nicht gesichert (Delphin & Stavnezer 1995, Qiu & Stavnezer 1998). Zusätzlich werden die Moleküle CD80 und CD86 (früher B7-1 und B7-2) auf der Oberfläche der B-Zelle exprimiert. Ihr Kontakt zu den CD28-Rezeptoren der T-Zelle stellt ein entscheidendes Signal für die Zytokinsekretion und das Überleben der T-Zellen dar, wobei CD86 insbesondere für die T<sub>H2</sub>-Entwicklung, die IgE-Produktion und dem damit verbundenen allergischen Geschehen eine besondere Rolle einzunehmen scheint (Schwartz 1992, Kuchroo *et al.* 1995, Keane-Myers *et al.* 1998). IgE-Antikörper binden an den hochaffinen Rezeptor IgE<sub>R1</sub>. Dieser wird besonders stark auf der Oberfläche der klassischen Effektorzellen der Anaphylaxis wie Mastzellen und Basophile exprimiert (Metzger 1992, Kinet 1999). Die Kreuzvernetzung der Rezeptoren

durch Antigen-Antikörperkontakte liefert schließlich das entscheidende Signal zur Initiierung einer Signalkaskade, an deren Ende die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine steht.

### 1.3 Allergene – Initiatoren der allergischen Reaktion

Der Begriff Allergen beschreibt Antigene, die eine allergische Reaktion initiieren und hervorrufen können. Allergie auslösende Proteine sind in einer großen Bandbreite von biologischen Materialien anzutreffen. Die vielfältigen Allergenquellen reichen von Pollen, Schimmelpilzen, Insekten, Säugetieren bis hin zu einer großen Palette von Nahrungsmitteln (Mygind *et al.* 2000). Entsprechend dem Aufnahmeweg in den Körper werden Allergie auslösende Proteine als Inhalations- und Nahrungsmittelallergene klassifiziert.

In den letzten Jahren fanden umfangreiche Bemühungen statt, Allergene aus den Extrakten der jeweiligen Allergie auslösenden Materialien zu reinigen und zu charakterisieren. Aus den umfangreichen Daten, die sich aus einer Anzahl von über 300 bekannten Allergenen (<http://www.allergen.org/List.htm>) ergeben, leiten sich mehrere für die Allergenizität eines Proteins relevante Faktoren ab. Dazu gehören zunächst Aspekte wie Löslichkeit und Größe, die die Abhängigkeit der Allergenizität vom Transport über mucosale Barrieren spiegeln oder auch Faktoren wie Stabilität und Kompaktheit, welche die Zugänglichkeit des Moleküls für proteolytische Enzyme beeinflussen (Aalberse 2000). Die Relevanz dieser Faktoren steht in enger Abhängigkeit mit den vornehmlichen Inkorporationsmechanismen. Aspekte wie posttranslationale Modifizierungen oder enzymatische Aktivität wurden zwar in einigen Fällen als Allergenizität verstärkende Prinzipien beschrieben, können aber nicht als zwingende Voraussetzung selbiger angesprochen werden (Bufe *et al.* 1998). Letztlich ist die Definition eines allgemein gültigen Prinzips als Voraussetzung für die Identität eines Proteins als Allergen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Es scheinen jedoch insbesondere strukturelle Charakteristika, die eng mit oben genannten Aspekten korrelieren, eine wichtige Rolle für die Kapazität eines fremden Proteins zur Modulation in Richtung allergischer Reaktion zu spielen.

Der Begriff Allergen wird zur Beschreibung mehrerer molekularer Eigenschaften verwendet. Dazu gehört die Fähigkeit zur Sensibilisierung (Induktion der IgE-Antikörper-Produktion), die Fähigkeit zur Ausbildung einer allergischen Reaktion im Sinne einer klinischen Symptomatik und die Fähigkeit zur Bindung von IgE-Antikörpern. Allergene wie Mal d 1 (Vanek-Krebitz *et al.* 1995) aus Apfel erfüllen diese Kriterien nur teilweise. Sie sind

zwar zur Aktivierung von Mastzellen befähigt, können jedoch keine IgE-Antikörper induzieren. Sie werden gelegentlich als nichtsensibilisierende oder unvollständige Allergene bezeichnet (Yagami *et al.* 2002). Allergene werden nach der Prävalenz von spezifischen IgE-Antikörper in Patientenseren untergliedert. Als Hauptallergene oder majore Allergene werden Proteine bezeichnet, gegen die IgE-Antikörper in über 50 % der Patientensera nachzuweisen sind, als minore Allergene oder Nebenallergene entsprechend Proteine, die von weniger als 50 % der Seren gebunden werden (Larsen & Lowenstein 1996).

Die Interaktion von Allergenen mit T-Helferzellen in Form von MHC-Klasse-II-Peptidkomplexen und mit IgE-Antikörpern verläuft über so genannte T- bzw. B-Zellepitope. Im Fall der B-Zellepitope sind lineare (kontinuierliche, sequenzielle) und konformationelle (diskontinuierliche) Epitope zu unterscheiden (Bredehorst *et al.* 2001). Lineare Epitope werden mittels synthetischer überlappender Peptide, welche die gesamte Aminosäuresequenz des Allergens repräsentierten, identifiziert (Becker & Reese 2001). Für eine Reihe von Allergenen wie beispielsweise aus Milch (Kahlert *et al.* 1992, Ball *et al.* 1994), Sojabohne (Herian *et al.* 1990, Helm *et al.* 2000), Shrimps (Shanti *et al.* 1993) oder Erdnüssen (Stanley *et al.* 1997, Burks *et al.* 1997, Shin *et al.* 1998, Rabjohn *et al.* 1999) wurden multiple lineare IgE Bindungsstellen identifiziert. Bisher konnten keine Indikationen für einen allgemeinen strukturellen Charakter linearer Epitope gefunden werden. Konformationelle Epitope werden aus unterschiedlichen Abschnitten der Aminosäuresequenz gebildet und sind stark von der dreidimensionalen Struktur eines Proteins abhängig. Die Identifizierung konformationeller Epitope ist auf Grund der Notwendigkeit von strukturellen Daten äußerst aufwendig. Neben der direkten Identifizierung durch die Untersuchung von Allergen-Antikörper-Komplexen, kann zumindest die Lokalisation der Epitope unter der Voraussetzung der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur indirekt durch Mutageneseverfahren ermittelt werden. Unabhängig von der genannten Klassifizierung, welche eher auf Basis der Identifizierungsmethodik beruht, müssen auch lineare Epitope, die mit Fragmenten großer konformationeller Epitope korrespondieren können, als Teile einer Gesamtstruktur betrachtet werden.

T-Zellepitope werden ähnlich wie lineare B-Zellepitope durch die Sequenz der das Allergen repräsentierenden synthetischen überlappenden Peptide identifiziert. Diese werden auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der Proliferation von T-Zell Klonen und zur Produktion eines T<sub>H2</sub> typischen Zytokinmusters getestet. Allergenmoleküle zeigen ein großes Repertoire an über die gesamte Polypeptidkette verteilten T-Zellepitopen (Yssel *et al.* 1992, O'Brien *et al.* 1994, Higgins *et al.* 1994, van Neerven *et al.* 1994, Burks *et al.* 1998). Auch im Fall dieser Epitope

konnten keine allgemeinen Sequenzmerkmale definiert werden.

## **1.4 Nahrungsmittelallergien**

### **1.4.1 Allgemeine Eigenschaften**

Nahrungsmittelallergien sind eine Form von Abwehrreaktionen gegen Nahrungsmittel. Neben immunvermittelten Abwehrreaktionen existieren eine Vielzahl von Reaktionen, denen nichtimmunologische Mechanismen zu Grunde liegen. Zu selbigen zählen sowohl toxische Reaktionen als auch Lebensmittelintoleranzen auf Grund einer entsprechenden Enzymdefizienz wie beispielsweise die Laktoseintoleranz (Ring *et al.* 2001).

Die Prävalenz der Nahrungsmittelallergien ist stark von den Ernährungsgewohnheiten und vom soziokulturellen Hintergrund der einzelnen Bevölkerungsgruppen abhängig. Im zentralen Europa und in den USA sind vor allem Allergien gegen Kuhmilch, Hühnereier, Fisch, Meerestiere, Nüsse, Erdnüsse, Früchte, Soja, Gemüse und Weizen verbreitet (Sampson & Albergo 1984). Neben geographischen Unterschieden bestehen große Differenzen im Allergiespektrum von Kindern und Erwachsenen. Während Kinder hauptsächlich Allergien gegen Lebensmittel tierischer Herkunft wie Kuhmilch und Hühnereier entwickeln, dominieren im Erwachsenenalter allergische Reaktionen auf Nüsse und Früchte (Jakobsson & Lindberg 1979, Sampson 1983, Ring *et al.* 2001).

### **1.4.2 Allergene aus Nahrungsmitteln**

Alle bekannten Lebensmittelallergene sind gut wasserlösliche, kleine Proteine oder Glykoproteine mit Molekularmassen in einem Bereich von 10 bis 70 kDa. Alle bisher bekannten Nahrungsmittelallergene können einer kleinen Zahl von Proteinklassen zugeordnet werden (Tab. 1.1). Ein großer Teil aller Lebensmittelallergene zeigt Homologien zur Gruppe der „*pathogenesis-related*“ (PR) Proteine. PR-Proteine werden nach Kontakt mit Bakterien oder pathogenen Faktoren wie Chemikalien, osmotischem Stress oder Umweltverschmutzung induziert (Stintzi *et al.* 1993, Yagami *et al.* 1998). In Früchten und Gemüsesorten mit hohem Wassergehalt sind Chitinasen, Proteasen und antifungale Proteine die dominierenden Allergene, während allergene Samenspeicherproteine und Enzyminhibitoren hauptsächlich in Weizen, Reis, Senfsamen oder Sojabohnen anzutreffen sind.

**Tab. 1.1 Einteilung der Nahrungsmittelallergene in Proteinklassen.**

<i>Proteinklasse</i>	<i>Funktion</i>	<i>Beispiele</i>
PR 2	$\beta$ -1,3-Glucanase	Früchte, Gemüse
PR 3	Typ I (basisch) und Typ II Chitinase	Avocado (Pers a I), Banane, Kastanie
PR 4	Chitinase	Holunderbeere, Kohlrübe
PR 5	Thaumatococcus und Osmotin ähnliche Proteine (antifungal)	Kirsche (Pru av 2), Apfel (Mal d 2), Paprika
PR 6	Protease und Amylase Inhibitoren	Sojabohne, Gerste (Hor v 1/BMAI-1, Cmb, BDP), Weizen (CM16), Roggen (Sec c 1, RDAI-1, RDAI-3), Reis (RAP)
PR 9	Peroxidase	Weizen, Roggen
PR 10	Bet v 1 Homologe	Apfel (Mal d1), Kirche (Pru av1), Karotte (Dau c 1), Sellerie (Api g 1), Birne (Pyr c 1), Haselnuss (Cor a 1), Aprikose (Pru ar 1)
Profiline	Actin-bindende Proteine, Signaltransduktion	Sellerie, Kartoffel, Haselnuss, Apfel, Birne, Tomate, Kirsche, Sojabohne, Erdnuss
Parvalbumin	Ca <sup>2+</sup> -bindende Proteine	z. B. Lachs (Sal s 1)
Tropomyosin	Ca <sup>2+</sup> -bindende Proteine	Shrimps (Met e 1, Pen a1, Pen i 1), Hummer (Hom a 1), Tintenfisch (Tod p 1), Seeohr (Hal m 1), Jakobsmuschel, Krabbe (Cha f 1)
Samenspeicherproteine	2S Albumine, Viciline, Conglutine, Glycinine, Beta-Conglycinine	Senf (Sin a 1, Bra j 1), Rizinus (Ric c 1), Rapssamen (Bu III), Paranuss (Ber e 1), Walnuss (Jug r1, Jug r 2), Erdnuss (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 4), Soja
Lipidtransferproteine	Lipidmetabolismus	Pflaume (Pru p 3), Rapssamen, Apfel, Aprikose, Mais, Pfirsich, Broccoli, Karotte
Protease	Proteolyse	Papaya (Papain), Ananas (Bromelain), Feige (Ficin), Kiwi (Act c 1), Soja (Gly m 1)
Peroxidasen	Peroxidation	Weizen, Gerste
Lectine	Kohlenhydratbindung	Erdnussagglutinin

### 1.4.3 Kreuzallergien

Der Begriff Kreuzallergie bezeichnet Reaktionen während einer bestehenden Allergie auf Proteine mit ähnlichen molekularen Eigenschaften ohne vorherige Sensibilisierung. Die Kreuzreaktivität von allergenspezifischen Antikörpern ist ein weit verbreitetes Phänomen unter den Nahrungsmittelallergien. Kreuzreaktionen treten nicht nur zwischen verwandten sondern auch zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies auf. Beispiele für letztere sind Kreuzallergien zwischen Birke und Kiwi (Gall *et al.* 1994) oder das so genannte „bird-egg“-Syndrom, eine Allergie gegen Eigelb, die durch Inhalation von Vogel-Serumproteinen induziert wird (de Blay *et al.* 1991, de Blay *et al.* 1994). IgE-Kreuzreaktionen zwischen phylogenetisch verwandten Spezies bestehen innerhalb der Familie der Leguminosen, unter Parvalbuminen verschiedener Fische und zwischen Graspollen und Getreideproteinen (Bernhisel-Broadbent & Sampson 1989, Jones *et al.* 1995). Kreuzallergien unter Leguminosen und zwischen Graspollen und Getreideproteinen sind klinisch kaum signifikant (Bruijnzeel-Koomen *et al.* 1995, Jones *et al.* 1995).

### 1.4.3.1 Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien

15-20 % der Bevölkerung in den Industrienationen entwickeln Allergien gegen Pollen, 50-93 % der Birkenpollenallergiker zeigen IgE-vermittelte Reaktionen zu Pollen-verwandten Nahrungsmitteln (Dreborg 1988, Wüthrich *et al.* 1995). Kreuzallergien zu Frucht- und Gemüsesorten treten hauptsächlich bei Birkenpollenallergien auf, es gibt jedoch einige wenige Fälle von beobachteten Kreuzallergien zwischen Äpfeln, Tomaten oder Erdnüssen mit Graspollenallergien (Ortolani *et al.* 1993). Bei Pollen-assoziierten Gemüse- und Fruchtaggergien dominieren vergleichsweise milde Symptome wie ein Anschwellen von Lippen und Zunge.

Unter den Birkenpollenallergenen sind Bet v 1, Bet v 2 und Bet v 6 die bedeutendsten kreuzreagierenden Allergene. Unter ihnen sind Bet v 1 homologe Allergene Hauptverursacher für Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien (Vieths *et al.* 2002). Die IgE-Reaktivität von Bet v 1, einem Mitglied der Gruppe der „*pathogenesis related*“-Proteine (Kap. 1.4.2), und seiner Homologen ist stark konformationsabhängig. Proteinfragmente oder Punktmutanten mit veränderter Konformation sind nicht oder nur noch stark reduziert IgE-reaktiv (Scheurer *et al.* 1999, Son *et al.* 1999). Bet v 2 gehört zur Gruppe der Profiline und scheint, wie am Sojabohnenprofilin gezeigt, ebenfalls konformationelle Epitope zu besitzen (Rihs *et al.* 1999). Profiline sind ubiquitär vorkommende und untereinander stark homologe Proteine. Ihre Tertiärstruktur ist auf Grund ähnlicher Spezifität der Ligandenbindung selbst in phylogenetisch weit entfernten Spezies stark konserviert (Rozycki *et al.* 1994). Neben Birkenpollen-assoziierten Lebensmittelallergien können auch Gras- und Beifußpollen-assoziierte Lebensmittelallergien durch Profiline vermittelt werden (Jankiewicz *et al.* 1996, van Ree *et al.* 1995). Wellhausen *et al.* (1996) isolierten Bet v 6, welches IgE aus 12 % der Seren von Birkenpollenallergikern bindet, aus Birkenpollen. Bet v 6 weist eine 81 %ige Sequenzidentität zu Isoflavonreduktase-homologen Proteinen auf. Bet v 6-bindende IgE-Antikörper zeigten Kreuzreaktionen mit Proteinen vergleichbarer Größe aus Apfel, Birne, Orange, Banane, Mango, Lychee und Karotte (Vieths *et al.* 1998, Wellhausen *et al.* 1996).

### 1.4.3.2 Pollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien

Kreuzreaktionen bei Pollen-unabhängigen Nahrungsmittelallergien wurden im mediterranen Raum unter der Familie der Lipidtransferproteine (LTPs) beobachtet. LTPs wurden von Pastorello *et al.* (1994) als die bedeutendsten Hauptallergene unter den Steinobstarten beschrieben. Es handelt sich dabei um in Pflanzen ubiquitär vorkommende Proteine geringen

Molekulargewichtes, die sich durch ein konserviertes Muster aus 8 Cysteinen auszeichnen. Wie am Beispiel der Kirsche gezeigt, scheinen bei Sensibilisierung gegen LTPs stärkere Symptome im Vergleich zu einer Pollensensibilisierung aufzutreten (Ballmer-Weber *et al.* 2002).

Latex-assoziierte Fruchallergien sind ein weiteres Beispiel für Pollen-unabhängige Kreuzallergien. (Nettis *et al.* 2002, Yagami 2002). In Folge einer Sensibilisierung mit Latexproteinen ist die Ausprägung von Allergien gegen Kiwi oder Banane keine Seltenheit, ihre klinische Symptomatik ist mit denen der Pollen-assoziierten Fruchallergien vergleichbar (Yagami 2002). Unter den Leguminosen sind Kreuzreaktionen zwischen Erdnuss und Sojabohne am bedeutendsten, auf welche im folgenden noch gesondert eingegangen werden soll (Kap. 1.5.2).

#### 1.4.3.3 Kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten

Die Existenz von IgE-Antikörpern gegen Kohlenhydratdeterminanten wurde erstmals vor zwei Jahrzehnten von Aalberse *et al.* (1981) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die IgE-Reaktivität einzelner Komponenten eines Patientenserums nach Behandlung mit Periodat verschwand, sich hingegen einer Hitzebehandlung gegenüber resistent verhielt. Diese Beobachtung deutete auf eine Beteiligung von Kohlenhydratstrukturen an der IgE-Bindung hin. Glykoproteine sind nach Art ihrer Kohlenhydratbindung zu unterscheiden. N-Glykane werden über die freie Aminogruppe eines Asparaginrestes an das Proteinrückgrat gebunden, O-Glykane sind über Serin-, Threonin- oder Hydroxyprolinreste verknüpft (Berger *et al.* 1982, Carraway & Hull 1989, Hounsell *et al.* 1996, Lerouge *et al.* 1998). Beispiele für Allergene mit N-Glykandeterminanten (Fötisch & Vieths 2001) sind die Phospholipase A 2 (PLA 2) aus Insektengift (Tretter *et al.* 1993) die  $\beta$ -Fructofuranosidase aus Tomate (Petersen *et al.* 1996) und Ara h 1 aus der Erdnuss (van Ree *et al.* 2000). Der zentrale Kern der N-Glykan-Kohlenhydratdeterminanten besteht aus zwei N-Acetyl-Glukosamin-Einheiten und einem Mannoserest. Der proximale N-Acetyl-Glukosaminrest ist bei PLA 2 mit einer  $\alpha$ -(1,3)-Fucose verknüpft, während eine  $\beta$ -(1,2)-Xylose am Mannoserest gebunden vorliegen kann, was jedoch bei PLA 2 nicht der Fall ist. Die  $\alpha$ -(1,3)-Fucose und die  $\beta$ -(1,2)-Xylose-Verknüpfung stellen Substitutionen dar, die in Säugetieren nicht auftreten, sie machen eine Kohlenhydratdeterminante zu einer hoch immunogenen Struktur und stellen entscheidende Elemente für die IgE-Erkennung dar (Prenner *et al.* 1992, van Ree *et al.* 2000). Ihr weit verbreitetes Vorkommen in N-Glykanen von Pflanzen und Invertebraten sind die Grundlage der hochgradigen Kreuzreaktivität, die für Kohlenhydrat-spezifische IgE-Antikörper

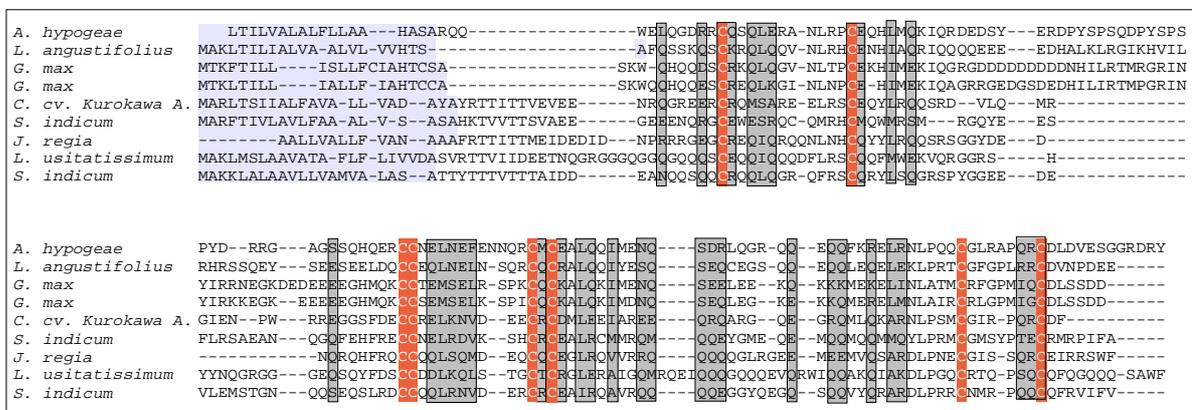
beschrieben wurde (Aalberse *et al.* 1981, van Ree *et al.* 1995, van der Veen *et al.* 1997, Mari *et al.* 1999, Vieths *et al.* 2002). Kohlenhydrat-reaktive IgEs wurden hauptsächlich in Seren von Pollen- und Insektengiftallergikern gefunden (Aalberse *et al.* 1981, Aalberse & van Ree 1996, Aalberse & van Ree 1997). Sie reagieren mit einer Vielzahl von Allergenen aus Früchten, Gemüse und Invertebraten, werden jedoch primär durch Pollen und Insektengifte induziert. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Kreuzsensibilisierung. Die klinische Relevanz dieser Antikörper war lange Zeit äußerst umstritten (van Ree & Aalberse 1999). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Patienten wie Pollenallergiker keine Symptome auf Lebensmittel trotz des nachgewiesenen Vorhandenseins von kreuzreagierenden anti-Kohlenhydrat-IgEs zeigen (van der Veen *et al.* 1997, Mari *et al.* 1999). Auch ist die biologische Aktivität der Antikörper äußerst gering (van der Veen *et al.* 1997). Als Ursache dafür kommt vor allem die geringe Größe der Kohlenhydratdeterminanten in Frage. Proteine mit multiplen Kohlenhydratketten sind zwar prinzipiell zur Kreuzvernetzung der FcεRI-Rezeptoren in der Lage, die Bindung kann jedoch sehr ineffizient und von geringer Affinität sein (van Ree 2002). Beides führt zu einer verringerten Ausschüttung von Mediatoren durch Effektorzellen.

#### 1.4.4 2S Albumine – Panallergene in Pflanzensamen

Mitglieder der Familie der 2S Albumine sind sehr weit verbreitete pflanzliche Samenspeicherproteine. Sie gehören zur Superfamilie der Prolamine (Shewry *et al.* 2002). Die Existenz der Prolaminsuperfamilie wurde erstmals 1985 von Kreis *et al.* postuliert (Kreis *et al.* 1985). Grundlage der Klassifizierung bildete ein konserviertes Cysteinmuster (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-C-Xn-C). Die beiden ungewöhnlichen Motive CC und CXC erlauben auch die Zuordnung von Proteinen mit geringer Sequenzidentität. Neben den 2S-Albuminen gehören nichtspezifische Lipidtransferproteine (LTPs),  $\alpha$ -Amylase- und Trypsininhibitoren und Puroindoline zur Prolaminsuperfamilie (Shewry *et al.* 2002). Die überwiegende Mehrzahl aller Mitglieder sind Samenproteine.

2S Albumine sind in der Regel kleine Proteine (12 bis 15 kDa) mit 8 oder mehr disulfidverbrückten Cysteinen (Abb. 1.2). Auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihrer starken Präsenz in den Proteinkörperchen der Samen und ihrer Mobilisierung während der Keimung wurde eine Funktion als Stickstoff- und Schwefeldonor postuliert (Youle & Huang 1979, Barciszewski *et al.* 2000). Neben ihrer Speicherfunktion sind für einzelne 2S Albumine Aktivitäten als antifungale Agenzien (Terras *et al.* 1993), Serinproteaseinhibitoren

oder Calmodulinantagonisten (Polya *et al.* 1993) beschrieben. 2S Albumine werden häufig als Präpropolypeptide synthetisiert und durchlaufen einen oder mehrere posttranslationale Modifikationsschritte. Für die 2S Albumine aus Raps (*Brassica napus*), auch Napine genannt, wurde gezeigt, dass diese zunächst als 20 kDa Vorläuferproteine synthetisiert werden und anschließend nach Abspaltung eines aminoterminalen Signalpeptides an vier weiteren Positionen prozessiert werden (Muren & Rask 1996, Muntz *et al.* 1998, Barciszewski *et al.* 2000). Reife Napine sind dementsprechend aus einer kleinen (4,5 kDa) und einer großen (10 kDa) Untereinheit, welche über Disulfidbrücken verbunden sind, zusammengesetzt (Gehrig & Biemann 1996). Neben ihren biochemischen Eigenschaften ist vor allem ihre Allergenizität von großem Interesse. Als erste allergene 2S Albumine wurden Sin a 1 aus Senf (Menendez-Arias *et al.* 1988, Menendez-Arias *et al.* 1990), Bra j 1 aus Senf (González de la Peña *et al.* 1991) und Ric c 1 aus Rizinus (Irwin *et al.* 1990) beschrieben. In den vergangenen Jahren wurde die Allergenizität von 2S Albuminen aus verschiedenen Spezies gezeigt (Pastorello *et al.* 2001a). Sie können dementsprechend ähnlich wie die eng verwandten LTPs als ubiquitäre Allergene oder Panallergene angesprochen werden.



**Abb. 1.2:** Sequenzvergleich einer Auswahl an 2S Albuminen.

*A. hypogaeae*: *Arachis hypogaeae* (Erdnuss); *L. angustifolius*: *Lupinus angustifolius* (Blaue Lupine); *G. max*: *Glycine max* (Soja); *C. cb. Kurokawa*: *Cucurbita cv. Kurokawa Amakuri* (Kürbis); *J. regia*: *Juglans regia* (Englische Walnuss); *L. usitatissimum*: *Linum usitatissimum* (Leinsamen); *S. indicum*: *Sesamum indicum* (Orientalischer Sesam). Als Vertreter der Erdnuss 2S Albumine (*A. hypogaeae*) wurde Ara h 2 gewählt.

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) erstellt. Identische Regionen sind grau hinterlegt, die konservierten Cysteinreste rot. Die Bereiche der vorhergesagten aminoterminalen Signalsequenzen (Programm: *Signal P*; <http://www.expasy.org/tools/>) sind durch einen blauen Hintergrund markiert.

## 1.5 Die Erdnussallergie

Die Inkorporation von Erdnüssen (*Arachis hypogaea*) und erdnusshaltigen Lebensmitteln gilt als Hauptverursacher von schweren allergischen Reaktionen bei Kindern und Erwachsenen. Studien aus Großbritannien und den USA belegen, dass circa eines von 150 bis 200 Individuen von Erdnussallergien betroffen ist (Emmett *et al.* 1999, Sicherer *et al.* 1999). Im Vergleich mit anderen Nahrungsmittelallergien zeichnet sich die Erdnussallergie durch ihre besonders schwere Symptomatik aus. 23 bis 47 % aller Nahrungsmittel induzierter anaphylaktischer Reaktionen und sieben von dreizehn tödlich verlaufenden anaphylaktischen Reaktionen in den USA werden durch Erdnüsse hervorgerufen (Yunginger *et al.* 1988, Sampson *et al.* 1992, Yocum & Khan 1994, Kemp *et al.* 1995, Pumphrey & Stanworth 1996). Es genügen häufig kleinste Mengen Erdnuss um derartige Reaktionen auszulösen. In Einzelfällen waren bereits 100 µg Erdnuss ausreichend um subjektive Reaktionen zu erzeugen, typischerweise bewegt sich die notwendige Dosis im Bereich von 100 bis 1000 mg (Hourihane *et al.* 1997, Moneret-Vautrin *et al.* 1998, Sicherer *et al.* 2000). Von Erdnussallergien sind Erwachsene und Kinder gleichermaßen betroffen. Im Gegensatz zu vielen anderen Nahrungsmittelallergien wie Milch-, Ei-, Sojabohnen- und Weizenallergien bleibt die Erdnussallergie auch im Erwachsenenalter bestehen (Bock 1982, Bock & Atkins 1989, Sampson & Scanlon 1989, Hou *et al.* 1994). Die Entwicklung einer klinischen Toleranz zu Erdnüssen aber auch zu Baumnussarten ist außerordentlich selten (Hourihane *et al.* 1998).

### 1.5.1 Allergenspektrum der Erdnuss

Peanut-1 wurde 1981 von Sachs *et al.* als erstes Erdnussallergen identifiziert (Sachs *et al.* 1981). Das Concanvalin A-reaktive Glykoprotein wurde ebenfalls als Allergen der Erdnuss publiziert, isoliert und teilweise charakterisiert (Barnett & Howden 1986). In jüngeren Studien wurde die Existenz von drei Hauptallergenen aus der Klasse der Samenspeicherproteine gezeigt. Dazu gehören Ara h 1 (Burks *et al.* 1991b) Ara h 2 (Burks *et al.* 1992) und Ara h 3 (Rabjohn *et al.* 1999). Ara h 1 und Ara h 2 reagieren mit IgE-Antikörpern von über 90 % der sensibilisierten Patienten, während Ara h 3 von 45 % der Patientensera gebunden wird (Burks *et al.* 1992, Stanley *et al.* 1997, Rabjohn *et al.* 1999). Zusätzlich wurden bisher weitere vier als minore Allergene bezeichnete Erdnussallergene beschrieben (Kleber-Janke *et al.* 1999). Ara h 4, 6 und 7 zeigen neben den Hauptallergenen eine Sequenzähnlichkeit zu den Klassen der Samenspeicherproteine, während Ara h 5 in die Gruppe der Profiline (Valenta *et al.* 1992) einzuordnen ist, eine Proteinfamilie, für die viele

allergene Vertreter in zahlreichen Pflanzen beschrieben wurden. Unter den bisher bekannten Erdnussallergenen findet sich außerdem ein Protein aus der Klasse der Lektine. Es handelt sich dabei um das 31 kDa Erdnussagglutinin, auf welches jedoch nur eine Minderheit der Erdnussallergiker reagiert und welches damit von untergeordneter Bedeutung ist (Burks *et al.* 1994).

### 1.5.1.1 Das Vicilin Ara h 1

Ara h 1 wurde durch Immunoblotanalysen mit vereinigten Patientenseren identifiziert und anschließend gereinigt, kloniert und charakterisiert (Burks *et al.* 1991b, Burks *et al.* 1995). Es zeigt Sequenzähnlichkeit zur Gruppe der Viciline. Mitglieder dieser Familie fungieren als Speicherproteine in Leguminosen. Sie kommen in Keimblättern in sehr hohen Konzentrationen vor und zeigen eine Tendenz zur Ausbildung von oligomeren Strukturen. Dies dient möglicherweise einer effektiven Verpackung im Samenkorn. Eine enzymatische Aktivität wurde für Viciline bislang nicht beschrieben. Ara h 1 ist ein 65 kDa schweres Glykoprotein (Burks *et al.* 1991a) mit zahlreichen IgE-Bindungsstellen sowohl im Protein- als auch im Kohlenhydratanteil (Burks *et al.* 1997, Shin *et al.* 1998). Der allergene Charakter von Ara h 1, welches zu den häufigsten Proteinen in der Erdnuss zählt (Burks *et al.* 1991a), bleibt sowohl nach Lebensmittelverarbeitung als auch nach Verdau mit einem *in vitro* System stabil (Astwood *et al.* 1996, Lehrer *et al.* 1996).

Fluoreszenzanisotropy-Experimente zeigten, dass Ara h 1 die Fähigkeit der Ausbildung sehr stabiler trimerer Komplexe aufweist, wobei der Kontakt der Monomere über hydrophobe Aminosäuren vermittelt wird (Shin *et al.* 1998, Maleki *et al.* 2000). Derartige trimere Strukturen sind ebenfalls von Homologen wie Phaesolin oder Canavalin beschrieben (Ko *et al.* 1993, Lawrence *et al.* 1994). Basierend auf der Kristallstruktur des homologen Phaesolins wurde eine Strukturmodell von Ara h 1 erstellt. Das trimere Strukturmodell von Ara h 1 zeigt, dass terminale hydrophobe Regionen die Kontaktpunkte der Monomerinteraktion bilden (Maleki *et al.* 2000). Im Bereich dieser Monomer-Monomer Kontaktpunkte sind ein Großteil aller IgE-bindenden Epitope des Moleküls lokalisiert (Maleki *et al.* 2000). Für Ara h 1 wurden 23 lineare Epitope identifiziert (Burks *et al.* 1997). Die Ausbildung einer multimeren Struktur wird als Ursache für die Stabilität des Proteins diskutiert (Maleki *et al.* 2000, Shin *et al.* 1998). Die Lokalisation der Epitope im Kontaktbereich der Monomere schützen diese möglicherweise vor proteolytischem Abbau. In der Tat wurde gezeigt, dass Trypsin-, Chymotrypsin- und Pepsin-resistente Ara h 1-Fragmente intakte IgE-Bindungsstellen enthalten (Maleki *et al.* 2000).

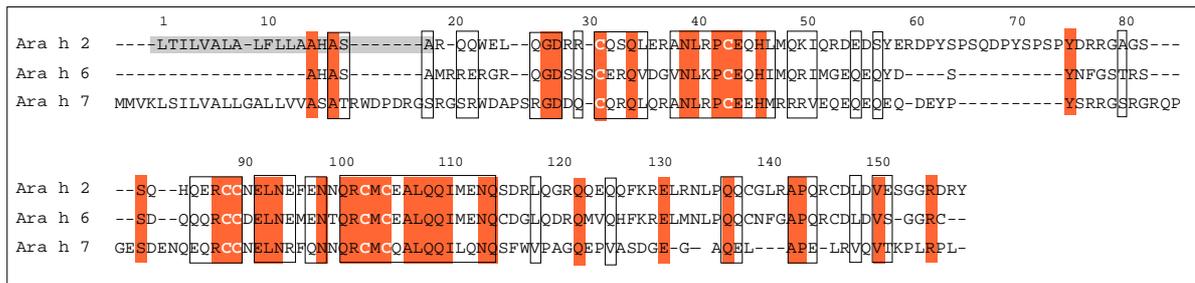
### 1.5.1.2 Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 – 2S Albumine der Erdnuss

Ara h 2 wurde als weiteres Hauptallergen der Erdnuss identifiziert, gereinigt und kloniert (Burks *et al.* 1992, Stanley *et al.* 1997). Das 17,5 kDa Protein ist Mitglied der Conglutinfamilie der Samenspeicherproteine. Bislang wurden 10 lineare IgE-bindende Epitope identifiziert (Stanley *et al.* 1997). Patientenseren reagieren mit multiplen Ara h 2-Epitopen, drei der IgE-bindenden Epitope werden von nahezu allen Patientenseren erkannt und wurden demzufolge als immunodominant eingestuft (Stanley *et al.* 1997). Mutationstudien zeigten, dass durch Austausch einzelner Aminosäuren, insbesondere im zentralen Bereich der Epitope, ein vollständiger Verlust der Erdnuss-spezifischen IgE-Bindung erreicht werden kann (Burks *et al.* 1999a).

Die Analyse der genomischen Nukleotidsequenz von Ara h 2 wies auf die Existenz eines potentiellen aminoterminalen Signalpeptids einer Länge von 21 Aminosäuren (Viquez *et al.* 2001) hin. Signalpeptide spielen eine Rolle bei der Translokation von Proteinen aus dem Cytosol in die Zielorganellen. Sie bestehen typischerweise aus hydrophoben Aminosäuren wie Typtophan, Phenylalanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Partielle Unterschiede der genomischen Sequenz und der Nukleotidsequenz der mRNA (Stanley *et al.* 1997) deuten auf das Vorhandensein von Ara h 2-Isoformen oder Varianten durch alternatives Splicing hin (Viquez *et al.* 2001).

Ara h 6 und Ara h 7 wurden als minore Erdnussallergene identifiziert (Kleber-Janke *et al.* 1999). Nach einer Untersuchung von Kleber-Janke *et al.* (1999) reagieren 38 % bzw. 43 % der getesteten Patientenseren mit den rekombinanten Formen von Ara h 6 und Ara h 7.

Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 zeigen untereinander und zu Proteinen der 2S Albuminfamilie eine hohe Sequenzähnlichkeit (Abb. 1.3). Die Sequenzidentität von Ara h 6 und Ara h 7 zu Ara h 2 beträgt 59 bzw. 35 %. Die Sequenzen der drei Proteine weisen einen hohen Anteil einzelner Aminosäuren wie Glutamat, Glutamin, Arginin und Cystein auf. 2S Albumine gelten als universelle Allergene unter den Samenspeicherproteine und waren Gegenstand umfangreicher immunologischer und biochemischer Untersuchungen. Auf selbige wurde in Kapitel 1.4.4 gesondert eingegangen.



**Abb. 1.3:** Sequenzvergleich der drei 2S Albumine Ara h 2 (Genbank: L77197), Ara h 6 (AAD56337 und Ara h 7 (AAD56719) aus *Arachis hypogaea*.

Identische Bereiche sind rot markiert, ähnliche schwarz umrandet. Die grau unterlegte Sequenz entspricht dem aminoterminalen Signalpeptid von Ara h 2. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm T-COFFE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) erstellt. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die aminoterminalen Signalsequenz von Ara h 2.

### 1.5.1.3 Das Glycinin Ara h 3

Die zur cDNA korrespondierende Aminosäuresequenz von Ara h 3, dem dritten Hauptallergen der Erdnuss, zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zur Familie der 11S Samenspeicherproteine (Rabjohn *et al.* 1999). Diese in Leguminosen zahlreich anzutreffenden Speicherproteine fungieren als Stickstoffquellen in der sich entwickelnden Pflanze und werden als 60 kDa große Präproglobuline synthetisiert (Nielsen *et al.* 1989). Die Sequenzidentität zwischen Ara h 3 und den Glycininen der Sojabohne (*Glycine max*) und der Erbse (*Pisum sativum*) liegt zwischen 62 und 72 %. Alle drei Sequenzen beinhalten eine konservierte Spaltstelle zwischen Asparagin 325 und Glycin 326. Durch eine Asparaginyleno-Endopeptidase wird das 60 kDa Präproglobulin in eine 40 kDa aminoterminalen, sauren Untereinheit und in eine 20 kDa carboxyterminale basische Untereinheit gespalten (Scott *et al.* 1992).

Zur Identifizierung von B-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz wurden überlappende synthetische Peptide und Serum-IgE von Ara h 3-allergischen Patienten verwendet. Dabei wurden vier Epitope bestimmt, die ausschließlich in der aminoterminalen sauren Untereinheit lokalisiert sind (Rabjohn *et al.* 1999). Rabjohn *et al.* zeigte mittels kurzer Peptide, dass der Austausch einzelner kritischer Aminosäuren, vor allem im Zentrum der Epitope, zu einer drastischen Reduktion der IgE-Bindung führt (Rabjohn *et al.* 1999). Die vier effektivsten Mutationen wurden in die aminoterminalen sauren Untereinheit von Ara h 3 eingeführt. Das modifizierte Protein zeigte eine zum Wildtyp 35 bis 85 % reduzierte IgE-Bindung mit Ara h 3 spezifischen Patientenserum (Rabjohn *et al.* 2002). Da keine der Mutationen in unter den Glycininen konservierten Bereichen lokalisiert ist, wird von einer geringen Beeinflussung der Struktur des Proteins bei gleichzeitiger Reduktion der Allergenizität ausgegangen. Auf Grund

dieser Eigenschaften und der nachgewiesenen Erhaltung der Fähigkeit zur T-Zellaktivierung wird modifiziertes Ara h 3 als potentielles Immuntherapeutikum diskutiert (Rabjohn *et al.* 2002).

#### 1.5.1.4 Sonstige Erdnussallergene

Ara h 4 und Ara h 5 wurden durch Phagendisplay von funktionellen cDNA-Expressionsprodukten identifiziert und kloniert (Kleber-Janke *et al.* 1999). Ara h 5 zeigt eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit zu zahlreichen Vertretern pflanzlicher Profiline. Profiline sind hochkonservierte ubiquitäre 12 bis 15 kDa Aktin-bindende Proteine. Sie wurden als bedeutende Kreuzallergene in Gräsern, Birkenpollen und Weizen beschrieben (Valenta *et al.* 1992). Da mit Ara h 5 nur 13 % der Patientenserum reagieren und es nur in geringen Mengen in der Erdnuss vorzukommen scheint, spielt es wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle innerhalb erdnussallergischer Reaktionen (Kleber-Janke *et al.* 1999).

Ara h 3 und Ara h 4 sind nahezu identische Mitglieder der Glycininfamilie. Sie wurden von Kleber-Janke *et al.* (1999) und Rabjohn *et al.* (1999) unabhängig voneinander beschrieben und vom IUIS (International Union of Immunological Societies) als 2 separate Allergene eingeführt (King *et al.* 1995). Auf Grund ihrer hohen Sequenzübereinstimmung ist jedoch wahrscheinlich von der Identität beider Proteine auszugehen.

#### 1.5.2 Kreuzreaktivität

Für viele Erdnussproteine sind Homologe in anderen Leguminosen bekannt. Tatsächlich zeigen Patienten mit klinischen Symptomen auf eine einzelne Pflanze IgE-Bindung (positive Pricktests oder RAST-(Radio-Allergosorbent-Test)-Analysen mit einer Vielzahl weiterer Leguminosen (Barnett *et al.* 1987, Bernhisel-Broadbent & Sampson 1989). Diese Reaktionen sind jedoch mehrheitlich klinisch nicht signifikant (Sicherer 2002). Eine Ausnahme stellen möglicherweise die Allergene der Sojabohne dar. Eine neuere Studie weist auf eine Unterbewertung der Sojabohne als Ursache allergischer Reaktionen in Erdnuss-allergischen Individuen in der Vergangenheit hin (Foucard & Malmheden Yman 1999). Xiang *et al.* (2002) identifizierten ein gemeinsames IgE-bindendes Epitop in den drei allergenen Glycininen G1a und G2a aus Sojabohne und Ara h 3 aus Erdnuss. Die Sequenz des gemeinsamen Epitops ist unter den Glycininen von Leguminosen hoch konserviert und kann ein Grund für die beobachtete *in vitro* Kreuzreaktivitäten darstellen.

Nussarten wie Walnuss, Paranuss oder Cashewnuss beinhalten keine zur Erdnussproteinen

signifikant homologen Proteine (Sicherer 2002). Dennoch geht aus verschiedenen Studien hervor, dass 28 bis 49 % der Erdnussallergiker auch an Allergien gegen Baumnüsse leiden und umgekehrt (Ewan 1996, Hourihane *et al.* 1996, Sicherer *et al.* 1998). Es handelt sich dabei jedoch um so genannte Co-Allergien, deren Ursachen weniger in kreuzreagierenden Proteinen als in einer atopischen Veranlagung zu suchen sind (Sicherer 2002).

### 1.5.3 Therapiemöglichkeiten

Momentan kann ein Schutz vor den häufig schweren und teilweise lebensbedrohlichen Reaktionen in Folge einer Erdnussallergie nur bei absolutem Verzicht auf erdnusshaltige Lebensmittel gewährleistet werden. Ein vollständiger Verzicht auf Erdnussbestandteile ist bei einer Ernährung mit kommerziellen Produkten kaum zu realisieren. Ein besonderes Problem stellt die Verwendung von Erdnussprotein als Streckerprotein in den unterschiedlichsten Lebensmitteln dar. Obwohl der Erdnussgehalt in vielen Ländern einer Kennzeichnungspflicht unterliegt, können Lebensmittel mit Spuren von Erdnussbestandteilen unbemerkt kontaminiert sein. Einige sehr sensitive Patienten können selbst auf derartige Spuren mit sehr schweren Symptomen reagieren (McKenna & Klontz 1997). Eine wirksame Therapie bzw. Prävention bei Erdnussallergien existiert derzeit noch nicht. Es gibt jedoch mehrere definierte Therapieansätze für Erdnuss- und Lebensmittelallergien, die momentan Gegenstand zahlreicher Forschungen sind. Von Nelson *et al.* (1997) wurden die Anwendung von Erdnussprotein innerhalb einer Immuntherapie bei Erwachsenen untersucht. Tatsächlich wurde dadurch eine erhöhte Toleranz bei oraler Aufnahme erreicht, das Auftreten von IgE-vermittelten Nebenreaktionen blieb jedoch nicht aus. Es bestehen daher Anstrengungen diese Gefahr durch den Einsatz von partiell verdauten oder rekombinanten Proteinen mit durch Mutation abgeschwächter Allergenizität zu minimieren (Burks *et al.* 1999b; Hong *et al.* 1999). Eine weitere Methode der spezifischen Immuntherapie besteht in der Anwendung von Erdnussprotein-kodierender DNA. Ziel ist dabei die endogene Produktion von allergenen Proteinen, was eine Toleranz und eine Verlagerung der Effekte der  $T_{H2}$  vermittelten Immunantwort in Richtung der  $T_{H1}$  Antwort zur Folge haben kann. Diese Methode wurde in verschiedenen Systemen, unter anderem in einem Mausmodell getestet (Li *et al.* 1999, Roy *et al.* 1999). Die prophylaktische Gabe von Plasmid-DNA konnte teilweise einen Schutz gegen einzelne Erdnussallergene bewirken. Die Effekte waren jedoch stark stammabhängig und sind deshalb nicht zu generalisieren (Li *et al.* 1999). Weitere Forschungsansätze sind Zytokintherapien und die Verwendung von immunstimulierenden Sequenzen (Lee *et al.* 2001, Li *et al.* 2001).

## 1.6 Strukturelle Eigenschaften von Allergenen

Die momentane Liste der bekannten Allergene umfasst mehrere Hundert verschiedene Proteine (<http://www.allergen.org/List.htm>). Für viele diese Allergene ist die Primärstruktur bekannt. Kenntnisse zu molekularen Details und insbesondere zur dreidimensionalen Struktur sind hingegen nur für eine sehr begrenzte Anzahl von Allergenen vorhanden. Insbesondere die dreidimensionale Struktur eines Allergens spielt für viele Aspekte der molekularen Mechanismen der allergischen Reaktion eine entscheidende Rolle. Dazu gehört vor allem die Bindung des Allergens an auf Mastzellen exprimierten IgE-Antikörpern und die IgE-Bindung von konformationellen B-Zell Epitopen.

Zahlreiche optisch spektroskopische Methoden wie Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR), Ramanspektroskopie und Cirkulardichroismusspektroskopie (CD) sind zur Erlangung erster Strukturinformationen geeignet. Vor allem die CD-Spektroskopie ist bei relativ niedrigem apparativem Aufwand und geringen Anforderungen an Menge und Konzentration der Probe eine häufig angewendete Methode zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen. Dennoch kann die optische Spektroskopie allenfalls strukturelle Teilaspekte aufklären, zur Auflösung von Proteinstrukturen auf atomarem Niveau sind aufwendige Methoden wie kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenstrukturanalyse notwendig. Die Röntgenstrukturanalyse wurde vor mehr als 40 Jahren etabliert und erstmals von Perutz und Kendrew bei den Strukturbestimmungen von Hämoglobin und Myoglobin angewendet (Kendrew *et al.* 1960, Perutz *et al.* 1960). Ein entscheidender Nachteil der Röntgenstrukturanalyse ist die notwendige Kristallisation des zu untersuchenden Proteins. Die Herstellung von großen, möglichst perfekt gebauten, einzelnen Kristallen, den so genannten Einkristallen, erfordert ein Erproben vieler hundert Kristallisationsbedingungen. Außerdem ist die Entstehung von strukturellen Artefakten durch die Kristallpackung nicht auszuschließen. Vor ungefähr zwei Jahrzehnten wurde die erste Proteinstruktur mit NMR-Daten aufgeklärt (Williamson *et al.* 1985). Die NMR-Spektroskopie hat den Vorteil, Proteine in Lösung untersuchen zu können, was einerseits den oft schwierigen Schritt der Kristallisation erspart und andererseits Probenbedingungen schafft, die den physiologischen Bedingungen ähnlicher sind als im Kristall. Neben der Bestimmung der molekularen Struktur auf atomarem Niveau ermöglicht die NMR-Spektroskopie die Untersuchung verschiedenster molekularer Phänomene wie beispielsweise Ligandenbindungs- oder Proteinfaltungsprozesse. Auch bei der NMR-Spektroskopie werden hohe Ansprüche an die zu untersuchende Probe gestellt. Diese muss auf Grund der geringen

Sensitivität der Methode in hohen Konzentrationen und bei Proteinen einer Größe von über 10 kDa häufig isopenmarkiert vorliegen. Die Entwicklung von mehrdimensionalen heteronuklearen NMR-Techniken erlaubt jedoch mittlerweile die Strukturbestimmung von Proteinen bis zu einer Molekularmasse von 25 kDa oder vereinzelt auch darüber. Außer der experimentellen Strukturbestimmung von Proteinen besteht die Möglichkeit, Strukturen unter bestimmten Voraussetzungen theoretisch über komparative Modellierung vorherzusagen. Dies setzt jedoch das Vorhandensein von bekannten homologen Strukturen mit einer Sequenzidentität von mindestens 25 % voraus und liefert meist niedrigere Qualitäten als die experimentell bestimmten Strukturen.

### **1.6.1 Primärstruktur und posttranslationale Modifikationen**

Für ein Großteil der identifizierten Allergene ist die Primärstruktur bekannt. Diese Strukturinformation wird im Allgemeinen durch Sequenzieren der komplementären DNA (cDNA) gewonnen. Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz entspricht auf Grund posttranslatonaler Modifikationen häufig nicht der finalen Primärstruktur des Allergens (Aalberse 2000). Viele Allergene wie beispielsweise die 2S Albumine sind extrazelluläre Proteine. Ihre Sekretion erfordert die Anwesenheit einer entsprechenden aminoterminalen Signalsequenz, welche durch Proteasen im Endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird. Glykosylierungen sind die häufigsten posttranslationalen Modifizierungsreaktionen bei Allergenen. Die Mehrheit aller Nahrungsmittelallergene sind Glykoproteine (Burks *et al.* 1998). Kohlenhydratstrukturen können eine Rolle für Proteinstabilität und Kreuzreaktivität spielen (Kap. 1.4.3.3). Für einzelne Allergene wie Ole e 1, Ara h 1 oder Lol p 11 wurde die Primärstruktur der Kohlenhydratkomponenten aufgeklärt (van Ree *et al.* 2000, Wilson & Altmann 1998).

### **1.6.2 Dreidimensionale Allergenstrukturen**

Die dreidimensionale Struktur einer Reihe von Allergenen wurde experimentell bestimmt bzw. konnte auf Grund von Sequenzhomologien vorhergesagt werden. Allergene Proteine wurden von Aalberse (2000) entsprechend ihrer Faltung klassifiziert und in eine kleine Zahl von Strukturfamilien untergliedert. Allergene Proteine, deren dreidimensionale Struktur mittels Röntgenkristallographie oder NMR bestimmt wurden, sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

**Tab. 1.2 Zusammenstellung von allergenen Proteinen mit experimentell bestimmter dreidimensionaler Struktur.**

Allergene Peptide wurden nicht vermerkt.

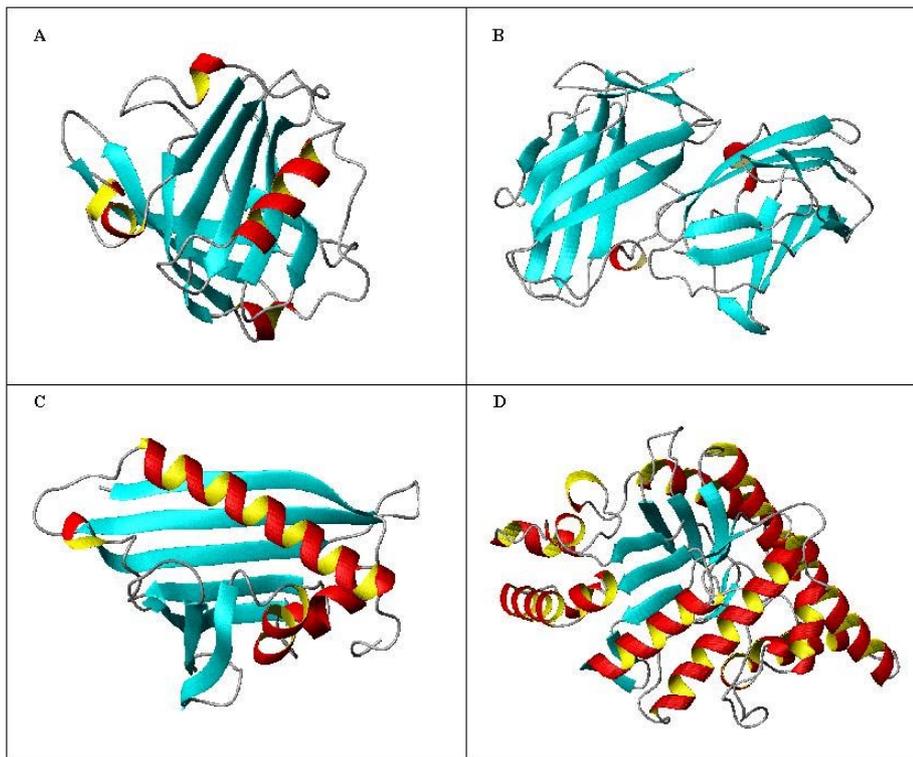
<i>Allergen</i> <sup>1</sup>	<i>Proteinfamilie</i> <sup>2</sup>	<i>Allergenquelle</i>	<i>Struktur-elemente</i> <sup>2</sup>	<i>PDB-Eintrag</i>	<i>Referenz</i>
Amb t V	Profilin	Traubenkraut	$\alpha+\beta$	2BBG	(Metzler <i>et al.</i> 1992)
Api m 2	(Trans)Glykosidase	Honigbiene	$\alpha+\beta$	1FCQ/1FCV/1FCU	(Markovic-Housley <i>et al.</i> 2000)
Asp f 5	Mikrobielle Ribonuklease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	$\alpha+\beta$	1AQZ	(Yang & Moffat 1996)
Bet v 2	Profilin (Aktin-bindendes Protein)	Pollen	$\alpha+\beta$	1CQA	(Fedorov <i>et al.</i> 1997a)
Bos d 4	$\alpha$ -Lactalbumin	Rind	$\alpha+\beta$	1HFZ	(Pike <i>et al.</i> 1996)
Bet v 1	PR10 (pathogenesis-related protein)	Pollen	$\alpha+\beta$	1BETV/1BV1/1B6F	(Gajhede <i>et al.</i> 1996) (Schweimer <i>et al.</i> 1999)
Pru av 1	PR10 (pathogenesis-related protein)	Kirsche	$\alpha+\beta$	1E09	(Neudecker <i>et al.</i> 2001a)
Llpr10.1A	PR10 (pathogenesis-related protein)	Gelbe Lupine	$\alpha+\beta$	1ICX	(Biesiadka <i>et al.</i> 2002)
Phl p 2	Pollenallergen Phl p 2	Pollen	$\beta$	1WHO/1WHP/1BMW	(De Marino <i>et al.</i> 1999; Fedorov <i>et al.</i> 1997b)
Der p 2	Immunoglobulin	Hausstaubmilbe	$\beta$	1A9V/1KTJ	(Derewenda <i>et al.</i> 2002) (Müller <i>et al.</i> 1998)
Der f 2	Immunoglobulin	Hausstaubmilbe	$\beta$	1AHK/1AHM	(Ichikawa <i>et al.</i> 1998)
Mus m 1	Lipocalin	Maus (Urin)	$\beta$	1MUP	(Bocskei <i>et al.</i> 1992)
Bos d 2	Lipocalin	Rind	$\beta$	1BJ7	(Rouvinen <i>et al.</i> 1999)
Equ c 1	Lipocalin	Pferd	$\beta$	1EW3	(Lascombe <i>et al.</i> 2000) (Gregoire <i>et al.</i> 1999)
Bos d 5	Lipocalin	Lebensmittel (Milch, Rind)	$\beta$	1BEB	(Brownlow <i>et al.</i> 1997)
Gal d 4	Lysozym	Lebensmittel (Hühnerei)	$\beta$	2LYM	(Kundrot & Richards 1987)
Phl p 5b	Pollenallergen	Wiesenlischgras	$\alpha$	1L3P	(Rajashankar <i>et al.</i> 2002)
Asp f 6	Mn-Superoxiddismutase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	$\alpha$	1KKC	(Fluckiger <i>et al.</i> 2002)
Zea m 14	LTP	Mais	$\alpha$	1AFH/1MZM/1MZL	(Gomar <i>et al.</i> 1996)
Phl p 7	EF-Hand	Wiesenlischgras	$\alpha$	1K9U	(Verdino <i>et al.</i> 2002)
Api m 1	Phospholipase A2	Honigbiene	$\alpha$	1POC	(Scott <i>et al.</i> 1990)

<sup>1</sup> Allergennomenklatur der International Union of Immunological Societies (<http://www.allergen.org/List.htm>)<sup>2</sup> nach SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop>)

Viele der bekannten Strukturen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an  $\beta$ -Strängen aus. Vier von ihnen gehören zur Gruppe der Lipocaline (Pervaiz & Brew 1987). Lipocaline sind typischerweise Transportproteine, welche zur Bindung von kleinen hydrophoben Liganden wie Retinoide und Pheromone befähigt sind (Virtanen 2001). Diese 17 bis 22 kDa Proteine bestehen aus acht aufeinander folgenden  $\beta$ -Strängen, welche einen zentralen Hohlraum ausbilden. Sie können außerdem ein kurzes carboxyterminales  $\beta$ -Faltblatt, eine kurze  $3_{10}$ -Helix und eine  $\alpha$ -Helix aufweisen. Mit Bos d 5 findet sich unter den Lipocalinen eines der

wenigen Lebensmittelallergene mit bekannter dreidimensionaler Struktur (Brownlow *et al.* 1997; Abb. 1.4A). Bos d 5 ( $\beta$ -Lactoglobulin) gehört in Gemeinschaft mit Casein und Lactalbumin zu den vorherrschenden Allergenen in Milch (Wal 2001). Die Hausstaubmilbenallergene Der p 2 (Abb. 1.4B) und Der f 2, Mitglieder der Superfamilie der Immunoglobuline, weisen eine Sequenzidentität von 87,5 % auf. Beide Allergene beinhalten drei Disulfidbrücken und bestehen aus jeweils zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche das typische Faltungsmuster der Immunoglobuline formieren (Ichikawa *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998, Derewenda *et al.* 2002).

Die beiden PR10-Proteine Bet v 1 und Pru av 1 (Abb. 1.4C) zeigen bei einer Sequenzidentität von 59,1 % eine identische Topologie. Sie bestehen aus einem siebensträngigen antiparallelem  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices (Gajhede *et al.* 1996, Schweimer *et al.* 1999, Neudecker *et al.* 2001a). Beide Proteine weisen ähnlich wie die Lipocaline Mus m 1 und Bos d 1 einen großen Hohlraum im Inneren des Moleküls auf. Die physiologische Funktion von Bet v 1 als auch von Pru av 1 ist derzeit noch nicht bekannt. Die strukturelle Ähnlichkeit zu einem am Steroidstoffwechsel beteiligten Protein sowie die Ergebnisse einer molekularen Modellierung von Pru av 1, die zeigen, dass der Hohlraum der Proteine zwei Castasteronmoleküle simultan beherbergen kann, deuten auf eine mögliche Funktion als Steroid-bindendes Protein hin (Neudecker *et al.* 2001a). Die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Pollenallergen Bet v 1 und dem Nahrungsmittelallergen Pru av 1 kann eine mögliche Erklärung für die beobachtete Kreuzreaktivität dieser Allergene sein (Neudecker *et al.* 2001a).



**Abb. 1.4:** Darstellung der dreidimensionalen Strukturen der Allergene Bos d 5 (A), Der p 2 (B), Pru av 1 (C), Api m 2 (D).

PDB-Kennung: Bos d 5: 1BEB; Der p 2: 1A9V; Pru av 1: 1E09; Api m 2: 1FCQ. Die Abbildungen wurden mit dem Programm MolMol erstellt.

Ein weiteres Beispiel für Allergene mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Struktur ist das Bienenallergen Api m 1 (Abb. 1.4D). Das Protein, eine Hyaluronidase, weist die typische Topologie eines klassischen „TIM barrels“ auf. Die Fässstruktur wird durch sieben  $\beta$ -Stränge gebildet. Die an der Außenseite des Fasses gelegenen  $\alpha$ -Helices verbinden parallele Faltblattstränge.

Obwohl Allergene nur einer kleinen Zahl von Strukturfamilien angehören, können keine allgemeinen Strukturmerkmale definiert werden.

Für die ubiquitär in Pflanzen vorkommende Strukturklassen der  $\alpha$ -helikalen 2S Albumine sind keine hochaufgelösten NMR- oder Röntgenstrukturen bekannt. Die Gruppe der 2S Albumine enthält jedoch viele potente Lebensmittelallergene, darunter auch drei Erdnussallergene. Die Erdnussallergie, vor welcher nur ein Schutz bei absolutem Verzicht auf Erdnussprotein-haltige Lebensmittel möglich ist, zeichnet sich durch eine besonders schwere klinische Symptomatik aus. Verlässliche strukturelle Daten dieser potenten allergenen Proteine sind nicht nur von theoretischem Interesse hinsichtlich eines verbesserten Verständnisses der molekularen Grundlagen des allergischen Geschehens. Sie sind ebenso

---

von praktischer Bedeutung wie beispielsweise für die Entwicklung von hypoallergenen Proteinen, welche eine Voraussetzung für sichere prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen darstellen.

## 2 Ziele

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der dreidimensionalen Strukturen der allergenen 2S Albumine Ara h 2 und Ara h 6 aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*). Die strukturellen Eigenschaften der Proteine als mögliche Determinanten ihrer Allergenizität sollten mit für Lebensmittelallergene wichtigen molekularen Charakteristika wie der Stabilität gegenüber hohen Temperaturen oder gegenüber Hydrolysen durch Verdauungsenzyme korreliert werden.

Erdnussallergien, welche sich durch eine besonders schwere klinische Symptomatik auszeichnen, waren in der Vergangenheit vor allem Gegenstand zahlreicher immunologischer Untersuchungen mit dem Ziel der Entwicklung von therapeutischen oder prophylaktischen Behandlungsmöglichkeiten. Neben immunologischen Daten für das Hauptallergen Ara h 2 liegen jedoch kaum Informationen zu biochemischen oder strukturellen Eigenschaften der Erdnussallergene vom 2S Albumintyp vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Erdnussallergen Ara h 2 aus seiner natürlichen Quelle isoliert und charakterisiert werden. Dabei sollte vor allem das Vorliegen von posttranslationalen Modifikationen - wie aus anderen 2S Albuminen bekannt - geprüft werden, um die Eignung von heterologen Expressionssystemen für die Herstellung von authentischen Erdnuss 2S Albuminen abzuschätzen.

Für weiterführende strukturbiochemische Untersuchungen sollten effektive rekombinante Expressionssysteme für die Erdnuss 2S Albumine Ara h 2 und Ara h 6 entwickelt werden. Die Identität der Allergene als hochgradig disulfidverbrückte Proteine eukaryotischer Herkunft stellt besondere Anforderungen an heterologe Darstellungsverfahren. Bisher existiert für die Allergene Ara h 2 und Ara h 6 kein ausreichend leistungsfähiges Expressionssystem. Die strukturelle und immunologische Integrität rekombinant hergestellter Proteine sollte am Beispiel von Ara h 2 durch vergleichende Untersuchungen mit dem aus der Erdnuss gewonnenen natürlichen Ara h 2 Protein sichergestellt werden.

Zu den problematischsten Eigenschaften der Erdnussallergene gehören die Erhaltung der IgE-Bindungsaktivität auch nach der Nahrungsmittelverarbeitung und das Fehlen von effektiven Verfahren zur Reduktion der Allergenizität des Nahrungsmittels: Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass weder Erhitzen noch Hydrolyse mit Verdauungsenzymen die Allergenizität von Erdnussextrakten signifikant beeinflussen kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob eine entsprechende thermische und proteolytische Stabilität der

gereinigten rekombinanten Proteine Ara h 2 und Ara h 6 vorliegt. Darüber hinaus sollten die molekularen Ursachen für eine potentielle Stabilität mit besonderer Beachtung struktureller Aspekte untersucht werden. Insbesondere die Produkte proteolytischer Reaktionen mit Verdauungsenzymen sollen als letztlich für die Immunantwort relevante Spezies biophysikalisch charakterisiert werden.

Für ein Verständnis der molekularen Ursachen allergischer Erkrankungen als auch für die Entwicklung von Immuntherapeutika ist die Kenntnis der Struktur der verursachenden allergenen Proteine von entscheidender Bedeutung.

Für Erdnussallergene liegen derzeit keine experimentellen Strukturdaten vor. Während die Allergene Ara h 1 und Ara h 5 hohe Sequenzidentitäten zu Proteinen bekannter dreidimensionaler Strukturen aufweisen und Strukturinformationen über komparative Modellierungen gewonnen werden kann, ist dies für die drei in der Erdnuss vorkommenden 2S Albumine (Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7) nicht möglich. Die Qualität der einzigen Tertiärstruktur eines 2S Albumins und die niedrige Sequenzidentität eignet sich nicht für zuverlässige theoretische Vorhersagen.

Dementsprechend sollten die beiden Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6, für welche geeignete rekombinante Expressionssysteme etabliert werden müssen, an Hand erster NMR-Spektren auf ihre Eignung zur NMR basierten Strukturbestimmung geprüft werden. Von einem geeigneten Vertreter sollte die Lösungsstruktur mit NMR-Methoden ermittelt werden. Diese kann als Grundlage zur Homologiemodellierung anderer 2S Albumine genutzt werden.

Die Kenntnis von dreidimensionalen Strukturen allergener Proteine ist Voraussetzung zur Identifizierung konformationeller Epitope, zum Verständnis von Kreuzreaktionen und zur Entwicklung von Proteinen mit reduziertem allergenen Potenzial.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Geräte und Chemikalien

Die folgenden Aufzählungen beinhalten die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Chromatographiematerialien.

##### Verwendete Geräte

ÄKTApurifier 10-System	Amersham Biosciences, Freiburg
Kontron HPLC System	Kontron, Eching
P1-Pumpe	Amersham Biosciences, Freiburg
Waters HPLC System	Waters, Eschborn
C25KC Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Inkubatorschüttler Certomat HK/R	B. Braun Biotech International, Melsungen
Brutschrank Modell 200	Memmert, Schwabach
Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe HS	Kendro, Hanau
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Autoklav 23	Melag, Berlin
Kühlzentrifuge Centrikon T-124	Kontron, Eching
Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge Centrikon T-1170	Kontron, Eching
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge pico	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge stratos	Kendro, Hanau
SpeedVac vacuubrand	ABM Graffenberger Antriebstechnik, Marktrechwitz
Christ Alpha RVC	Christ, Osterode
Christ Alpha 1-4	Christ, Osterode
Hochvakuumpumpe	Balzers Pfeiffer, Aßlar
Gelkammern Mighty Small SE250/260	Hofer, San Francisco, CA, USA
PowerPac 3000	Bio-Rad, München
PowerPac 300	Bio-Rad, München
Multidrive XL	Amersham Biosciences, Freiburg
Gelkammer Agagel Maxi	Biometra, Göttingen

Gelkammer Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Mini Sub DNA Cell	Bio-Rad, München
Geldokumentationssystem Gel-Doc 2000	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
UV/VIS-Spektrometer Kontron 930	Kontron, Neufahrn
UV-Visible Spektrophotometer Helios $\gamma$	Thermo Spectronic, Cambridge, UK
Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
CD-Spektropolarimeter J-810 S	JASCO International, Tokyo, Japan
Temperatur-Kontrolleinheit CDF-426S	JASCO International, Tokyo, Japan
NMR-Spektrometer DRX-600	Bruker, Karlsruhe
NMR-Spektrometer DRX-400	Bruker, Karlsruhe
NMR-Spektrometer DMX-750	Bruker, Karlsruhe
LCT time of flight Massenspektrometer	Micromass Limited, Wythenshawe, UK
Feinwaage AC 1215	Sartorius, Göttingen
Waage MC1	Sartorius, Göttingen
pH-Meter WTW inoLab	WTW, Weilheim
WTW pH 535 MultiCal	WTW, Weilheim
Sonifier Labsonic u	B. Braun Biotech International, Melsungen
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Blotting Apparatur SEMI-PHOR™	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

### Spezielle Chemikalien

Amersham Biosciences (Freiburg): Q-Sepharose™Fast Flow

Bio-Rad (München): Protein-MW-Standard („low-range“: Phosphorylase B: 97,4 kDa, BSA: 66,2 kDa, Ovalbumin: 45,0 kDa, Carbonanhydrase: 31,0 kDa, Trypsininhibitor: 21,5 kDa, Lysozym: 14,4 kDa)

Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA):  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid (98 %)

CAMPRO (Veenendaal, Niederlande):  $^{15}\text{N}$ -Leucin (>98%  $^{15}\text{N}$ ), D-Glukose- $^{13}\text{C}_6$  (99 %  $^{13}\text{C}$ )

Clontech (Heidelberg): TALON™ Superflow

Eurisotop (Gif-sur-Yvette, Frankreich):  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8 % D)

GERBU (Gaiberg): Ampicillin, Kanamycinsulfat, 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP), Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)

Fluka (Neu-Ulm): Trifluoressigsäure (TFA), N-Dimethylformamid,

3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), 2-Mercaptoethanol, Tetracyclinhydrochlorid, Vitamin B<sub>1</sub>-hydrochlorid, Ethidiumbromid, Coomassie Brilliant Blau

Invitrogen (Groningen, Niederlande): Mark 12 MW Standard (Myosin: 200 kDa,  $\beta$ -Galactosidase: 116,3 kDa, Phosphorylase b, BSA: 66,3 kDa, Glutamatdehydrogenase: 55,4 kDa, Lactatdehydrogenase: 36,5 kDa, Carbonanhydrase: 31 kDa, Trypsininhibitor: 21,5 kDa, Lysozym: 14,4 kDa, Aprotinin: 6 kDa, Insulin B-Kette: 3,5 kDa, Insulin A-Kette: 2,5 kDa), NuPAGE<sup>®</sup>Novex Bis-Tris Gele, T4-DNA-Ligase

MBI Fermentas (Vilna, Litauen): *Bgl*III, *Bpu*1102I, *Eco*RI, *Eco*47I, *Hind*III, *Nco*I, *Taq*-DNA-Polymerase, alkalische Phosphatase

Macherey & Nagel (Düren): Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid Kit

New England Biolabs (Schwalbach/Taunus): *Vent*-DNA-Polymerase, PNGase F

Novagen (Madison, USA): 20% Tween 20, Enterokinase (rekombinant)

Roche (Mannheim): Proteaseinhibitorcocktail Complete EDTA-free, PNGase A

Roth (Karlsruhe): p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Glycin, 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), Agarose, Roti<sup>®</sup>Load1, Chloramphenicol, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Natriumdodecylsulfat (SDS), Lithiumdodecylsulfat (LDS), Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Serva (Heidelberg): L-Leucin

Sigma (München): Trypsin, Chymotrypsin, Anti-Rabbit IgE AP-konjugiert, Lysozym, Adenosintriphosphat (ATP), Rinderserumalbumin (BSA), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)

Qiagen (Hilden): QIAquick<sup>®</sup> Nucleotide Removal Kit, QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit

Immundetektionen mit den Patientensera JG3, Um33 und Gk31 wurden im Labor von Dr. Wolf-Meinhard Becker (Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Aldrich, Sigma, Fluka, Roth, Roche, Serva und Merck bezogen.

## Sonstige Materialien

Macherey & Nagel (Düren): SP 250/21 Nucleosil 100-7 C18 Säule, ET 125/4 Nucleosil 100-5 C18 Säule; Waters (Eschborn): RCM 8 × 10 Modul, PrePLC™ 25 mm Modul; Sartorius (Göttingen): Nitrocellulose-Blotting-Membran, Minisart Sterilfilter (0,45 µm), Cellulose Acetat-Filter; Millipore (Bedford, USA): Ultrafiltrationsmembran (YM3, YM 10); Roth (Karlsruhe): Spectra/Por-Dialyseschlauch (MWCO:1000); Whatman (Maidstom, England): Chromatography paper; Schleicher & Schuell (Dassel): Westran® Membran; Amersham Biosciences, Freiburg: Superdex Peptide-Säule (HR 10/30)

## 3.2 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tab. 3.1 Zusammenstellung von Stamm, Genotyp und Referenz der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr</i> , <i>hsdRMS</i> , <i>mcrBC</i> ), φ80 <i>lacZ</i> M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Grant <i>et al.</i> 1990
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> <sub>B</sub> ( <i>r</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> , <i>m</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	Studier & Moffatt 1986 Studier 1991
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> , <i>m</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> <sup>+</sup> , Tet <sup>r</sup> , <i>gal</i> λ, (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [ <i>argU ileYleuW Cam</i> ]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, <i>araD</i> 139, Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , Δ <i>phoAPvuII</i> , <i>phoR</i> , F <sup>+</sup> [ <i>lac</i> <sup>-</sup> ( <i>lacI</i> <sup>q</sup> ) <i>pro</i> ], <i>gor</i> 522:: <i>Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> ), <i>trxB</i> :: <i>kan</i> , (DE3)	Prinz <i>et al.</i> 1997
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, Δ <i>lacX74</i> , Δ <i>phoAPvuII</i> , <i>phoR</i> , Δ <i>malF3</i> , F <sup>+</sup> [ <i>lac</i> <sup>+</sup> ( <i>lacI</i> <sup>q</sup> ) <i>pro</i> ], <i>trxB</i> :: <i>kan</i> , (DE3)	Derman <i>et al.</i> 1993

### 3.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Tab. 3.2 Übersicht der verwendeten Plasmide unter Angabe ihrer selektierbaren Antibiotikaresistenz, ihres Verwendungszwecks und der entsprechenden Quellen.**

<i>Plasmid</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Eigenschaft</i>	<i>Referenz/Quelle</i>
pET-16b	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET-32a	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pBluescriptKS	Ap	Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pRARE	Cm	pACYC184-Derivat mit tRNA-Gene für die Codons: AGG AGA, AUA, CUA, CCC, GGA	Novagen, Madison, USA
pLysS	Cm		Novagen, Madison, USA
pET16b-His-Arah2.02	Ap	pET16b-Derivat mit integriertem Arah2.02-Gen und Hexahistidinanhang	Dr. W.-M. Becker, Forschungszentrum Borstel
pBluescript-Arah2	Ap	pBluescript-Derivat mit integriertem Arah2-Gen ohne Hexahistidinanhang	diese Arbeit
pET16b-Arah2	Ap	pET16b-Derivat mit integriertem Arah2-Gen	diese Arbeit
pET32a-Trx-His-EK-Arah2	Ap	pET32a-Derivat mit integriertem Arah2-Gen und zusätzlicher Enterokinaseerkennungssequenz	diese Arbeit
pET32a-Trx-His-PR-Arah2	Ap	pET32a-Derivat mit integriertem Arah2-Gen und NH <sub>2</sub> -terminaler PreScission-Proteaseerkennungssequenz	diese Arbeit
pUBS520	Kan	pBR322-Derivat mit tRNA-Gen für AGG und AGA Codons	Prof. Dr. R. Mattes, Universität Stuttgart
pUBS520-Cm	Cm	pBR322-Derivat mit tRNA-Gen für AGG und AGA Codons	diese Arbeit
pET32a-Trx-His-PR-Arah6	Ap	pET32a-Derivat mit integriertem Arah6-Gen und NH <sub>2</sub> -terminaler PreScission-Proteaseerkennungssequenz	diese Arbeit
pMalc-2-Arah6	Ap	pMalc-2-Derivat mit integriertem Arah6-Gen	Dr. W.-M. Becker, Forschungszentrum Borstel

### 3.4 Nukleotide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) oder BioTeZ (Berlin) bezogen, Desoxyribonukleotide (dNTPs) von der Firma MBI Fermentas (Vilna, Litauen).

**Tab. 3.3 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide unter Angabe ihrer Nukleotidsequenzen und Längen.**

<i>Bezeichnung</i>	<i>Nukleotidsequenz</i>	<i>Länge</i>
Arah2m1-5'	5'-gga gga gaa ttc gga gga gga ccc gta cag ccc tag tcc ata tga tgc g-3'	49-mer
Arah2m2-3'	5'-gga gga ggt cct gac tag ggc tgt acg gat ccc gtt cat atg aat cct c-3'	49-mer
Arah2m3-5'	5'-gga gga cgt tgc gac ttg gat gtc-3'	24-mer
Arah2tagless-5'	5'-gga gga gaa ttc acc atg gcg cgt cag cag tgg gaa ctc caa gga gac-3'	48-mer
Arah2rev-3'	5'-gga gga aag ctt gct cag ctt agt atc tgt ctc tgc cgc cac-3'	42-mer
Arah2EK-5'	5'-gga gga gaa ttc aga tct gga cga cga cga caa gcg tca gca gtg gga act cca agg aga c-3'	61-mer
Arah2PR-5'	5'-gga gga gaa ttc aga tct gct gga agt gct gtt tca ggg ccc gcg tca gca gtg gga act cca agg-3'	66-mer
Cm-pLysS-5'	5'-gga gga aag ctt taa ata aga tca cta ccg ggc g-3'	34-mer
Cm-pLysS-3'	5'-gga gga gga tcc gcg tag cac cag gcg ttt aag g-3'	34-mer
Arah6-5'	5'-gga gga gaa ttc aga tct gct gga agt gct gtt tca ggg-ccc-gat-gag gcg cga gag ggg gag aca gg-3'	68-mer
Arah6-3'	5'-gga gga aag ctt gct cag ctt aac tgc atc tgc cgc cac tca cgt cc-3'	47-mer
T7-Promotor	5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'	20-mer
T7-Terminator	5'-ggg gtt atg cta gtt att gg-3'	20-mer
T7-Terminator-2	5'-caa gac ccg ttt aga gg-3'	17-mer
pUCseq	5'-cag gaa aca gct atg ac-3'	17-mer
pUCseqrev	5'-gga aac agc tat gac cat g-3'	19-mer
trx-5'	5'-ggt cag ttg aaa gag ttc ctc g-3'	22-mer

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Anwendung eines kommerziellen, auf Anionenaustauschchromatographie basierenden Kits (Nucleospin® Plasmid Kit, Macherey & Nagel, Düren). Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers (Macherey & Nagel, Düren).

## **3.5.2 Reinigung und Fällung von DNA**

### **3.5.2.1 Butanolfällung**

Butanol als Fällungsmittel (Thomas 1994) wurde zur Präzipitation von DNA aus Ligationsansätzen verwendet (Kap. 3.5.3.3). Hierfür wurde das zehnfache Volumen *n*-Butanol zu einem entsprechenden Ansatz pipettiert und bis zur Aufhebung der Phasentrennung durch Vortexen oder Schütteln gemischt. Anschließend wurde die DNA durch 30-minütige Zentrifugation ( $10000 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) präzipitiert. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig abgezogen und das verbleibende DNA-Pellet nach vollständigem Trocknen in  $10 \text{ }\mu\text{l}$  *aqua bidest.* aufgenommen. Die gelöste DNA konnte direkt für eine Elektroporation (Kap. 3.5.5.2) eingesetzt werden.

### **3.5.2.2 Reinigung von DNA über Silikagelmembranen**

Zum Entsalzen von DNA und zum Entfernen von Enzymen aus DNA-Lösungen wurden Säulen mit Silikagelmembran verwendet (QIAquick spin columns, QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden). Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (QIAquick Spin Handbook, Qiagen, Hilden). Die an die Silikamembran gebundene DNA wurde standardmäßig mit  $40 \text{ }\mu\text{l}$   $2 \text{ mM}$  Tris, pH 8 eluiert.

### **3.5.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Abtrennung von Oligonukleotiden oder Plasmid-DNA bzw. sonstiger unerwünschter DNA-Spezies nach einer PCR-Reaktion wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.1.1) durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) wiedergewonnen. Die Durchführung der DNA-Reinigung erfolgte nach Herstellervorschrift (QIAquick Spin Handbook, Qiagen, Hilden). Eluiert wurde die DNA standardmäßig mit  $40 \text{ }\mu\text{l}$   $2 \text{ mM}$  Tris, pH 8.

## **3.5.3 Modifikation von DNA**

### **3.5.3.1 Restriktion**

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Die DNA wurde für mindestens  $1,5 \text{ h}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$

mit 2-10 Units Enzym /  $\mu\text{g}$  DNA inkubiert. Die Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen wurde parallel durchgeführt, falls für beide Reaktionen identische Puffer eingesetzt werden konnten. Bei nichtidentischem Pufferbedarf erfolgte der Verdau nacheinander, wobei die DNA über eine Silikagelmembran (QIAquick spin columns, QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden) nach dem ersten Inkubationsschritt von Salz und Enzym gereinigt wurde (Kap. 3.5.2.2). Sollte die DNA weiteren enzymatischen Schritten unterzogen werden, wurden die eingesetzten Enzyme entweder durch Erhitzen auf 65 °C oder 80 °C für 20 min inaktiviert oder im Fall von nicht inaktivierbaren Enzymen durch QIAquick-spin-Säulen (Qiagen, Hilden) abgetrennt.

### 3.5.3.2 Dephosphorylierung von 5'-überhängenden Enden

Dephosphorylierungsreaktionen wurden mit 1 U alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase (CIP), MBI Fermentas, Vilna, Litauen) pro  $\mu\text{g}$  DNA in Dephosphorylierungspuffer (0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 M  $\text{MgCl}_2$ ) durchgeführt. Bei thermaler Inaktivierbarkeit der Restriktionsenzyme konnte direkt nach Verdau und Inaktivierung in einem der 5 Puffer des *Five Buffer Plus Systems* der Firma MBI Fermentas ( $\text{B}^+$ -,  $\text{G}^+$ -,  $\text{O}^+$ -,  $\text{R}^+$ -,  $\text{Y}^+$ -Puffer, MBI Fermentas, Vilna, Litauen) dephosphoryliert werden. Die Inkubation erfolgte in 2 Schritten, wobei nach der ersten 30 minütigen Inkubation bei 37 °C erneut 1 U alkalische Phosphatase zum Ansatz hinzugegeben wurde und ein zweiter 30 minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C folgte. Enzym und Puffer wurden vor weiteren enzymatischen Reaktionsschritten durch QIAquick-spin-Säulen (Qiagen, Hilden) entfernt.

### 3.5.3.3 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurden 20-100 ng dephosphorylierter Vektor (Kap. 3.5.3.2) und das DNA-Fragment mit einem Vektor : Insert Verhältnis zwischen 1:5 und 1:20 in T4-Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) Polyethylenglykol 8000) für mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C mit 1 Unit T4-Ligase (Invitrogen, Groningen, Niederlande) inkubiert.

## 3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.* 1985) wurde in dieser Arbeit zur Klonierung, Mutagenese, Sequenzierung und zum Auffinden positiver Transformanten verwendet.

### 3.5.4.1 PCR mit Linker-Primern

Um die flankierenden Bereiche von DNA-Fragmenten zu verändern, wurde eine PCR mit Linker-Primern durchgeführt. Diese wiesen neben dem zur Matrize komplementären Bereich zusätzliche, zur Matrize nicht komplementäre Sequenzen auf. Dadurch konnten Sequenzen für Restriktions- oder Proteaseschnittstellen bzw. Sequenzen für Affinitätsanhänge generiert werden. Außerdem ermöglichte dieses Verfahrens den Austausch von Aminosäuren durch Punktmutationen am 5'- und 3'-Ende des Gens.

50-200 ng Plasmid-DNA, je 100 pmol 5'- bzw. 3'-Oligonukleotid und 2 µmol jedes dNTPs wurden in 100 µl PCR-Puffer (10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % (w/v) Triton X-100) vorgelegt. Nach Zugabe von 2 U Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert. Standardmäßig wurden jeweils 25 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Primer-Annealing bei einer dem GC-Gehalt der Primer angepassten Temperatur (T<sub>m</sub>) und Primer-Verlängerung bei 72 °C über einen Zeitraum von 6-10 s pro 100 bp durchgeführt (GeneAmp PCR System 9600 oder GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Zur Vervollständigung der Amplifikation wurde der letzte Primer-Verlängerungsschritt um 2 min verlängert und der PCR-Ansatz bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Berechnung des T<sub>m</sub>-Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,4 + 0,41 * (GC - \text{Gehalt}) - \frac{650}{\text{Oligonukleotidlänge}} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit Hilfe einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese von Ausgangsplasmid und Oligonukleotiden sowie von Puffern und Enzymen befreit (Kap. 3.7.1.1). Die Wiedergewinnung von DNA aus dem Agarosegel erfolgte wie in Kap. 3.5.2.3 beschrieben.

### 3.5.4.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Landt

Diese Methode ermöglicht über eine Zwei-Schritt-PCR-Reaktion die Mutation einer einzelnen Base im inneren Bereich eines Gens, welcher nicht durch Linker-Primer abzudecken ist (Landt *et al.* 1990). In einem ersten Schritt wird mit Hilfe eines den Basenaustausch enthaltenden Mutageneseprimers und eines entsprechenden 5'- oder 3'-

Primers ein Oligonukleotid-Amplifikat erhalten, welches in einer zweiten PCR als Doppelstrang-Primer eingesetzt werden kann. Die Orientierung des Mutagenesprimers wurde so gewählt, dass ein möglichst kurzes Oligonukleotid-Amplifikat entsteht. Der erste PCR-Schritt wurde wie unter Kap. 3.5.4.1 beschrieben durchgeführt. Das amplifizierte doppelsträngige DNA-Fragment wurde über eine präparative Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel präpariert (Kap. 3.7.1.1, 3.5.2.3). Das gereinigte Oligonukleotid-Amplifikat wurde anschließend in Kombination mit einem geeigneten Gegenstrangprimer für den zweiten PCR-Schritt eingesetzt, der ebenfalls wie unter Kap. 3.5.4.1 beschrieben, durchgeführt wurde. Das Reaktionsprodukt wurde wiederum einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen und aus dem Agarosegel extrahiert (Kap. 3.7.1.1, 3.5.2.3).

### **3.5.4.3 Kolonie-PCR**

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung wurden Bakterienkolonien direkt als DNA-Lieferant für eine PCR eingesetzt. Auf eine Präparation von plasmidaler DNA konnte verzichtet werden. Als PCR-Primer dienten Oligonukleotide, die stromaufwärts bzw. stromabwärts des klonierten Fragments hybridisierten. In einem PCR-Gefäß wurden 1,3  $\mu\text{M}$  5'- bzw. 3'-Oligonukleotid, 200  $\mu\text{M}$  jedes dNTP's, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris, pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08 % (w/v) Nonidet P-40 und 0,1 mg/ml BSA vorgelegt. Anschließend wurde 1 U Taq-DNA Polymerase (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) pro 50  $\mu\text{l}$  Ansatz auf Eis zupipettiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine gut separierte Kolonie von einer Agarplatte mit Transformanten abgenommen und in das PCR-Gefäß getaucht. Der identische Zahnstocher wurde anschließend in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der PCR-Ansatz wurde 5 min bei 95 °C denaturiert. Es folgten 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Annealing bei 50 °C und 1 min Primer-Extension bei 72 °C. Der letzte Primer-Extension-Schritt wurde um 2 min verlängert. Die PCR-Ansätze wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Von Kolonien, die nach PCR eine Amplifikation eines DNA-Fragments der Größe des klonierten Gens zeigten, wurde eine Plasmid-Präparation nach Übernachtskultivierung durchgeführt. Die präparierte DNA wurde einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen (Kap. 3.5.4.4).

### **3.5.4.4 DNA-Sequenzierung**

Plasmid-DNA wurde von der Firma TOPLAB/MediGenomix (Martinsried) oder AGOWA (Berlin) durch Cycle-Sequencing mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminator auf einem ABI-System sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI-Prism-Software.

Die Analyse von DNA- oder Proteinsequenzen erfolgte mit dem Programmpaket GCG (Genetics Computer Group, Madison, USA)

### 3.5.5 Transformation von Bakterien

#### 3.5.5.1 CaCl<sub>2</sub>-Transformation

Die CaCl<sub>2</sub>-Transformation (Hanahan 1983) wurde verwendet um präparierte Plasmid-DNA (Kap. 3.5.1) in *E. coli* Expressionsstämme zu übertragen.

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurden 200 ml LB-Medium (Kap. 3.6.1.1) mit einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2000 × g für 10 min bei 4 °C pelletiert, in 20 ml eiskalter CaCl-Lösung (50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert (3000 × g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und durch erneutes Zentrifugieren pelletiert (3000 × g, 10 min, 4 °C). Nach Resuspension in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung standen die Zellen für eine Transformation zur Verfügung. Nicht sofort verwendete Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 40 µl Aliquots der kompetenten Zellen mit 20-100 ng Plasmid-DNA versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Es erfolgte eine weitere zehnminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB (Kap. 3.6.1.1) wurden die Transformationsansätze für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 100 µl der Zellsuspension und ein Konzentrat aus den restlichen pelletierten und in 50 µl LB resuspendierten Zellen wurden auf Selektivmedium-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### 3.5.5.2 Elektrotransformation (Elektroporation)

Die Elektroporation (Dower *et al.* 1988) wurde zur Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli* TOP10 oder von Plasmid-DNA in *E. coli* Origami(DE3) und in *E. coli* AD494(DE3) eingesetzt.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde 1 Liter LB-Medium (Kap. 3.6.1.1) mit einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurden die Zellen durch eine 15-minütige Zentrifugation

(3000 × g, 4 °C) geerntet und in einen Liter einer 10 %igen (w/v) Glycerinlösung resuspendiert. Es folgten drei weitere Zentrifugationsschritte (3000 × g, 4 °C). Die Resuspension der Pellets erfolgte in abnehmenden Volumina 10 %iger (w/v) Glycerinlösungen (500 ml, 250 ml, 3 ml). Die Resuspensionsschritte erfolgten auf Eis, eine Erwärmung der Zellen und Lösung wurde streng vermieden. Die Zellen standen nach der letzten Resuspension in 3 ml Glycerinlösung für die Transformation zur Verfügung. Nicht sofort verwendete kompetente Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Elektroporation wurden etwa 5-100 ng Plasmid-DNA in 1-3 µl *aqua bidest.* in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (0,1 cm, BioRad, München) mit 40 µl elektrokompenter Zellen gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Nach Einsetzen der Küvette in den Schlitten des Elektroporators und dem Einschieben desselben in die Schockkammer erfolgte ein 1,8 kV-Puls. Der Transformationsansatz wurde mit 500 µl LB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 100 µl der Zellsuspension und ein Konzentrat aus den restlichen pelletierten und in 50 µl LB resuspendierten Zellen wurden auf Selektivmedium-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## **3.6 Mikrobiologische und präparative Arbeitsmethoden**

### **3.6.1 Kultivierung von Biomasse**

#### **3.6.1.1 Kulturmedien**

Alle Medien wurden mit *aqua bidest.* hergestellt und zur Sterilisation autoklaviert (120 °C, 20 min, 1,2 bar; Autoklav Typ 23, bzw. Varioklav, Melag, Berlin). Für die Herstellung von Selektivmedien wurde den sterilisierten Medien nach Abkühlen auf etwa 50 °C sterilfiltriertes (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Antibiotikum (Endkonzentrationen: Ampicillin 200 µg/ml; Kanamycin 15 µg/ml; Tetracyclin 12,5 µg/ml; 34 µg/ml Chloramphenicol) zugesetzt.

### LB-(Luria Bertani)-Flüssigmedium

10 g Pepton, tryptisch verdaut, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, *ad* 1 Liter mit *aqua bidest.*

### Nährmedium für Agarplatten

LB-Medium (10 g Pepton (tryptisch verdaut), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, *ad* 1 Liter mit *aqua bidest.*) wurde mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar versetzt und 20 min bei 120 °C autoklaviert (1,1 bar). Nach Abkühlen auf ca. 80 °C wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt und Petrischalen (92 × 16 mm) mit je 10 ml Agar-haltigem LB-Medium befüllt.

### Minimalflüssigmedium

Zur Bakterienanzucht in Minimalmedium wurde M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.* 1989) als Grundlage verwendet. 1 l Minimalmedium wurde mit 1 ml TS2 Spurenelementlösung (Meyer & Schlegel 1983), 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 10 mM Fe(III)-citrat, 0,1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>, 20 ml 20 % (w/v) Glukose, sowie 0,1 ml 0,5 % (w/v) Vitamin B<sub>1</sub>-Hydrochlorid versetzt. Die Kultivierung des Leucin-auxotrophen Stammes *E. coli* Origami(DE3) erforderte die Zusetzung von 40 µg/ml L-Leucin bzw. <sup>15</sup>N L-Leucin (>98% <sup>15</sup>N). Bei der Anzucht von Zellen für die Expression von markiertem Protein wurde D-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glukose (99 % <sup>13</sup>C) und/oder <sup>15</sup>N NH<sub>4</sub>Cl (98% <sup>15</sup>N) verwendet.

**5-fach M9 Stammlösung:** 33 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O, 15,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH<sub>4</sub>Cl bzw. <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl *ad* 1 Liter *aqua bidest.*

**Spurenelementlösung TS2:** 100 mg ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 30 mg MnCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O, 300 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200 mg CoCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 20 mg NiCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 10 mg CuCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 900 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 20 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> *ad* 1 Liter *aqua bidest.*

### **3.6.1.2 Herstellung von Dauerkulturen**

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden frische LB-Übernachtskulturen verwendet. 1,5 ml Übernachtskultur wurden zu 350 µl sterilisiertem Glycerin pipettiert, vermengt und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.6.1.3 Kultivierung

Vor der Anzucht von größeren Mengen an Bakterien wurde von jedem Bakterienstamm mit dem gewünschten Expressionsplasmid Induktionsversuche im kleinen Maßstab durchgeführt. Dazu wurde 5-10 ml LB-Medium nach Zusatz entsprechender Antibiotika mit 100 µl Glycerindauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 bis 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 250-ml-Erlenmeyerstichkolben mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1-0.3 beimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,8 wurde die Expression des Zielproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde für weitere 3 bis 5 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Probennahme vor und stündlich nach Induktion im SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 3.7.1.2) überprüft. Dabei wurde Bakteriensuspension, die einer optischen Dichte von 1,0 OD<sub>600</sub> entsprach durch Zentrifugation (13000 × g, 5 min) pelletiert, in 50 µl Roti-Load-1×-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. 10 µl der Probe wurden jeweils auf 19 ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.

Zur Gewinnung größerer Mengen Biomasse wurden 3-l-Erlenmeyerstichkolben verwendet. 10 bis 100 ml Vorkulturen wurden mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit 500 µl Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für eine Kultivierung im Minimalmedium wurde M9-Medium mit der Spurenelementlösung TS2, den entsprechenden Salzen, Glukose, den entsprechenden Antibiotika und im Fall des Leucin-auxotrophen Stammes *E.coli* Origami(DE3) mit 40 µg/ml Leucin, versetzt (Kap. 3.6.1.1). 500 – 1000 ml LB- oder Minimalmedium wurden im 3-l-Erlenmeyerstichkolben mit Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,1 und 0,3 angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden entweder nach drei- bis vierstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm oder nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 200 rpm durch Zentrifugation (5000 × g, 15 min, 4 °C) geerntet.

## 3.6.2 Herstellung zellfreier Extrakte

### 3.6.2.1 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Zellaufschlüsse wurden generell unter nativen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde das bei -20 °C eingefrorene Zellpellet in dem 3- bis 5-fachen Volumen an entsprechendem Aufschlusspuffer (Ara h 2: 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8 bzw. Ara h 6: 100 mM

Tris/HCl, pH 8,5) in Gegenwart von 0,2 mg/ml Lysozym, DNase I und einer Proteaseinhibitortablette (Proteaseinhibitorcocktail Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim) resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgten drei 40 s Ultraschallbehandlungen (150 W, Labsonic U, B. Braun Biotech International, Melsungen), wobei die Probe auf Eis gehalten wurde, um ein übermäßiges Erhitzen derselben zu vermeiden. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation ( $20000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ\text{C}$ ) von Membranen und Zelltrümmern abgetrennt und stand für die nachfolgenden Chromatographien zur Verfügung.

### 3.6.2.2 Herstellung von Erdnussextrakten

Zur Gewinnung von natürlichem Ara h 2 wurden handelsübliche Erdnüsse verwendet. Diese wurden geschält, stark zerkleinert und anschließend durch Mörsern zerrieben. Die Extraktion von Erdnussprotein erfolgte durch zweistündiges Rühren des zerkleinerten Erdnussmaterials in 20 mM Tris/HCl, pH 8 in Gegenwart einer Tablette eines Proteaseinhibitorcocktails (Proteaseinhibitorcocktail Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim) bei Raumtemperatur. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei  $5000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  wurde das sich an den Wänden des Zentrifugengefäßes absetzende Fett durch vorsichtiges Abschöpfen entfernt. Unlösliches Erdnussmaterial wurde durch eine weitere 30-minütige Zentrifugation bei  $13000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Der gewonnene Erdnussextrakt wurde abschließend durch Filtration durch einen Faltenfilter von Schwebeteilchen befreit.

Zum Zwecke der Analyse von Erdnussproteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zerriebenes Erdnussmaterial lediglich in Probenpuffer (Roti-Load-4 $\times$ -Puffer, Roth, Karlsruhe, Verhältnis 1:4 (v/v)) gelöst, durch 5 minütiges Erhitzen bei  $90^\circ\text{C}$  denaturiert und anschließend durch Zentrifugation (5 min,  $13000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) von unlöslichen Bestandteilen befreit.

### 3.6.3 Proteinreinigung

Umkehrphasenchromatographien wurden an den HPLC-Anlagen Kontron HPLC System (Kontron, Eching) und Waters HPLC System (Waters, Eschborn) durchgeführt, für alle anderen Chromatographien wurde das FPLC-(Fast Performance Liquid Chromatography)-System ÄKTApurifier 10 (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet.

### 3.6.3.1 Metallionen-Affinitätschromatographie an TALON-Superflow

Die Reinigung von Thioredoxininfusionsproteinen mit carboxyterminalem Hexahistidin-((His)<sub>6</sub>)-Anhang erfolgte mittels Cobalt-(Co<sup>2+</sup>)-basierter immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (Porath *et al.* 1975) an TALON-Superflow (Clontech, Heidelberg). 20 bis 50 ml des durch einen Faltenfilter geklärten zellfreien Extraktes wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf 15 ml mit Bindungspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, pH 8, Flussrate: 2 ml/min, 3 Säulenvolumen) äquilibriertem TALON-Superflow-Material aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit Bindungspuffer (Flussrate: 1,5 ml/min; 5 Säulenvolumen) wurde gebundenes Protein mit einem Stufengradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8, Flussrate: 1 ml/min) eluiert. Nach proteolytischer Spaltung des Thioredoxininfusionsproteins wurde eine zweite Affinitätschromatographie an TALON-Superflow durchgeführt. Dadurch konnte eine Separierung von Thioredoxin mit carboxyterminalem (His)<sub>6</sub>-Anhang und dem Zielprotein, welches im Säulendurchbruch erschien, erzielt werden. Gesammelte Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.1.2) analysiert. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und mehrfach gegen 5 l *aqua bidest.* für mindestens 2 h bei 4 °C dialysiert.

### 3.6.3.2 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

Für die Reinigung von Ara h 2 aus Erdnussextrakt wurde Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Der Erdnussextrakt wurde im Vorfeld durch Filtration von unlöslichen Bestandteilen und Schwebeteilchen befreit. 50 bis 70 ml des Extraktes wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf 30 ml mit Bindungspuffer (120 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8, Flussrate 2 ml/min) äquilibriertem Q-Sepharose Fast Flow Säulenmaterial aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 90 ml Bindungspuffer (20 mM, Tris/HCl, pH 8, Flussrate 1,5 ml/min) wurden gebundene Proteine durch zwei aufeinander folgende NaCl-Gradienten (60 ml 0 – 10 % Elutionspuffer, 450 ml 10 – 100 % Elutionspuffer) mit Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 M NaCl, Flussrate 1,5 ml/min) eluiert. Gesammelte Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.1.2) analysiert. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und mehrfach gegen 5 l *aqua bidest.* für mindestens 2 h bei 4 °C dialysiert.

### 3.6.3.3 Größenausschlusschromatographie

Zur Entfernung von Peptidverunreinigungen wurde eine Gelfiltration mit einer Superdex Peptide-Säule (HR 10/30, Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Nach Äquilibrieren der Säule (Säulenvolumen: 23 ml) mit dem zweifachen Säulenvolumen an 20 mM Tris/HCl, pH 8 und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurden 100 bis 250 µl Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen 20 mM Tris/HCl, pH 8 bei unveränderter Flussrate.

### 3.6.3.4 Umkehrphasenchromatographie

Umkehrphasenchromatographie wurde sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab durchgeführt. Für analytische und semipräparative Anwendungen wurden zwei auf Octadecylphasen (C18) basierende Säulen (RCM 8 × 10 Modul, Waters, Eschborn; Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, Düren) eingesetzt. Filtrierte Proben wurden in Volumina zwischen 200 µl und 5 ml appliziert, die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten zwischen 0 und 80 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % TFA (v/v) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Für präparative Anwendungen wurden ein PrepLC™ 25 mm Modul (Waters, Eschborn) bzw. eine Nucleosil 100-7 C18-Säule (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Proben in Volumina zwischen 10 und 200 ml wurden im Vorfeld der Chromatographie durch Zentrifugation (13000 × g, 15 min) oder Filtration von Schwebeteilchen befreit und mit 0,1 % (v/v) TFA versetzt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten zwischen 0 und 80 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % TFA (v/v) bei einer Flussrate von 10 ml/min. Die in den gewonnenen Fraktionen anfallenden Lösungsmittel wurden durch Vakuumkonzentration (Speed Vac Christ Alpha RVC, Braun Biotech International, Melsungen) abgezogen. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 220 und 280 nm.

### 3.6.4 Proteolytische Reaktionen

Thioredoxininfusionsproteine wurden mit Enterokinase bzw. PreScission-Protease gespalten. Enterokinasespaltungen erfolgten in 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8 für mindestens 3 h bei Raumtemperatur. Die Spaltungen mit PreScission-Protease (0,8 U / 100 µg) wurden in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 8 bei Raumtemperatur innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde durchgeführt. Die entsprechenden Pufferbedingungen wurden durch zweimaliges Dialysieren (5 l Puffer,

mindestens 2 h) der Proben eingestellt.

Proteolytische Reaktionen mit Trypsin oder Chymotrypsin wurden im analytischen und im präparativen Maßstab, wenn nicht anders angegeben, in 50 mM Tris, pH 8 über 2 bis 4 h bei 37 °C durchgeführt. Für den proteolytischen Verdau von 100 µg Protein wurden 3 µM Enzym eingesetzt. Das Abstoppen von analytischen Proben erfolgte durch Zugabe von SDS- und DTT-haltigen Probenpuffern und durch anschließende 10-minütige Inkubation bei 90 °C. Präparative Ansätze wurden durch Größenausschlusschromatographie und / oder Umkehrphasenchromatographie gereinigt (Kap. 3.6.3.3 und Kap. 3.6.3.4).

## **3.7 Analytische Methoden**

### **3.7.1 Elektrophoresen**

#### **3.7.1.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Agarose-Gelelektrophorese wurde analytisch zur Überprüfung von Plasmidpräparationen und Restriktionen, sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Dabei kamen 0,8 % bzw. 1,5 % (w/v) Agaroselösungen zur Anwendung, die durch Aufkochen in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8) hergestellt wurden. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gellösung wurde diese in eine 6 × 10 cm große Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Elektrodenpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V in einem horizontalen *Mini Sub DNA Cell*-System (BioRad, München). DNA-Banden wurden mit einem Transilluminator visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc2000, BioRad, München) dokumentiert. Für präparative Anwendungen wurden entsprechende Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte wie unter 3.5.2.3 beschrieben.

#### **3.7.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

SDS-(sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. Die diskontinuierlichen Elektrophoresen wurden in vertikalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Die Molekularmassen der zu analysierenden Proteine wurden mit Hilfe des

„low molecular weight“-Standards (BioRad, München) bzw. des Mark12 Standards (Invitrogen, Groningen, Niederlande) ermittelt.

#### 19 %ige SDS-Gele nach Lämmli

Die Abmessung der Gele betrug  $10,2 \times 60,75$  cm. Zur Herstellung derselben wurde eine Trenngellösung (19 % (w/v) Acrylamid (T), 0,46 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (C), 0,1 % (w/v) SDS, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8) und eine Sammelgel-Lösung (7,5 % (w/v) Acrylamid (T), 0,21 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (C), 0,1 % (w/v) SDS, 62 mM Tris/HCl, pH 6,8) hergestellt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 13  $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) und 150  $\mu$ l 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) pro 20 ml Gellösung gestartet. Die Elektrophorese wurde in einem Tris-Glycin-Laufpuffer (0,25 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) bei einer konstanten Stromstärke von 24 mA durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis 1:4 (v/v) mit Roti-Load-4 $\times$ -Laufpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftragsvolumina betragen zwischen 5 und 20  $\mu$ l.

#### 10 %ige und 12 %ige NUPAGE Bis-Tris Polyacrylamidgele

Die Abmessung der kommerziell erworbenen Gele (Invitrogen, Groningen, Niederlande) betrug  $10,2 \times 10,2$  cm. Die Elektrophorese wurde in einem NuPAGE MES SDS-Laufpuffer (50 mM MES, pH 7,2, 50 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA) bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis 1:4 (v/v) mit 4 $\times$  Laufpuffer (1 $\times$  NUPAGE LDS Laufpuffer: 10 % (w/v) Glycerin, 141 mM Tris Base, 106 mM Tris/HCl, 2 % (w/v) LDS, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA Blue G250, 0,175 mM Phenolrot) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftragsvolumina betragen zwischen 5 und 20  $\mu$ l.

#### Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die Färbung der Proteinbanden erfolgte für 15 bis 30 min in Protein-Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure). Anschließend wurden die Gele für 30 min mit Entfärbelösung I (25 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) und bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes mit Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) behandelt. Färbung und Entfärbung erfolgten unter leichtem Schwenken mittels eines Horizontalschüttlers.

### 3.7.2 Western-Blotting

#### 3.7.2.1 Proteintransfer

Der Proteintransfer erfolgte über ElektrobloTTing in einem „Semi-Phor Semi-Dry“-System (Amersham Biosciences, Freiburg) und mittels eines MPC 2 × 3000 Stromversorgungsgerätes (MWG Biotech, Ebersberg). Die zu analysierenden Proteinproben wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und der Trenngelanteil 10 min in Transferpuffer äquiliBriert (12 mM Tris, 96 mM Glycin, pH 8,3, 20 % (v/v) Methanol). Die Blotting-Membran (Nitrocellulose, Porengröße 0,45 µm, Sartorius, Göttingen bzw. PVDF, Schleicher & Schuell, Dassel) und 8 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM, Madestone, England) wurden auf die Größe des Geles zugeschnitten und ebenfalls für 5 min mit Transferpuffer getränkt. Die anodische Graphitplatte wurde mit 4 Filterpapierlagen, der Membran, dem Gel und weiteren 4 Filterpapierlagen luftblasenfrei beschichtet. Auf dem Transferstapel wurde abschließend die kathodische Graphitplatte platziert und die Apparatur mit einem geeigneten Gegenstand beschwert. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,3 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) für 90 min. Die Membran wurde anschließend aus der Apparatur entnommen und getrocknet. Bei Mehrfachauftragung identischer Proben wurden die einzelnen Spuren exakt auf der Membran abgemessen und mit einem scharfen Skalpell sauber ausgeschnitten. Die erhaltenen Streifen wurden bis zu 2 Monate gelagert und für Immundetektionsreaktionen eingesetzt.

#### 3.7.2.2 Immundetektion

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden zunächst durch einstündige Inkubation in Blockierungspuffer (TTBS (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,1 % (w/v) Tween 20), 10 % (w/v) fettarmes Trockenmilchpulver) unter leichtem Schwenken (Swip KM-2, Labortechnik Edmund Bühle) blockiert. Die Membran wurde anschließend mit einer entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers über Nacht und wiederum unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Patientensera JG3, Um33 und Gk31 wurden in einem Verhältnis 1:20 bis 1:200 in TBST verdünnt. Kaninchenserum gegen Ara h 2 wurden als 1:4 × 10<sup>9</sup> Verdünnung (in TTBS) angewendet. Nach viermaligem Waschen in 100 bis 200 ml TTBS (je 10 min) wurde die spezifische Bindung der Patienten IgE oder Kaninchen-Antikörper durch monoklonale Anti-Mensch-IgE Mausantikörper (Verdünnung in TTBS: 1:2000, Allergopharma, Reinbeck) oder Anti-Kaninchen-IgG Ziegenantikörper (Verdünnung in TTBS: 1:2000) als sekundäre mit Alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper detektiert.

Nach zweistündiger Inkubation mit sekundären Antikörpern wurde die Membran für jeweils 10 min mit 100 bis 200 ml TTBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat-p-toluidin (BCIP) in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) visualisiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde mit *aqua bidest.* gewaschen.

### 3.7.3 Aminoternale Ansequenzierung

Zur aminoternalen Proteinsequenzierung wurden die entsprechenden Proteinproben über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und wie unter 3.7.2.1 durch Elektrobloiting auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert (0,3 mA / cm<sup>2</sup>, 90 min). Als Transferpuffer diente CHAPS-Puffer (3,5 mM CHAPS, 3,25 mM DTT, 15 % (v/v) Methanol, pH 10,5). Gel und Filterpapier wurden 10 min in CHAPS-Transferpuffer inkubiert. Die Membran wurde 5 min in Methanol und 5 min in CHAPS-Transferpuffer äquilibriert. Nach erfolgtem Transfer wurden Proteinbanden auf der Membran durch einminütige Coomassie-Blau-Färbung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) visualisiert. Anschließend erfolgte eine einminütige Entfärbung in 80 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure und eine zehnminütige Entfärbung in 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure. Die entsprechenden Banden wurden mit einem scharfen Skalpell aus der Membran ausgeschnitten und getrocknet. Die aminoternale Proteinsequenzierung erfolgte über automatisierten Edman Abbau und wurde auf einem ABI-473A-Sequencer im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin (ZMMK) der Universität Köln durchgeführt.

### 3.7.4 Massenspektrometrie

Zur Molekularmassenbestimmung gereinigter Proteine wurde Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-(MALDI)-Massenspektrometrie angewendet.

MALDI-Massenspektren wurden an einem Flugzeitmassenspektrometer (MALDI-MS, Bruker-Reflex<sup>TM</sup>II, Bruker-Franzen, Bremen) durch die Serviceabteilung des Forschungszentrums Borstel gemessen. Gefriergetrocknete Proteinproben wurden dazu in 0,1 % (v/v) TFA gelöst und mit einer gesättigten Lösung Sinapinsäure als Matrix vermenget.

### 3.7.5 Nachweis freier SH-Gruppen

Die Existenz freier SH-Gruppen wurde durch Umsetzen mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), (DTNB)) geprüft (Ellman 1959). Dazu wurden Proteinlösungen eines Volumens von 1 ml und einer Konzentration von ca. 30  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7 mit 2,5 ml 8 M Harnstoff bei 90 °C über einen Zeitraum von 10 min denaturiert. Nach Zugabe von 1 ml DTNB (4 mg/ml) wurde die Extinktion des Testansatzes bei 412 nm gemessen. Dabei wurde die Extinktion eines proteinfreien Kontrollansatzes als Leerwert subtrahiert.

### 3.7.6 Deglykosylierungsreaktionen

Zum Nachweis möglicher Glykananteile wurden Deglykosylierungsreaktionen mit den N-Glycosidasen PNGase A (Roche, Mannheim) und PNGase F (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) durchgeführt. Dabei wurden 40  $\mu\text{l}$  einer 20  $\mu\text{M}$  Proteinlösung mit 10  $\mu\text{l}$  PNGase A (5 mU/100  $\mu\text{l}$ ) in 10 mM Natriumacetat, 0,6 M NaSCN, 0,1 M 2-Mercaptoethanol, pH 5,1 für 36 h bei 37 °C inkubiert. Die PNGase F-Behandlung erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer ebenfalls 36 h bei 37 °C. Als Kontrollansätze wurden jeweils Proben ohne Enzymzusatz mitgeführt.

## 3.8 Spektroskopische Verfahren

### 3.8.1 UV/VIS-Spektroskopie

#### 3.8.1.1 Absorptionsmessungen

Die Absorptionsmessungen im UV/VIS-Bereich wurden mit einem Uvicon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) und mit einem He $\lambda$ ios  $\gamma$ Spektrophotometer (Thermo Spectronic, Cambridge, UK) durchgeführt. Für Messungen im sichtbaren Bereich wurden Polystyrol Küvetten (Roth, Karlsruhe) einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. UV-Absorptionsmessungen wurden in Schwarzwand-Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) einer Schichtdicke von 0,5 cm durchgeführt. Der verwendete Messbereich lag zwischen 0,05 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden mit dem Referenzmedium verdünnt.

### 3.8.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte

Zur Bestimmung der Bakteriendichte wurden Trübungsmessungen bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Ab einer  $OD_{600}$  von 0,3 wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen Medium verdünnt. Eine Absorptionseinheit ( $OD_{600}$ ) entspricht in etwa einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^9$  Zellen / ml.

### 3.8.1.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen bzw. Peptiden wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Es gilt die Beziehung:  $A = c \cdot d \cdot \epsilon$ . Dabei ist A die im Photometer gemessene Absorption, c die molare Konzentration (mol/l), d die Schichtdicke (cm) und  $\epsilon$  der molare Absorptionskoeffizient ( $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Der molare native Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{280nat}$ ), welcher für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen angewendet wurde, wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des entfalteten Proteins bei 280 nm ( $\epsilon_{280GdnHCl}$ ) und dem Verhältnis der Absorption von nativem und entfaltetem Protein bei 280 nm ( $A_{280nm}$  bzw.  $A_{280GdnHCl}$ ) nach folgender Beziehung bestimmt (Gill & Hippel 1989).

$$\epsilon_{280nat} = \frac{A_{280nat} \cdot \epsilon_{280GdnHCl}}{A_{280GdnHCl}} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Zur Bestimmung von  $A_{280nat}$  wurden 75  $\mu$ l Proteinlösung zu 425  $\mu$ l 7 M Guanidiniumchlorid, 25 mM Kaliumphosphat (pH 6,5) pipettiert. Die Absorption beider Lösungen wurde bei 280 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280GdnHCl}$  ergibt sich durch Addition beschriebener Werte (Gill & Hippel 1989) für jeden Tryptophanrest ( $5690 M^{-1}cm^{-1}$ ), Tyrosinrest ( $1280 M^{-1}cm^{-1}$ ) und für vorhandene Disulfidbrücken ( $120 M^{-1}cm^{-1}$ ) in der Aminosäuresequenz des Proteins.

Für den molaren nativen Extinktionskoeffizient von Ara h 2 wurde der Wert  $9126 M^{-1}cm^{-1}$  für Ara h 6 wurde  $2800 M^{-1}cm^{-1}$  ermittelt.

### 3.8.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte näherungsweise durch Absorptionsmessung bei 260 nm ( $A_{260}$ ). Dabei wurde zu Grunde gelegt, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm ( $1 A_{260}$ ) einer ds DNA-Menge von 50  $\mu\text{g}$ , einer ssDNA-Menge von 33  $\mu\text{g}$  sowie einer RNA-Menge von 42  $\mu\text{g}$  entspricht (Sambrook *et al.* 1989). Bei Nukleinsäuren mit einem hohen Reinheitsgrad liegt der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,7 und 2,0.

### 3.8.2 Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie

CD-spektroskopische Untersuchungen wurden an einem J-810 Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan), welches mit einem CDF-426S Peltier Temperaturkontrollelement und einem Julabo F200 Wasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Groß-Umstadt) ausgerüstet war, durchgeführt. Dabei wurden Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) einer Schichtdicke von 1 mm und 1 cm verwendet. Die Aufnahmegeschwindigkeit lag zwischen 20 - 50 nm/min, die Auflösung der Datenpunkte betrug 0,2 nm. Proteinproben wurden in einer Konzentration von 10 bis 20  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7 in Abwesenheit oder Präsenz von 0,5 mM DTT vermessen. Entsprechende Pufferspektren wurden jeweils subtrahiert. Thermische Übergänge wurden durch die Detektion der Elliptizität bei 222 nm verfolgt. Die entsprechenden CD-Temperaturkurven wurden in einem Bereich von 20 bis 100 °C mit einer Heiz- oder Abkühlrate von 1 °C/min aufgenommen. Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{MRW}$  ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) wurde nach Gleichung 3.3 aus den gemessenen Werten berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Dabei sind  $\Theta$  die beobachtete Elliptizität, N die Anzahl der Aminosäuren, d die Schichtdicke der Küvette und c die Proteinkonzentration.

## 3.9 NMR-Spektroskopie

### 3.9.1 Probenvorbereitung

NMR-Messungen erfolgten in Ultra Precision NMR Probenröhrchen (Norell, Inc., Landisville, NJ, USA) und Shigemi NMR Probenröhrchen (Campro Scientific, Veendendaal, Niederlande). Die gefriergetrockneten Proteine wurden direkt vor den Messungen in Probenpuffer gelöst. Als Probenpuffer diente 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 0,02 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ , 10 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Konzentration der zur Strukturbestimmung verwendeten  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -markierten Ara h 6 Probe betrug 0,8 mM. Für die Aufnahme von 1D  $^1\text{H}$  NMR und  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren wurden Proteine in Konzentrationen zwischen 200 und 500  $\mu\text{M}$  gelöst. Die Spektrenaufnahme erfolgte bei 298 K.

### 3.9.2 Geräte und Messbedingungen

NMR-Experimente wurden an Bruker Avance Spektrometern (DRX-400, DRX-600, Bruker, Karlsruhe) bei Protonenresonanzfrequenzen von 400.13 und 600.13 MHz durchgeführt. Diese sind mit einem inversen  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanz-Probenkopf mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in z-Richtung (DRX-400) und in alle drei Raumachsen (DRX-600) ausgestattet. Die Temperatur wurde mittels einer BVT3000 Einheit (Bruker, Karlsruhe) konstant gehalten. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in beiden Zeitdimensionen unter Verwendung der States-TPPI-Technik (*time proportional phase incrementation*; Marion *et al.* 1989). Alle Kohlenstoffpulse wurden generell auf einem Radiofrequenzkanal gesetzt, Selektivität wurde dabei mittels bandselektiver Pulse (G3, G4-Gauß-Kaskaden; Emsley & Bodenhausen 1990) erreicht. Als Signal für den Feld-Frequenz-Lock wurde die Resonanzfrequenz des zugesetzten  $\text{D}_2\text{O}$  verwendet. Die ppm-Werte der Protonenverschiebung wurden relativ zu DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat) als externen Standard geeicht. Die Eichung der ppm-Skala für  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne erfolgte indirekt über das Verhältnis zu den Nullpunktsfrequenzen der Protonen ( $\omega_{\text{C}}/\omega_{\text{H}} = 0.251449527$  bzw.  $\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.10101329051$ ; Markley *et al.* 1998). Die Entkopplung der Heterokerne während der Aufnahme des FID wurde durch Anwendung der GARP-Sequenz realisiert (Shaka *et al.* 1983). Im Folgenden sind die verwendeten NMR-Experimente und ihre Aufnahmeparameter aufgelistet.

**Tab. 3.4 Zusammenstellung der verwendeten NMR-Spektren mit Aufnahmeparametern und Referenzen.**

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Spektren an einem DRX-600 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) gemessen.

<i>Experiment</i>	<i>NS<sup>t</sup></i>		<i>Kern</i>	<i>SW (Hz)<sup>2</sup></i>	<i>TD<sup>3</sup></i>	<i>Referenz</i>
1D- <sup>1</sup> H <sup>6</sup>	8192/1024	F1	<sup>1</sup> H	8389	16384	McDonald & Phillips 1970
2D-TOCSY	128	F1	<sup>1</sup> H	8389	512	Braunschweiler & Ernst 1983
		F2	<sup>1</sup> H	8389	2048	
<sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC <sup>6</sup>	16 <sup>5</sup>	F1	<sup>15</sup> N	1257,0	256	Mori <i>et al.</i> 1995
		F2	<sup>1</sup> H	5208,3	1024	
ct-[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C]-HSQC	16	F1	<sup>13</sup> C	10565,2	512	Vuister & Bax 1992
		F2	<sup>1</sup> H	8389,3	2048	
ct-[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C]-HSQC für aromatische Aminosäuren	64	F1	<sup>13</sup> C	6613,8	1024	Vuister & Bax 1992
		F2	<sup>1</sup> H	3471,3	224	
HNCO	16	F1	<sup>13</sup> C	2414,9	96	Grzesiek & Bax 1992a
		F2	<sup>15</sup> N	1609,9	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
HNCA	16	F1	<sup>13</sup> C	4527,4	96	Grzesiek & Bax 1992a
		F2	<sup>15</sup> N	1509,1	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
CBCA(CO)NH	16	F1	<sup>13</sup> C	8451,3	104	Grzesiek & Bax 1992b
		F2	<sup>15</sup> N	1408,5	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
HNCACB	16	F1	<sup>13</sup> C	8451,3	104	Wittekind & Mueller 1993
		F2	<sup>15</sup> N	1408,5	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
C(CO)NH	16	F1	<sup>13</sup> C	9960,2	104	Grzesiek <i>et al.</i> 1993
		F2	<sup>15</sup> N	1422,9	64	
		F3	<sup>1</sup> H	7788,2	1024	
HBHACONH	16	F1	<sup>1</sup> H	3300,6	128	Grzesiek & Bax 1992b
		F2	<sup>15</sup> N	1320,2	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
HNHA	16	F1	<sup>1</sup> H	4200,8	138	Vuister & Bax 1993
		F2	<sup>15</sup> N	1400,3	64	
		F3	<sup>1</sup> H	7183,9	1024	
HC(CO)NH	16	F1	<sup>1</sup> H	3600,7	128	Grzesiek <i>et al.</i> 1993
		F2	<sup>15</sup> N	1440,3	64	
		F3	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	

H(C)CH-COSY	8	F1	<sup>1</sup> H	4200,8	160	Ikura <i>et al.</i> 1991
		F2	<sup>13</sup> C	4200,8	64	
		F3	<sup>1</sup> H	7183,9	1024	
3D- <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-NOESY-HSQC	16	F1	<sup>1</sup> H	8992,8	240	Talluri & Wagner 1996
		F2	<sup>15</sup> N	1824,5	64	
		F3	<sup>1</sup> H	8992,8	1024	
3D- <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-NOESY-HSQC <sup>4</sup>	16	F1	<sup>1</sup> H	9054,9	256	Cavanagh <i>et al.</i> 1996
		F2	<sup>13</sup> C	4527,4	64	
		F3	<sup>1</sup> H	7183,9	1024	
3D- <sup>15</sup> N- <sup>15</sup> N- <sup>1</sup> H-HMQC-NOESY- HSQC	16	F1	<sup>15</sup> N	1459,6	80	Ikura <i>et al.</i> 1990
		F2	<sup>15</sup> N	1459,6	64	
		F3	<sup>1</sup> H	7183,9	1024	
3D- <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H-HMQC-NOESY- HSQC	16	F1	<sup>13</sup> C	4527,4	64	Diercks <i>et al.</i> 1999
		F2	<sup>13</sup> C	9054,9	128	
		F3	<sup>13</sup> H	7183,9	1024	
3D- <sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N- <sup>1</sup> H-HMQC-NOESY- HSQC	16	F1	<sup>13</sup> C	12262,4	128	Schweimer unveröffentlicht
		F2	<sup>15</sup> N	1824,5	64	
		F3	<sup>13</sup> H	1024	301	
2D- <sup>13</sup> C-editiertes-NOESY-HSQC zur Detektion aromatischer Resonanzen	16	F1	<sup>1</sup> H	6613,8	640	Jeener <i>et al.</i> 1979
		F2	<sup>1</sup> H	6613,8	1024	
<sup>13</sup> C (F2) gefiltertes 2D NOESY	16	F1	<sup>15</sup> N	6613,8	512	Schweimer, unveröffentlicht
		F2	<sup>1</sup> H	6613,8	2048	

<sup>1</sup> Anzahl gemessener Scans.

<sup>2</sup> Spektrale Weite in Hz.

<sup>3</sup> Zahl der realen Datenpunkte.

<sup>4</sup> Das <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC wurde in Abweichung zu allen anderen Spektren an einem DMX-750 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) gemessen.

<sup>5</sup> Diese Angabe bezieht sich nur auf das für die Zuordnung der Amidresonanzen von prAra h 6 verwendete Spektrum. Die Messparameter anderer <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N HSQC Spektren sind im Ergebnisteil gesondert vermerkt.

<sup>6</sup> Diese Spektren wurden entweder an einem DRX-600 oder an einem DRX-400 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) gemessen. Der Spektromertyp ist dem Ergebnisteil für die entsprechenden Experimente zu entnehmen.

Zur Identifizierung der langsam austauschenden Amidprotonen wurde eine gefriergetrocknete <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N markierte Probe in D<sub>2</sub>O gelöst. 10 min nach D<sub>2</sub>O Zugabe wurde ein <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC mit 128 \* 1024 komplexen Datenpunkten (2 Akkumulationen) gemessen.

Zur Messung des {<sup>1</sup>H}<sup>15</sup>N NOE wurde eine von Dayie & Wagner (1994) publizierte Pulssequenz verwendet. Dazu wurde ein Referenzspektrum ohne Protonensättigung und ein Spektrum mit Sättigung mit 128 \* 512 komplexen Datenpunkten und 32 Akkumulationen

gemessen. Das Relaxationsintervall zwischen den einzelnen Akkumulationen betrug 6 s, bei den Sättigungsexperimenten wurden die Protonen während der letzten 3 s durch  $120^\circ$  Pulse bei leicht abgeschwächter Leistung im Abstand von 5 ms gesättigt worden.

### 3.9.3 Prozessierung der NMR-Spektren

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Programmpakete NDEE (SpinUp Inc., Dortmund), NMRView5.0.4 (Johnson & Blevins 1994) und am Lehrstuhl Biopolymere, Universität Bayreuth entwickelter Software und automatischer Peakroutinen (Schweimer 1997, 2000).

Die FIDs (*free induction decay*) der 1D-Spektren wurden vor der Fouriertransformation mit einer Exponentialfunktion multipliziert.

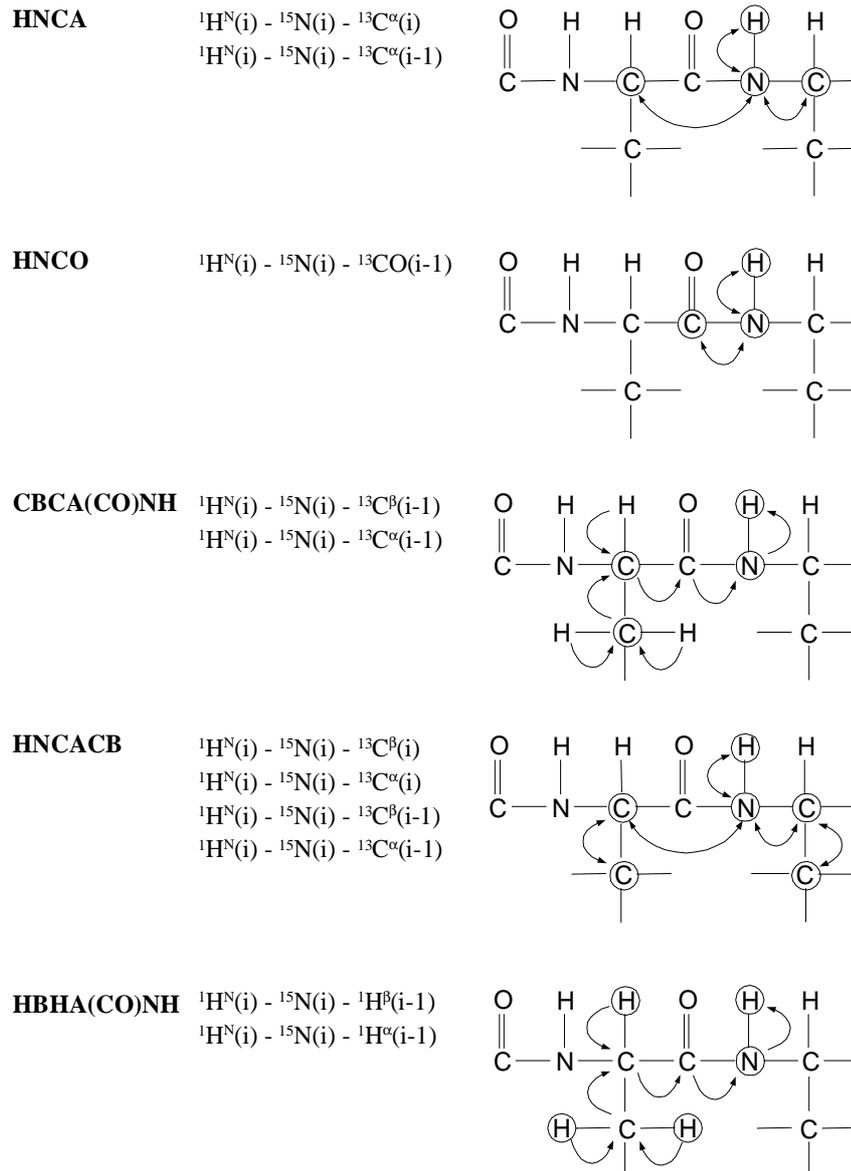
Zur Verbesserung der digitalen Auflösung wurden die FIDs der zweidimensionalen Datensätze entlang beider Dimensionen vor der Fouriertransformation auf die doppelte bis vierfache Länge mit Nullen aufgefüllt (*zerofilling*). Als Filterfunktionen wurden Sinus- und Sinusquadratfunktionen verwendet (Cavanagh 1996). Falls notwendig, wurde eine Basislinienkorrektur entlang der Aufnahmedimension mit dem Programm *base\_fast* (Schweimer 2000) durchgeführt.

Für die meisten dreidimensionalen Spektren wurden die Aufnahmedimension (F3) und eine indirekte Dimension (F1 oder F2) durch ein *zerofilling*, Multiplikation des FIDs mit der Filterfunktion ( $60^\circ$ - $90^\circ$  phasenverschobene Sinus- oder Sinusquadratfunktionen) und Fouriertransformation prozessiert. Die Prozessierung der verbleibenden indirekten Dimension erfolgte durch *linear prediction* (LP), wodurch der FID in der betreffenden Dimension verlängert und die digitale Auflösung erhöht wurde (Schweimer 1997).

### 3.9.4 Auswertung der NMR Daten

#### 3.9.4.1 Zuordnung der Resonanzen

Die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates erfolgte mit Tripelresonanzexperimenten an  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -markiertem Protein. Die in den Experimenten HNCA, HNCO, CBCA(CO)NH, HNCACB und HBHA(CO)NH auftretenden Magnetisierungstransfers und die beobachtbaren Korrelationen für die Zuordnung von Resonanzen sind in Abb. 3.1 illustriert.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Magnetisierungstransfers in verschiedenen Tripelresonanzexperimenten.**

Der Verlauf des Magnetisierungstransfers ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die im jeweiligen Experiment zu beobachtenden Spins sind durch Einkreisung hervorgehoben. Aus Schweimer (2000).

Zunächst wurden sämtliche Resonanzen im  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC mit der Funktion PeakPick des Programms NMRView5.0.4 (Johnson & Blevins 1994) nummeriert. Unter Verwendung der Spektren CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCA, HNHA und HBHA(CO)NH wurden die zu den  $\text{H}^{\text{N}}(i)$ - und  $\text{N}(i)$ -Resonanzen des  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC gehörenden Spinsysteme durch Bestimmung der CO,  $\text{C}^{\alpha}$ ,  $\text{C}^{\beta}$ ,  $\text{H}^{\alpha}$ ,  $\text{H}^{\beta}$  ( $i-1$ ) und  $\text{C}^{\alpha}$ ,  $\text{C}^{\beta}$ ,  $\text{H}^{\alpha}$  ( $i$ ) Resonanzen identifiziert und erfasst. In einem zweiten Schritt wurden sequenziell benachbarte Spinsysteme durch Vergleich der intraresidualen chemischen Verschiebungen eines Spinsystems ( $i$ ) mit den interresidualen chemischen Verschiebungen eines weiteren Spinsystems ( $i-1$ ) ermittelt. Der

Informationsgehalt des C(CO)NH, aus welchem die Kohlenstoffverschiebungen des Proteinrückgrates und der Seitenkette der Vorgängeraminosäure i-1 zu entnehmen sind, wurde unterstützend verwendet. Das Resonanzmuster des C(CO)NH erlaubt in einigen Fällen die Bestimmung des Aminosäuretyps des vorhergehenden Spinsystems und eignet sich damit einerseits zum Auffinden von Startpunkten für die Zuordnung und andererseits für die Verifizierung von durch Vergleich der chemischen Verschiebungen ermittelten Nachbarschaften.

Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erfolgte unter Verwendung der Spektren C(CO)NH, HC(CO)NH und H(C)CH-COSY. In Einzelfällen wurde der Informationsgehalt der verschiedenen NOESY-Spektren unterstützend genutzt.

### 3.9.4.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart

Die Analyse der Sekundärstruktur auf der Basis ermittelter chemischer Verschiebungen verschiedener Atome des Proteinrückgrates erfolgte nach Wishart & Sykes (1994) in Form der Erstellung eines Verschiebungsindex. Hierzu wurden die Differenzen ( $\Delta\delta = \delta_{\text{beob}} - \delta_{\text{rc}}$ ) von chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}^\alpha$ ,  $^{13}\text{C}^\alpha$  bzw.  $^{13}\text{CO}$  Atome ( $\delta_{\text{beob}}$ ) und den entsprechenden Werten im Zufallsknäuel ( $\delta_{\text{rc}}$ ) berechnet. Ist die Differenz für einen Abschnitt von mindestens vier Resten kleiner als -0,10 ppm für  $^1\text{H}^\alpha$ , -0,5 ppm für  $^{13}\text{C}^\alpha$  und -0,5 ppm für  $^{13}\text{CO}$  wird eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur erwartet, ist sie für drei oder mehr Aminosäuren hintereinander größer als 0,10 ppm bei  $^1\text{H}^\alpha$ , 0,8 ppm bei  $^{13}\text{C}^\alpha$  und 0,5 ppm bei  $^{13}\text{CO}$  kann von einem  $\beta$ -Faltblattbereich ausgegangen werden. Den verschiedenen Spins wurden die Indizes +1 bzw. -1 zugeordnet, wenn die Werte für sekundäre chemische Verschiebungen  $\Delta\delta$  größer bzw. kleiner als die genannten Toleranzen ausfielen. Zur Erhöhung der Zuverlässigkeit wurden die chemischen Indizes für  $^1\text{H}^\alpha$ ,  $^{13}\text{C}^\alpha$  bzw.  $^{13}\text{CO}$  Atome zu einem Konsensus-Index zusammengefasst. Dieser erhielt den Wert +1, wenn die Summe der Einzelindizes mindestens +2 betrug und -1, wenn die Summe höchstens -2 ergab. Der Index für die jeweiligen Spins wurde als Funktion der Sequenz aufgetragen.

### 3.9.4.3 Bestimmung von Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Abstandsbeschränkungen wurden aus den Kreuzresonanzen der NOESY Spektren gewonnen. Es kamen dabei folgende Spektren zur Auswertung: 3D- $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -NOESY, 3D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NOESY,  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes 2D NOESY, 2D-NOESY (Detektion der aromatischen Resonanzen), 3D- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -NOESY und 3D- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (Tab. 3.4). Entsprechend

der Intensitäten der NOE-Kreuzresonanzen wurden diese in drei Abstandsklassen eingeteilt (Tab. 3.5). Die Intensitäten wurden aus den Spektren visuell geschätzt.

**Tab. 3.5** Beziehung der NOE-Intensitäten und Protonenabstände im Molekül nach Clore *et al.* (1987).

<i>NOE-Intensität</i>	<i>Abstand [nm]</i>
schwach	<0,5
mittel	<0,35
stark	<0,27

#### 3.9.4.4 Beschränkung der Diederwinkel durch J-Kopplungskonstanten

Die Berechnung der Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  erfolgte nach Gleichung 3.4 aus dem Verhältnis der Intensitäten von Kreuz- und Diagonalsignal des HNHA-Experimentes (Vuister & Bax 1993). Für Strukturberechnungen wurden die für  $\alpha$ -Helices typischen Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz in Winkel konvertiert ( $\phi = -60 \pm 20^\circ$ ). Die Werte wurden auf Grund der Größe von Ara h 6 um den Wert 1,1 korrigiert (Vuister & Bax 1993, Kuboniwa *et al.* 1994, Düx *et al.* 1997).

$${}^3J_{\text{HNH}\alpha} = F_c \cdot \frac{1}{2\pi \cdot 12,3 \text{ ms}} \arctan \sqrt{-\frac{I_c}{I_d}} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$I_c$ : Intensität des Kreuzpeaks

$I_d$ : Intensität des Diagonalpeaks

Länge des Kohärenztransfers von HN zu H $\alpha$ : 12,3 ms

$F_c$ : Korrekturfaktor (1,1)

#### 3.9.5 Strukturberechnung

Alle Berechnungen wurden auf SUN ULTRA 5-Workstations (Sun Microsystem Inc., Palo Alto, CA, USA) sowie auf SUN Fire V880 Servern unter Verwendung des Programmpaketes X-PLOR 3.8.5.1 (Brünger 1993) durchgeführt.

Die computergestützte Berechnung dient grundsätzlich der Umsetzung der NMR spektroskopisch abgeleiteten Randbedingungen in eine räumliche Struktur. Die experimentell bestimmten Abstände reichen jedoch zur Definition einer globalen dreidimensionalen Struktur nicht aus - erst die zusätzliche Berücksichtigung geometrischer Parameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel und nichtkovalente Wechselwirkungen erlauben eine hinreichend genaue Strukturbestimmung. Die Strukturberechnung von Ara h 6 erfolgte mit Hilfe eines Moleküldynamik-Verfahrens, welches auf einem dreiphasigen *Simulated-Annealing*-Protokoll basierte (Nilges 1996).

Für alle Berechnungen wurde die auf dem CHARMM-Kraftfeld (Brooks *et al.* 1983) basierende Parameterdatei „parallhdg.pro“ des Programmpaketes X-PLOR verwendet. Diese enthält Informationen zu Bindungslängen, Bindungswinkel, van der Waals Radien sowie skalierbare Kraftkonstanten für alle Potenzialterme.

Zunächst wurde eine Startstruktur, die eine gestreckte Polypeptidkette mit korrekter lokaler Geometrie darstellt, generiert. Dazu wurde die Struktur der Aminosäuren und deren Anordnung in der Primärsequenz als auch die in Ara h 6 vorhandenen Disulfidbrücken als kovalente Bindungen enthaltende Strukturdatei „arah6.psf“ mit Hilfe des Programmes „generate\_structure.inp“ (X-PLOR-Standardprotokoll), welches Informationen über die Anordnung der Atome in den einzelnen Aminosäuren, sowie deren Ladung und Masse aus der Datei „topallhdg.pro“ (Teil des X-PLOR-Programmpaketes) bezieht, erzeugt. Die zugehörige Koordinatendatei „arah6\_new.pdb“ wurde mit dem Programm „generate\_template.inp“ (X-PLOR-Standardprotokoll), welche sowohl auf die erzeugte „arah6.psf“-Datei also auch auf die „parallhdg.pro“-Datei zurückgreift, generiert.

Ausgehend von der Startstruktur wurden 60-250 Proteinstrukturen mit Hilfe einer Moleküldynamiksimulation nach dem Prinzip des *simulated annealing* unter Verwendung eines modifizierten X-PLOR-Protokolls („sa\_arah6\_Lauf33KL.inp“; Anhang 10.4) berechnet. Zunächst erfolgte eine Randomisierung der Startstrukturen mit zufälligen  $\Phi/\Psi$  Winkeln und eine kurze (50 Schritte) Energieminimierung (Powell 1977). Danach erfolgt ein Absuchen des Konformationsraums für 40 ps bei 2000 K. Anschließend wird die Geschwindigkeit der Atome durch zwei Abkühlphasen mit Simulationen für 30 ps bis 1000 K und 15 ps bis 100 K bei einer Abkühltrittweite von 50 K langsam reduziert. Zum Schluss wurden die erhaltenen Strukturen wiederum einer Energieminimierung unterzogen. Dabei wurden 1000 Energieminimierungsschritte ohne Datenbank-Potenzial durchgeführt. Gegebenenfalls wurde diesen 1000 Schritten eine 200 Schritte umfassende Energieminimierung mit konformationellen Datenbank-Potenzial (Kuszewski *et al.* 1996, Clore & Gronenborn 1998,

Neudecker *et al.* 2001b) vorangestellt. Das Datenbank-Potenzial leitet sich von hochaufgelösten Kristallstrukturen ab und dient der Stabilisierung von durch experimentelle Randbedingungen schlecht definierten Bereichen. Es wurde ein dreidimensionales Datenbank-Potenzial für die Torsionswinkel  $\Phi$ ,  $\Psi$ ,  $X_1$  in Verbindung mit Potenzialtermen niedriger Dimensionen eingesetzt (Kuszewski *et al.* 1996, Clore & Gronenborn 1998, Neudecker *et al.* 2001b).

### 3.9.6 Strukturanalyse

Alle Analysen wurden auf SUN ULTRA 5-Workstations (Sun Microsystem Inc., Palo Alto, CA, USA) durchgeführt.

Mit Hilfe des Perl-Skriptes „XPLR\_rank\_2.pl“ wurden jeweils die X-PLOR-Strukturen eines *simulated annealing* Laufes nach ansteigender Gesamtenergie geordnet. Die mittlere quadratische Standardabweichung (RMSD-Wert) einer Strukturschar gegenüber einer Durchschnittsstruktur wurde mit dem X-PLOR-Skript „average.inp“ berechnet. Das Perl-Skript „noe\_violations.pl“ diente der Analyse der NOE-Verletzungen der Mitglieder einer Strukturschar. Die Programme „back\_calc“ und „NOEfromPDB“ (Schweimer 2000) dienten der Auflistung sämtlicher Protonenabstände in X-PLOR-Strukturen. „NOEfromPDB“ (Schweimer 2000) prüft zusätzlich, ob für Protonenpaare mit kurzem räumlichen Abstand bereits eine NOE Kreuzresonanz zugeordnet wurden. Zur Analyse der Torsionswinkel und Sekundärstrukturelemente wurde das Programm PROCHECK 3.4 (Laskowski *et al.* 1993) angewendet. Graphische Darstellungen erfolgten mit den Programmen RasMolV2.6 (Sayle 1995), MolMol Version 2K.1 (ETH Zürich, Spektrospin AG, Fällanden, Schweiz) und SYBYL Version 6.5 (Tripos, St. Louis, USA).

### 3.10 Erstellen des Strukturmodells von Ara h 2

Das Homologie basierte Modell von Ara h 2 wurde auf der Basis der in dieser Arbeit bestimmten Ara h 6-Struktur erstellt. Dazu kamen die Programme Swiss-Pdb Viewer (Guex & Peitsch 1997) und Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) zur Anwendung. Die modellierte Struktur wurde abschließend mit Hilfe des Programmes SYBYL Version 6.5 (Tripos, St. Louis, USA) Energie minimiert (1000 Schritte, *conjugate gradient*).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Reinigung und Charakterisierung von nAra h 2 aus Erdnuss

Das Erdnussallergen Ara h 2 sollte zum einen für eine biochemische und strukturelle Charakterisierung und zum anderen zur Beurteilung der Authentizität von heterolog dargestelltem Proteinmaterial aus seiner natürlichen Quelle isoliert werden.

#### 4.1.1 Extraktion und Reinigung von Ara h 2

##### 4.1.1.1 Optimierung der Extraktionsbedingungen

In der Literatur sind verschiedene Verfahren für die Extraktion von Proteinen aus Erdnüssen beschrieben. Bei einem Großteil der Methoden geht dem eigentlichen Extraktionsvorgang eine Entfettungsprozedur voraus. Dabei werden Lipide aus zerriebenem Erdnussmaterial mit großen Volumina hydrophober Lösungsmittel wie *n*-Hexan entfernt. Die nachfolgenden Extraktionsschritte erfolgen häufig unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Harnstoff. Das Erdnussallergen Ara h 2 sollte aus Erdnüssen hingegen unter nativen Bedingungen gewonnen werden. Der Verzicht auf denaturierende Schritte gewährleistet die Authentizität des Proteins, was vor allem für spätere strukturelle Untersuchungen von Bedeutung ist. Dementsprechend wurden verschiedene Verfahren auf ihre Eignung, nAra h 2 (natürliches Ara h 2 aus Erdnuss) effektiv zu extrahieren, untersucht, wobei denaturierende Techniken einer nativen gegenübergestellt wurden (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1** Versuchsbedingungen zur Proteinextraktion aus Erdnüssen.

<i>Entfettung</i>	<i>Extraktionspuffer</i> <sup>3</sup>	<i>Extraktionsdauer</i>	<i>Gel</i> <sup>4</sup>
+ <sup>1</sup>	20 mM Tris/HCl, pH 8	2 h, RT	3;5
- <sup>2</sup>	20 mM Tris/HCl, pH 8	2 h, RT	4;6
+ <sup>1</sup>	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8	über Nacht, 4 °C	7
+ <sup>1</sup>	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, 8 M Harnstoff	über Nacht, 4 °C	-

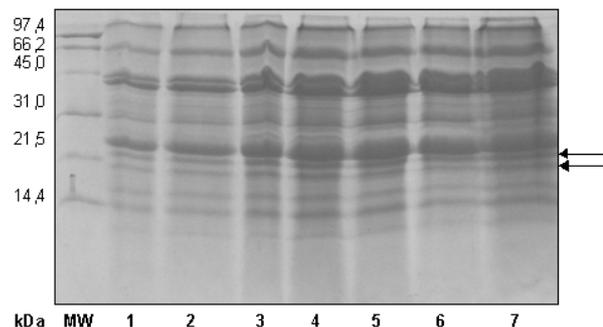
<sup>1</sup> Erdnussentfettung erfolgte durch 250 ml *n*-Hexan / 100 g gemörsertes Erdnussmaterial

<sup>2</sup> gemörsertes Erdnussmaterial wurde direkt verwendet

<sup>3</sup> 1 mg Erdnuss / 20 ml Puffer

<sup>4</sup> Nummer der korrespondierenden Spur des entsprechenden Extraktes im SDS-Gel (Abb. 4.1)

Die gewonnenen Erdnussextrakte wurden in äquimolaren Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen und durch Elektrophorese (Kap. 3.7.1) analysiert (Abb. 4.1). Alle unter den in Tabelle 4.1 aufgeführten Bedingungen hergestellten Erdnussextrakte zeigen im SDS-Gel ein nahezu identisches Proteinmuster mit vergleichbarer Bandenintensität (Abb. 4.1). Ara h 2 ist in allen Extrakten als Doppelbande bei ca. 18 und 20 kDa in vergleichbarer Konzentration enthalten. Dabei führt weder eine Entfettungsprozedur mit *n*-Hexan noch die Anwesenheit von Harnstoff (nicht dargestellt) im Extraktionspuffer zu einer nennenswerten Steigerung der Extraktionseffizienz. Dementsprechend wird im Folgenden auf eine vorherige Lipidentfernung verzichtet. Proteine werden lediglich durch zweistündiges Rühren in Tris/HCl, pH 8 extrahiert (Kap. 3.6.2.2). Die Entfernung von Fett und unlöslichen Bestandteilen erfolgt durch zweimalige Zentrifugation. Die Anwesenheit von nAra h 2, welches generell als Doppelbande bei ca. 18 und 20 kDa im SDS-Gel erscheint, wurde nachfolgend durch eine aminoternale Proteinsequenzierung bestätigt (Kap. 4.1.2.1).



**Abb. 4.1: Proteinextraktion aus Erdnuss.**

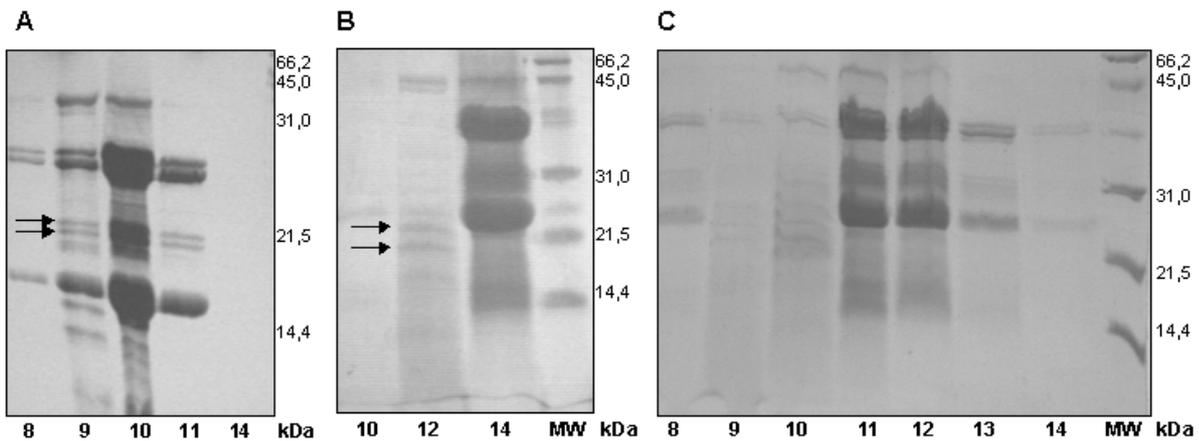
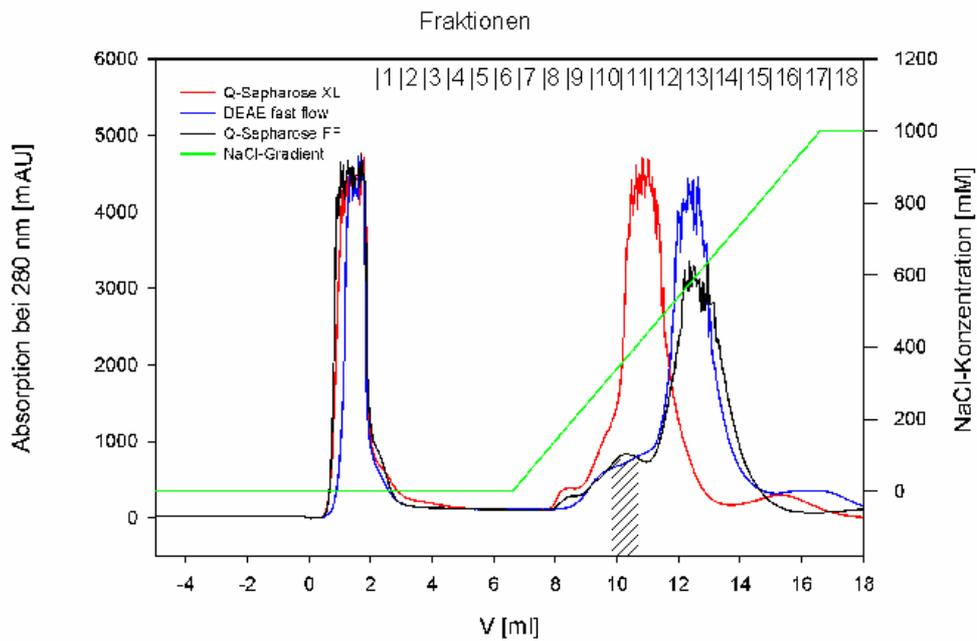
Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Erdnussextrakte nach verschiedenen Extraktionsprozeduren (Tab. 3.1) und Zentrifugation. Bahn 1 und 2 zeigt die direkte Auftragung von entfettetem Erdnusspulver in Roti-Load-Probenpuffer (1 mg / 0,1 ml), Bahn 3-7 mit Roti-Load versetzte Proben der löslichen Extrakte. Bahn 3: Entfettung, Tris/HCl; Bahn 4: Tris/HCl; Bahn 5 und 6: äquivalent zu 3 und 4, jedoch doppelte Auftragsvolumina; Bahn 7: Natriumphosphatpuffer; Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low molecular weight“).

Die detaillierten Extraktionsbedingungen sind Tab. 4.1 zu entnehmen. Die Ara h 2-Doppelbande ist mit Pfeilen markiert.

#### 4.1.1.2 Reinigung von nAra h 2 aus Erdnussextrakt

Zur Reinigung von Ara h 2 wurde eine von Burks *et al.* (1992) publizierte Methode, welche der Gewinnung von analytischen Proteinmengen diene, mit dem Ziel, Ausbeuten im Milligrammbereich zu erreichen, modifiziert und optimiert. Für die native Reinigung von

Ara h 2, einem sauren Protein mit einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 5,5 erschien Anionenaustauschchromatographie geeignet. Zunächst wurden drei verschiedene Säulenmaterialien hinsichtlich ihrer Fähigkeit Ara h 2 effektiv und sauber zu reinigen verglichen (Abb. 4.2). Dazu wurden 1 ml-Testsäulen mit 0,5 ml Erdnussextrakt pro Chromatographielauf beladen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte über einen kontinuierlichen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl bei einem pH von 8,0. Ara h 2 eluierte zwischen 350 und 400 mM NaCl von der Säule. Während das Q-Sepharose FF Material vergleichsweise saubere Ara h 2 Fraktionen lieferte, eluierte Ara h 2 von den beiden übrigen Säulenmaterialien nur gemeinsam mit zahlreichen und im Fall der DEAE fast flow Säule hochkonzentrierten Fremdproteinen. Um die Trennung von Ara h 2 über das Q-Sepharose FF Material weiter zu verbessern, wurde der verwendete Salzgradient sukzessive verlängert. Die Abflachung des ursprünglichen Gradienten (10 Säulenvolumina, Flussrate 1 ml/min) um den Faktor 2 bis 2,5 (20 bis 25 Säulenvolumina, Flussrate 1 ml/min) erwies sich dabei als optimal.



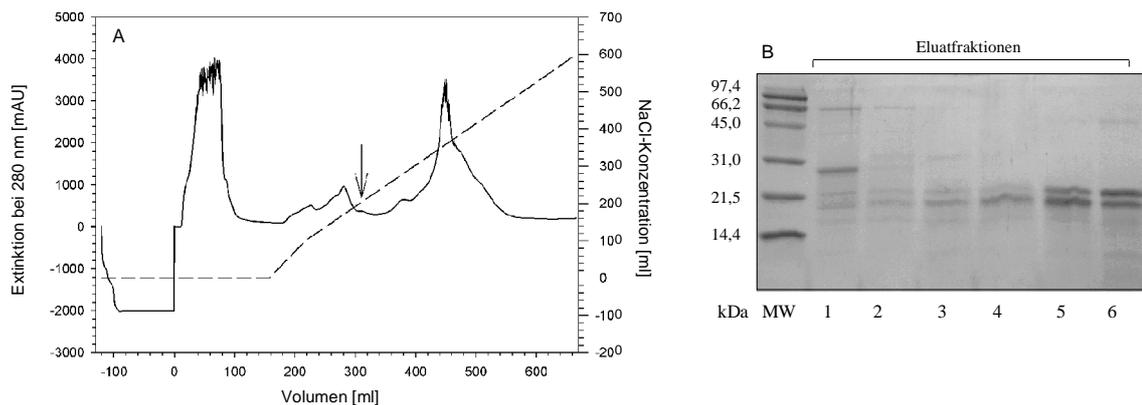
**Abb. 4.2: Optimierung der Reinigung von nAra h 2 mittels Anionenauschromatographie.**

(oben) Chromatographie von Erdnussextrakt an DEAE fast flow (blau), Q-Sepharose FF (schwarz) und Q-Sepharose XL (rot). Säulenvolumen: 1 ml, Probenvolumen: 1,5 ml, Flussrate: 1 ml/min, Bindungs-/Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8, Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 M NaCl. Gebundene Proteine wurden über einen kontinuierlichen Gradienten zwischen Bindungs-/Waschpuffer und Elutionspuffer (10 Säulenvolumina) eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert. Der Bereich der Ara h 2-Elution ist durch Schraffierung gekennzeichnet.

(unten) 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele einzelner Fraktionen der Anionenaustauschchromatographien an DEAE fast flow (A), Q-Sepharose FF (B) und an Q-Sepharose XL (C) nach Coomassiefärbung. Die Nummerierung der einzelnen Spuren entspricht den Fraktionsnummern der einzelnen Chromatographieläufe (A). Die Ara h 2-Doppelbande ist mit Pfeilen markiert. Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“).

Entsprechend der Ergebnisse der Material- und Gradientenoptimierung im analytischen Maßstab wurde zur Reinigung von größeren Proteinmengen eine 30 ml-Q-Sepharose™Fast Flow-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet (Kap. 3.6.3.2). Die Elution erfolgte ebenfalls mittels eines sehr flachen und kontinuierlichen Salzgradienten. Ara h 2 eluierte bei einer im Vergleich zur 1 ml-Testsäule geringeren NaCl-Konzentration von 220 bis 250 mM sauber von der Säule (Abb. 4.3 A, B: Spur 4 - 6).

Mit dem beschriebenen Verfahren war es möglich, auf nativem Wege bei Verzicht auf Entfettungsprozeduren oder denaturierenden Teilschritten und unter Anwendung einer Einzschrittreinigung 4 bis 8 mg sauberes Ara h 2 aus 100 mg Erdnussmaterial zu gewinnen. Die Trennung der Ara h 2-Doppelbande war in Übereinstimmung mit allen bisherigen Literaturbefunden (Burks *et al.* 1992, de Jong *et al.* 1998, Koppelman *et al.* 2001) weder über Anionenaustauschchromatographie noch über Umkehrphasenchromatographie möglich.



**Abb. 4.3: Reinigung von nAra h 2 an Q-Sepharose Fast Flow im präparativen Maßstab.**

(A) Chromatographie von Erdnussextrakt an Q-Sepharose Fast Flow. Säulenvolumen: 30 ml, Probenvolumen: 67 ml, Flussrate: 1 ml/min, Bindungs-/Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8, Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 M NaCl. Gebundene Proteine wurden durch kontinuierliche Gradienten zwischen Bindungs-/Waschpuffer und Elutionspuffer (0 – 0,1 M NaCl: 2 Säulenvolumina; 0,1 M - 1 M NaCl; 15 Säulenvolumina) eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert. Der Bereich der Elution von nAra h 2 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

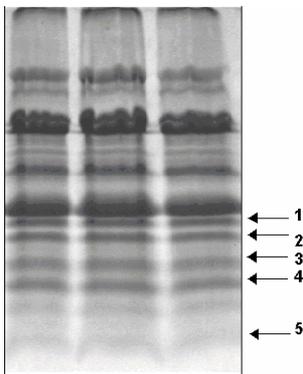
(B) 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel einzelner Eluatfraktionen der Chromatographie in einem Bereich zwischen 300 und 330 ml nach Coomassiefärbung. Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“).

## 4.1.2 Biochemische Charakterisierung von nAra h 2

### 4.1.2.1 Aminoterninale Ansequenzierung von Erdnussproteinen

Zur Bestätigung der Identität der Ara h 2-Doppelbande bei 18 und 20 kDa einerseits und zur Untersuchung der Existenz möglicher prozessierter Ara h 2-Spezies andererseits wurden vier Proteine eines Molekularmassenbereiches zwischen 20 und 10 kDa einer aminoterminalen Sequenzanalyse unterzogen. Motivation der letztgenannten Frage war die signifikante Sequenzhomologie von Ara h 2 zur Gruppe der 2S Albumine (Kap. 1.4.4). Innerhalb dieser Familie sind posttranslationale Modifikationen im Sinne einer einfachen oder mehrfachen Spaltung der Polypeptidkette keine Seltenheit. Einzelne Beispiele beschreiben die Existenz unterschiedlich prozessierter Spezies, die sich von einem einzigen Vorläufer ableiten (Barciszewski *et al.* 2000, da Silva *et al.* 1996). Die mögliche Existenz derartiger Ara h 2-Varianten sollte mittels Sequenzanalyse von Erdnussproteinen geringen Molekularmasse geprüft werden.

Zur Sequenzanalyse wurden Erdnussproteine aus SDS-Polyacrylamidgelen (Abb. 4.4) elektrophoretisch auf PVDF-Membranen transferiert (Kap. 3.7.3). Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel, dessen Spuren jeweils mit identischen Proben beladen waren, halbiert, wobei ein Teil mit Coomassie gefärbt (Abb. 4.4) wurde, während der zweite Teil für die „Blotting“-Prozedur verwendet wurde. Gut separierte Banden, die auf der „Blotting“-Membran visualisiert werden konnten, wurden ausgeschnitten und für eine Sequenzanalyse eingesetzt.



**Abb. 4.4: Erdnussproteine für die Sequenzanalyse.**

19 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Elektrophorese von Erdnussmaterial in Roti-Load-Probenpuffer (1mg / 0,2ml) und Coomassie-Färbung. Die mit Pfeilen und Ziffern beschrifteten Banden wurden mittels nicht gefärbter und identisch beladener Spuren auf PVDF geblottet und aminoterninal ansequenziert (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2 Aminoterminale Sequenzen einzelner Erdnussproteine.**

<i>Bande</i> <sup>1</sup>	<i>Sequenz</i>	<i>Intensität</i>	<i>Bemerkung</i>
1	R Q Q X E L Q G D R R	90 %	Ara h 2
2	R Q Q X E L Q G D R R	90 %	Ara h 2
3	R E F S D Q G Q Q	90 %	?
4	I S F R Q Q P E E N	30 %	NH <sub>2</sub> -Terminus Ara h 3/Ara h 4 <sup>2</sup>
5	(G,S,R) (Q,N,T) (F,E,R) (E,S,V) (Q,E,T,N) (D,Q,L) (Q,F,P) (Q,G,E,T) (D,N,A, Q) (N,R)	je 30 % (die jeweils ersten drei angegebenen Aminosäuren)	verschiedene interne Sequenzen der Erdnussallergene Ara h 2, Ara h 3/Ara h 4 <sup>2</sup> , Ara h 6, Ara h 7

<sup>1</sup> korrespondierende Bande in Abb. 4.4

<sup>2</sup> Ara h 3 und Ara h 4 stellen höchstwahrscheinlich Isoformen oder Varianten des selben Proteins dar.

### Identität der Doppelbande bei 18 und 20 kDa als Ara h 2 und Ara h 2.02

Zur Bestätigung der Identität der beobachteten Doppelbande als Ara h 2 wurden die Sequenzierergebnisse der entsprechenden Banden (1 und 2) analysiert. (Abb. 4.4, Tab. 4.2). Es wurden jeweils eindeutig 11 Aminosäuren bestimmt, wobei Position 4 in beiden Fällen nicht ermittelt werden konnte. Beide aminoterminale Sequenzen sind identisch und entsprechen bisher publizierten aminoterminale Proteinsequenzen von Ara h 2 aus Erdnuss (Burks *et al.* 1992, Stanley *et al.* 1997). In allen Fällen konnte die vierte Aminosäure, ein Tryptophan, nicht bestimmt werden. Die ermittelte aminoterminale Sequenz stimmt außerdem mit den verfügbaren Ara h 2-Datenbankeinträgen (Abb. 4.5) überein. Zwei der Datenbanksequenzen von Ara h 2 sind nahezu identisch, sie leiteten sich von einer cDNA- bzw. genomischen Nukleotidsequenz ab (Abb. 4.5: Ara h 2, Ara h 2\*). Die dritte Sequenz (Abb. 4.5: Ara h 2.02) entspricht einer Ara h 2-Isoform, welche mit Ausnahme einer Insertion von 12 Aminosäuren, nahezu identisch ist. Die Aminosäuren der Positionen 1 bis 20 der abgeleiteten Datenbanksequenzen entsprechen einer putativen Signalsequenz (Nielsen *et al.* 1997). Eine derartige Sequenz wäre, da sie im Verlaufe der Translokation abgespalten wird, im reifen Protein nicht nachweisbar. Dies entspricht den erhaltenen Ergebnissen.

Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei der beobachteten Bande mit höherem Molekulargewicht um eine Isoform handelt, deren Sequenz möglicherweise einem als Ara h 2.02-Isoform bezeichneten Datenbankeintrag entspricht (Chatel *et al.* 2003).

```

Arah2.02      MAKLTILVALALFLLAAHASARQQWELQDRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSY 60
Arah2         ---LTILVALALFLLAAHASARQQWELQDRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSY 57
Arah2*        MAKLTILVALALFLLAAHASARQQWELQDRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSY 60
                *****

Arah2.02      GRDPYSPSQDPYSPSQDPDRRDPYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRMCCEA 120
Arah2         ERDPYSPSQDPYSP-----SPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRMCCEA 105
Arah2*        ERDPYSPSQDPYSP-----SPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRMCCEA 108
                *****

Arah2.02      LQQIMENQSDRLQGRQEQQFKRELRLNLPQQCGLRAPQRCDLVESGGRDRY 172
Arah2         LQQIMENQSDRLQGRQEQQFKRELRLNLPQQCGLRAPQRCDLVESGGRDRY 157
Arah2*        LQQIMENQSDRLQGRQEQQFKRELRLNLPQQCGLRAPQRCDLVESGG---- 156
                *****:*****

```

**Abb. 4.5: Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Ara h 2-Datenbankeinträge.**

Bei Ara h 2 (Genbank: L77197; Stanley *et al.* 1997) und Ara h 2.02 (Genbank: AY158467; Chatel *et al.* 2003) handelt es sich um die von der Nukleotidsequenz der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz. Ara h 2\* (Genbank: AY007229, Viquez *et al.* 2001) entspricht der korrespondierenden Aminosäuresequenz von genomischer DNA. Die Bereiche der vorhergesagten aminoterminalen Signalsequenzen (Programm: *Signal P*; <http://www.expasy.org/tools/>) sind grau unterlegt. Unterstrichene Bereiche entsprechen den durch aminoterminalen Sequenzanalyse ermittelten Proteinabschnitten. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) angefertigt.

### Die Identität weiterer Banden kleiner 14 kDa

Sequenz 4 konnte durch eine Datenbanksuche mit Hilfe des Programmes BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast>) eindeutig als Aminoterminus der Erdnussallergene Ara h 3 und Ara h 4 identifiziert werden (Abb. 4.4, Tab. 4.2). Auf Grund weitestgehender Sequenzidentität beider hinterlegter Datenbanksequenzen ist von einer Identität der Proteine oder von einem Vorliegen von Isoformen oder Varianten auszugehen (King *et al.* 1995). Sequenz 3 konnte durch Datenbanksuche nicht identifiziert werden, möglicherweise handelt es sich um ein noch nicht beschriebenes Erdnussprotein.

Die als Bande 5 bezeichnete Probe lieferte kein eindeutiges Sequenzierergebnis (Abb. 4.4, Tab. 4.2). Offenbar enthält der ausgeschnittene Membranbereich mindestens drei verschiedene Proteine mit annähernd identischen Konzentrationen. Jeder Sequenzposition konnten mehrere mögliche Aminosäuretypen zugeordnet werden (z. B. Position 1: G, S, N; Position 2: Q, N, T). Dementsprechend ergeben sich beispielsweise durch Kombination der einzelnen Aminosäuren zu Dipeptiden bereits folgende neun Möglichkeiten: GQ, SQ, RQ, GN, SN, RN, GT, ST, RT. Um die Identität der in der Mischsequenz verborgenen Einzelsequenzen dennoch zu ermitteln, wurden sämtliche bekannte Erdnussallergensequenzen mit dem Programm *FindPatterns* des GCG Programmpaketes (Genetics Computer Group,

Madison, USA) nach dem Vorhandensein des Motivs (g,s,r)(q,n,t)(f,e,r)(e,s,v)(q,e,t,n)(d,q,l)(q,f,p)(q,g,e,t)(d,n,a,q)(n,r) durchsucht.

Die Methode erlaubt das Absuchen nach sämtlichen sich ergebenden Kombinationsmöglichkeiten, durch Variation der vorgegebenen Reste für die einzelnen Sequenzpositionen. Die *Patternsuche* lieferte Treffer für Sequenzabschnitte der Erdnussallergene Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7 und Ara h 3 (= Ara h 4), dabei waren mehrheitlich keine aminoterminal gelegenen Bereiche, sondern interne Positionen aufzufinden (Abb. 4.6). Im Fall der 2S Albumine Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 handelt sich dabei möglicherweise um verkürzte Formen ein und des selben Vorläuferproteins oder aber um eine im reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel in Erscheinung tretende Untereinheit eines disulfidverbrückten Heterodimers, welches durch proteolytische Spaltung eines oder mehrerer Sequenzabschnitte resultieren könnte. Die zu Ara h 3 bzw. Ara h 4 korrespondierende Sequenz könnte ebenfalls Ausdruck eines Fragmentes des Vorläuferproteins sein. Das Protein gehört zur Klasse der Glycinine der Samenspeicherprotein, welche typischerweise als 60 kDa Vorläufer synthetisiert werden und anschließend in eine aminoternale (40 kDa) und eine carboxyterminale (20 kDa) Untereinheit und 20 kDa Protein proteolytisch prozessiert werden (Scott *et al.* 1992). In der Erdnuss wurde bereits ein 14 kDa großes Ara h 3 Fragment nachgewiesen (Rabjohn *et al.* 1999). Dieses konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 4.4, Tab. 4.2).

Das Vorliegen von anderen nicht allergenen Erdnussproteinen mit unbekannter Sequenz kann an dieser Stelle nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch die Möglichkeit von Aufarbeitungsartefakten ohne physiologische Relevanz muss in Betracht gezogen werden. Dies erscheint jedoch als außerordentlich unwahrscheinlich, da auf Bedingungen, die eine chemische oder enzymatische Fragmentierung wie lange Inkubationszeiten oder stark saure pH-Werte verzichtet wurde.

Pattern: (G,S,R)(Q,N,T)(F,E,R)(E,S,V)(Q,E,T,N)(D,Q,L)(Q,F,P)(Q,G,E,T)(D,N,A,Q)(N,R)	
	↓
Ara h 3/4	NH <sub>2</sub> -Terminus: G Q E E E D (Q) G (D) N Datenbank: 252: RRERA G Q E E E D (E) G (G) N IFSGF
Ara h 2	NH <sub>2</sub> -Terminus: R Q - - E L Q G D R Datenbank: 19: AHASA R Q (Q) (W) E L Q G D R RCQSQ
Ara h 6	NH <sub>2</sub> -Terminus: S T R S - D Q Q Q R Datenbank: 53: SYNFG S T R S (S) D Q Q Q R CCDEL
Ara h 2	NH <sub>2</sub> -Terminus: - N E - N - F E N N Datenbank: 89: HQERC (C) N E (L) N (E) F E N N QRCCMC
Ara h 7	NH <sub>2</sub> -Terminus: - N E - N - F Q N N Datenbank: 100: QEQR (C) N E (L) N (R) F Q N N QRCCMC

**Abb. 4.6:** Ergebnis der „Pattern“-Suche mit den aminoterminalen Sequenzen der Bande 5 (Tab. 4.2).

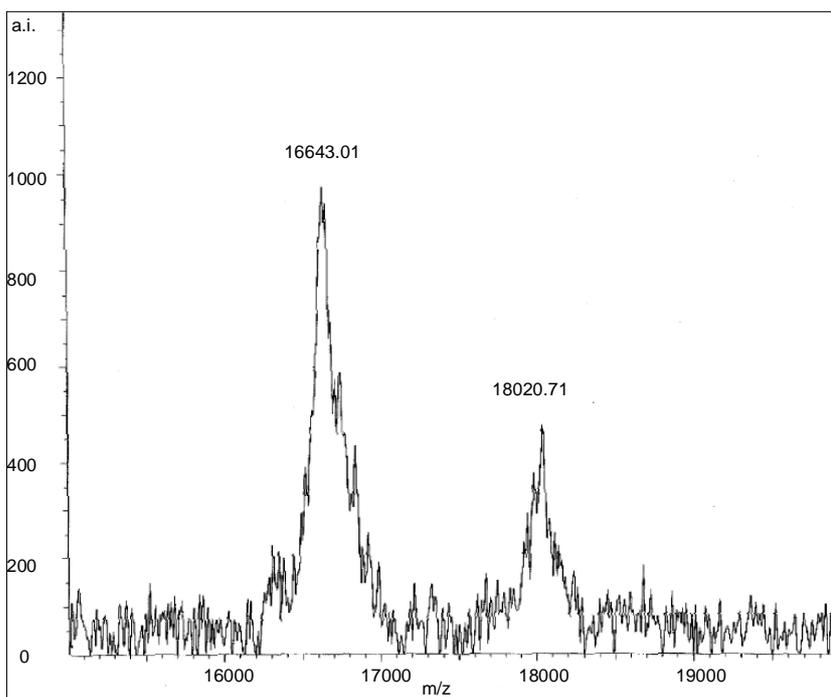
Mit dem Programm „*FindPatterns*“ des GCG Programmpaketes (Genetics Computer Group, Madison, USA) wurde das Vorhandensein der variablen Sequenz (g,s,r)(q,n,t)(f,e,r)(e,s,v)(q,e,t,n)(d,q,l)(q,f,p)(q,g,e,t)(d,n,a,q)(n,r) innerhalb der Aminosäuresequenzen der Erdnussallergene Ara h 2, Ara h 3 (Ara h 4), Ara h 5, Ara h 6 und Ara h 7 geprüft. Mit Datenbanksequenzen (Datenbank) übereinstimmende ermittelte aminoterminalen Sequenzabschnitte mit bis zu drei fehlerhaften Resten sind dargestellt. Die Sequenzposition übereinstimmender Bereiche ist durch eine Ziffer vor den flankierenden Aminosäuren bezeichnet. Nicht oder falsch bestimmte Reste sind mit runden Klammern markiert.

#### 4.1.2.2 Nachweis der Identität von nAra h 2 als Protein ohne Kohlenhydratanteil

Im Vorfeld struktureller Untersuchungen sollte die Anwesenheit von Kohlenhydratketten bei Ara h 2 geprüft werden. Die typische Ara h 2-Doppelbande könnte außer durch die mögliche Existenz zweier oder mehrerer Isoformen theoretisch auch durch unterschiedlich stark glykosylierte Formen verursacht werden. Zur Klärung dieser Frage wurde gereinigtes nAra h 2 mit MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Das Massenspektrum zeigt die Existenz zweier Hauptsignale bei m/z 16643 und 18020 (Abb. 4.7). Das Signal bei m/z 16643 entspricht dem berechneten Molekulargewicht (16640,1 Da) des Natriumadduktes (M+Na)<sup>+</sup> von dem ursprünglich von Stanley *et al.* (1997) beschriebenen Allergen Ara h 2 (GenBank: L77197) bei Abzug der vorhergesagten und durch aminoterminalen Sequenzanalyse bestätigten Signalpeptidsequenzen (Kap. 4.1.2.1). Das Signal m/z 18020,71 stimmt unter Annahme eines

Natriumadduktes mit einer in der Datenbank hinterlegten Ara h 2.02 Isoform (17985,5 Da; GenBank: AY158467; Chatel *et al.* 2003) mit einem Unterschied von 24 Da überein. Möglicherweise resultiert die beobachtete Massendifferenz aus Messungenauigkeiten der offenbar gering konzentrierten Probe oder aber ist Ausdruck einer leichten Variation der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen aus verschiedenen Erdnusspezies.

Die Existenz von kovalent verknüpften Zuckerresten sollte sich in einer Erhöhung der Molekularmasse des natürlichen Proteins im Vergleich zur berechneten Masse auf Basis der Sequenz der Polypeptidkette äußern. Dies kann zumindest bei der kleineren Ara h 2-Variante ausgeschlossen werden. Die Molekularmassendifferenz von 1377 Da zwischen den beiden Varianten könnte in der Tat durch die Anwesenheit eines Glykananteils im Fall des größeren Proteins verursacht werden. Die relativ genaue Übereinstimmung mit der berechneten Masse der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von Ara h 2.02 lässt dies jedoch eher unwahrscheinlich erscheinen. Auch die Überlagerung einer Isoform und einer glykosylierten Spezies wäre denkbar.

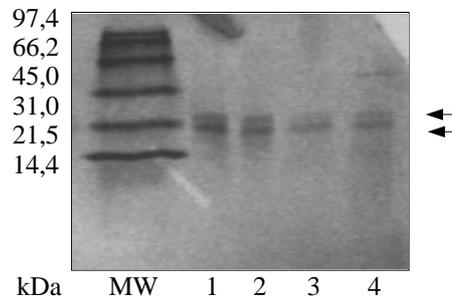


**Abb. 4.7:** Ausschnitt des MALDI-Massenspektrums von nAra h 2.

Aus der Erdnuss gereinigtes Ara h 2 wurde in Spuren in 0,1 % TFA (v/v) gelöst und an einem Flugzeitmassenspektrometer (MALDI-MS, Bruker-Reflex<sup>TM</sup>II, Bruker-Franzen, Bremen) gemessen.

Zur genaueren Absicherung des Befundes des fehlenden Glykananteils wurden Deglykosylierungstests mit gereinigtem nAra h 2 durchgeführt (Kap. 3.7.6). Bei enzymatischer Spaltung eines möglicherweise vorhandenen Kohlenhydratanteils wäre eine Reduktion des apparenten Molekulargewichtes und damit eine veränderte elektrophoretische Beweglichkeit des Proteins zu erwarten. Natürliches Ara h 2 aus Erdnuss zeigte hingegen weder nach PNGaseF- noch nach PNGaseA-Inkubation eine veränderte Laufhöhe im SDS-

Polyacrylamidgel (Abb. 4.8). Insgesamt wurden keine Hinweise auf die Existenz eines Glykananteils bei Ara h 2 gefunden.



**Abb. 4.8: Deglykosylierungsversuch mit nAra h 2 aus Erdnuss.**

10 %iges Coomassie-gefärbtes NUPAGE-Bis-Tris SDS-Polyacrylamidgel. Dargestellt sind nAra h 2 Proben nach PNGaseA (1) und PNGaseF (3) Behandlung sowie mitgeführte Enzym-freie Kontrollen (2,4). 12 bis 15  $\mu$ M nAra h 2 wurden mit 0,5 mU PNGaseA bzw. 0,2 U PNGaseF für 48 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollproben wurden exakt gleich behandelt, jedoch mit der zum eingesetzten Enzymvolumen äquivalenten Menge Wasser versetzt. Molekulargewichtsstandard: Mark12.

#### 4.1.2.3 IgE-Bindung von nAra h 2

Gereinigtes Ara h 2 als auch Erdnussextrakt wurden mittels Westernblotexperimenten unter Verwendung des Serums eines Erdnuss-allergischen Patienten analysiert (Kap. 3.7.2). Nach Elektrophorese wurden Spuren von gereinigtem nAra h 2 und Erdnussextrakt sowohl einer Coomassie-Färbung als auch einem Western-Blot (Abb. 4.9) unterzogen. Das gereinigte Protein zeigt eine starke und definierte Reaktion mit Patientenserum. Beide Banden sind von gleicher Intensität, woraus identische immunologische Eigenschaften der beiden Ara h 2-Isoformen abzuleiten sind.

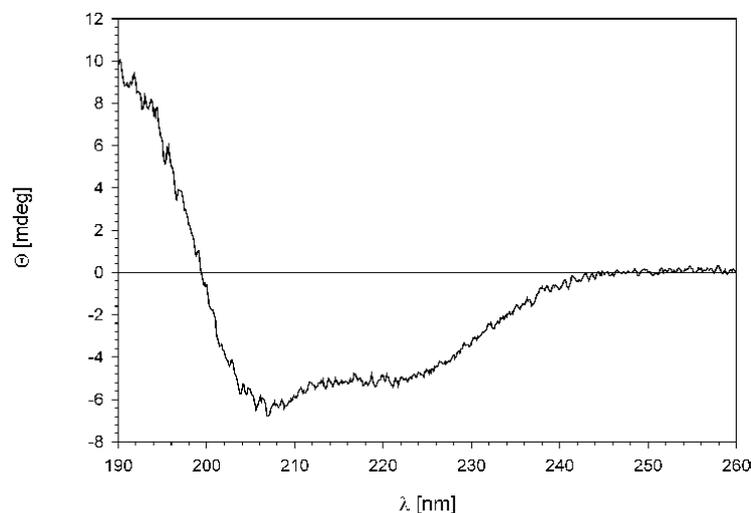


**Abb. 4.9: Westernblotanalyse von nAra h 2 aus Erdnuss mit Antiserum eines Erdnuss-allergischen Patienten.**

Gereinigtes Ara h 2 wurde einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die spezifische Bindung von Patientenserum wurde mit Anti-Mensch-IgE als sekundären mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Antikörper detektiert. Gebundene Antikörper wurden durch Inkubation mit NBT/BCIP visualisiert.

### 4.1.3 Strukturelle Untersuchungen von nAra h 2 aus Erdnuss

Zum Zwecke einer ersten strukturellen Charakterisierung von nAra h 2 wurden CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (Kap. 3.8.2, 3.9.1). Primäres Ziel war zunächst das Vorhandensein von Sekundär- und Tertiärstruktur am gereinigten Protein zu prüfen. Das CD-Spektrum weist deutlich auf Anteile regulärer Sekundärstruktur hin (Abb. 4.10). Die charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm sprechen für eine stark  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur. Die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität als auch der exakten Proteinkonzentration war im Fall von natürlichem Ara h 2 auf Grund der Isoformenzusammensetzung nicht möglich. Aus dem CD-Spektrum können demzufolge ausschließlich qualitative Aussagen getroffen werden.

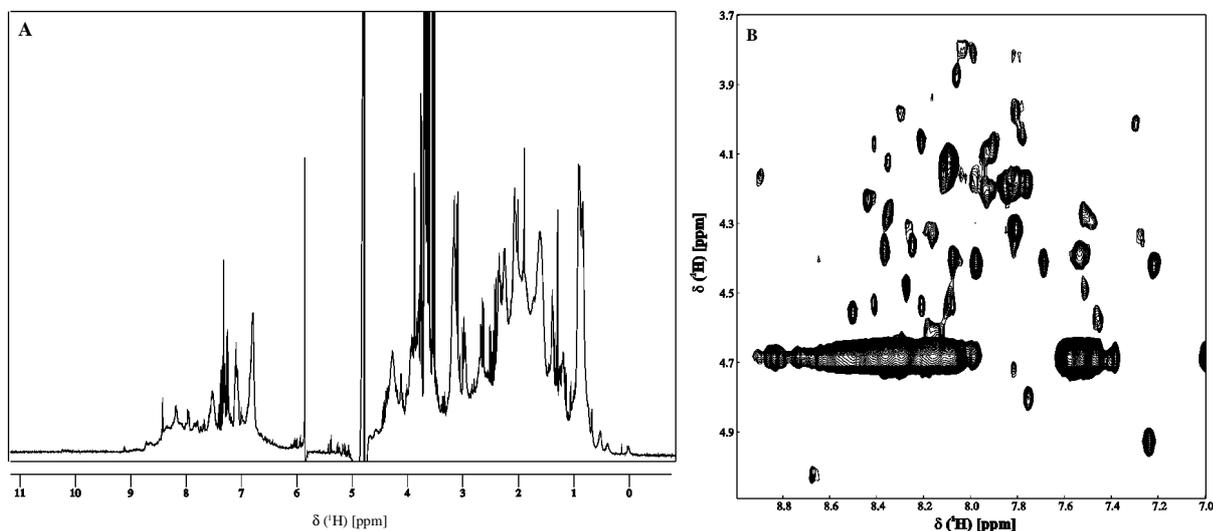


**Abb. 4.10: Fern-UV-CD-Spektrum von nAra h 2.**

Die Messung erfolgte in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7 bei 20 °C bei einer Küvettschichtdicke von 0,1 cm. 8 Spektren wurden akkumuliert. Die identisch aufgenommenen und 8-fach akkumulierten Pufferspektren wurden subtrahiert.

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht weitergehende Aussagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur. Das 1D  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von nAra h 2 zeichnet sich durch eine für  $\alpha$ -helikale Proteine typische begrenzte Dispersion der Amidprotonenresonanzen zwischen 7,5 und 8,5 ppm aus (Abb. 4.11A). Außerdem zeigt es mehrere Hochfeldverschiebungen von Methylgruppen (Hochfeld von 0,8 ppm). Dies kann als ein starkes Indiz für vorhandene Tertiärstruktur gewertet werden. Einzelne scharfe Resonanzen stammen möglicherweise von niedermolekularen Verunreinigungen in der Probe. Im TOCSY-Spektrum sind trotz der geringen Probenmenge (2 mg/ml) eine große Anzahl von Kreuzsignalen erkennbar

(Abb. 4.11). Die meisten Amid und C<sup>α</sup> Protonenresonanzen befinden sich im Bereich von 7,5 bis 8,5 ppm bzw. 3,8 ppm bis 4,8 ppm. Resonanzen in diesem Bereich sind charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Proteine mit geringem oder nicht vorhandenem  $\beta$ -Strukturanteil.



**Abb. 4.11: NMR-Spektroskopie an nAra h 2.**

(A) 1D <sup>1</sup>H NMR Spektrum von 2 mg/ml nAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 10 % D<sub>2</sub>O. Bruker Avance Spektrometer DRX-400, 298 K, 8192 gemessene Scans.

(B) Fingerprintbereich eines TOCSY Spektrums von 0,3 mM nAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 10 % D<sub>2</sub>O. Bruker Avance Spektrometer DRX-400, 298 K, 128 gemessene Scans.

## 4.2 Heterologe Darstellung und Charakterisierung von Ara h 2

Für eine NMR-basierte Strukturbestimmung ist aus der Erdnuss gewonnenes Ara h 2 bereits auf Grund des Vorhandenseins von Isoformen nicht geeignet. Außerdem erfordern strukturbiochemische Untersuchungen mit NMR an einem Protein der Größe von Ara h 2 Isotopenmarkierung und Probenmengen im Milligramm Maßstab. Dementsprechend war es notwendig, ein effizientes *E. coli* basiertes heterologes Expressionssystem sowie ein geeignetes Reinigungsprotokoll zu etablieren.

Die bakterielle Expression von Ara h 2 erscheint in zweierlei Hinsicht problematisch. Die erste Schwierigkeit ist in der eukaryotischen Herkunft der zu verwendenden DNA zu suchen. Eine Analyse des zur Verfügung stehenden Ara h 2-Klones zeigte, dass die von *E. coli* äußerst selten zur Kodierung herangezogenen Arginincodons AGG und AGA zu einem sehr hohen Anteil von 12 % in der Nukleotidsequenz von Ara h 2 zu finden sind. Dieser Umstand, verbunden mit der entsprechend niedrigen Konzentration an tRNA<sub>AGA/AGG</sub>, ist häufige Ursache

für geringe Expressionsraten, Abbruch der Translation oder dem fehlerhaften Einbau von Aminosäuren (Kane 1995). Die zweite Problematik resultiert aus dem Vorhandensein von 8 disulfidverbrückten Cysteinresten innerhalb der Aminosäuresequenz von Ara h 2. Disulfidverbrückte Proteine zeigen im bakteriellen reduzierenden Cytoplasma eine starke Tendenz zur Akkumulation in unlösliche Einschlusskörperchen oder werden nicht korrekt gefaltet (Georgiou & Valax 1996). Vor allem im Hinblick auf strukturelle Untersuchungen ist eine authentische Faltung von außerordentlicher Bedeutung. Das Auftreten von unlöslichen Einschlusskörperchen ist ebenfalls von Nachteil, da Protein nur in denaturierter Form gewonnen werden kann. Die anschließend erforderlichen Rückfaltungsprozeduren sind insbesondere bei disulfidverbrückten Proteinen außerordentlich problematisch. Um den genannten Problemen effektiv zu begegnen, wurden verschiedene Expressionssysteme hergestellt und verglichen. Dabei sollte die Anwendung von Stämmen mit defekter Reduktionsmaschinerie auf ihre Eignung zur Expression von löslichem und disulfidverbrücktem Protein in Form eines Thioredoxin-Ara h 2-Fusionsproteins und eines Anhang-freien Proteins getestet werden. Außerdem sollte eine Möglichkeit zur Steigerung der Ara h 2-Expressionsrate durch Koexpression von in *E. coli* selten vorkommende tRNAs gefunden werden.

#### 4.2.1 Klonierung verschiedener Ara h 2-Expressionssysteme

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Plasmid pET16b-His-Arah2.02 vor (Dr. W.-M. Becker; Forschungszentrum Borstel). Die korrespondierende Aminosäuresequenz des insertierten Genes entspricht einer unter der Bezeichnung Ara h 2.02 in *Genbank* (AY158467) hinterlegten, aus der Nukleotidfolge einer komplementären DNA abgeleiteten Sequenz. Es handelte sich dabei um eine von Chatel *et al.* (2003) beschriebenen Ara h 2-Isoform, die sich durch die Insertion der Sequenz PYSPSQDPDRRD (Sequenzpositionen 50-61), durch den Austausch eines Glutamatrestes durch Glycin an Sequenzposition 40 (E40G) sowie durch den Austausch eines Aspartatrestes durch Glutamat an Sequenzposition 142 (D142E) von Ara h 2 unterscheidet (Abb. 4.12). Das Plasmid pET16b-His-Arah2.02 diente als Grundlage zur Konstruktion des Ara h 2-Genes (Burks *et al.* 1992, Stanley *et al.* 1997, Viquez *et al.* 2001). Im Gegensatz zu der erst kürzlich beschriebenen Isoform Ara h 2.02 existieren für Ara h 2 sehr umfangreiche immunologische Daten (Burks *et al.* 1992, Stanley *et al.* 1997). Die Untersuchung von Ara h 2.02 war daher nicht Gegenstand dieser Arbeit.

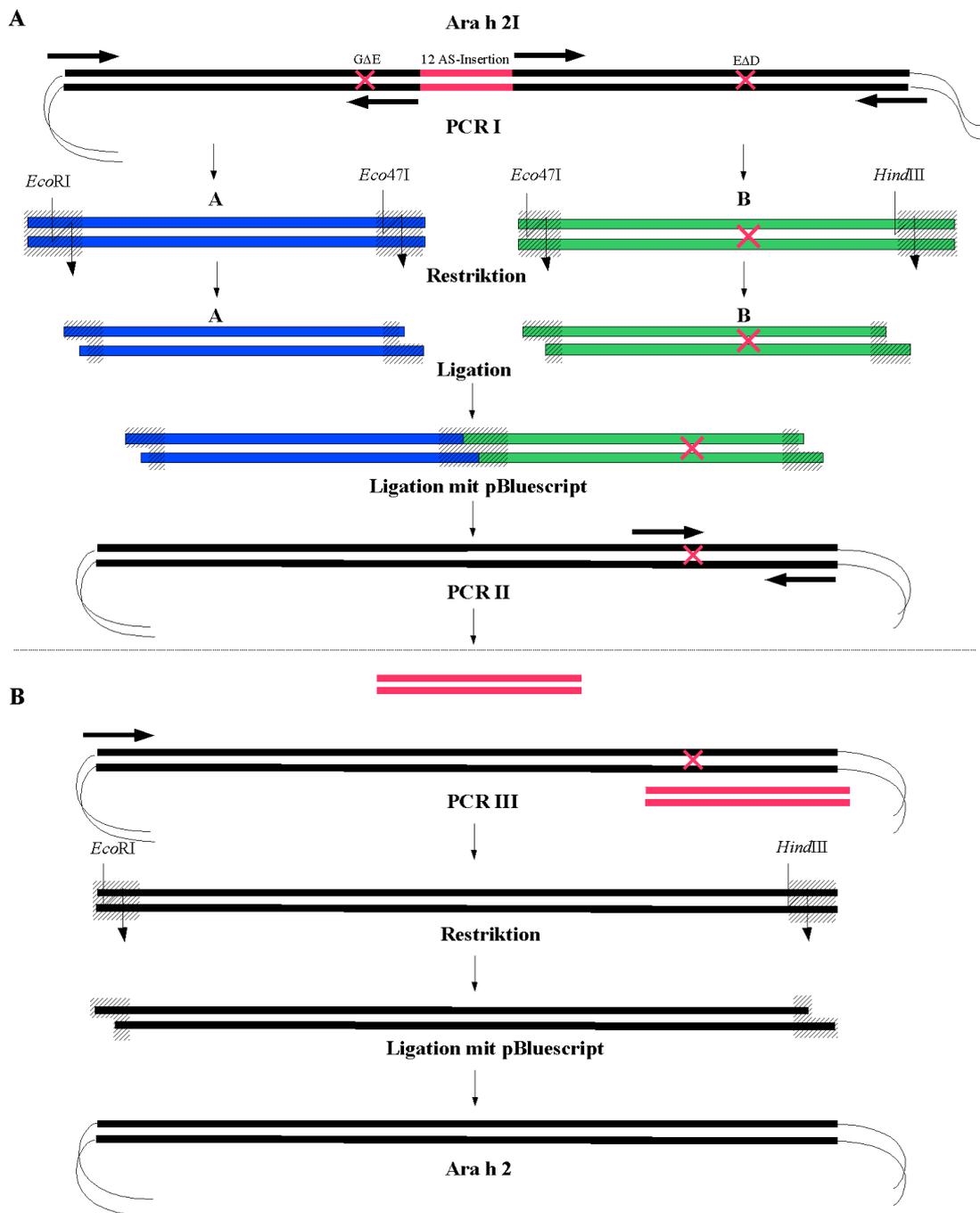
Arah2.02	RQQWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSY <u>GRDPYSPSQDP</u> 50
Arah2	RQQWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSY <u>ERDPYSPSQD</u> - 49
Arah2.02	<u>YSPSQDPDRRD</u> PYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRCMCEAL 100
Arah2	-----PYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRCMCEAL 88
Arah2.02	QQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDL <u>E</u> VESGGRDRY 151
Arah2	QQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDL <u>D</u> VESGGRDRY 139

**Abb. 4.12: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ara h 2 (Genbank: L77197 ) und Ara h 2.02 (Genbank: AY158467).**

Beide Proteine sind ohne aminoterminalen Signalsequenzen dargestellt. Die Aminoermini entsprechen denen der reifen Proteine.

#### 4.2.1.1 Umwandlung von Ara h 2.02 zu Arah2

Die Umwandlung von Ara h 2.02 zu Ara h 2 erfolgte in zwei Stufen (Abb. 4.13). In einem ersten Schritt wurde der 36 Nukleotide umfassende in Ara h 2.02 insertierte Sequenzabschnitt (Aminosäuren: PYSPSQDPDRRD) entfernt. Zu diesem Zweck wurden die stromaufwärts und stromabwärts der Insertion befindlichen Gensegmente (Aminosäuresequenzposition in Ara h 2.02: 1-49 und 62-151) unter Verwendung der Linkerprimerpaare Arah2m2-3' und Arah2tagless-5' sowie Arah2m3-5' und Arah2rev-3' mittels PCR separat amplifiziert und anschließend durch Ligation von *Eco47I*-kohäsiven Enden zu einem einzigen DNA-Doppelstrang verbunden. Dabei wurde der Umstand genutzt, dass die Codons *cag*, *gac* und *ccc* (Q48, D49 und P62 in Ara h 2.02), die in der resultierenden Ara h 2-Sequenz benachbart vorliegen, durch *Eco47I*-Restriktion (Erkennungssequenz: *g'gacc*) beider Fragmente und anschließender Ligation generiert werden können. Zu diesem Zweck wurde am 3'-Ende des Genfragmentes für AS(1-49) die Sequenz 5'-*cag'gac c-3'* und am 5'-Ende des Fragmentes 62-151 die Sequenz 5'-*g'ga ccc c-3'* durch Linker-PCR (Kap. 3.5.4.1) erzeugt. Nach Restriktion (Kap. 3.5.3.1) und Ligation (3.5.3.3) resultiert die für QDP kodierende Basenfolge *cag gac ccc*. Am 5'-Ende des Fragmentes AS(1-49) (Aminosäureposition in Ara h 2.02) und am 3'-Ende des Fragmentes AS(62-151) (Aminosäureposition in Ara h 2.02) wurden außerdem flankierende Restriktionsschnittstellen für eine spätere Klonierung des kompletten Genes in pBluescript (*EcoRI* und *HindIII*) und in pET-16b (*NcoI*, *Bpu1102I*) generiert. Als primärer Klonierungsvektor wurde auf Grund der einfachen Handhabbarkeit (geringe Größe, „Blau-Weiß-Screening“) pBluescript verwendet. Mittels Primer Arah2m2-3' wurde parallel der Austausch von Glycin gegen Glutamat durch Einführen des Codons *gaa* an Stelle *gga* ohne weitere Mutageneseschritte realisiert.

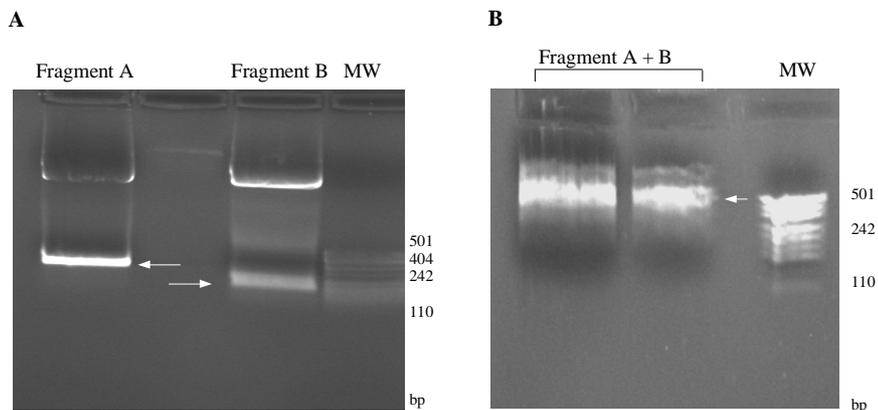


**Abb. 4.13: Schematische Darstellung des Ablaufs der Mutagenese von Ara 2.02 zu Ara h 2.**

(A) Entfernung der 12-Aminosäure-Insertion und Austausch von Glycin durch Glutamat. Amplifikation der Gensegmente A und B mit Linkerprimern. Restriktionsverdau und Ligation der beiden Segmente zu einem Gesamtgen. Ligation in pBluescript.

(B) Austausch von Glutamat durch Aspartat durch Zwei-Schritt-PCR.: PCR mit 2 Linker-Primern, wobei der Mutagenesprimer den Basenaustausch realisiert. Das die Mutation tragende Produkt wird als Doppelstrangprimer für eine zweite PCR eingesetzt. Nach Restriktionsverdau erfolgt Ligation mit pBluescript.

Die amplifizierten Gensegmente (Abb. 4.14A) einer Größe von 308 und 169 bp wurden nach elektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel extrahiert (Kap. 3.5.2.3) und mit *Eco*47I und *Eco*RI (Fragment AS(1-49)) bzw. *Eco*47I und *Hind*III (Fragment 62-151) hydrolysiert und ligiert. Das resultierende Produkt wurde erneut durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und anschließend mit einem *Eco*RI und *Hind*III-restrigierten pBluescript ligiert (Abb. 4.14B). Positive Transformanten wurden nach Elektrotransformation in *E. coli* Top10 durch Kolonie-PCR (Kap. 3.5.4.3) mit weißen Kolonien (Blau-Weiß-Screening) unter Verwendung der Primer pUCseq und pUCseqrev identifiziert. Bereits bei der Herstellung dieses Konstruktes wurden flankierende Restriktionsstellen für eine pET-16b-Klonierung generiert. Von positiven Klonen, die eine Amplifikatlänge von 592 bp aufwiesen, wurde Plasmid-DNA präpariert.



**Abb. 4.14: Zwischenprodukte der Mutagenese zur Herstellung von Ara h 2.**

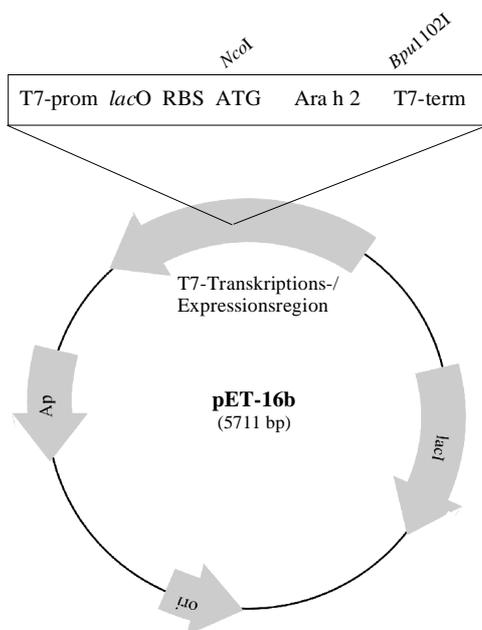
Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel nach Elektrophorese der Amplifikate (A) AS(1-49) (Fragment A) und AS(62-151) (Fragment B) sowie des Gesamtgenes (B: Fragment A+B) nach *Eco*47I-Restriktion und Ligation beider Gensegmente. Die DNA-Fragmente wurden jeweils aus dem Agarosegel extrahiert. Molekulargewichtsmarker: pUC19DNA/MspI Marker.

Abschließend wurde das Codon *gaa* durch eine Zwei-Schritt-PCR (Kap. 3.5.4.2) in *gat* umgewandelt und damit der Aminosäureaustausch E130D (Sequenzposition in Ara h 2) realisiert. Nach der ersten PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer Arah2m3-5' und Arah2rev-3' und des primär erzeugten Konstruktes als Matrize wurde das resultierende DNA-Fragment durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und als Doppelstrangprimer in Kombination mit Arah2rev-3' für eine zweite PCR eingesetzt. Das Amplifikat wurde auf gleiche Weise gereinigt, mit *Hind*III und *Eco*RI hydrolysiert und mit einem analog restrigierten und dephosphorylierten pBluescript ligiert. Nach Elektrotransformation in *E. coli* TOP10 wurden weiße Kolonien einer Kolonie-PCR mit den Primern pUCseq und pUCseqrev

unterzogen. Die korrekte Sequenz des konstruierten Plasmides pBluescript-Arah2 wurde durch Sequenzierung verifiziert (Anhang 10.1).

#### 4.2.1.2 Konstruktion des Anhang-freien Ara h 2-Expressionssystems

Die Herstellung eines Systems zur Expression von Ara h 2 ohne Anhang oder Fusionspartner erfolgte unter Verwendung des Vektors pET-16b (Novagen, Madison, USA; Abb. 4.15). Der Vektor ermöglicht eine T7-RNA-Polymerase-abhängige Expression von Zielgenen, enthält eine Polyhistidin- und eine Faktor-Xa-Erkennungssequenz. Zur Insertion des Ara h 2-Genes wurden die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bpu*1102I genutzt. Die im Vektor ursprünglich vorhandene Polyhistidinsequenz wurde durch *Nco*I/*Bpu*1102I-Restriktion entfernt. Ara h 2 konnte ohne Durchführung von PCR-Reaktionen aus dem Plasmid pBluescript-Ara h 2 (Kap. 4.2.1.1) in pET-16b umgesetzt werden, da bereits bei der Konstruktion des pBluescript-Systems zusätzliche flankierende Restriktionsstellen für eine pET-16b-Klonierung generiert wurden. Nach Restriktion (Kap. 3.5.3.1) von pBluescript-Ara h 2 mit *Nco*I und *Bpu*1102I, wurde Ara h 2 mittels präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt und mit einem analog hydrolysierten und dephosphorylierten pET-16b-Vektor ligiert (Abb. 4.15). Das resultierende Konstrukt erhielt die Bezeichnung pET-16b-Ara h 2 und wurde in die Stämme *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL und *E. coli* AD494(DE3) transformiert.

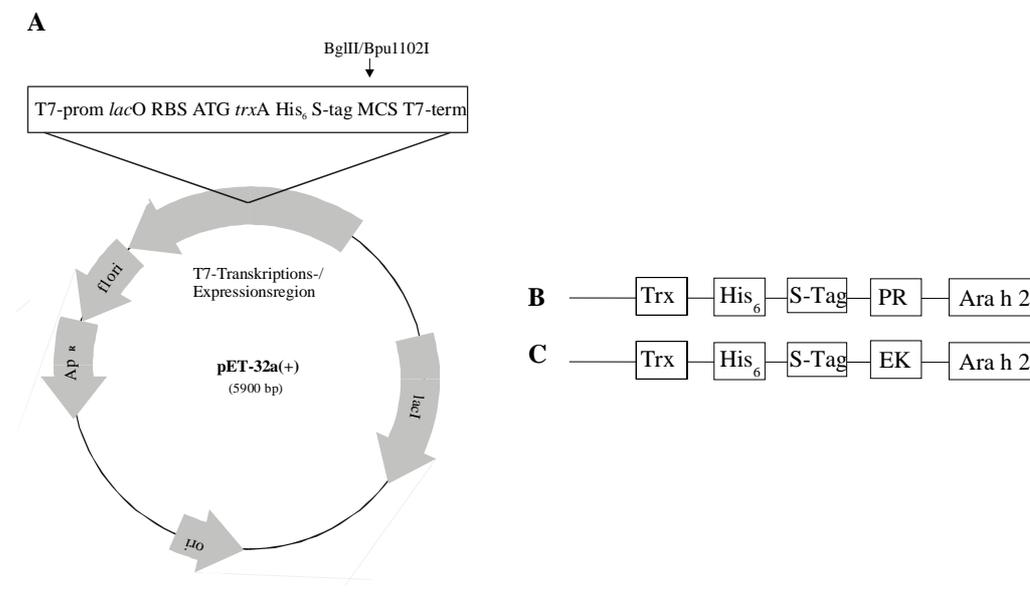


**Abb. 4.15: Schematische Darstellung des Anhang-freie Ara h 2-Expressionssystem.**

Schematische Darstellung des pET-16b-Ara h 2-Plasmids. Ara h 2 wurde über die Schnittstellen *Nco*I und *Bpu*1102I in den Vektor inseriert.

### 4.2.1.3 Konstruktion der Thioredoxin-Ara h 2-Expressionssysteme

Als Basis für Thioredoxin-Ara h 2-Expressionssysteme wurde der Vektor pET-32a (Novagen, Madison, USA) verwendet. Der Vektor erlaubt die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression eines Zielgens als Thioredoxin-(Trx)-Fusionsprotein. Er kodiert darüber hinaus für eine S-Anhangsequenz und Polyhistidinsequenzen sowie für Erkennungssequenzen für Thrombin und Enterokinase. Die zu klonierenden Ara h 2-Konstrukte sollten neben dem Thioredoxingen, carboxyterminal von Trx einen Hexahistidinanhang und daran anschließend eine Proteaseerkennungssequenz aufweisen. Es wurden zwei nahezu identische Konstrukte kloniert, die sich lediglich durch die Art der integrierten Proteaseschnittstellen (Enterokinase, PreScission-Protease) unterschieden (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16: Schematische Darstellung des Thioredoxin-Ara h 2-Expressionsplasmids.**

Darstellung des pET-32-Vektors (A) und Schema des Aufbaus der Expressionsprodukte der Plasmide pET32a-Trx-His-PR-Arah2 (B) und pET32a-Trx-His-EK-Arah2 (C).

Die Insertion des Ara h 2-Gens in pET-32a erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Bg*III und *Bpu*1102I. Die Erkennungssequenzen für Enterokinase und PreScission-Protease wurden über zwei unterschiedliche 5'-Primer eingeführt. Die im Vektor enthaltene Enterokinasesequenz wurde nicht genutzt, da die dafür notwendig Klonierungsstrategie einen Überhang zweier Aminosäuren am Aminoterminus von Ara h 2 nach proteolytischer Spaltung nach sich gezogen hätte.

Zur Konstruktion der Plasmide wurde eine Linker PCR (Abb. 3.5.4.1) unter Verwendung der 5'-Primer Arah2EK-5' bzw. Arah2PR-5' und des gemeinsamen 3'-Primers Arah2rev-3' durchgeführt (Kap. 3.5.4.1). Als Matrize diente das Plasmid pBluescript-Arah2. Das Amplifikat wurde von überschüssigen Primern und Matrize mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, aus dem Gel extrahiert (Kap. 3.5.2.3) und mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Bpu*1102I restringiert (Kap. 3.5.3.1). Anschließend erfolgte eine Ligation (Kap. 3.5.3.3) mit einem *Bgl*III/*Bpu*1102I hydrolysierten und dephosphorylierten pET-32a-Vektor. Nach Elektro-transformation (Kap. 3.5.5.2) in *E. coli* Top 10 wurden Kolonie-PCR-Reaktionen (Kap. 3.5.4.3) unter Verwendung der Primer *trx*-5' und T7-Terminator-2 zur Identifizierung von positiven Transformanten durchgeführt. Von Klonen, die eine Amplifikatlänge von ca. 620 bp aufwiesen, wurde Plasmid-DNA präpariert (Kap. 3.5.1). Die korrekte Nukleotidsequenz der Plasmide pET32a-Trx-His-EK-Arah2 und pET32a-Trx-His-PR-Arah2 wurde durch Sequenzierung verifiziert (Anhang 10.1). Die Plasmide wurden in *E. coli* Origami(DE3) und in *E. coli* AD494(DE3) transformiert.

Der zur Koexpression von *argU*-tRNA verwendete pUBS520S-Cm Vektor wurde aus pUBS520S generiert. Die genomische Kanamycinresistenz der Stämme Origami(DE3) und AD494(DE3) erforderte eine Änderung des ursprünglich Kanamycin-resistenten pUBS520S Vektors hin zur Chloramphenicol(Cm)-resistenz. Dazu wurde die Sequenz des Cm-Gens aus pLysS (Novagen, Madison, USA) mit den Oligonukleotidprimern pLysS-5' und pLysS-3' amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI in pUBS520S kloniert. Die *Hind*III Restriktionsschnittstelle ist in der für die ursprüngliche Kanamycinresistenz kodierenden Sequenz lokalisiert, wodurch diese eliminiert wurde.

## 4.2.2 Expression und Reinigung von Ara h 2

### 4.2.2.1 Optimierung der Expressionsrate und Aufschlusseffektivität

Zur Ermittlung eines geeigneten Expressionssystems für Ara h 2 wurden verschiedene Konstrukte hinsichtlich ihrer Expressionsrate und der Verteilung von Protein in Überstand und Sediment nach Zellaufschluss verglichen.

Zunächst wurden Ara h 2-Expressionsraten in Abhängigkeit verschiedener *E. coli*-Stämme und der verwendeten Expressionssysteme untersucht (Tab. 4.3). *E. coli* Origami(DE3) mit einer *trxB/gor*-Doppelmutation und *E. coli* AD494(DE3) mit einer *trxB*-Mutation ermöglichen die Ausbildung von Disulfidbindungen im Cytoplasma (Derman *et al.* 1993, Prinz *et al.* 1997). Zur Steigerung der Expression und um Abbruch während der Translation

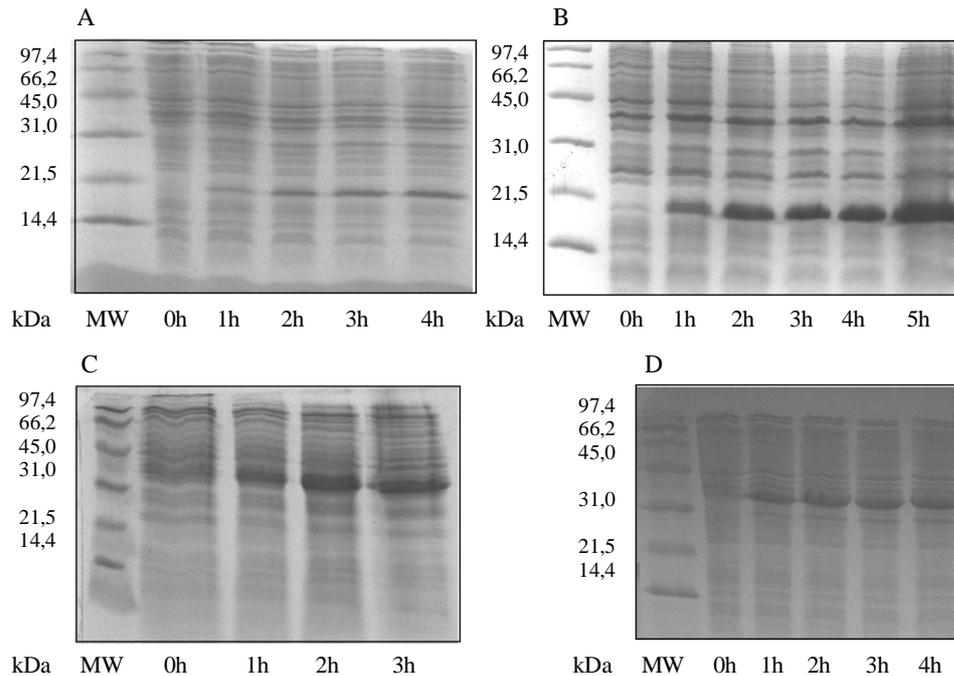
zu verhindern, wurden beide Stämme mit dem Plasmid pUBS520S-Cm, welches für *argU* tRNA codiert, kotransformiert. Diesen Zellen wurde *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, ein Stamm mit intaktem Reduktionssystem, gegenübergestellt. Er besitzt zusätzliche Kopien der in *E. coli* seltenen tRNA-Gene *argU*, *ileY* und *leuW*.

**Tab. 4.3 Übersicht verwendeter Expressionssysteme.**

<i>Stamm</i>	<i>Vektor</i>	<i>Zusätze</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>E. coli</i> Origami(DE3)	pET32a-Trx-His-PR-Arah2	pUBS520-Cm	<i>trxB/gor</i> , <i>argU</i> tRNA
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	pET32a-Trx-His-PR-Arah2	pUBS520-Cm	<i>trxB</i> , <i>argU</i> tRNA
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	pET16b-Arah2	pUBS520-Cm	<i>trxB</i> , <i>argU</i> tRNA
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	pET16b-Arah2	-	<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> tRNA

Für die Induktionsversuche (Kap. 3.6.1) wurden die unter Tabelle 4.3 aufgelisteten Expressionsstämme mit Ara h 2 enthaltenden Plasmiden transformiert. Von den Transformanten wurden einzelne Kolonien gepickt und über Nacht in LB-Flüssigmedium kultiviert. Die Testkultivierungen erfolgten im 250 ml-Maßstab in LB-Medium bei 37 °C. Der Verlauf der Induktion wurde durch SDS-Gelelektrophorese mit Kulturproben vor und ein bis vier Stunden nach IPTG-Zugabe analysiert (Abb. 4.17).

Die Expression von Thioredoxin-Ara h 2-Fusionsprotein war sowohl in *E. coli* Origami(DE3) als auch in *E. coli* AD494(DE3) sehr effizient. Anhang-freies Ara h 2 wurde im Gegensatz dazu und trotz sehr guter Ergebnisse mit *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL in Stämmen mit defektem Reduktionssystem nur sehr schwach exprimiert. Offenbar wirkt sich die Anwesenheit von Thioredoxin positiv auf die Expressionsrate in Stämmen mit *trxB* und *trxB/gor* Mutationen aus. Thioredoxin wird im Allgemeinen auf Grund seiner löslichkeitsfördernden Eigenschaften eingesetzt (LaVallie *et al.* 1993). Die Kombination mit AD494(DE3) und Origami(DE3) ist jedoch vor allem deshalb sinnvoll, da Thioredoxin die Ausbildung von Disulfidbindungen in diesen Stämmen zu katalysieren scheint (Stewart *et al.* 1998).



**Abb. 4.17: Vergleich der Expressionsraten von *E. coli* AD494(DE3)-pET-16b-Arah2 (A), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-pET-16b-Arah2 (B), *E. coli* Origami(DE3)-pET-32a-Trx-His-PR-Arah2 (C) *E. coli* AD494(DE3)-pET-32a-Trx-His-PR-Arah2 (D).**

Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit Kulturproben vor und stundenweise nach Induktion mit IPTG. Kultivierung erfolgte bei 37 °C in LB. *E. coli* Origami(DE3) *E. coli* AD494(DE3) enthielten pUBS520S-Cm. Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“)

Zellaufschlüsse erfolgten unter identischen Bedingungen durch Lysozym- und Ultraschallbehandlung (Kap. 3.6.2). Nach Klärung der Extrakte durch hochtourige Zentrifugation wurden äquimolare Mengen von Zellsediment und zellfreien Extrakten in Probenpuffer gelöst und elektrophoretisch analysiert. Die Aufschlusseffektivitäten, welche mit den einzelnen Expressionssystemen erzielt wurden, divergierten beträchtlich (Tab. 4.4). Anhang-freies Ara h 2 wurde sowohl im Fall einer Kultivierung mit *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL als auch mit *E. coli* AD494(DE3) zu über 90 % im Zellsediment aufgefunden. Im Gegensatz dazu war das mit Thioredoxin fusionierte Protein zu mindestens 50 % im lösliche Überstand enthalten. Daraus wird deutlich, dass die alleinige Anwendung von Stämmen mit defektem Reduktionssystem und damit die Möglichkeit zur Ausbildung der Disulfidbindungen im Cytoplasma nicht zu einer Erhöhung der Aufschlusseffektivität führt. Offenbar besteht eine Korrelation zwischen Löslichkeit und Anwesenheit der Thioredoxininfusion. Insgesamt wird deutlich, dass sich konventionelle *E. coli* Stämme mit zusätzlichen tRNA-Genen trotz hoher Expressionseffizienz auf Grund der Akkumulation des Proteins in unlöslicher Form nach Zellaufschluss nicht für die native Gewinnung von Ara h 2 eignen.

**Tab. 4.4 Subzelluläre Verteilung von Ara h 2 bei verschiedenen Expressionssystemen.**

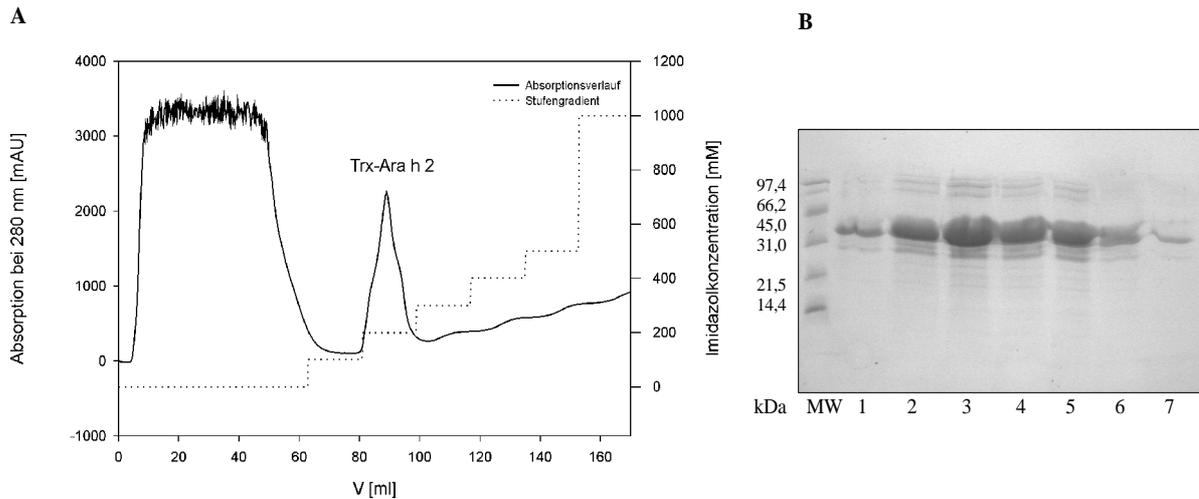
<i>Stamm</i>	<i>Vektor</i>	<i>Anteil im Zellsediment<sup>1</sup></i>	<i>Anteil im löslichen Überstand<sup>1</sup></i>
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	pET 16b	> 95 %	< 5 %
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	pET 16b	90 %	10 %
	pET 32a	50 %	50%
<i>E. coli</i> Origami(DE3)	pET 16b	> 95 %	< 5%
	pET 32a	50 %	50%

<sup>1</sup> Prozentuale Verteilung in den Fraktionen des Zellaufschlusses wurde entsprechend der Bandenintensität im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nach Auftragung äquivalenter Mengen abgeschätzt.

#### 4.2.2.2 Spaltung von Thioredoxin-Ara h 2-Fusionsprotein durch Proteasen

Thioredoxininfusionsproteine sollten basierend auf einer internen Hexahistidinsequenz mittels Metallaffinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und anschließend proteolytisch in einen Thioredoxin/Hexahistidin- und einen Ara h 2-Anteil gespalten werden. Zur Auswahl geeigneter Restriktionsproteasen wurde die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins auf das Vorliegen von Erkennungssequenzen von kommerziell erhältlichen Proteasen untersucht. Für Thrombin und Faktor Xa wurden sekundäre Erkennungssequenzen gefunden, Enterokinase und PreScission-Protease erschienen jedoch geeignet.

Thioredoxininfusionsproteine mit Enterokinase- und PreScission-Protease-Spaltstelle (Trx-EK-Arah2 und Trx-PR-Arah2) wurden durch Kultivierung von *E. coli* Origami(DE3)-pET32a-Trx-His-PR-Arah2 und *E. coli* AD494(DE3)-pET32a-Trx-His-EK-Arah2 (Kap. 4.2.1.3) hergestellt. Mit der durch Zentrifugation nach Lysozym- und Ultraschallaufschluss gewonnenen löslichen Fraktion wurde eine auf  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen basierende Metallaffinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt. Beide Proteine wurden mit ca. 200 mM Imidazol von der Säule eluiert. Abb. 4.18 zeigt exemplarisch das Chromatogramm und SDS-Polyacrylamidgel einer Trx-EK-Arah2-Reinigung.



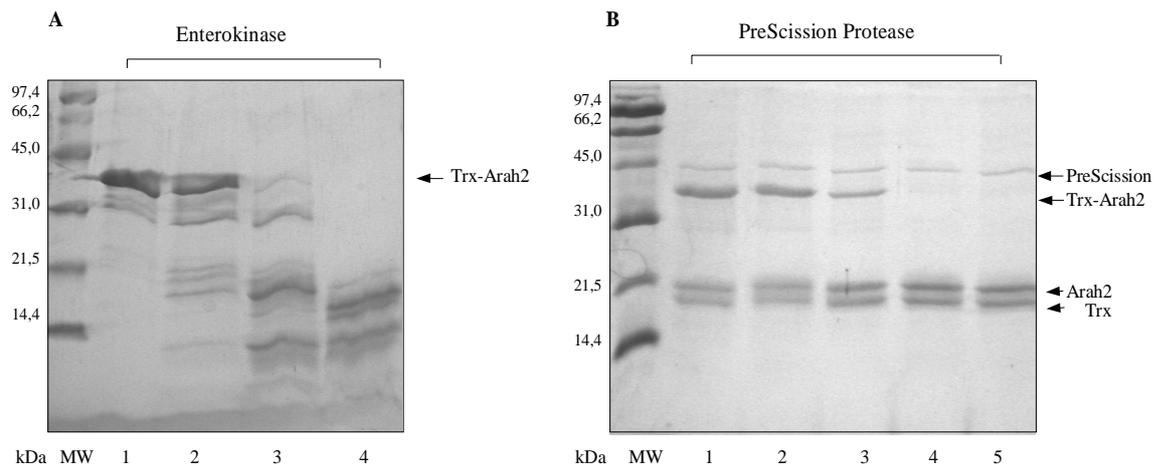
**Abb. 4.18: Reinigung eines Thioredoxin-fusionsproteins mittels  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie.**

(A) Verlauf der Chromatographie von Trx-EK-Arah2 (AD494(DE3)-pET32a-Trx-His-EK-Arah2) an TALON™ Superflow. 15 ml Säulenvolumen; 2 ml/min Flussrate; Äquilibrierungs-/Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 8; Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8; Elution über Stufengradient (2 Säulenvolumen bei 100, 200, 300, 400, 500 mM und 1 M Imidazol). Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.

(B) Analyse der eluierten Fraktionen an Hand eines 19 %igen SDS-Gels nach Coomassiefärbung (B). Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“).

Die Spaltung von Trx-EK-Arah2 erfolgte entsprechend der Herstellerangaben in 20 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ . Trx-PR-Arah2 wurde in einem modifizierten Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl) gespalten. Um eine Reduktion des disulfidverbrückten Proteins zu unterbinden, wurde auf den vom Hersteller empfohlenen Zusatz von DTT verzichtet. Pufferwechsel erfolgten jeweils durch zwei- bis dreimalige Dialyse gegen Spaltpuffer. Die Spaltung mit Enterokinase führte bei allen getesteten Versuchsbedingungen zur Ausbildung von Produkten einer Molekularmasse von ca. 17 und 10 kDa (Abb. 4.19). Die errechnete Molekularmasse der erwarteten Produkte beträgt 16,9 (Trx-Anteil) und 16,6 kDa (Ara h 2-Anteil). Möglicherweise beinhaltet die Bande, die bei 17 kDa im SDS-Gel erscheint, beide Spaltprodukte, die deutliche Bande bei ca. 10 kDa ist jedoch Ausdruck einer oder mehrerer sekundärer Spaltreaktionen. Weder eine Variation der Inkubationszeiten (von 2 bis 12 Stunden) noch eine Veränderung der eingesetzten Enzymmenge (0,2 U bis 1 U Enzym) konnten derartiger Reaktionen unterbinden.

Die Spaltung mit PreScission-Protease erfolgte außerordentlich spezifisch (Abb. 4.19). Nebenprodukte wurden nicht beobachtet. Mit 0,8 U/ 100  $\mu\text{g}$  Protein konnte eine vollständige Spaltung bereits nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erzielt werden. Nach Spaltung mittels PreScission-Protease resultiert ein artifizierender Überhang von zwei Aminosäuren (Gly-Pro) am Aminoterminal von Ara h 2.



**Abb. 4.19: Analyse der Trx-Ara h 2-Produkte nach Spaltung mit Proteasen.**

Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Gel nach Elektrophorese der Enterokinase (A) und PreScission-Protease-Spaltprodukte (B). Molekulargewichtstandard: BioRad („low range“)

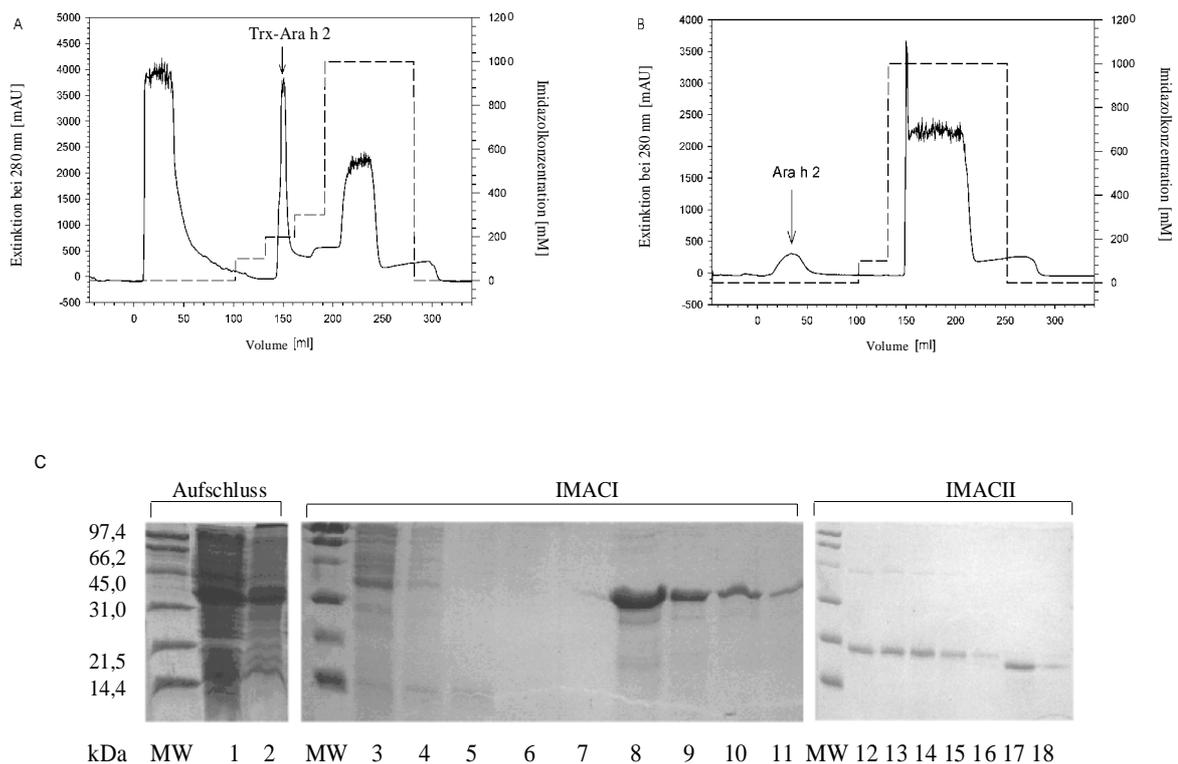
(A) Enterokinasespaltung bei Raumtemperatur und 12 h Inkubation. 1: 0 U/mg Fusionsprotein, 2: 0,02 U/mg Fusionsprotein, 3: 0,2 U/mg Fusionsprotein, 4: 2 U/mg Fusionsprotein

(B) PreScission-Proteasespaltung bei Raumtemperatur. 0,8 U / 100 µg nach 1, 2, 10, 30 und 60 min (Spur 2 - 5).

#### 4.2.2.3 Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von rAra h 2

Die Ergebnisse zur Optimierung der Expressions-, Aufschluss- und Spaltungsbedingungen (Kap. 4.2.2.1, 4.2.2.2) wurden zur Etablierung eines Reinigungsprotokolls zur Gewinnung größerer Mengen an rekombinantem Ara h 2 (rAra h 2) genutzt. Das Protein rAra h 2 wurde dementsprechend als Thioredoxinfusionsprotein in *E. coli* Origami(DE3) exprimiert. Die *argU* t-RNAs wurden mittels pUBS520-Cm koexprimiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine kombinierte Lysozym- / Ultraschallbehandlung (Kap. 3.6.2.1). Das Thioredoxinfusionsprotein wurde durch eine erste  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt und nachfolgend mit PreScission-Protease in einen Thioredoxinanteil mit Histidinanhang und einen rAra h 2-Teil gespalten (Kap. 3.6.3.1, 3.6.4). Die Separierung von rAra h 2 und Thioredoxin erfolgte durch eine zweite  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie. rAra h 2 erscheint im Durchbruch. In Abb. 4.20 ist der Verlauf einer typischen Reinigungsprozedur dargestellt.

Das Protokoll konnte sowohl mit in LB-kultivierten Zellen als auch mit Minimalmedium-Kulturen erfolgreich angewendet werden. Die Ausbeute an Thioredoxin-Ara h 2-Fusionsprotein betrug durchschnittlich etwa 40 mg pro Liter Kultur. Die Endproduktausbeuten an rAra h 2 lagen zwischen 10 und 13 mg Protein pro Liter LB-Kultur und zwischen 9 und 11 mg Protein pro Liter M9-Kultur.

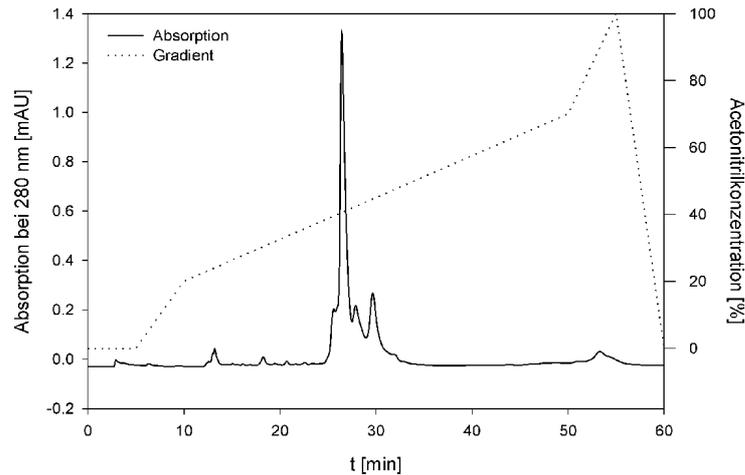


**Abb. 4.20: Typischer Verlauf der Reinigung von rAra h 2**

(A, B) Verlauf der Chromatographie des zellfreien Extraktes (*E. coli* Origami(DE3)-pET32a-Trx-His-PR-Arah2; A) und des Spaltansatzes nach Restriktion mit PreScission-Protease (B) an TALON Superflow. 15 ml Säulenvolumen; 2 ml/min Flussrate; Equilibrierungs-/Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 8; Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8); Elution über Stufengradient (2 Säulenvolumen bei 100 mM, 200, 300, 400, 500 mM und 1 M Imidazol). Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.

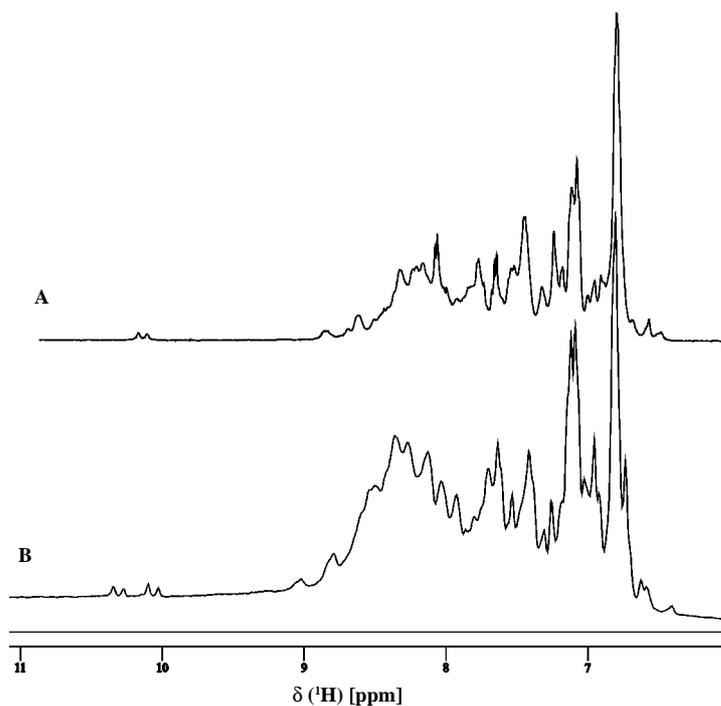
(C) Analyse der Reinigung an Hand eines 19 %igen SDS-Polyacrylamidgels nach Coomassiefärbung. Zellsediment (1) und zellfreier Extrakt (2) nach Zellaufschluss; Durchbruch der ersten IMAC (4,5); Waschfraktionen der ersten IMAC (6,7,8); Eluatfraktionen der ersten IMAC (9-12); Ara h 2 im Durchbruch der zweiten IMAC (12-16); Trx nach zweiter IMAC (17,18); Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“).

Bei unbefriedigender Reinheit der Probe, was typischerweise bei der Präparation von markiertem Protein zu beobachten war, wurde an die Affinitätschromatographieläufe eine präparative C18-Umkehrphasenchromatographie angeschlossen (Kap. 3.6.3.4; Abb. 4.21). Dazu wurde direkt und ohne vorherige Gefriertrocknung das vereinigte Eluat nach der zweiten Affinitätschromatographie verwendet. Die Authentizität der Faltung des Proteins nach diesem denaturierenden Schritt wurde durch den Vergleich von 1D  $^1\text{H}$  Spektren von Proben, welche mit und ohne zusätzlichen Umkehrphasenchromatographieschritt präpariert wurden, geprüft (Abb. 4.22). Beide Spektren weisen einen hohen Grad an Ähnlichkeit auf. Somit kann ein Umkehrphasenchromatographieschritt als finaler Reinigungsschritt bei der Präparation von rAra h 2 Proben im Bedarfsfall durchgeführt werden.



**Abb. 4.21: Präparative Umkehrphasenchromatographie von rAra h 2.**

Die Proteinprobe wurden mit einem Acetonitril/H<sub>2</sub>O-Gemisch (80 % Acetonitril (v/v) in *aqua bidest.*, 0,1 % (v/v) TFA) über einen dreiphasigen konstanten Gradienten (0-20 % in 5 min, 20-70% in 40 min, 70-100 % in 5 min) eluiert. HPLC-Trennsäule: Nucleosil 100-7 C18 (Macherey Nagel, Düren); Flussrate 10 ml/min; Detektion der Absorption bei 280 nm.



**Abb. 4.22: 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren von mit (A) und ohne (B) C18-Umkehrphasenreinigungsschritt präpariertem rAra h 2.**

Dargestellt ist eine Überlagerung der Amid- und Aromaten-<sup>1</sup>H-Protonenresonanzen-Region der 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren. (A): 0,3 mM unmarkiertes rAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; 10 % D<sub>2</sub>O; 10 µl einer Proteaseinhibitorlösung (1 Tablette (Roth) / 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7). Die mit Pfeilen gekennzeichneten Dubletts wurden durch die der Probe zugesetzten Proteaseinhibitorlösung verursacht. Bruker Avance Spektrometer DRX-400, 298 K, 8192 gemessene Scans. (B): 0,355 mM <sup>15</sup>N-markiertes rAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; 10 % D<sub>2</sub>O. Die Spektrenaufnahme erfolgte ohne <sup>15</sup>N-Entkopplung, was zu einer Aufspaltung der N-gebundenen Signale führt. Bruker Avance Spektrometer DRX-600, 298 K, 2048 gemessene Scans.

### 4.3 Vergleichende Untersuchungen von heterolog exprimiertem und natürlichem Ara h 2

Im Vorfeld von strukturellen Untersuchungen an heterolog exprimiertem Ara h 2 stand der Nachweis der Identität der natürlichen und rekombinanten Form. Bei der Expression eines hochgradig disulfidverbrückten eukaryotischen Proteins in einem bakteriellen System sind sowohl Faltungs- als auch Disulfidisomere nicht auszuschließen. Bisher beschriebene Expressionsverfahren zur Bearbeitung von strukturellen Fragestellungen verwandter Proteine basierten generell auf Hefesysteme, bakterielle Verfahren wurden nicht eingesetzt. Um die Eignung eines *E. coli*-Systems zu prüfen, wurde heterolog exprimiertes Ara h 2 mit einem aus Erdnuss gereinigten Analogon hinsichtlich immunologischer und struktureller Eigenschaften vergleichend untersucht.

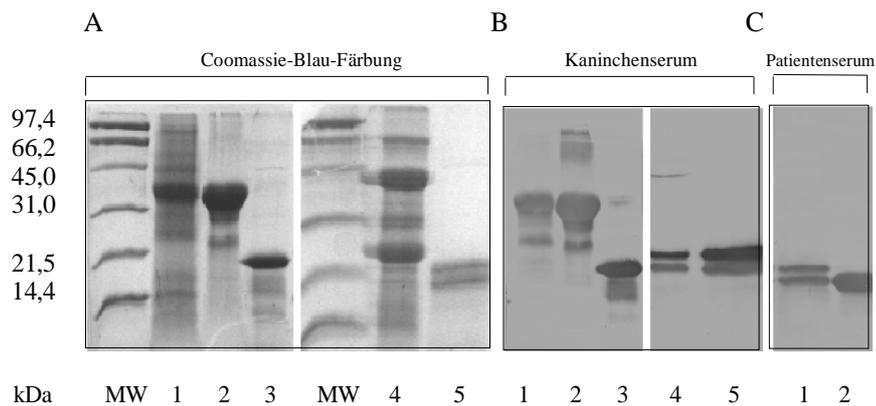
#### 4.3.1 Immunologische Eigenschaften

Zur Untersuchung immunologischer Eigenschaften wurden Westernblotexperimente (Kap. 3.7.2) von nAra h 2 und rAra h 2 unter Verwendung von Anti-rAra h 2-(rekombinantes Ara h 2)-Serum aus Kaninchen und von Antiserum eines Erdnuss-allergischen Patienten (JG3) durchgeführt (Abb. 4.23). Nach Elektrophorese wurden die entsprechenden SDS-Gele geteilt und die Spuren der einen Hälfte einer Coomassie-Färbung (Abb. 4.23A) und die Spuren der zweiten Hälfte einem Western-Blot (Abb. 4.23B, C) unterzogen. Untersucht wurden jeweils die löslichen Extrakte (Erdnussextrakt, *E. coli* zellfreier Extrakt) und die gereinigten Formen (nAra h 2, rAra h 2).

Rekombinantes Ara h 2 zeigt als Fusionsprotein sowohl im zellfreien Extrakt als auch in gereinigter Form und nach Abspaltung des Trx-Fusionspartners eine starke Reaktion mit Kaninchenserum (Abb. 4.23B, Bande: 1-3). Zusätzliche Banden mit geringerer Intensität können auf die Anwesenheit von Kontaminationen in der ebenfalls aus *E. coli* gewonnenen Ara h 2-Probe, die für die Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden, zurückgeführt werden. Derartige Effekte treten mit natürlichen Ara h 2-Proben (Abb. 4.23B, Bande: 4 und 5) nicht auf, was die genannte Ursache für das Auftreten zusätzlicher Banden unterstützt. Eine Reaktion mit Kaninchenserum von nAra h 2 erfolgt im Erdnussextrakt und mit gereinigtem Protein. Die auch im Westernblot zu beobachtenden Ara h 2-Doppelbande spricht für eine starke Ähnlichkeit der vorhanden Isoformen oder Varianten.

Mit Patientenserum erfolgt ebenfalls eine vergleichbar starke Bindung mit der natürlichen

und rekombinanten Ara h 2-Variante (Abb. 4.23C). Unspezifische Reaktionen treten nicht auf. Vor allem die Bindung von rAra h 2 durch Patientenserum zeigt eindeutig die immunologische Authentizität des heterologen Proteins. Auf Grund des Vorhandenseins mehrerer linearer Epitope entlang der Polypeptidkette von Ara h 2 (Stanley *et al.* 1997) können aus diesem Befund jedoch keine Aussagen zur Identität der Tertiärstruktur abgeleitet werden.



**Abb. 4.23: Analyse der IgE-Bindung von nAra h 2 und rAra h 2.**

(A) Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit zellfreiem Extrakt (1), Trx-rAra h 2 (2), rAra h 2 (3), Erdnussextrakt (4), nAra h 2 (5).

(B) Westernblotanalyse von nAra h 2 und rAra h 2 mit Kaninchen-anti-rAra h 2-IgG. Zellfreier *E. coli* Extrakt (1), Trx-rAra h 2 (2), rAra h 2 (3), Erdnussextrakt (4), nAra h 2 (5).

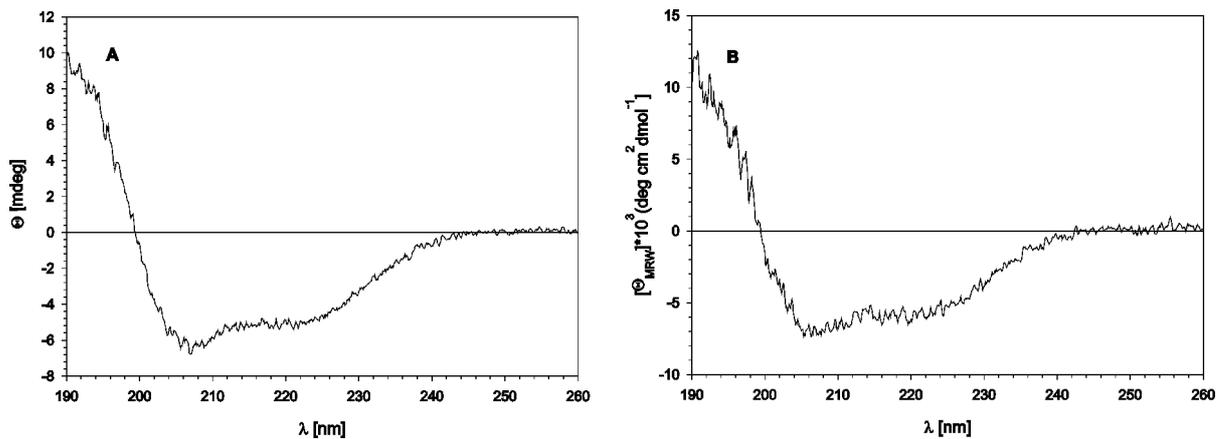
(C) Westernblotanalyse von nAra h 2 und rAra h 2 mit Antiserum eines Erdnuss-allergischen Patienten (JG3). nAra h 2 (1), rAra h 2 (2)

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit dem identischen Probenspektrum doppelt beladen, wobei die eine Hälfte mit Coomassie-Blau (A) gefärbt und die zweite Hälfte für einen Westernblot eingesetzt wurde (B). Zur Westernblotanalyse wurden die separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die spezifische Bindung von Kaninchen- oder Patientenserum wurde mit Maus-anti-Mensch-IgE bzw. Ziegen-anti-Kaninchen-IgG als sekundäre mit Alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper detektiert. Gebundene Antikörper wurden durch Inkubation mit NBT/BCIP visualisiert.

### 4.3.2 Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen

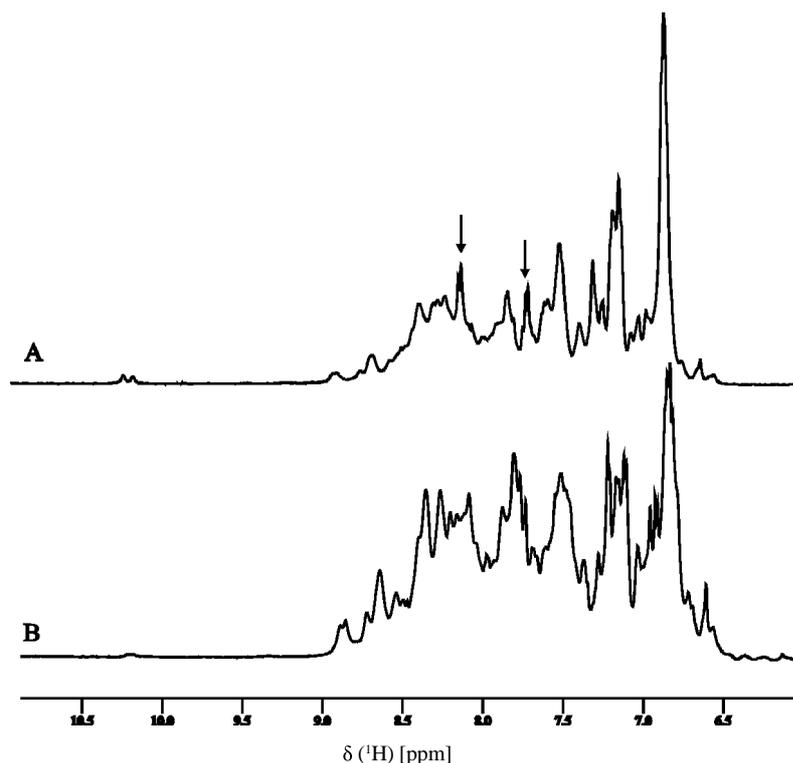
Zum Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen von heterolog exprimiertem und natürlichem Ara h 2 wurde CD-Spektroskopie und 1D-NMR-Spektroskopie verwendet (Kap. 3.8.2; 3.9.2) Sowohl die CD- (Abb. 4.24) als auch die 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren (Abb. 4.25) der beiden Proteine sind nahezu identisch. Beide CD-Spektren zeigen die typischen Kennzeichen einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur in Form der Minima bei 208 und 222 nm. Die 1D <sup>1</sup>H NMR Spektren erlauben einen Vergleich hinsichtlich Sekundärstruktur, aber auch

der Tertiärstruktur der Proteine. Die Regionen der Amidprotonen- und aromatischen  $^1\text{H}$ -Resonanzen zeigen bis auf zwei Dubletts, die einzig im Spektrum von rAra h 2 auftreten, eine starke Übereinstimmung. Wie in Kontrollspektren (nicht abgebildet) verifiziert, stammen die Dubletts von einem der rekombinanten Probe zum Schutze vor proteolytischem Abbau zugesetzten Proteaseinhibitorgemisch (Protease Inhibitor Cocktail).



**Abb. 4.24: Fern-UV (190-260 nm)-CD-Spektroskopie an nAra h 2 (A) und rAra h 2 (B).**

Messbedingungen: 20 °C, 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, 1 mm-Küvetten, Scangeschwindigkeit 50 nm/min. Es wurden jeweils 5 Spektren akkumuliert. Die Konzentration der rekombinanten Probe betrug 10  $\mu\text{M}$ . Die exakte Konzentration der natürlichen Ara h 2-Probe konnte auf Grund der Anwesenheit einer zweiten Isoform in einem unbekanntem Verhältnis nicht ermittelt werden. Die mittlere molare Elliptizität wurde dementsprechend nur für rekombinantes Ara h 2 berechnet.



**Abb. 4.25:** Überlagerung der Amid- und Aromaten-<sup>1</sup>H-Protonenresonanzenregion der 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren von rekombinatem und natürlichem Ara h 2.

Oben: 0,3 mM rAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; 10 % D<sub>2</sub>O; 10 µl einer Proteaseinhibitorlösung (1 Tablette (Roth) / 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7). Bruker DRX-600 NMR Spektrometer, 1024 gemessene Scans, 298 K.

Unten: nAra h 2 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; 10 % D<sub>2</sub>O. Bruker DRX-600 NMR Spektrometer, 8192 gemessene Scans, 298 K.

Die mit Pfeilen gekennzeichneten Dubletts werden durch die zur rekombinanten Ara h 2-Probe zugesetzte Proteaseinhibitorlösung verursacht.

### 4.3.3 Disulfidverbrückung

Im Vorfeld vergleichender Untersuchungen zum Disulfidmuster sollte geprüft werden, ob alle vorhandene Cysteine tatsächlich in Disulfidbindungen involviert sind. Dazu wurde bei nAra h 2 und rAra h 2 die Abwesenheit freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz verifiziert (Kap. 3.7.5). Die Proteine wurden mit Harnstoff und durch zehnmütiges Erhitzen denaturiert und anschließend mit DTNB versetzt. Die Reaktion freier SH-Gruppen mit DTNB mit der Folge der Ausbildung eines Farbstoffes wurde durch Absorptionmessung bei 415 nm untersucht. Während ein Farbumschlag der Kontrolle (Cystein) beobachtet wurde, zeigten nAra h 2 und pAra h2 keine Reaktion mit DTNB. Dies lässt die Einbindung sämtlicher Cysteine in Disulfidbindungen folgern. Freie Thiolgruppen sind nicht vorhanden.

Zur Untersuchung der Identität der Disulfidverbrückung der natürlichen und rekombinanten

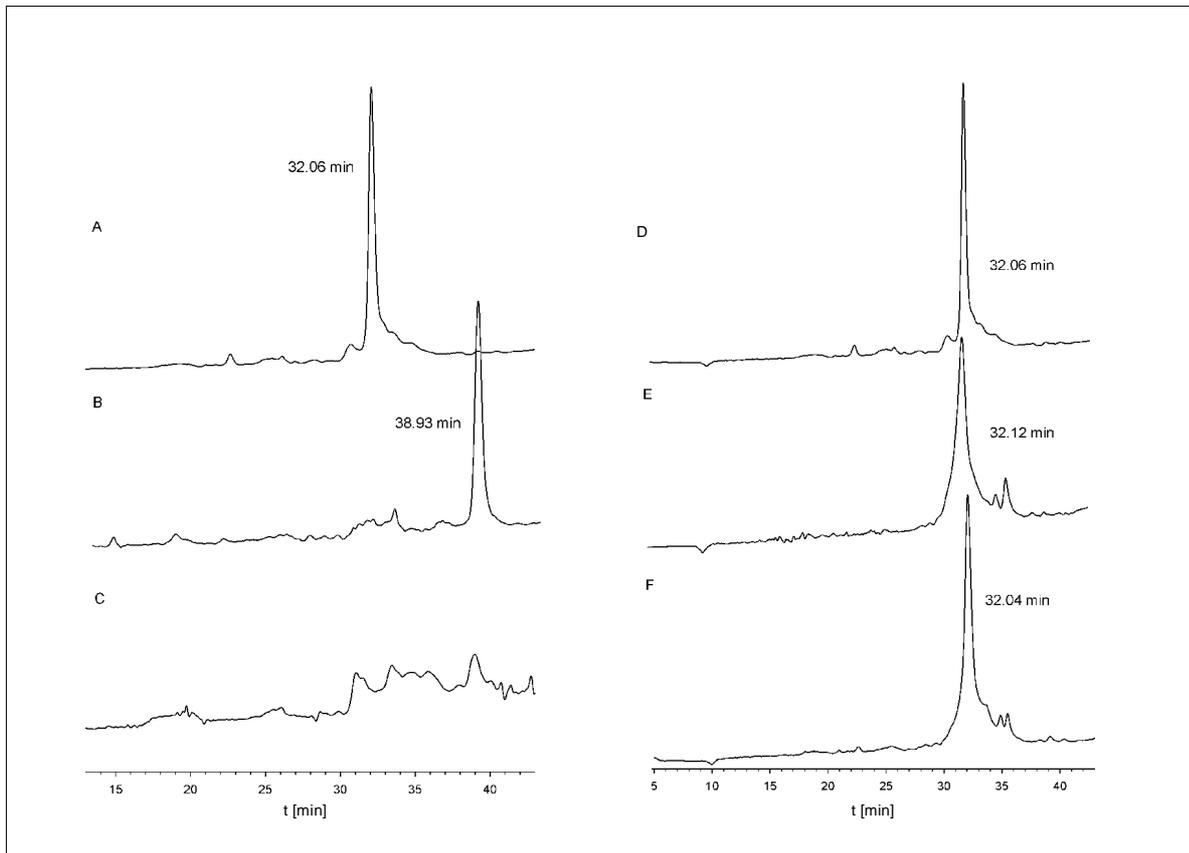
Form wurde Umkehrphasenchromatographie an C18-Material durchgeführt. Die Trennung von Proteinen über Umkehrphasenchromatographie basiert auf der unterschiedlichen Hydrophobizität der Probenkomponenten. Ein verändertes Disulfidmuster resultiert häufig in einer veränderten Hydrophobizitätsverteilung und sollte sich in einer Verschiebung der Retentionszeiten äußern. Da die gezielte Herstellung von einzelnen Disulfidisomeren nicht praktikabel ist, wurde ein Gemisch verschiedener Isomere, die jedoch im Einzelnen nicht definiert werden können, durch Reduktion und Reoxidation erzeugt. An Hand des Retentionsverhaltens reduzierter und reoxidierter Spezies sollte geprüft werden, ob C18-Chromatographie die Möglichkeit zur Unterscheidung von unterschiedlich verbrückten Formen bietet.

Die Reduktion der Proben (30  $\mu$ M) erfolgte durch einstündige Inkubation mit 10 mM DTT, die Reoxidation durch Dialyse (dreimalig gegen 5 l 10 mM Kaliumphosphat, pH 7, je 2 h) gegen DTT-feien Puffer. Rekombinantes Ara h 2 eluiert in seinem oxidierten Zustand, d.h. in seiner präparierten Form ohne Zusatz von Reduktionsmittel, bei einer Retentionszeit von 32 min (Abb. 4.26A). Nach Reduktion des Proteins (Abb. 4.26B) verschiebt sich dessen Retentionszeit in Richtung einer höheren Verweildauer (38,93 min) auf der Säule. Das Auftreten eines isolierten Einzelpeaks nach DTT-Behandlung zeigt, dass die gewählten Bedingungen eine Reduktion des Proteins erlaubten. Die Differenz der Retentionszeiten ist mit 7 min erheblich. Nach Reoxidation der reduzierten Probe ist eine Vielzahl nicht sauber getrennter Peaks im Chromatogramm zu beobachten (Abb. 4.26C). Die unterschiedlichen Spezies eluieren bei Retentionszeiten in einem Bereich zwischen oxidiertem und reduziertem Protein. Die Heterogenität des Chromatogramms wurde als Ausdruck für die Bildung einer großen Varietät unterschiedlich verbrückter Spezies gewertet.

Entsprechend dieses Befundes sollten sich Unterschiede in der Disulfidverbrückung bei rekombinantem und natürlichem Ara h 2 ebenfalls in einem verändertem Retentionsverhalten äußern. Dieses wurde von rAra h 2 (Abb. 4.26D) und nAra h 2 (Abb. 4.26E) zunächst separat untersucht. Beide Proteine eluieren identisch nach 32 min von der Säule. Auch die Koinjektion von rAra h 2 und nAra h 2 resultiert in einem einzigen Hauptpeak. Im Fall des natürlichen Proteins treten zwei zusätzliche Peaks geringer Intensität, die möglicherweise von Verunreinigungen in der Probe herrühren, in Erscheinung. Diese sind nach Koinjektion analog zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Identität der Disulfidmuster des heterolog exprimierten Proteins und seines natürlichen Analogons sehr wahrscheinlich ist.

Die beiden natürlichen Isoformen Ara h 2 und Ara h 2.02 mit gleicher Disulfidverbrückung können in Übereinstimmung mit sämtlichen Literaturdaten über chromatographische

Methoden nicht getrennt werden (Burks *et al.* 1992, de Jong *et al.* 1998, Koppelman *et al.* 2001). Beide Proteine scheinen außerordentlich ähnliche biochemische und biophysikalische Eigenschaften aufzuweisen.



**Abb. 4.26: Analytische Umkehrphasenchromatographie zum Nachweis der Identität von nAra h 2 und rAra h 2.**

Die Proteine wurden mit einem Acetonitril/H<sub>2</sub>O-Gemisch (80 % (v/v) Acetonitril in *aqua bidest.*, 0,1 % (v/v) TFA) über einen konstanten Gradienten (0-70% in 50 min) eluiert. C18-Säule: RCM 8×10 module (Waters, Eschborn); Flussrate 1,5 ml/min; Detektion der Absorption bei 220 nm; Probenvolumen: 100 µl, Probenkonzentration: 30 µM, Probenpuffer: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH7, 0,1 % (v/v) TFA, gegebenenfalls 10 mM DTT.

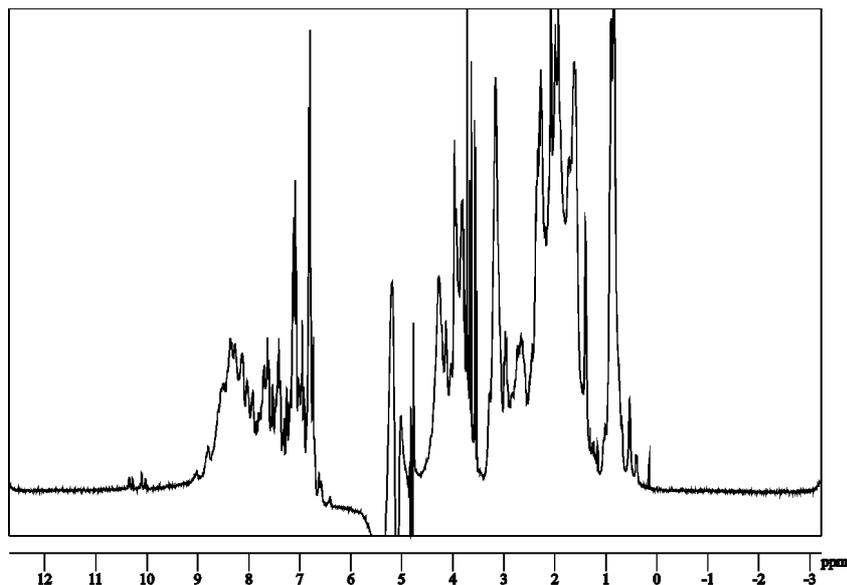
(A-C) Elutionsprofile von oxidiertem (A), reduziertem (B) und reoxidiertem (C) rAra h 2. Reduktion erfolgte mit 10 mM DTT, Reoxidation durch dreimalige Dialyse gegen je 5 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.

(D-F) Elutionsprofile von rAra h 2 (D), nAra h 2 (E) und der Koinjektion (F) beider Proteine, jeweils im oxidierten Zustand.

## 4.4 NMR-Spektroskopie an rAra h 2

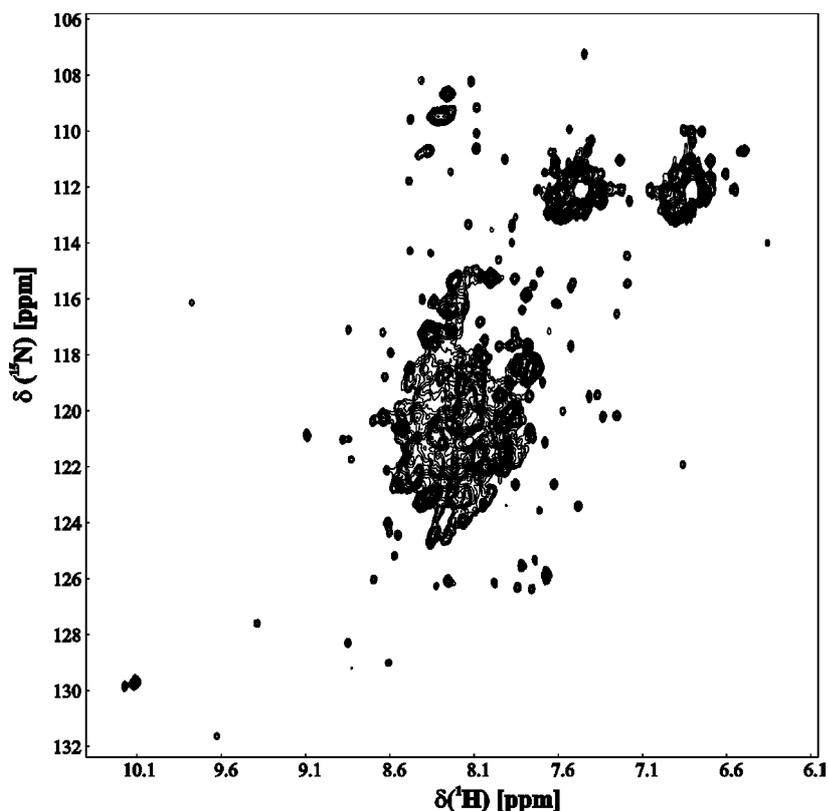
Die Authentizität der rekombinant hergestellten Ara h 2-Proben konnte in Kapitel 4.3 eindeutig an Hand verschiedener Vergleichsexperimente mit natürlichem Protein gezeigt werden. Das gewonnene Protein eignet sich dementsprechend prinzipiell für weiterführende strukturorientierte Untersuchungen. Die NMR basierte Strukturbestimmung eines Proteins der Größe von Ara h 2 (149 Aminosäurereste) erfordert meist auf Grund spektraler Überlappungen in homonuklearen Spektren eine einfache oder mehrfache Isotopenmarkierung. Zu diesem Zweck muss das üblicherweise für die Kultivierung der Biomasse verwendete Vollmedium durch ein Minimalmedium, welches  $^{15}\text{N}$ -markiertes  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $^{13}\text{C}$ -markierte Glukose enthält, ersetzt werden (Kap. 3.6.1.1). Die Kultivierung in Minimalmedium erfordert auf Grund der Leucinauxotrophie des Stammes *E. coli* Origami(DE3) die zusätzliche Applikation dieser Aminosäure. Leucin wurde je nach Fragestellung entweder unmarkiert oder  $^{15}\text{N}$ -markiert zugesetzt.

Zur ersten Qualitätsabschätzung einer so gewonnenen Probe eignet sich die Analyse eines zweidimensionalen  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums. Merkmale wie Signal-Rausch-Verhältnis, Linienbreiten, Signalüberlagerung oder auch die Anzahl von Resonanzen erlaubt eine erste Einschätzung darüber, in wie weit eine Probe für eine NMR basierte Strukturbestimmung geeignet ist. Zu diesem Zweck wurde rAra h 2 mittels Kultivierung in  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltigem Minimalmedium markiert, gereinigt, gefriergetrocknet, zu einer Konzentration von  $330\ \mu\text{M}$  in Puffer aufgenommen und mittels NMR untersucht (Abb. 4.27, 4.28). Die 1D  $^1\text{H}$  Spektren von rAra h 2 (Abb. 4.27) sind im Vergleich zum natürlichem Protein aus der Erdnuss (nAra h 2; Abb. 4.11) im Hinblick auf die für  $\alpha$ -helikale Proteine typische beschränkte Dispersion der Amidprotonen und dem Vorhandensein von Hochfeldsignalen sehr ähnlich. Das Vorliegen von Tertiärstruktur kann aus dem Vorhandensein von mehreren hochfeldverschobenen Methylresonanzen geschlossen werden. Trotz dieses Befundes ist die Qualität des  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums (Abb. 4.28) sehr mangelhaft.



**Abb. 4.27:** 1D  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem rAra h 2.

0,4 mM; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , Bruker Avance Spektrometer DRX-600; 298 K. Während der Messung erfolgte keine  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung, woraus eine Aufspaltung der Stickstoff-gebundenen Signale resultiert. Bruker Avance Spektrometer DRX-600, 298 K, 1024 gemessene Scans.



**Abb. 4.28:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von  $^{15}\text{N}$  markiertem rAra h 2.

0,33 mM rAra h 2 ( $^{15}\text{N}$ -markiert mit Ausnahme der Leucinreste) in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{l}$  einer Proteaseinhibitorlösung (1Tablette Proteaseinhibitorcocktail (Roth) / 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7); Bruker Avance Spektrometer DRX-600; 298 K; 64 gemessene Datenpunkte.

Die begrenzte Dispersion eines Großteils der Amidresonanzen zwischen 7,5 und 8,5 ppm im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ - HSQC Spektrum ist typisch für  $\alpha$ -helikale Proteine. Die wenigen vorhandenen Signale außerhalb dieses Bereiches weisen auf die Existenz einer Tertriärstruktur hin. (Abb. 4.28). Auffällig ist allerdings eine sehr starke Linienverbreiterung und spektrale Überlappung in der Mitte des Spektrums sowie eine hohe Variabilität der Linienbreiten und Intensitäten. Vor allem die Überlappung und Linienverbreiterung im Bereich der *random coil* Verschiebungen lässt auf einen gewissen Anteil im Protein ohne ausgeprägte Tertiärstruktur schließen. Dabei kann es sich sowohl um unstrukturierte Bereiche innerhalb der Polypeptidkette oder aber um das parallele Auftreten einer Spezies ohne ausgeprägte Tertiärstruktur, möglicherweise im Sinne einer oder mehrerer Konformationen, handeln. Für derartige Bereiche oder Spezies, die sich wahrscheinlich durch eine hohe Flexibilität auszeichnen, sind dynamische Prozesse zu erwarten, die letztlich in der beobachteten Linienverbreiterung resultieren können. Obwohl die genauen Ursachen für die beobachteten Phänomene nicht aufzuklären sind, muss an dieser Stelle eindeutig festgestellt werden, dass das Protein in diesem Zustand nicht für eine Strukturbestimmung geeignet ist. Um weitere Ursachen innerhalb der Probenvorbereitung auszuschließen, wurde die Gefriertrocknung durch Ultrafiltrationsmethoden ersetzt und Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen durchgeführt (nicht dargestellt). Keine der veränderten Bedingungen resultierte in einer entscheidenden Verbesserung der Spektrenqualität.

#### 4.5 Heterologe Darstellung und Charakterisierung von Ara h 6

Neben Ara h 2 sollte Ara h 6 als weiteres Erdnussallergen vom 2S Albumintyp untersucht werden. Ara h 6 zeigt einen hohen Grad an Sequenzidentität (62 %) zu Ara h 2. Ara h 6 weist jedoch im Vergleich zu Ara h 2 ein geringeres Molekulargewicht bei einer Gesamtlänge von 125 Aminosäuren auf und unterscheidet sich vor allem durch den stark verkürzten Abschnitt zwischen den Positionen 35 bis 64 (Sequenzposition in Ara h 2) und durch die um zwei erhöhte Anzahl an Cysteinresten. Neben einer strukturellen Charakterisierung soll vor allen Dingen die Eignung des heterolog exprimierten Proteins für die NMR-basierte Strukturbestimmung geprüft werden.

Ausgangspunkt der Arbeit war ein pMalc-2-Arah6 Vektor (Dr. W.-M. Becker, Borstel). Die korrespondierende Aminosäuresequenz des insertierten Ara h 6 Gens weist Abweichungen an neun Positionen (Anhang 10.1) zu einem derzeit verfügbaren Datenbankeintrag (Genbank: AAD56337) auf. Die verwendete Nukleotidsequenz wurde jedoch mehrfach durch

unabhängige cDNA-Klonierungen bestätigt (Dr. W.-M. Becker, persönliche Mitteilung). Vorhandene Unterschiede können auf die Verwendung nichtidentischer Erdnussorten zurückgeführt werden. Das Ara h 6-Gen wurde analog zu Ara h 2 in pET-32a kloniert und als Thioredoxininfusionsprotein exprimiert.

#### 4.5.1 Konstruktion des Thioredoxin-Ara h 6-Expressionssystems

Die Basis des Thioredoxin-Ara h 6-Expressionssystems bildete der Vektor pET-32a (Novagen, Madison, USA). Der Aufbau des Expressionssystems ist dem unter Kapitel 4.2.1.3 beschriebenen System pET32a-Trx-His-PR-Arah2 analog. Das resultierende Expressionsprodukt ist in Abb. 4.29 dargestellt. Das Protein wurde in seiner maturen Form ohne eine aminoterminalen Signalsequenz (AHASA) exprimiert. In Folge der PreScission-Proteasespaltung erhält das Zielprotein einen aminoterminalen, artifiziellen Gly-Pro-Überhang.



**Abb. 4.29:** Schematische Darstellung des Expressionsproduktes von pET32a-Trx-His-PR-Arah6.

Trx: Thioredoxin, PR: PreScission-Proteaseerkennungssequenz.

Die Einführung der PreScission-Protease Erkennungssequenz und der flankierenden Restriktionsschnittstellen erfolgte über Linker-PCR unter Verwendung des Vektors pMalc-2-Arah6 als Matrize und der Linker-Primer Arah6-5' und Arah6-3' (Kap. 3.5.4.1). Nach Reinigung über präparative Gelelektrophorese und Restriktion mit *Bgl*III und *Bpu*1102I wurde das Amplifikat mit einem ebenso hydrolysierten und dephosphorylierten pET-32a-Vektor ligiert (Kap. 3.5.2, 3.5.3). Positive Transformanten wurden durch Kolonie-PCR nach Elektrotransformation in *E. coli* Top10 identifiziert (Kap. 3.5.4, 3.5.5). Die korrekte Sequenz von pET32a-Trx-His-PR-Arah6 wurde durch Sequenzierung verifiziert (Anhang 10.1). Das Plasmid wurde in *E. coli* Origami (DE3) transformiert.

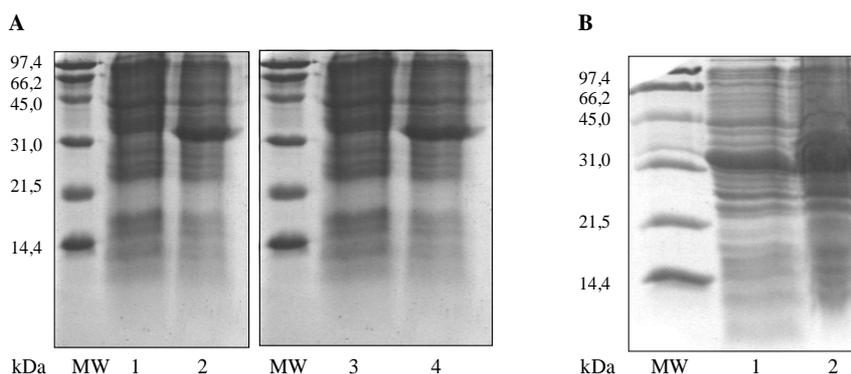
#### 4.5.2 Bakterielle Expression und Reinigung von Ara h 6

Für Expressionsversuche wurde pET32a-Trx-His-PR-Arah6 in *E. coli* Origami(DE3) transformiert. Zur Koexpression von seltenen tRNAs wurde das aus *E. coli* Rosetta (Novagen, Madison, USA) gewonnene Plasmid pRARE (Kap. 3.3) verwendet. Das Plasmid pRARE

codiert für die tRNAs der Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA. Die mit unterschiedlichen Resistenzgenen ausgestatteten Plasmide wurden schrittweise in *E. coli* Origami(DE3) elektrotransformiert (Kap. 3.5.5.2).

Die Kultivierung der Biomasse erfolgte in Schüttelkolben bei 37 °C. Hauptkulturen wurden mit über Nacht bebrüteten Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,3 beimpft. Die Induktion der Expression erfolgte mit IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 (Abb. 4.30). Sowohl im LB- als auch im Minimalmedium konnte eine starke Überexpression von Trx-Arah6-Fusionsprotein beobachtet werden (Abb. 4.30A). Der Biomassertrag bewegte sich zwischen 3 g/l bei LB-Kulturen und 2 g/l bei M9-Kulturen.

Zur Maximierung der Aufschlusseffektivität, die bereits für das analoge Ara h 2-System nicht über 50 % (Anteil rAra h 2 im löslichen Überstand) gesteigert werden konnte, wurden verschiedene Aufschlussparameter wie Art, Ionenstärke und pH-Wert des Puffersystems variiert. Der generelle Ablauf des für *E. coli* Origami(DE3)/ pET32a-Trx-His-PR-Arah2 optimierte Lysozym/Ultraschall-Aufschluss wurde nicht verändert (Kap. 3.6.2.1). Die prozentuale Verteilung von Ara h 6 in Sediment und Überstand nach einer 13000×g-Zentrifugation wurde mit Hilfe der Bandenintensitäten im SDS-Polyacrylamidgel geschätzt. Der maximale Anteil an löslichem Ara h 6 wurde in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 erzielt. Sowohl die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer, als auch eine Herabsetzung des pH-Wertes des Puffers wirkten sich negativ auf die Ausbeute an löslichem Ara h 6 aus. Der Anteil an Ara h 6 im löslichen Überstand überstieg jedoch auch unter diesen Bedingungen kaum einen Wert von 50 -60 % (Abb. 4.30B).



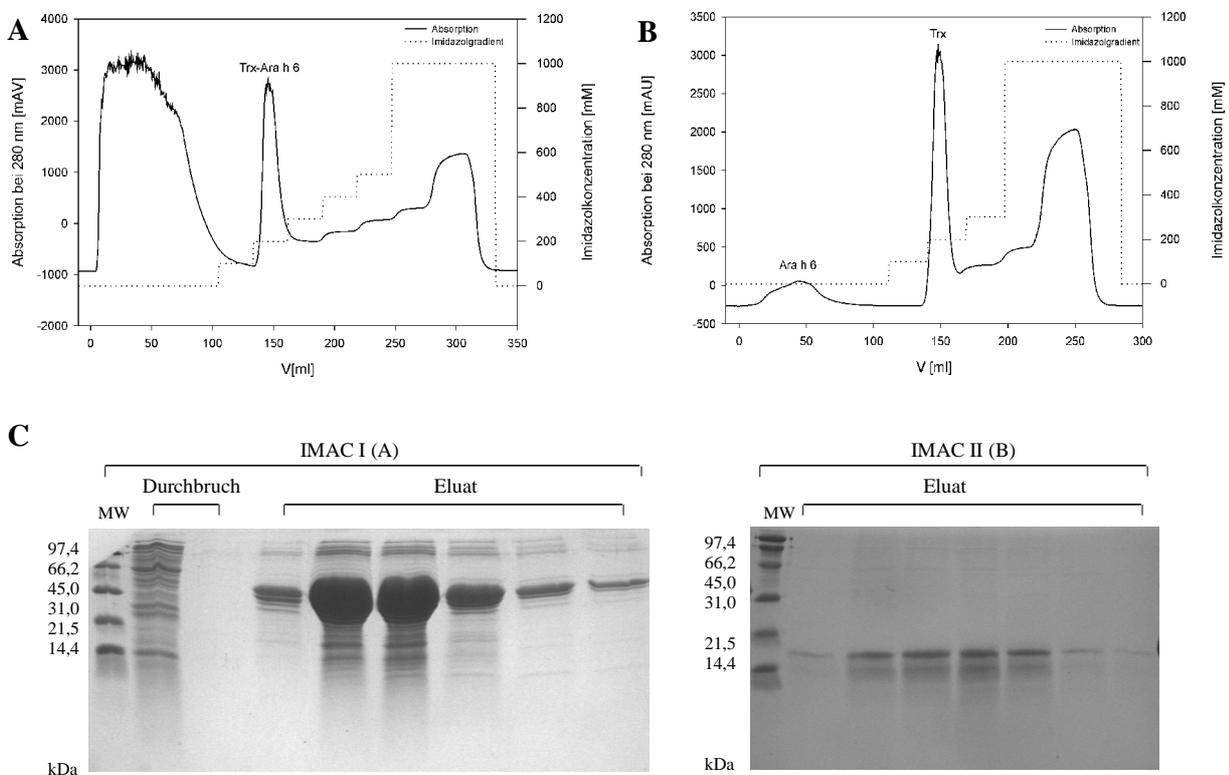
**Abb. 4.30: Expression und Zellaufschluss von Trx-Ara h 6-Fusionsprotein in *E. coli* Origami(DE3).**

(A) Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit Kulturproben vor und stundenweise nach Induktion mit IPTG in LB- (Bande: 1,2) und in M9-Medium (Bande: 3,4). *E. coli* Origami(DE3) enthält pET32a-Trx-His-PR-Arah6 und pRARE. Molekulargewichtsmarker: BioRad („low range“).

(B) Coomassie-gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit Proben von Überstand (1) und Sediment (2) nach Lysozym/Ultraschallaufschluss und 13000 × g Zentrifugation. Molekulargewichtsmarker: BioRad („low range“).

Zur Reinigung des Fusionsproteins, Spaltung der Fusionspartner und Separierung von Ara h 6 und Thioredoxin wurde das für Ara h 2 etablierte Protokoll analog angewendet (Abb. 4.31). Die Endproduktausbeuten bewegten sich zwischen 10 mg Ara h 6 / 1 LB-Kultur und 8 mg Ara h 6 / 1 M9-Kultur.

Vor allem bei Kultivierungen im Minimalmedium traten häufig Verunreinigungen in Gemeinschaft mit Ara h 6 auf. Bei den zumeist kleineren Proteinen könnte es sich möglicherweise um Ara h 6-Abbruchprodukte handeln. Vor allem kleine Fragmente können jedoch die Auswertung von NMR-Spektren auf Grund der Schärfe und Intensität ihrer Signale ganz erheblich erschweren.



**Abb. 4.31: Reinigung von Ara h 6 aus Minimalmedium mittels  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie.**

(A, B) Verlauf der Chromatographie des zellfreien Extraktes (*E. coli* Origami(DE3)-pET32a-Trx-His-PR-Ara h 6; A) und des Spaltansatzes nach Restriktion mit PreScission-Protease (B) an TALON™ Superflow (Clontech, Heidelberg). 15 ml Säulenvolumen; 2 ml/min Flussrate; Äquilibrierungs-/Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 8; Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8; Elution über Stufengradient (2 Säulenvolumen bei 100, 200, 300, 400, 500 mM und 1 M Imidazol). Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.

(C) Analyse der Reinigung an Hand eines 19 %igen SDS-Polyacrylamidgels nach Coomassie-Färbung. Durchbruch der ersten IMAC und Eluatfraktionen zwischen 140 und 160 ml Puffervolumen (A) sowie Durchbruchfraktionen der zweiten IMAC zwischen 20 und 80 ml Puffervolumen (B). Molekulargewichtsstandard: Bio-Rad („low range“)

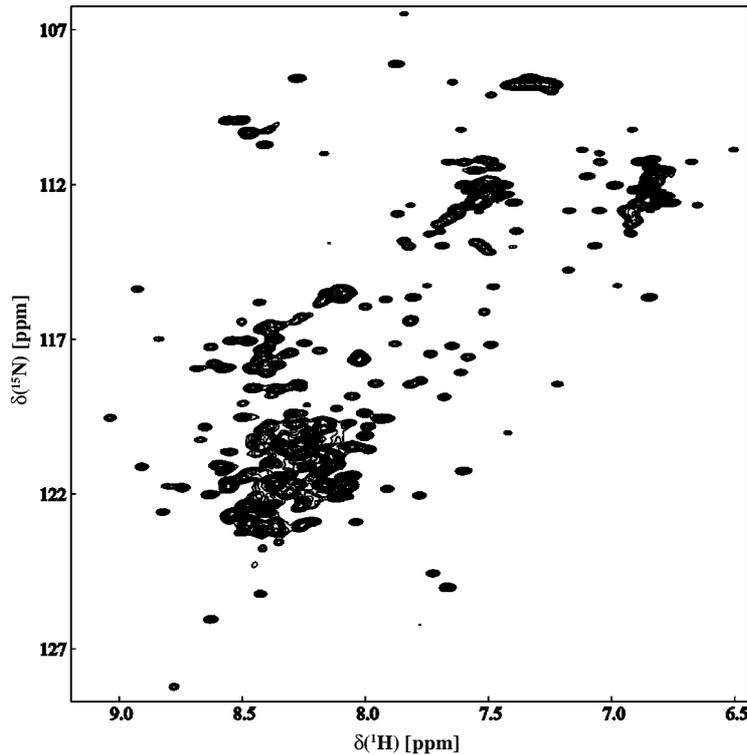
Um die Reinheit der Probe vor allem bei Minimalmediumkulturen zu erhöhen, wurde  $^{15}\text{N}$ -markiertes Ara h 6 analog zu rAra h 2 einem weiteren Reinigungsschritt in Form einer C18-Umkehrphasenchromatographie unterzogen (Kap. 3.6.3.4). Die Authentizität eines derartig gereinigten Proteins wurde durch den Vergleich von  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren einer gereinigten Probe nach zwei Affinitätschromatographieschritten und einer Probe mit zusätzlichem Umkehrphasenchromatographieschritt bestätigt.

### 4.5.3 NMR-Spektroskopie an heterologem Ara h 6

Anhand erster 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR Spektren sollte geklärt werden, inwieweit sich präpariertes Ara h 6 prinzipiell für eine Strukturbestimmung mittels NMR eignet.

$^{15}\text{N}$ -markiertes Ara h 6, welches mit einem abschließenden Umkehrphasenchromatographieschritt präpariert wurde, wurde für NMR-Messungen zu ca. 400  $\mu\text{M}$  in Natriumphosphatpuffer, pH 7 gelöst.

Das Spektrum zeichnet sich insbesondere im Vergleich zu den rAra h 2  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren (Abb. 4.28) durch eine deutlich bessere Qualität aus (Abb. 4.32). Die Linienbreiten der Resonanzen sind weitaus weniger divergent, außerdem ist die bei Ara h 2 beobachtete starke Überlappung der Signale zwischen 7,5 und 8,5 ppm stark reduziert. Ein Großteil der Resonanzen erscheinen gut separiert außerhalb der *random coil* Region. Die vergleichsweise geringe Dispersion weist auf ein  $\alpha$ -helikales Protein mit einem gewissen Anteil an nichtregulärer Sekundärstruktur hin.



**Abb. 4.32:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von rAra h 6.

400  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertes Ara h 6 ( $^{15}\text{N}$ -Leucin), in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , Bruker Avance Spektrometer DRX-400; 298 K.

## 4.6 Untersuchungen zur Stabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6

Eines der signifikantesten Charakteristika der Lebensmittelallergene ist ihre Stabilität gegenüber proteolytischer Aktivität im Verdauungstrakt und hohen Temperaturen während der Lebensmittelverarbeitung. Für eine Reihe von Lebensmittelallergenen konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu nicht allergenen Proteinen der gleichen Herkunft eine stark erhöhte Lebensdauer in einer simulierten gastrointestinalen Umgebung aufweisen (Astwood *et al.* 1996). Bisherige Untersuchungen zur Proteasestabilität von Lebensmittelallergenen und zur Überdauerung extremer Hitzebehandlungen beschränkten sich jedoch größtenteils nur auf die Demonstration derselbigen. Im Folgenden sollen die molekularen Grundlagen dieser Phänomene unter besonderer Berücksichtigung struktureller Merkmale untersucht werden.

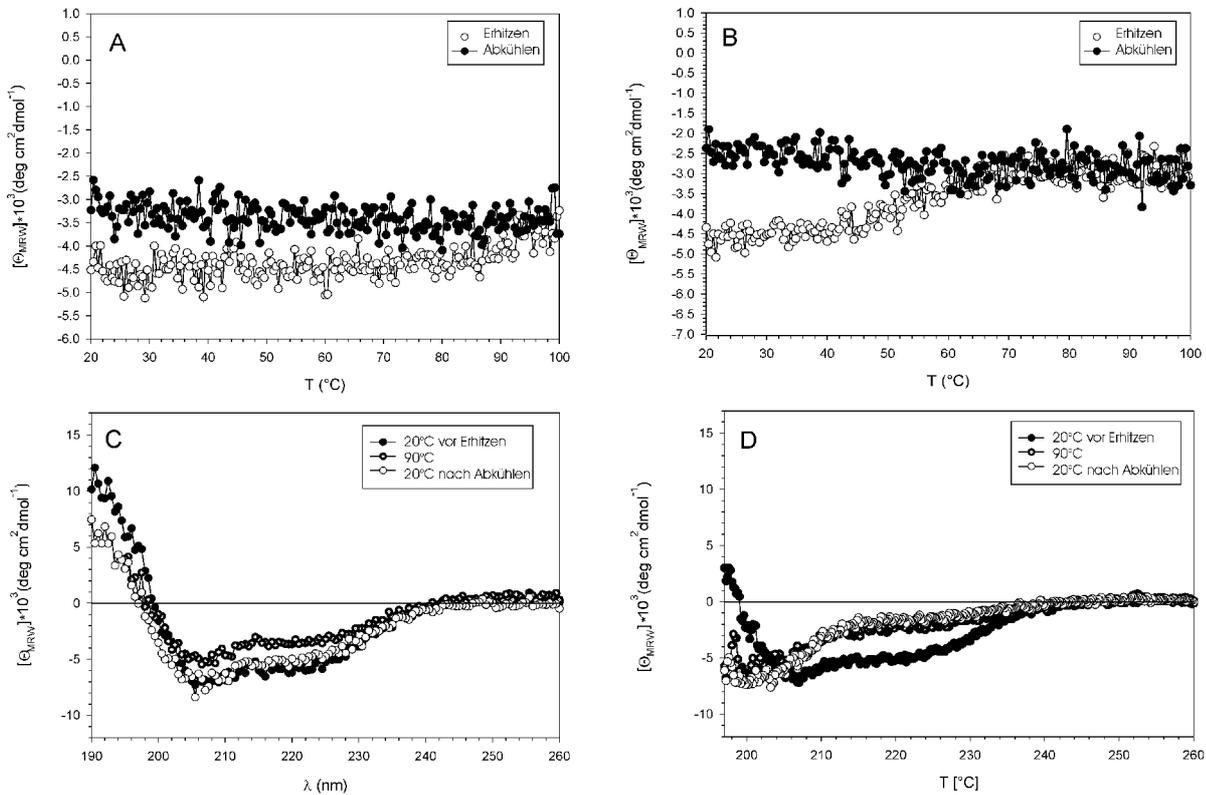
#### 4.6.1 Thermische Stabilität der Erdnussallergene Ara h 6 und Ara h 2

Die thermodynamische Stabilität der Proteine wurde auf Sekundärstrukturebene an Hand von CD-Schmelzkurven und von Fern-UV-Circulardichroismus Spektren (Fern-UV-CD Spektren) untersucht (Kap. 3.8.2). Dabei sollte insbesondere der Einfluss der Disulfidverbrückung auf Faltung und Stabilität geklärt werden.

Für Schmelzkurven wurde das CD-Signal bei einer Wellenlänge von 222 nm zwischen 20 und 100 °C verfolgt (Abb. 4.33/4.34 A, B). Fern-UV-CD-Spektren wurden bei 20 °C vor Aufheizen, bei 90 °C und bei 20 °C nach Abkühlen aufgenommen (Abb. 4.33/4.34 C, D). Es kamen ausschließlich heterolog gewonnene Proteine einer Konzentration von 10 bis 20 µM zur Anwendung.

Zunächst sollen Ara h 2 und Ara h 6 mit intakter Disulfidverbrückung betrachtet werden. Über den gesamten untersuchten Temperaturbereich wird bei beiden Proteinen kein thermischer Übergang in eine entfaltete Spezies beobachtet (Abb. 4.33/4.34A). Die Elliptizität bei 222 nm nimmt beim Erhitzen leicht und nahezu linear ab, steigt nach Abkühlen wieder an, erreicht jedoch nicht vollständig ihren Ausgangspunkt. Die Analyse der CD-Spektren unterstützt den Befund zur Thermostabilität der Sekundärstrukturelemente (Abb. 4.33/4.34C). Die Fern-UV-CD Spektren von Ara h 2 und Ara h 6 sind vor und nach dem Erhitzungsvorgang nahezu identisch. Bei der 90 °C-Messung ist vor allem bei Ara h 6 eine leichte Abnahme der Elliptizität bei 208 und 222 nm zu beobachten. Möglicherweise kommt es bei hohen Temperaturen teilweise zum Schmelzen endständiger Sekundärstrukturbereiche, die eine leichte Veränderung der Elliptizität erzeugen. Dieser Vorgang ist jedoch in jedem Fall reversibel, wie die Identität der Spektren bei 20 °C vor und nach der Hitzebehandlung verdeutlicht. Zur Untersuchung des Einflusses der Disulfidbindungen, deren Anzahl sich in Ara h 2 auf 4 und in Ara h 6 auf 5 beläuft, soll durch die CD-spektroskopische Analyse von mit DTT reduzierten Proteinen erfolgen (Abb. 4.33/4.34B). Im Vorfeld wurde an Hand von Umkehrphasenchromatographie nachgewiesen, dass unter den verwendeten Bedingungen (1 mM DTT) eine vollständige Reduktion erreicht werden kann (nicht dargestellt). Die CD-Schmelzkurven beider Proteine zeigen einen für Eindomänenproteine typischen kooperativen Übergang der Entfaltung. Die Mittelpunktstemperaturen  $T_m$  der thermischen Übergänge liegen bei ca. 60 °C (Ara h 2) und 62 °C (Ara h 6). Entsprechend der Abkühlungskurven, die keine erneute Zunahme der Elliptizitäten erfahren, ist der Vorgang der thermischen Entfaltung nicht reversibel. Die Fern-UV-CD-Spektren ergeben ein entsprechendes Bild (Abb. 4.33/4.34D). Die Spektren bei 90 °C und 20 °C nach Abkühlen sind sowohl in ihrem Verlauf

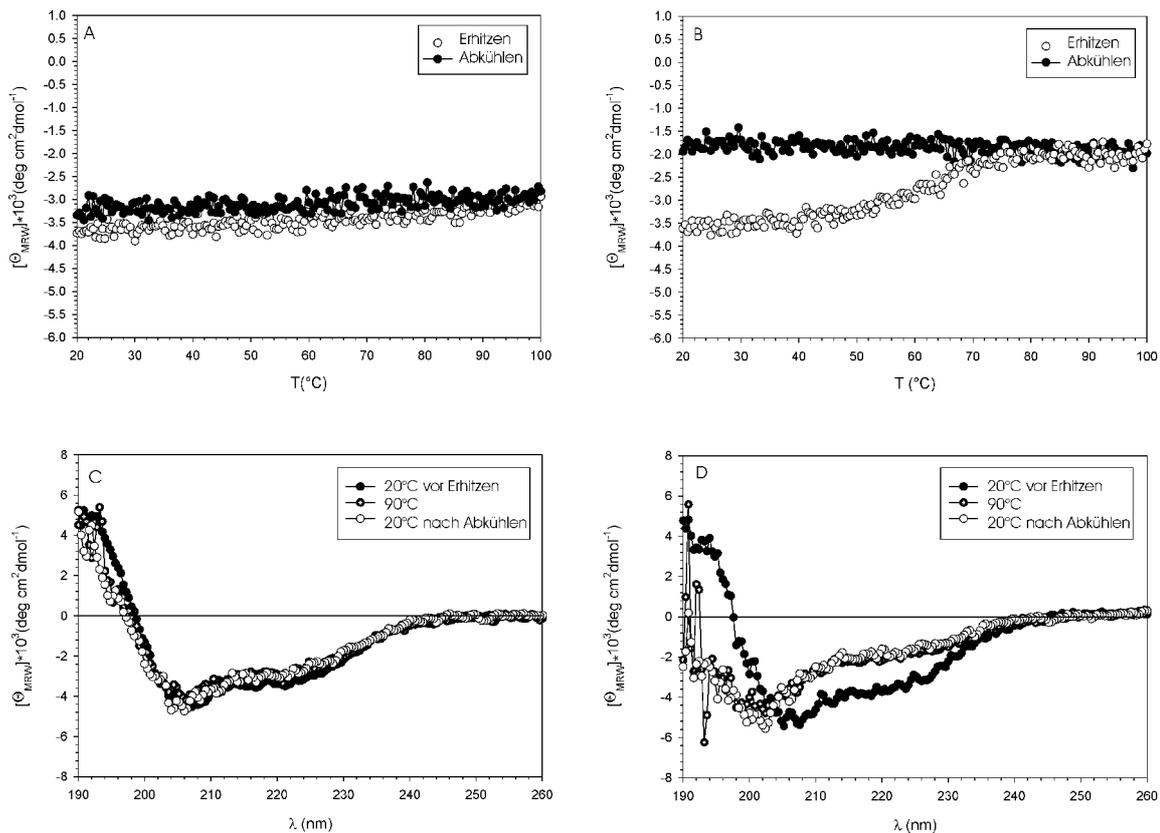
als auch in den Beträgen der mittleren molaren Elliptizität identisch und entsprechen in ihrer Form einem Protein ohne oder mit nur geringem Anteil an regulärer Sekundärstruktur.



**Abb. 4.33: Untersuchung der thermischen Stabilität von reduziertem und oxidiertem rAra h 2 mittels Fern-UV-CD Spektroskopie.**

Thermische Denaturierung ( $\circ$ ) und Rückfaltung ( $\bullet$ ) von rAra h 2 (1,5  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 0,5 mM DTT. Wellenlänge: 222 nm; Quarzküvette einer Schichtdicke von 1 cm, Heizrate: 1  $^{\circ}/\text{min}$ .

CD Spektren von rAra h 2 (10  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) in Abwesenheit (C) und Anwesenheit (D) von 0,5 mM DTT bei 20  $^{\circ}\text{C}$  vor Temperaturanstieg ( $\bullet$ ), 90  $^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) und 20  $^{\circ}\text{C}$  nach Temperaturabnahme ( $\circ$ ). Quarzküvette einer Schichtdicke von 1 mm, Messbereich: 190 bis 260 nm, Scangeschwindigkeit 20 nm/min, 6-fach akkumuliert. Pufferspektren wurden subtrahiert.



**Abb. 4.34: Untersuchung der thermischen Stabilität von reduziertem und oxidiertem rAra h 6 mittels Fern-UV-CD Spektroskopie.**

Thermische Denaturierung ( $\circ$ ) und Rückfaltung ( $\bullet$ ) von rAra h 6 (17  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 0,5 mM DTT. Wellenlänge: 222 nm; Quarzküvette einer Schichtdicke von 1 mm, Heizrate: 1  $^{\circ}/\text{min}$ .

CD Spektren von rAra h 6 (17  $\mu\text{M}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) in Abwesenheit (C) und Anwesenheit (D) von 0,5 mM DTT bei 20  $^{\circ}\text{C}$  vor Temperaturanstieg ( $\bullet$ ) 90  $^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) und 20  $^{\circ}\text{C}$  nach Temperaturabnahme ( $\circ$ ). Quarzküvette einer Schichtdicke von 1 mm, Messbereich: 190 bis 260 nm, Scangeschwindigkeit 50 nm/min, 6-fach akkumuliert. Pufferspektren wurden subtrahiert.

## 4.6.2 Proteasestabilität

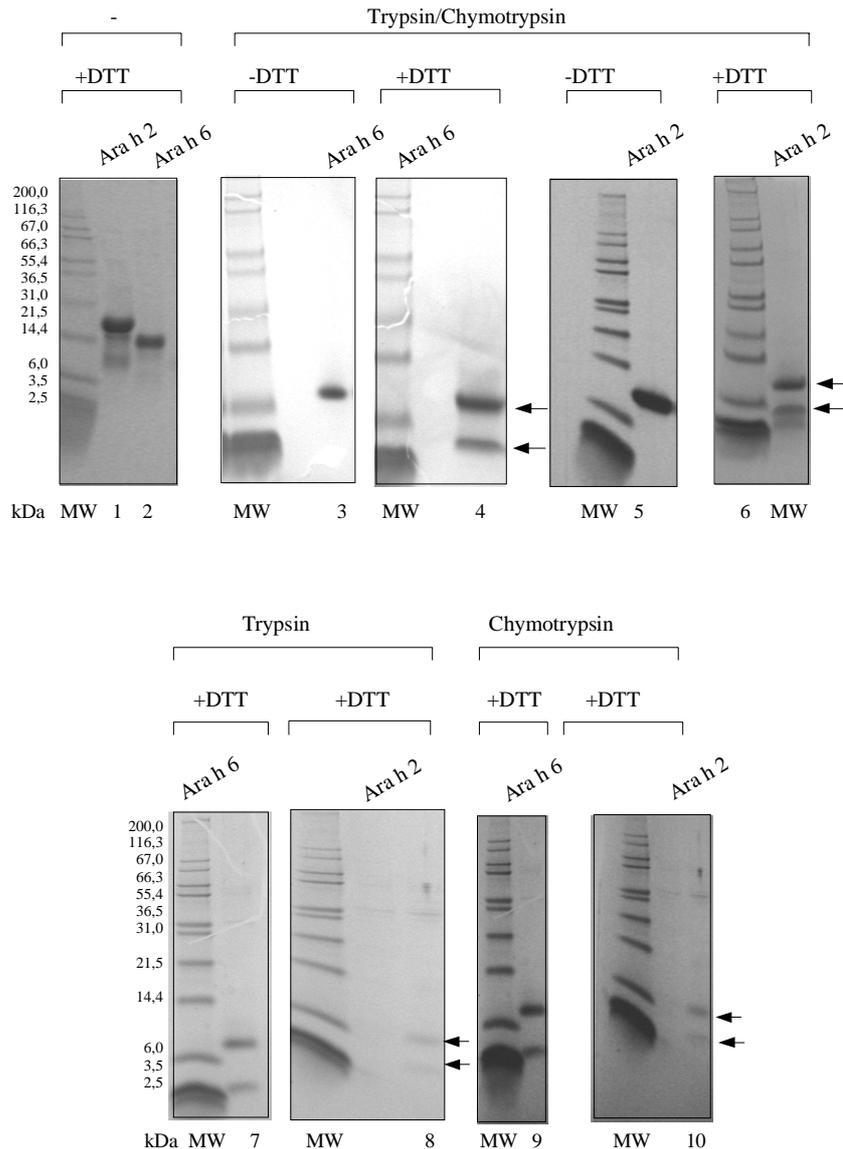
### 4.6.2.1 Nachweis von proteaseresistenten Proteinregionen

Zur Untersuchung der Proteasestabilität wurden exemplarisch die beiden Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin ausgewählt. Dazu wurden Proteinproben einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  mit 1  $\mu\text{M}$  Trypsin oder Chymotrypsin bzw. mit einer Mixtur aus beiden Enzymen bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Verlauf der Proteolyse wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von nach 10-minütiger Inkubation entnommenen Proben analysiert (Abb. 4.35). Die Elektrophorese der Proteolyseprodukte erfolgte mit kommerziell erhältlichen 10 %igen Bis-Tris-Gelen (Kap. 3.7.1.2). Diese ermöglichen die saubere Trennung von Peptiden bis zu einer minimalen Größe von 2,5 kDa. Die Proteolyseansätze wurden unter

oxidierenden (ohne Zusatz von DTT) und reduzierenden Bedingungen (2,5 mg/ml DTT) vergleichend elektrophoretisch untersucht.

Nach Reduktion mit DTT erscheinen bei fast allen Ansätzen zwei distinkte Banden (Abb. 4.35). Eine Ausnahme stellt Ara h 2 nach einem Doppelverdau mit Chymotrypsin und Trypsin dar. Hier tritt neben zwei deutlichen Hauptbanden eine dritte Bande schwächerer Intensität bei ca. 3 kDa in Erscheinung. Dabei kann es um eine Verunreinigung der verwendeten Probe oder um eine Variante des kleinen Ara h 2 Fragmentes handeln. Die mittels Molekulargewichtsstandards geschätzten Massen der Fragmente betragen ca. 4 und 9 kDa. Die entstanden Fragmentgrößen sind für Ara h 2 und Ara h 6 identisch und zeigen keine Protease-abhängige Variation. Bei Verzicht auf Reduktionsmittel tritt nach Elektrophorese hingegen nur ein einzige und im Fall von Ara h 6 sehr distinkte Bande in Erscheinung. Aus diesem Befund können bereits erste Aussagen zur Primärstruktur der proteaseresistenten Fragmente abgeleitet werden. Offenbar führt tryptischer und chymotryptischer Verdau zur Ausbildung eines Produktes, welches nicht mehr aus einer kontinuierlichen Polypeptidkette aufgebaut ist, sondern aus zwei disulfidverbrückten Untereinheiten besteht, die nach Reduktion im SDS-Gel als isolierte Banden in Erscheinung treten.

Wie eine zeitabhängige Analyse zeigte, bleiben die nach 10 min beobachteten Fragmente ohne Intensitätsverlust bis mindestens 15 h stabil (nicht dargestellt).



**Abb. 4.35: Analyse der Reaktionsprodukte der tryptischen, chymotryptischen und kombinierten (Trypsin und Chymotrypsin) Proteolyse von Ara h 6 und Ara h 2.**

10 %ige Coomassie-gefärbte NUPAGE-Bis-Tris-SDS-Polyacrylamidgele (Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach reduzierender und oxidierender Elektrophorese der intakten Proteine bzw. der Chymotrypsin- und Trypsin-resistenten Fragmente von Ara h 2 und Ara h 6. Molekulargewichtsmarker: Mark12.

Nach Inkubation mit den entsprechenden Proteasen (10 min, 50 mM Tris, pH 8, 37 °C) wurden die Proben mit reduzierendem bzw. oxidierendem Puffer versetzt (NUPAGE LDS-Puffer, gegebenenfalls 2,5 mg/ml DTT) und für 5 min bei 90 °C denaturiert. Die Reaktionsprodukte sind bei reduzierendem Probenauftrag durch Pfeile markiert.

(1,2) Ara h 2 und Ara h 6 vor Proteasebehandlung in DTT-haltigem Probenpuffer.

(3,4) Ara h 6 nach Trypsin-, Chymotrypsininkubation in Abwesenheit und Gegenwart von DTT im Probenpuffer.

(5,6) Ara h 2 nach Trypsin-, Chymotrypsininkubation in Abwesenheit und Gegenwart von DTT im Probenpuffer.

(7,8) Ara h 6 und Ara h 2 nach Trypsininkubation in Gegenwart von DTT im Probenpuffer.

(9,10) Ara h 6 und Ara h 2 nach Chymotrypsininkubation in Gegenwart von DTT im Probenpuffer.

#### 4.6.2.2 Charakterisierung der Primärstruktur der proteaseresistenten Ara h 2- und Ara h 6-Fragmente

Zur Charakterisierung der durch die proteolytische Reaktion entstandenen Produkte wurden die durch Reduktion erzeugten Untereinheiten der heterodimeren Proteine aminoterminal sequenziert (Kap. 3.7.3).

Zur Sequenzanalyse wurde Ara h 2 und Ara h 6 nach chymotryptischer und tryptischer Proteolyse unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt (Abb. 4.36A, 4.37A) und auf PVDF-Membranen transferiert. Die auf der Membran visualisierten Banden der beiden Untereinheiten wurden ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingeschickt.

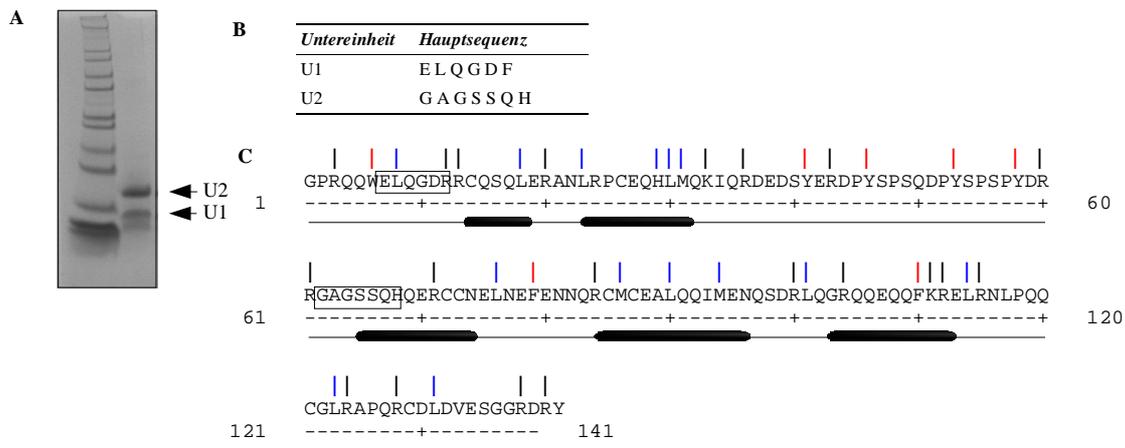
##### Ara h 2 Primärstruktur

Für Ara h 2 konnten jeweils deutlich zwei Hauptsequenzen ermittelt werden (Abb. 4.36). Im Fall der großen Untereinheit korrelieren die sieben ermittelten Reste (GAGSSQM) exakt mit Position 62 bis 69 der Ara h 2-Sequenz. Für die kleinere Untereinheit wurden sechs Aminosäurereste (ELGQGDF) identifiziert, die bis auf Ausnahme des terminalen Phenylalanins Sequenzposition 7 bis 11 entsprechen. Da die betreffende Sequenz nicht mehrfach innerhalb der Ara h 2 Polypeptidkette anzutreffen ist, kann hier für das terminale Phenylalanin von einem Sequenzierfehler ausgegangen werden. Dies erscheint besonders auf Grund der Existenz von Nebensequenzen geringerer Intensität wahrscheinlich (nicht dargestellt). Diese wurden insbesondere bei der sehr kleinen Untereinheit 1 beobachtet. Möglicherweise handelt es sich dabei um Verunreinigungen oder um aus Ara h 2 heraus gespaltenen Peptidfragmenten. Beide Sequenzen korrelieren mit den erwarteten Produkten einer chymotryptischen Reaktion mit Phenylalanin-, Tryptophan- und Tyrosinspezifität (kleine Untereinheit) bzw. des Trypsinverdau carboxyterminal von Arginin- und Lysinresten (große Untereinheit). Auf Grund der deutlichen Abnahme der Molekularmasse von 16,8 kDa auf 14 kDa (Summe der Molekularmassen der Untereinheiten) ist davon auszugehen, dass neben sechs aminoterminalen Resten, noch weitere Aminosäuren am carboxyterminalen Ende der kleinen Untereinheit 1 entfernt wurden.

Anzumerken ist, dass entsprechend der gewonnenen Ergebnisse höchstwahrscheinlich sämtliche Cysteine nach der Proteolyse intakt vorliegen. Untereinheit 1 sollte somit zwei Cysteinreste und Untereinheit 2 die restlichen sechs enthalten.

Entsprechend einer Sekundärstrukturvorhersage korrelieren die durch Proteasen angegriffenen Bereiche mit dem Nichtvorhandensein von regulärer Sekundärstruktur. Dies

trifft vor allem auf den aminoterminalen Bereich und den „*linker*“ Abschnitt zwischen den beiden Untereinheiten zu. Zusammenfassend ergibt sich für den proteaseresistenten Anteil des Proteins folgendes Bild.: Das stabile Restprotein ist auf Grund zahlreicher Cysteine in starkem Maße inter- und intramolekular disulfidverbrückt und enthält mehrere vorhergesagte helikale Sekundärstrukturelemente, der Anteil nichtregulärer Sekundärstruktur ist im Vergleich zum Ausgangsprodukt reduziert.



**Abb. 4.36: Charakterisierung der Primärsequenz des Trypsin-/Chymotrypsin-resistenten Ara h 2 - Fragmentes.**

(A) 10 %iges Coomassie-gefärbtes NUPAGE-Bis-Tris-SDS-Polyacrylamidgel (Invitrogen, Groningen, Niederlande) der unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennten Untereinheiten. Die mit Pfeilen und als U1 bzw. U2 beschrifteten Banden wurden mittels nicht gefärbter und identisch beladener Spuren auf PVDF gebロットet und aminoterminal ansequenziert. Probenpuffer: NUPAGE LDS-Puffer, 2,5 mg/ml DTT; Molekulargewichtsstandard: Mark 12.

(B) Ergebnis der aminoterminalen Ansequenzierung (Edman-Abbau).

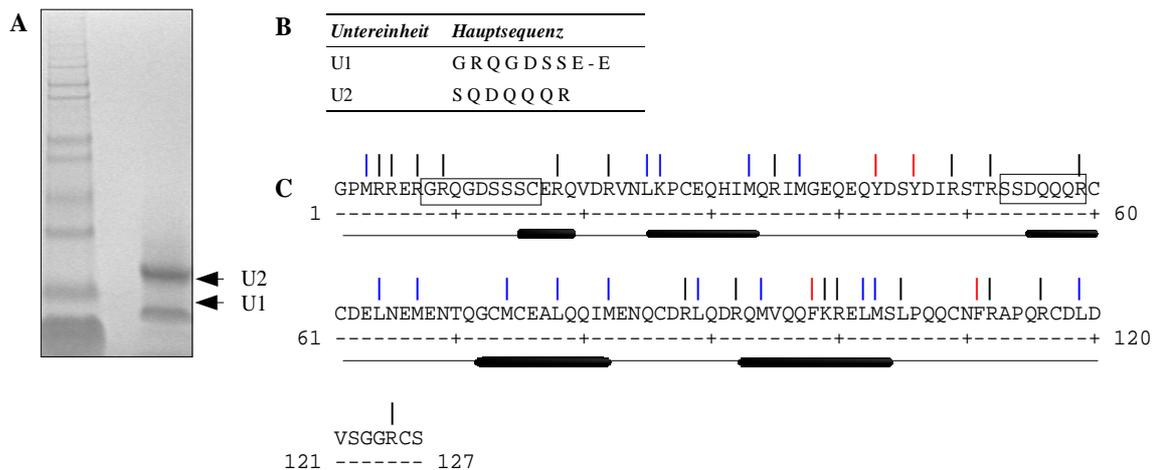
(C) Ara h 2 Aminosäuresequenz und Konsensus einer Sekundärstrukturvorhersage (Jpred: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>). Schwarze Zylinder markieren die vorhergesagten Helices. Die durch aminoterminalen Sequenzierung ermittelten Abschnitte der Untereinheiten des Ara h 2-Fragmentes sind schwarz umrandet. Vorhergesagte Proteaseschnittstellen sind mit vertikalen Strichen über der Sequenz gekennzeichnet. Trypsin (carboxyterminal von R/K): schwarz, Chymotrypsin hoher Spezifität (carboxyterminal von W/Y/F nicht vor P): rot, Chymotrypsin geringer Spezifität (carboxyterminal von F/Y/W/M/L, nicht vor P): blau.

### Ara h 6 Primärstruktur

Für Ara h 6 konnten ebenfalls deutlich zwei Hauptsequenzen ermittelt werden (Abb. 4.37). Im Fall der kleinen Untereinheit (U1) korrelieren die ersten sieben ermittelten Reste (GRQGDSS) exakt mit Position 9 bis 16 der Ara h 6-Sequenz. Die restlichen zwei bestimmten Reste zeigen keine Übereinstimmung. Als mögliche Ursache kann ein Cystein an

Position 18 vermutet werden. Cysteine können underivatisiert während des Edman-Abbaus nicht direkt bestimmt werden, sondern nur durch das Fehlen eines Signals identifiziert werden. Auch die beiden Serinreste an Position 12 und 13 gelten als „Problemaminoacids“, da diese durch Dehydratisierung während des Edman-Abbaus bis zu 80 % zerstört werden. Dies kann auf Grund von möglichen Nebenpeaks teilweise zu Fehlinterpretationen führen. Für die große Untereinheit (U2) wurden 7 Reste (SQDQQQR) identifiziert, die mit Ausnahme der zweiten Aminosäure, die wiederum ein Serin darstellt und offenbar zu Sequenziereschwierigkeiten führt, mit einem Bereich zwischen Rest 53 und 59 der Ara h 6 Sequenz korrelieren. Auch bei Ara h 6 stimmen die ermittelten aminoterminalen Reste mit möglichen Trypsin- und Chymotrypsinschnittstellen überein. Die resultierenden Untereinheiten von 4 und 10 kDa stimmen mit der Ausgangsmasse von 14,9 kDa gut überein, woraus von einer geringen Anzahl entfernter Aminosäuren auszugehen ist. Die entstanden Ara h 6 Untereinheiten weisen eine zu Ara h 2 analoge Cysteinverteilung auf. Zwei Cysteinreste befinden sich wiederum in der kleinen (U1) und in diesem Fall acht in der großen Untereinheit (U2).

Insbesondere bei Ara h 6 ist der für eine proteolytische Reaktion anfällige Anteil im Protein äußerst gering. Bei einer Anzahl von 36 vorhergesagten Proteaseschnittstellen, welche relativ gleichmäßig über die gesamte Ara h 6 Primärsequenz verteilt liegen, ist der größte Teil des Proteins vor proteolytischem Abbau geschützt. Auch im Fall von Ara h 6 stellt das stabile Restprotein als hochgradig disulfidverbrücktes und  $\alpha$ -helikales heterodimeres Protein dar.



**Abb. 4.37: Charakterisierung der Primärsequenz des Trypsin-/Chymotrypsin-resistenten Ara h 6-Fragmentes.**

(A) 19 %iges Coomassie-gefärbtes NUPAGE-Bis-Tris SDS-Polyacrylamidgel (Invitrogen, Groningen, Niederlande) der unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennten Untereinheiten. Die mit Pfeilen und als U1 bzw. U2 beschrifteten Banden wurden mittels nicht gefärbter und identisch beladener Spuren auf PVDF geblottet und aminoterminal ansequenziert. Probenpuffer: NUPAGE LDS-Puffer, 2,5 mg/ml DTT; Molekulargewichtsstandard: Mark 12.

(B) Ergebnis der aminoterminalen Ansequenzierung (Edman-Abbau).

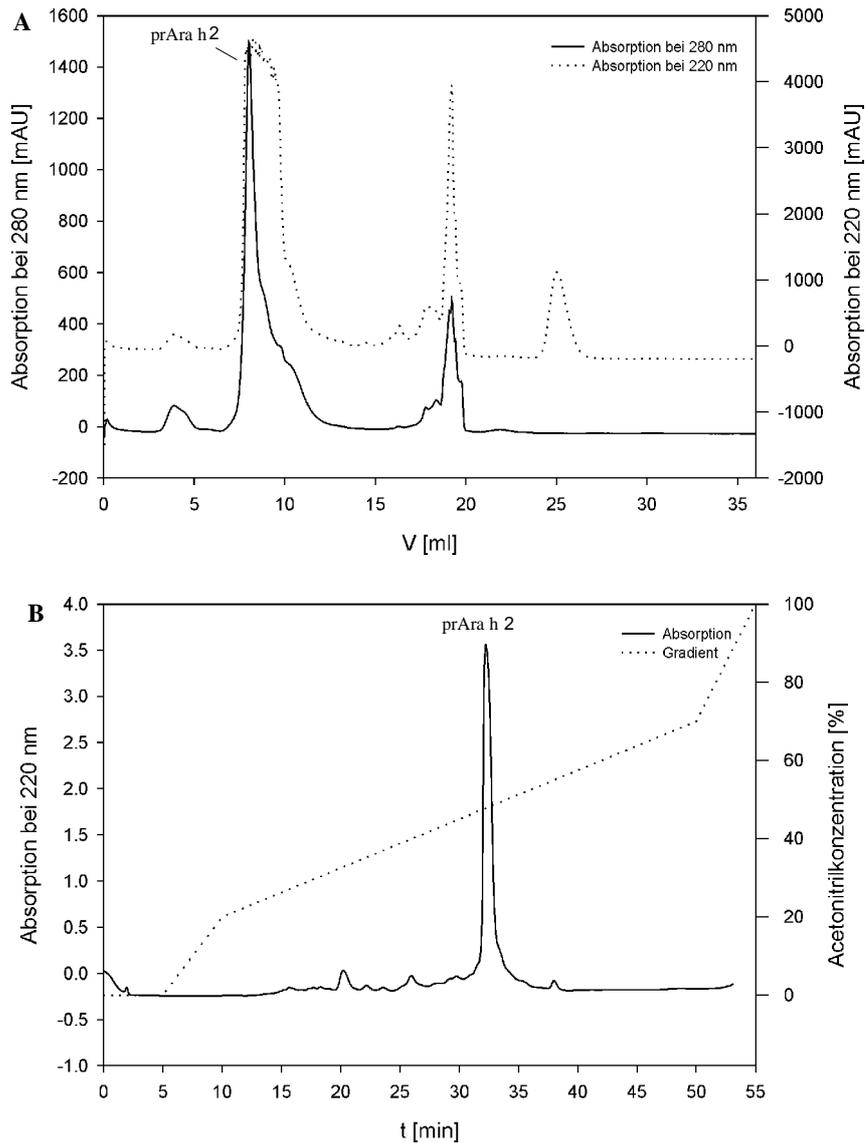
(C) Ara h 6 Aminosäuresequenz und Sekundärstrukturelemente. Helices sind durch schwarze Zylinder gekennzeichnet und sind der in dieser Arbeit bestimmten Tertiärstruktur von proteasesistentem Ara h 6 (Kap. 4.7) entnommen. Die durch aminoterminaler Sequenzierung ermittelten Abschnitte der Untereinheiten des Ara h 6-Fragmentes sind schwarz umrandet. Vorhergesagte Proteaseschnittstellen sind mit vertikalen Strichen über der Sequenz gekennzeichnet. Trypsin (carboxyterminal von R/K): schwarz, Chymotrypsin hoher Spezifität (carboxyterminal von W/Y/F nicht vor P): rot, Chymotrypsin geringer Spezifität (carboxyterminal von F/Y/W/M/L, nicht vor P): blau.

#### 4.6.2.3 Präparation von tryptisch und chymotryptisch verdautem Ara h 2 und Ara h 6 für NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die proteaseresistenten Fragmente Ara h 2 und Ara h 6 (prAra h 2, prAra h 6) sollten strukturell untersucht und mit den unbehandelten Proteinen verglichen werden. Dazu wurden  $^{15}\text{N}$ -markierte Ara h 2 und Ara h 6 Proben nach den bereits beschriebenen Verfahren für rAra h 2 und rAra h 6 (Kap. 4.2.2.3; 4.5) präpariert. Die tryptische und chymotryptische Proteolyse erfolgte direkt im Anschluss der zweiten Affinitätschromatographie ohne vorherige Gefriertrocknung des Proteins. Dazu wurden 60 ml Proteinlösung einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  mit 0,1 bis 0,2  $\mu\text{M}$  Trypsin bzw. Chymotrypsin bei 37 °C über einen Zeitraum von 12 h inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wurde elektrophoretisch kontrolliert. Die Probe wurde nach erfolgter Proteolyse gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das getrocknete Protein wurde in 250  $\mu\text{l}$  20 mM Tris/HCl, pH 8 aufgenommen

und mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex Peptide-Säule HR 10/30; Amersham Biosciences, Freiburg; Kap. 3.6.3.3) von kleineren Peptidverunreinigungen befreit (Abb. 4.38A). Nach erneuter Dialyse gegen Wasser und anschließender Gefriertrocknung standen die Proteine für NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung.

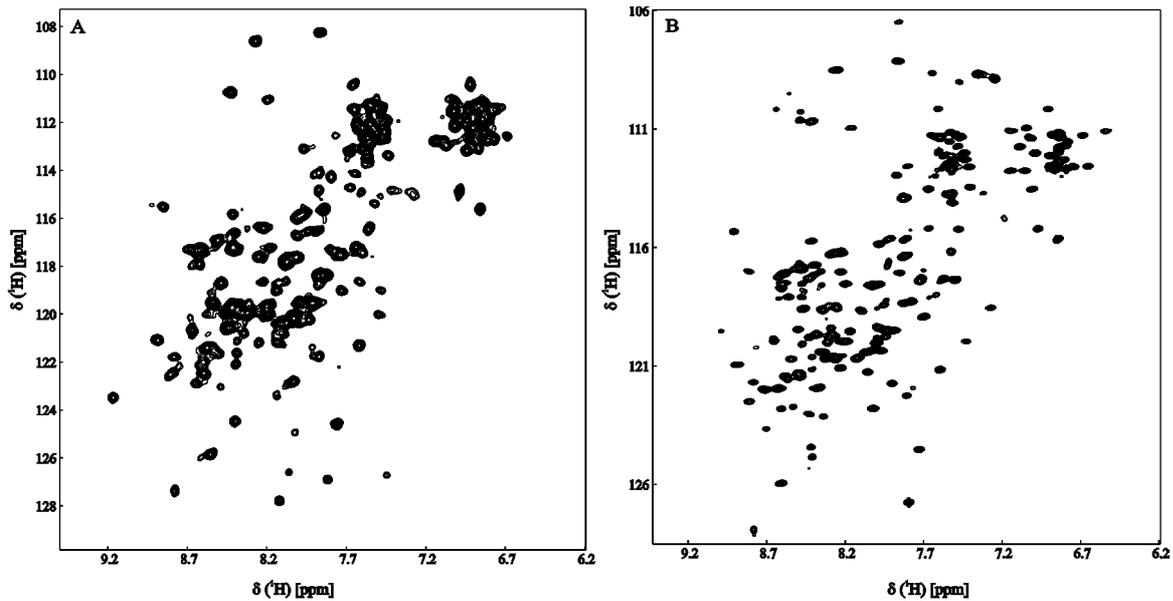
Bei sehr guter Qualität des  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums von prAra h 2, zeigte das entsprechende Spektrum von prAra h 6 eine Anzahl scharfer Resonanzen, welche als Hinweise auf Verunreinigungen in Form von kleineren Peptiden oder Proteinfragmenten gedeutet werden können. Zur effektiven Entfernung derartiger Verunreinigungen wurde die Probe einer zusätzlichen präparativen Umkehrphasenchromatographie (Abb. 4.38B, Kap. 3.6.3.4) unterzogen, zur Trockene eingengt und anschließend erneut vermessen. Durch den Vergleich der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von prAra h 6 vor und nach der Umkehrphasenchromatographie wurde sichergestellt, dass das Protein auch nach einem potentiell denaturierenden Reinigungsschritt authentisch gefaltet vorliegt (Abb. 4.38). Das resultierende Spektrum zeichnet sich durch eine sehr gute Qualität aus, zusätzliche scharfe Resonanzen konnten effektiv entfernt werden, während die eindeutig von gefaltetem Protein herrührenden Signale identische chemische Verschiebungen zum komplett nativ präparierten prAra h 6 aufwiesen.



**Abb. 4.38: Typischer Verlauf einer Peptidelfiltration und C18-Umkehrphasenchromatographie nach chymotryptischem und tryptischem Verdau von Ara h 6 (prAra h 6).**

(A) Verlauf der Größenausschlusschromatographie nach Restriktion mit Trypsin und Chymotrypsin. Superdex Peptide-Säule (HR 10/30, Amersham Biosciences, Freiburg), 13 ml Säulenvolumen; 0,5 ml/min Flussrate; Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8; Probenvolumen: 250 µl. Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.

(B) Verlauf der C18-Umkehrphasenchromatographie. Die Proteinprobe wurden mit einem Acetonitril/H<sub>2</sub>O-Gemisch (80 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA) über einen dreiphasigen konstanten Gradienten (0-20 % in 5 min, 20-70% in 40 min, 70-100 % in 5 min) eluiert. HPLC-Trennsäule: Nucleosil 100-7 C18 (Macherey Nagel, Düren); Flussrate 10 ml/min; Detektion der Absorption bei 220 nm. Probenvolumen: 2 ml.



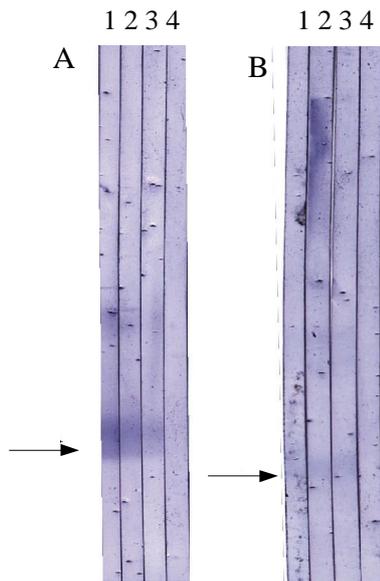
**Abb. 4.39:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren von ohne (A) und mit (B) C18-Umkehrphasenreinigungsschritt präpariertem prAra h 6.

(A): 0,65 mM  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertes prAra h 6 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , Bruker Avance Spektrometer DRX-600, 298 K, 16 gemessene Scans.

(B): 0,8 mM  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertes prAra h 6 nach Umkehrphasenchromatographie in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Bruker Avance Spektrometer DRX-600, 298 K, 16 gemessene Scans.

#### 4.6.2.4 Immunologische Eigenschaften von prAra h 2 und prAra h 6

Die tryptisch und chymotryptisch verdauten Proteine prAra h 2 und prAra h 6 wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur IgE-Bindung untersucht. Dabei kamen drei verschiedene Patientenseren (Jg3, Um33, Gk31) zur Anwendung (Abb. 4.40). PrAra h 2 und prAra h 6 wurden in Abwesenheit eines Reduktionsmittel elektrophoretisch getrennt und auf PVDF geblottet. Beide Proteine zeigten Reaktionen mit allen drei Patientenseren. Dementsprechend handelt es sich bei den proteolytisch behandelten Proteinen um immunologisch aktive Formen.



**Abb. 4.40: Westernblot von prAra h 2 (A) und prAra h 6 (B) unter oxidierenden Bedingungen.**

Die Proteine wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf PVDF-Membranen übertragen. Die spezifische Bindung von Patientensera wurde mit anti-Mensch-IgE detektiert. Gebundene Antikörper wurden durch Inkubation mit NBT/BCIP visualisiert. Patientensera: 1 = Jg3 (1:200), 2 = Um33 (1:29), 3 = Gk31 (1:20), 4 = Kontrolle (anti-Mensch-IgE).

#### 4.6.2.5 NMR spektroskopische Charakterisierung der proteaseresistenten Fragmente prAra h 2 und prAra h 6

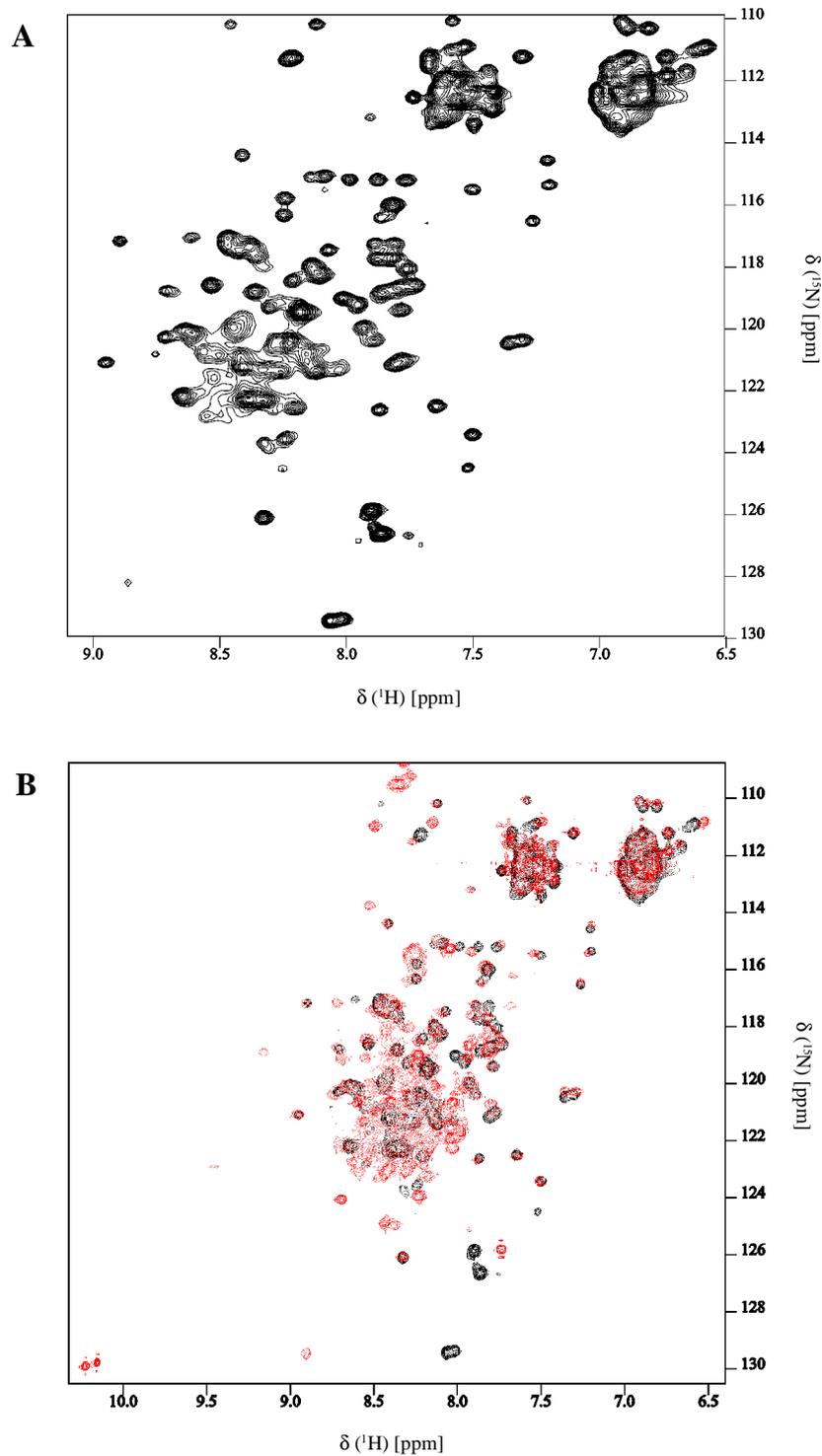
Von rAra h 2, prAra h 2, rAra h 6 und prAra h 6 wurden  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte Proteinproben hergestellt. Die gemessenen  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren sollten Aufschluss zu strukturellen Unterschieden und Gemeinsamkeiten insbesondere zwischen den entsprechenden proteaseresistenten Fragmenten und den unprozessierten Formen liefern.

Die Überlagerungen der Spektren von prAra h 2 und rAra h 2 (Abb. 4.41) bzw. prAra h 6 und rAra h 6 (Abb. 4.42) zeigt, dass die isoliert erscheinenden Resonanzen mit guter Dispersion in den verdauten und unbehandelten Proteinen nahezu identische chemische Verschiebungen aufweisen. Daraus kann eine weitestgehende Identität der globalen Tertiärstrukturen der unbehandelten und prozessierten Spezies abgeleitet werden. Unterschiede bestehen im Anteil der breiten Resonanzen im Bereich der *random coil* chemischen Verschiebungen zwischen 8,2 und 8,6 ppm. Die Spektren beider Proteine sind ausschließlich im unbehandelten Zustand von einem hohen Anteil derartiger Signal geprägt und zeigen damit das Vorliegen heterogener Konformationen an. Diese konformationelle Heterogenität kann durch Proteolyse ganz erheblich reduziert werden. Das Spalten der Polypeptidkette hebt die für einen internen Bereich ohne reguläre Sekundärstruktur typischen heterogenen Konformationen auf und führt zu einer entscheidenden Verbesserung der Spektrenqualität.

Beide Proteine zeigen in ihrer verdauten Form ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, eine Einheitlichkeit der Linienbreiten sowie eine geringe spektrale Überlappung und eine

hinreichend gute Dispersion.

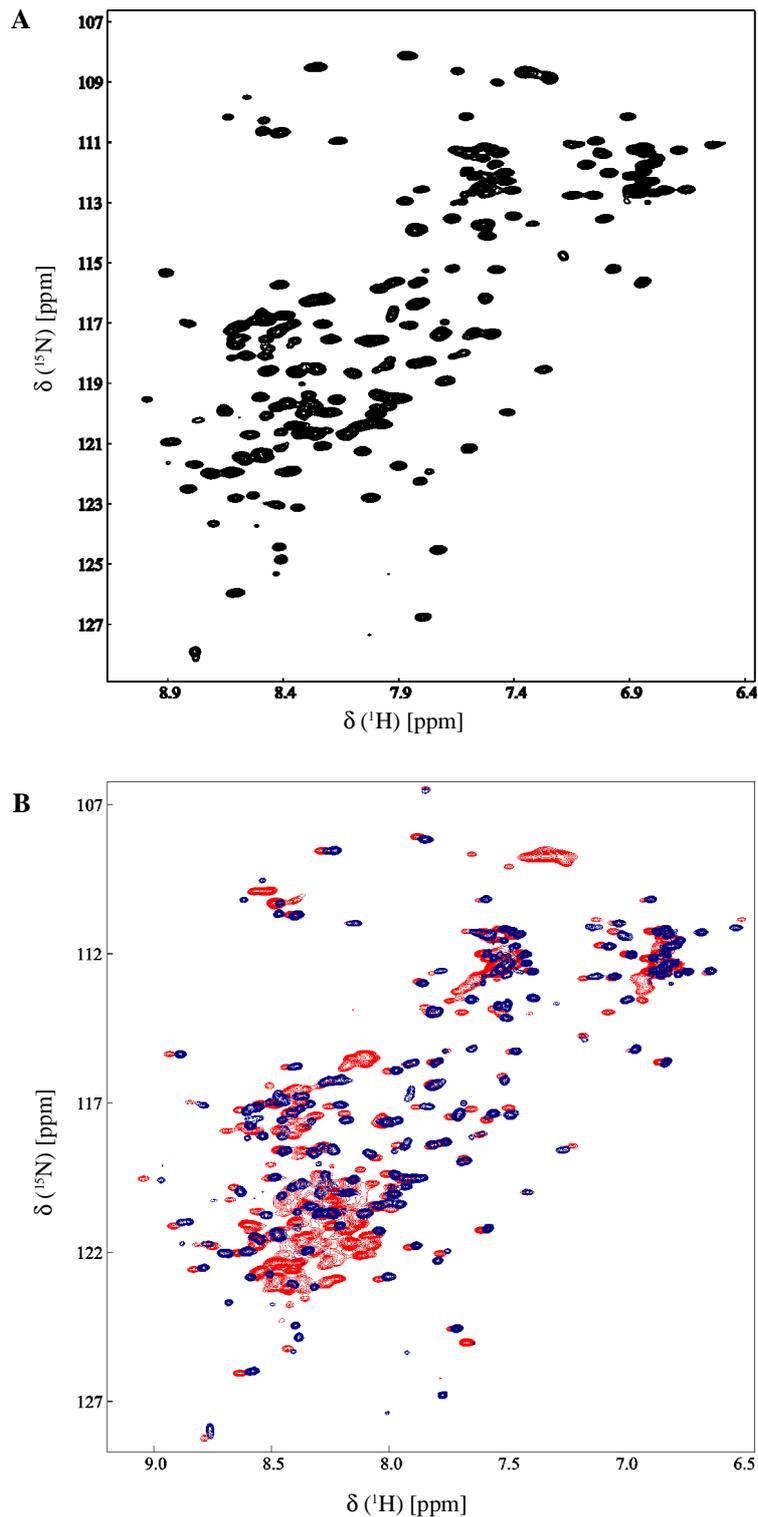
Auf Grund der sehr guten Spektrenqualität erscheinen die proteaseresistenten Fragmente auch für weiterführende strukturorientierte Experimente geeignet. Für eine NMR basierte Strukturbestimmung wurde prAra h 6 ausgewählt, welches die genannten Kriterien insbesondere im Hinblick auf die spektrale Überlappung der Signale und die Homogenität der Signalintensität am besten erfüllt.



**Abb. 4.41: Vergleich der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von proteolytisch behandeltem prAra h 2 (schwarz) und unprozessiertem rAra h 2 (rot).**

(A) 330 mM  $^{15}\text{N}$ -markiertes prAra h 2 nach Trypsin und Chymotrypsininkubation in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ; Bruker Avance Spektrometer DRX-400; 298 K; 32 gemessene Scans.

(B) Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von prAra h 2 (schwarz) und rAra h 2 (rot). prAra h 2: siehe A; rAra h 2: 330 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ; Bruker Avance Spektrometer DRX-400; 298 K; 32 gemessene Scans.



**Abb. 4.42: Vergleich der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von proteolytisch behandeltem prAra h 6 (schwarz, blau) und unprozessiertem rAra h 6 (rot).**

(A) 0,8 mM  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertes prAra h 6 nach Trypsin- und Chymotrypsininkubation in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ; Bruker Avance Spektrometer DRX-600; 298 K; 16 gemessene Scans.

(B) Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von prAra h 6 (blau) und rAra h 6 (rot). prAra h 2: siehe A; rAra h 2: 0,65 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ; 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ; Bruker Avance Spektrometer DRX-400; 298 K; 32 gemessene Scans.

## 4.7 Strukturbestimmung von prAra h 6

### 4.7.1 NMR-Probe

Für die NMR basierte Strukturbestimmung von prAra h 6 wurde eine 0,8 mM  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  markierte Probe verwendet, welche wie in Kap. 4.5.2 und 4.6.2.3 über  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie und nach Proteolyse über Größenausschluss- und C18-Umkehrphasenchromatographie gereinigt wurde, verwendet. Die proteolytische Spaltung der Probe führte zu einer deutlichen Qualitätssteigerung der Probe, welche sich durch einen geringen Grad an Signalüberlappung einerseits und die Homogenität der Signalintensitäten auszeichnet (siehe Abb. 4.42A). Alle im folgenden verwendeten Nummerierungen von Aminosäureresten beziehen sich auf die Sequenz des ungespaltenen Proteins.

### 4.7.2 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen

Zu Beginn der Bestimmung der 3D-Struktur mittels NMR ist die Zuordnung der individuellen Resonanzfrequenzen der Spins zu einzelnen Aminosäuren erforderlich. Zuordnungsstrategien für unmarkierte oder  $^{15}\text{N}$ -markierte Proben basieren auf skalaren Korrelationsexperimenten über die  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  Kopplungen, die die Zuordnung der Resonanzen innerhalb einer Aminosäure ermöglichen, und auf der Auswertung von NOEs zur Festlegung der sequenziellen Nachbarschaft von Spinsystemen einzelner Aminosäuren. Mit zunehmender Größe eines Proteins erfahren genannte Strategien eine rasche Limitierung durch Mehrdeutigkeiten auf Grund starker Signalüberlagerung und Entartung von Resonanzfrequenzen und durch eine abnehmende Transfereffizienz der skalaren Korrelationsexperimente über die  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  Kopplungen.

Die Resonanzzuordnung von prAra h 6 erfolgte daher mittels dreidimensionaler heteronuklearer Techniken in Form so genannter Tripelresonanzexperimente und erforderte eine vollständige Markierung mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ . Tripelresonanzexperimente erlauben den Zugang zu eindeutig sequenzieller Information ohne die Auswertung von häufig frequenzdegenerierten  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOEs. Neben dem effizienteren magnetischen Transfer ermöglichten die angewendeten Techniken der restlichen Signalüberlappung beizukommen. Die Hauptursache für die beobachteten Signalüberlagerungen war die starke Präsenz einzelner Aminosäuretypen. Dazu gehören vor allem Glutamin- und Argininreste, die 15,7 % bis 12,6 % sämtlicher Aminosäurereste darstellen und zum Teil in repetitiven Sequenzen vorkommen.

#### 4.7.2.1 Die Identifizierung von Spinsystemen

Die Identifizierung der Spinsysteme einzelner Aminosäuren erfolgte weitestgehend durch die Auswertung der Tripelresonanzexperimente HNCO, HNCA, HNCACB und CBCA(CO)NH (Kap. 3.9.2). Der Informationsgehalt der einzelnen Spektren erlaubt das Auslesen von chemischen Verschiebungen der CO, C $^{\alpha}$ , C $^{\beta}$  (i-1) und C $^{\alpha}$ , C $^{\beta}$  (i) Spins (Abb. 4.43). In einem ersten Schritt wurden möglichst viele Spinsysteme an Hand ihrer H $^N$ (i), N(i), C $^{\alpha}$ (i), C $^{\alpha}$ (i-1), C $^{\beta}$ (i) und C $^{\beta}$ (i-1) Resonanzen charakterisiert.

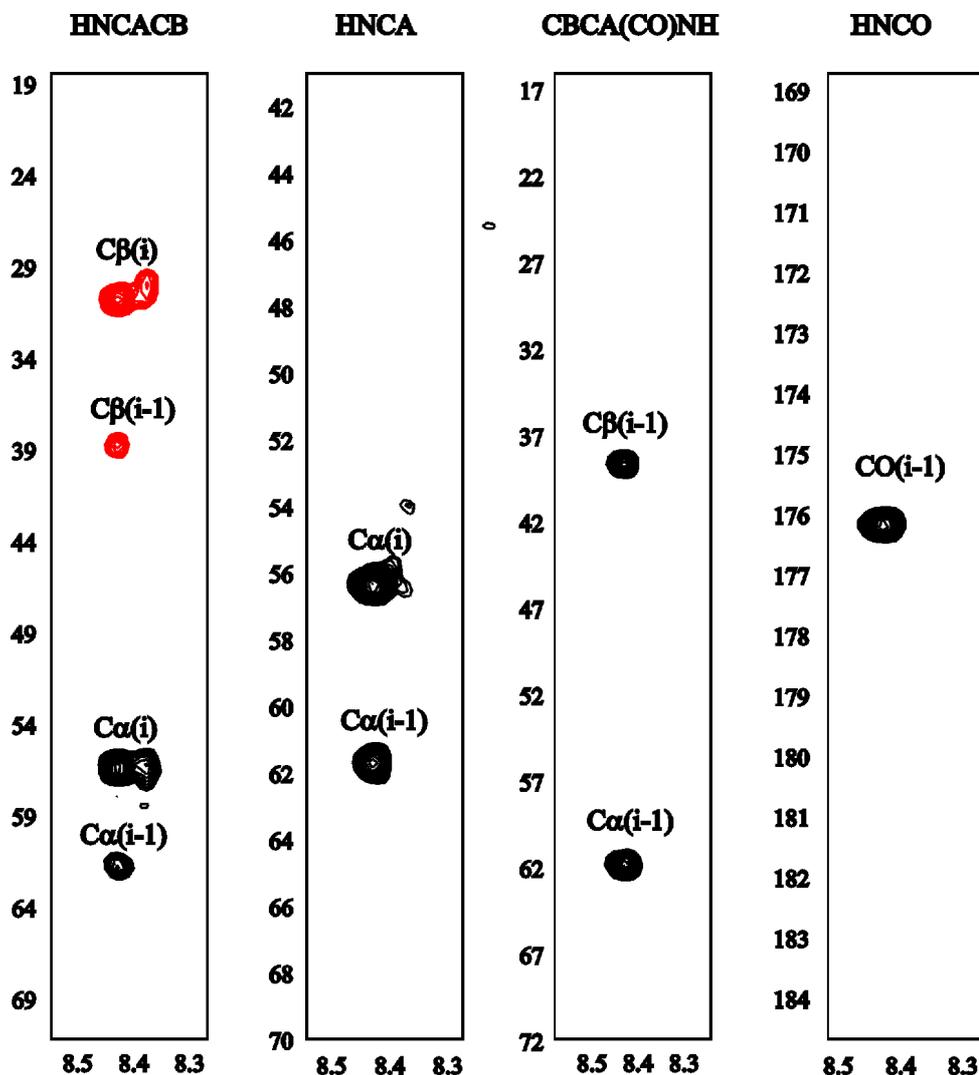


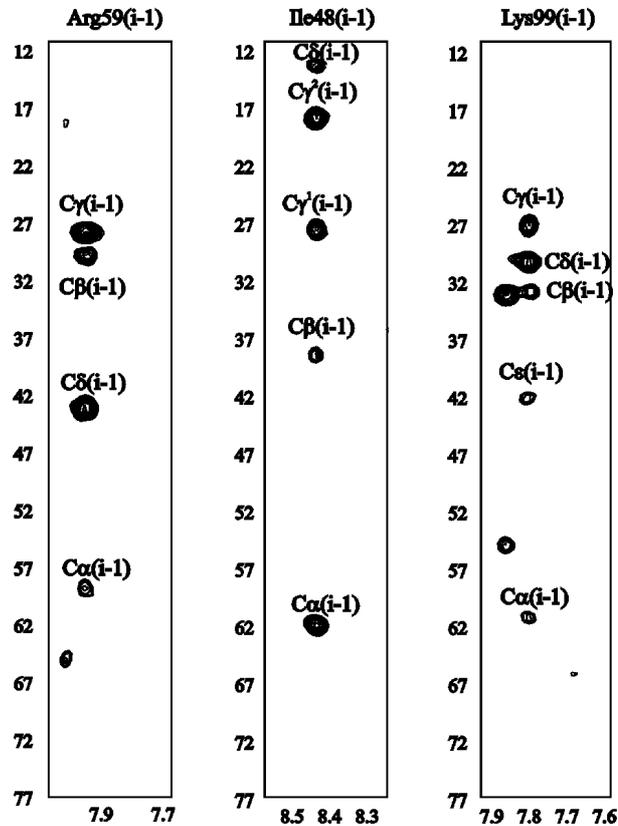
Abb. 4.43: Informationsgehalt verwendeter Tripelresonanzexperimente.

Für die Amidresonanz von Arginin 49 aus Ara h 6 ( $\delta$  ( $^1\text{H}^N$ ) = 8,4 ppm;  $\delta$  ( $^{15}\text{N}$ ) = 124,5 ppm) sind die entsprechenden Streifen aus den  $^1\text{H}^N$ ,  $^{13}\text{C}$  Ebenen der 3D Spektren bei der  $^{15}\text{N}$  Verschiebung mit der Zuordnung der Kreuzresonanzen dargestellt.

Im Verlauf der Zuordnung wurde die Bestimmung der zu den  $H^N(i)$ ,  $N(i)$ -Resonanzen gehörigen  $C^\alpha$  und  $C^\beta$ -Verschiebungen schrittweise vervollständigt.

Die Daten wurden verwendet, um die  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Amidresonanzen den Aminosäuren bzw. deren Spinsystemen sequenzspezifisch zuzuordnen. Grundlegendes Prinzip ist dabei die Suche von sequenziellen Nachbarschaften durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der inter- und intraresidualen  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Resonanzen. Die chemischen Verschiebungen der  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Atome ermöglichen eine grobe Klassifizierung in Aminosäuretypen. Sehr individuelle chemische Verschiebungen der  $^{13}C$  Resonanzen zeigen nur einige wenige Aminosäuren wie beispielsweise Glycine, Serine oder Threonine. Spinsysteme der genannten Reste und Spinsysteme, in denen selbige Aminosäuren als Vorgängerresonanzen erkennbar waren, wurden zu einem Großteil identifiziert. Die genaue Zuordnung der Sequenzposition war nur in Ausnahmefällen möglich, da nahezu alle Aminosäuren mehrfach in der Arah6-Sequenz auftreten. Die betreffenden Spinsysteme wurden nun als Ausgangspunkte verwendet, um durch Vergleich der chemischen Verschiebungen des  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Spins vor- oder rückwärtig sequenziell benachbarte Reste aufzufinden. Der Erfolg dieses Vorgehens war jedoch durch das gehäufte Auftreten von Mehrdeutigkeiten, in erster Linie verursacht durch den hohen Anteil von Aminosäuren mit sehr ähnlichen  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Resonanzen wie Glutamin, Glutaminsäure, Methionin und Arginin, stark limitiert. Es war daher notwendig, die Informationen aus einem  $C(CO)NH$  Spektrum, zu analysieren und mit den vorhandenen Daten zu kombinieren. Das  $C(CO)NH$  liefert Daten zur chemischen Verschiebung mehrerer Kohlenstoffatome des Spinsystems des in der Sequenz vorhergehenden Restes (Abb. 4.44). Spinsysteme mit eindeutigem Resonanzmuster und besonders typischen chemischen Verschiebungen der  $C^\alpha$  Atome und Kohlenstoffatome der Seitenketten konnten dabei direkt identifiziert werden. Zunächst wurde versucht, möglichst viele Aminosäuren, die in nur geringer Häufigkeit innerhalb der Sequenz vorkommen und ein sehr typisches Resonanzmuster erzeugen, im  $C(CO)NH$  aufzufinden. Dadurch wurde entweder ein- oder zweideutig (bei zweifachem Auftreten der Aminosäure) die Amidresonanz der unmittelbar benachbarten Aminosäure identifiziert. Diese Sequenzpositionen stellten weitere Startpunkte für die auf den Vergleich von  $C^\alpha$  und  $C^\beta$ -Verschiebungen von benachbarten Aminosäuren ((i), (i-1)) basierenden Zuordnung dar. Nach diesem Schema wurden möglichst lange Ketten von den zu in der Sequenz unmittelbar benachbarten Aminosäuren gehörenden Amidresonanzen gesucht. Die fortschreitende sequenzielle Zuordnung wurde generell mit den Daten aus dem  $C(CO)NH$  verifiziert. In einigen Fällen wurden zusätzliche Informationen aus HNHA und

HBHA(CO)NH herangezogen. Der Vergleich der aus diesen Spektren ermittelbaren chemischen Verschiebungen der  $H^\alpha(i)$  und  $(i-1)$  Spins konnte in Einzelfällen sequenzielle Nachbarschaften absichern.



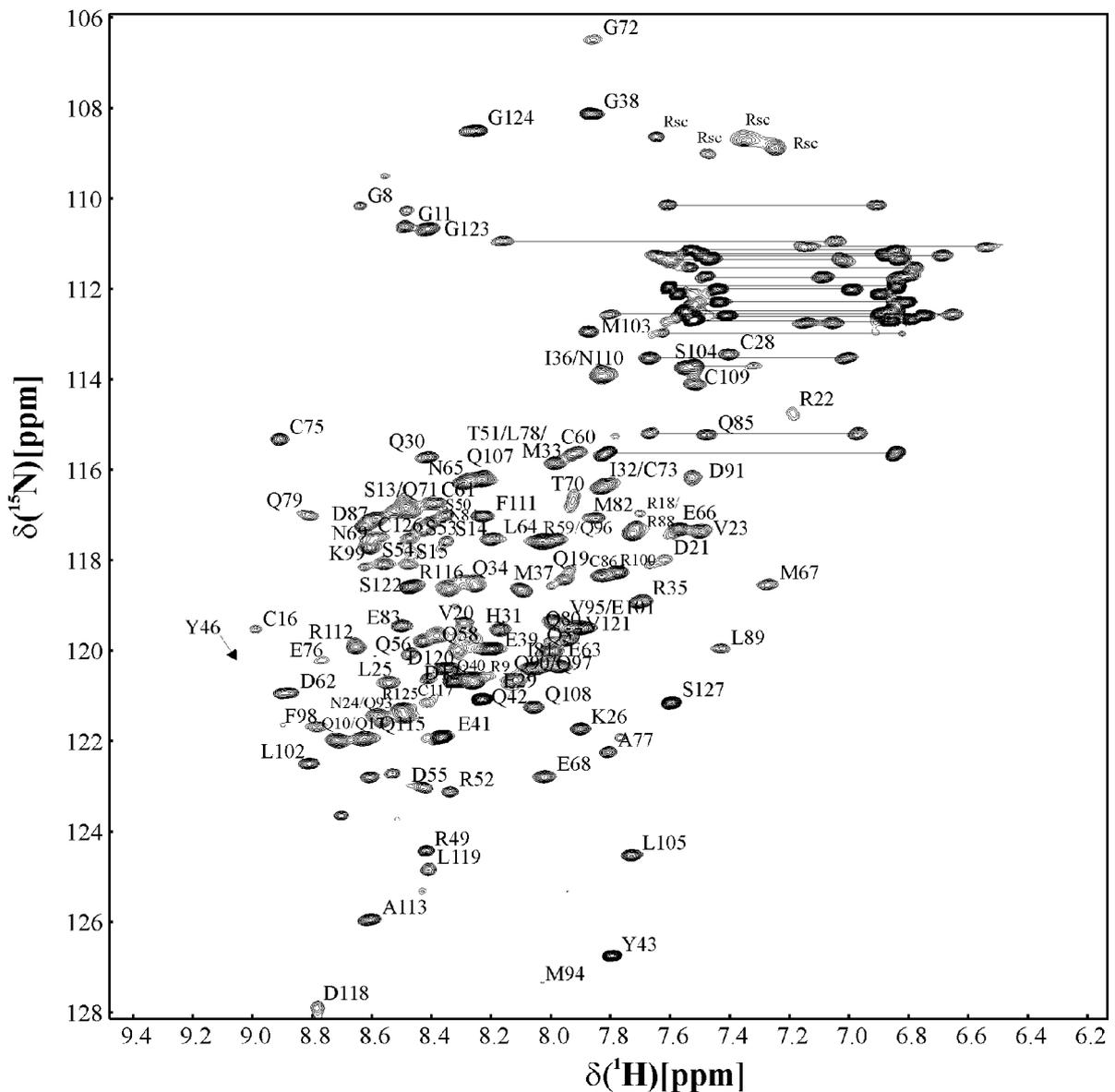
**Abb. 4.44: Informationsgehalt des C(CO)NH Experiments.**

Für die Amidresonanzen C60 ( $\delta(^1\text{H}^N) = 7,92$  ppm;  $\delta(^{15}\text{N}) = 115,7$  ppm), R49 ( $\delta(^1\text{H}^N) = 8,40$  ppm;  $\delta(^{15}\text{N}) = 124,45$  ppm) und R100 ( $\delta(^1\text{H}^N) = 7,76$  ppm;  $\delta(^{15}\text{N}) = 118,3$  ppm) sind die Streifen aus den  $^1\text{H}^N$ ,  $^{13}\text{C}$  Ebenen dargestellt. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffresonanzen des Vorgängers sind entsprechend bezeichnet. Dargestellt sind Aminosäuren, die besonders gut auf Grund der charakteristischen  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen und der Anzahl der Resonanzen der  $(i-1)$  Aminosäure zu identifizieren sind.

Eine Besonderheit stellten die sieben vorhandenen Leucinreste dar. Diese lagen auf Grund der Eigenschaften des Expressionssystems nur  $^{15}\text{N}$ -, nicht aber  $^{13}\text{C}$ -markiert vor. Dementsprechend waren keinerlei Kohlenstoffresonanzen bei Leucinresten sichtbar. Für die Zuordnung der Amidresonanzen des Proteinrückgrates resultierten daraus jedoch keine Schwierigkeiten.

Wie durch aminoterminal Ansequenzierung (Kap. 4.6.2.2) gezeigt, erfolgte eine Spaltung des Proteinrückgrates carboxyterminal von Arg7 und Arg52. Dies führte zu einer starken Verbesserung der Homogenität der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren. Resonanzen von mehreren aminoterminal von Arg52 lokalisierten Aminosäuren fielen durch geringe Signalintensitäten

auf. Zwei Aminosäuren (D44, D47) dieses Bereiches konnten nicht zugeordnet werden. Dieser Befund legt nahe, dass einige Reste im Bereich zwischen Gly 38 und Arg 52 teilweise durch proteolytische Reaktionen entfernt wurden. Dennoch konnte die Zuordnung der Amidresonanzen des Proteinrückgrates auch in diesem Bereich nahezu vollständig erfolgen. Insgesamt war mit Ausnahme des aminoterminalen Bereiches der Untereinheit 1 (Gly1 bis Arg7), dessen Abwesenheit durch Proteinsequenzanalyse bestätigt wurde, eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Amidresonanzen von 96 % der Aminosäuren möglich (Abb. 4.45).



**Abb. 4.45:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -markierten prAra h 6 aus Erdnuss.

Die Resonanzen des Proteinrückgrates sind mit Aminosäuretyp und Sequenzposition bezeichnet. Die Seitenkettenamide sind mit einer verbindenden Linie gekennzeichnet. Die Arginine der Seitenketten sind mit dem Kürzel „sc“ markiert.

#### 4.7.2.2 Aliphatische Seitenketten

Ausgehend von der Kenntnis der chemischen Verschiebungen der Amidresonanzen des Proteinrückgrates wurden anschließend die Resonanzen der aliphatischen Seitenketten zugeordnet. Das HNHA und das HBHACONH lieferte die chemischen Verschiebungen der  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  Atome (Kap. 3.9.2; Abb.4.46). Im HNHA werden die chemischen Verschiebungen der  $H^\alpha$  Atome des eigenen Spinsystems, im HBHACONH die der  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  Atome der Vorgängeraminosäure mit den  $H^N, N$  Resonanzen korreliert. Die kombinierte Analyse beider Spektren ermöglichte auch bei Signalüberlagerungen eine zuverlässige Zuordnung der entsprechenden Resonanzen.

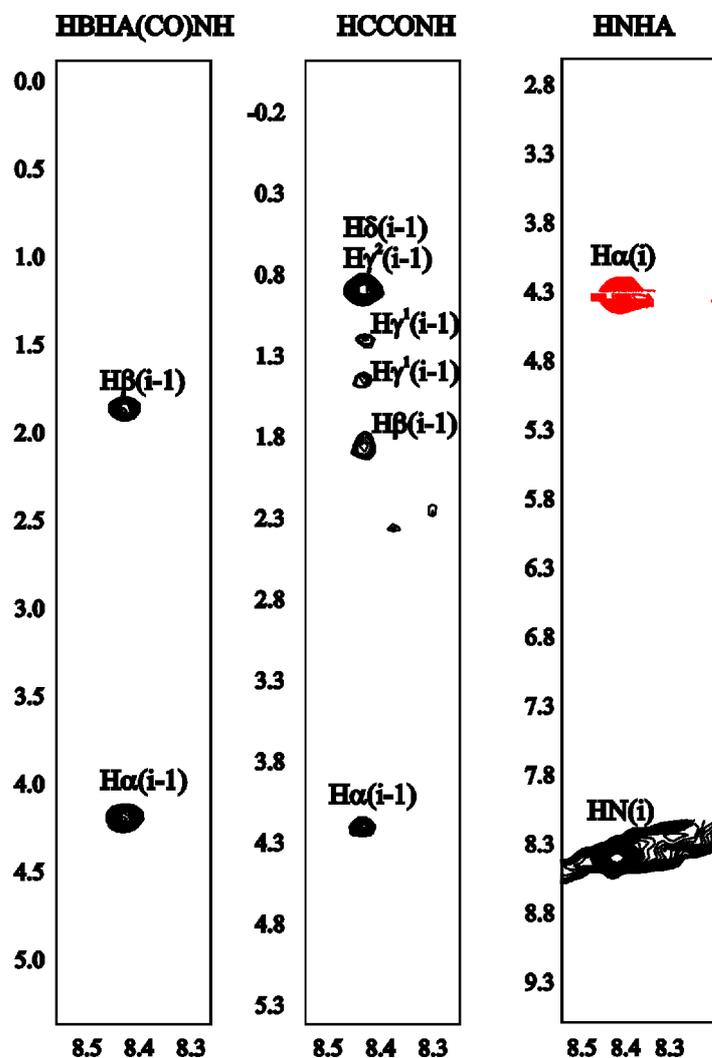
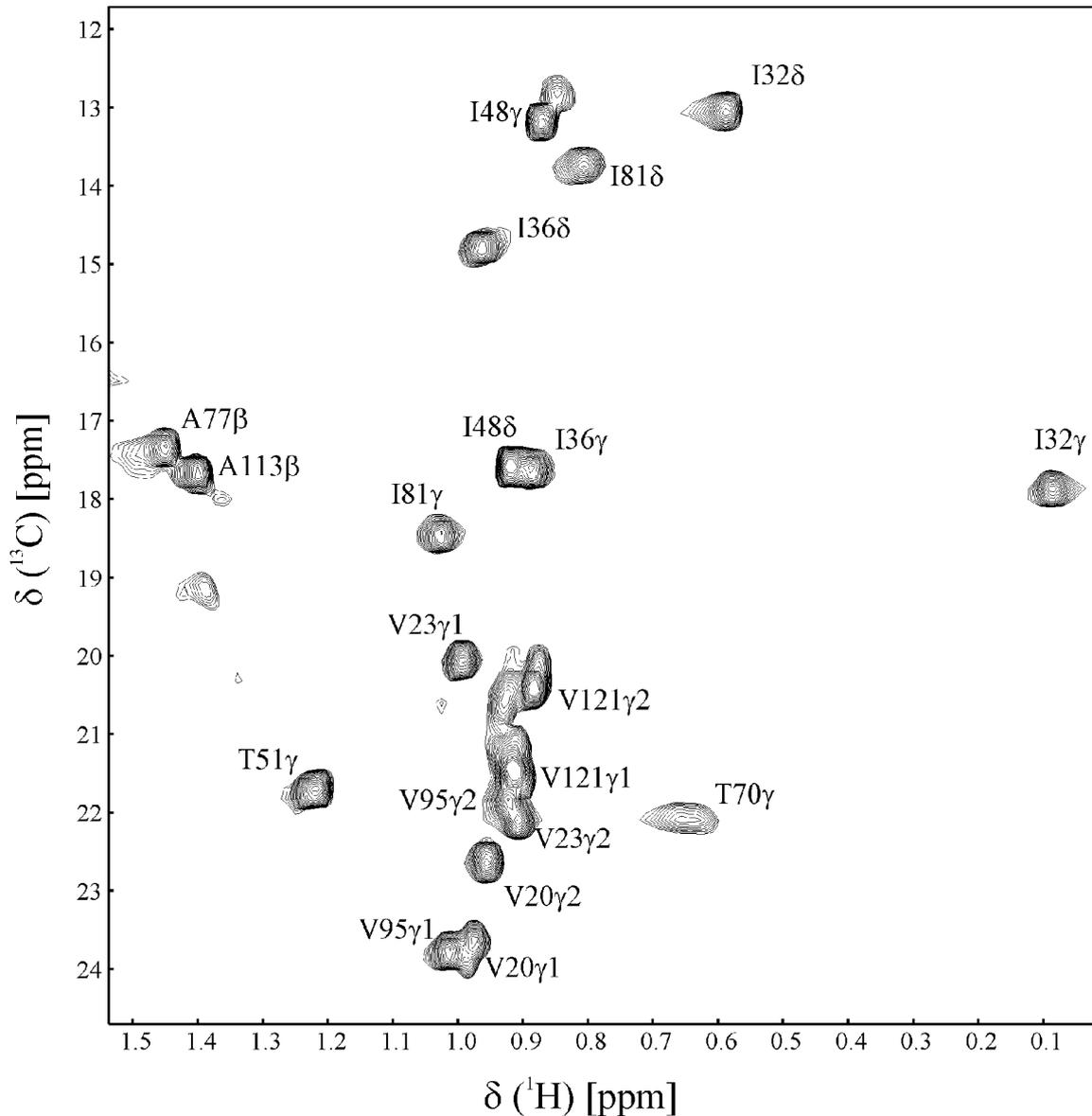


Abb. 4.46: Informationsgehalt von für die Zuordnung von Protonenresonanzen verwendeten 3D NMR Experimente.

Für die Amidresonanz des Arginin 49 aus Ara h 6 ( $\delta(^1H^N) = 8,40$  ppm;  $\delta(^{15}N) = 124,45$  ppm) sind die entsprechenden Streifen aus den  $^1H^N, ^1H$  Ebenen der 3D Spektren bei der  $^{15}N$ -Verschiebung mit der Zuordnung der Kreuzresonanzen dargestellt.

Ausgehend von den bekannten  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ ,  $H^\beta$  und  $C^\beta$  Verschiebungen wurden die Protonenresonanzen der Seitenketten mittels zwei weiterer Spektren dem H(C)CH-COSY und dem HC(CO)NH, zugeordnet (Kap. 3.9.2). Das H(C)CH-COSY liefert bei Kenntnis der Protonen- und Kohlenstoffverschiebungen in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Position die Protonenverschiebungen der intraresidual benachbarten Protonen. Das HC(CO)NH liefert in Analogie zum C(CO)NH die Resonanzen sämtlicher aliphatischer Protonen des sequenziellen Vorgängers (Kap. 3.9.2; Abb. 4.46). Der Protonentyp kann hierbei bei langen Seitenketten nicht eindeutig bestimmt werden und muss durch die parallele Analyse des H(C)CH-COSY Spektrums verifiziert werden.

Auch im Fall der Zuordnung der Seitenkettenprotonen war vor allem die kombinierte Analyse zweier Spektren mit teilweise redundantem Informationsgehalt von entscheidender Bedeutung. Die  $^{13}\text{C}$  Resonanzen der Seitenketten wurden durch die Analyse des C(CO)NH-Spektrums zugeordnet. Bei Unklarheiten, welche vor allem daraus resultierten, dass das HC(CO)NH zwar sämtliche Protonenresonanzen der Vorgängeraminosäure liefert, ihre Zuordnung jedoch nur durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Standardwerten erfolgen kann, wurden verschiedenen NOESY Spektren herangezogen. Die Zuordnung konnte bis auf Ausnahme der  $H^\epsilon$  Verschiebungen der Methionine und der Seitenkettenprotonenverschiebungen der Leucine weitgehend vollständig erfolgen. In Abb. 4.47 ist ein Ausschnitt des  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -CTHSQC Experimentes dargestellt, welcher exemplarisch die Zuordnung der Methylgruppenresonanzen zeigt. Die Amidprotonenresonanzen der Seitenketten wurden nicht ausgewertet. Bereits im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC wurde deutlich, dass die starke Signalüberlagerung auf Grund des außerordentlich hohen Anteils von Glutamin-, Arginin- und Asparaginresten eine Zuordnung nur in Ausnahmefällen möglich ist.

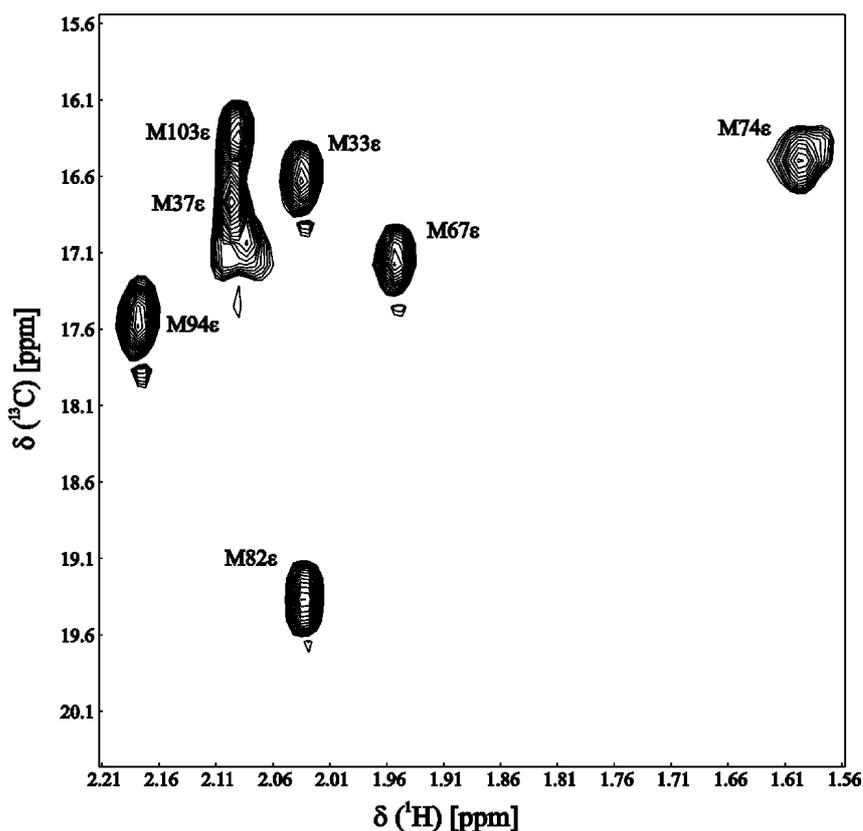


**Abb. 4.47:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -CTHSQC von prAra h 6.

Der Ausschnitt zeigt die sich durch eine sehr gute Dispersion auszeichnenden Methylgruppenresonanzen. Die Signale sind mit Aminosäuretyp, Sequenzposition und Protonentyp bezeichnet.

Die noch fehlenden Seitenkettenresonanzen wurden durch Analyse intraresidualer NOE Kreuzsignale in NOESY Spektren bestimmt. Resonanzen der Seitenkettenprotonen der Leucine sind auf Grund der fehlenden  $^{13}\text{C}$ -Markierung mit den verwendeten Experimenten nicht detektierbar. Auf Grund der außerordentlich individuellen chemischen Verschiebungen ihrer  $\text{H}^\delta$  Atome konnten diese meist in Form intraresidualer NOEs aus dem  $^{15}\text{N}$  NOESY Spektren entnommen werden.  $\text{H}^\beta$  und  $\text{H}^\gamma$  Atome konnten nicht zugeordnet werden, da eine Unterscheidung der selbigen mit den verwendeten Methoden nicht möglich war. Besondere Schwierigkeiten bereitete die Zuordnung der Methionin  $\epsilon$ -Protonen- und

Kohlenstoffresonanzen (Abb. 4.48). Sie können im H(C)CH-COSY auf Grund zu kleiner  $^{13}\text{C}$ -Kopplungen zum  $\text{C}^\gamma$  nicht bestimmt werden. Außerdem liegen die Werte der  $\epsilon$ -Protonenverschiebung im Bereich der  $\text{H}^\beta$  Resonanzen, und sind daher auch im  $^{15}\text{N}$ -NOESY in Form von intraresidualen NOE-Kreuzresonanzen auf Grund der starken Signalüberlagerung nicht zu ermitteln. Erst die Analyse des CCH-NOESY-Spektrums lieferte die entscheidenden Informationen für eine Zuordnung dieser Resonanzen. Dabei wurde ausgenutzt, dass sich die sieben vorhandenen Methionine bei sehr ähnlichen  $^{13}\text{C}^\beta$ ,  $\text{H}^\alpha$  und  $\text{H}^\beta$  Verschiebungen leicht in den chemischen Verschiebungen der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome unterscheiden. Ausgehend von den  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Verschiebungen der 7  $\epsilon$ -Resonanzen, die im  $^{13}\text{C}$ -HSQC eindeutig identifizierbar waren, wurden intraresiduale NOE-Kreuzsignale zum  $\text{C}^\alpha$  Atom ausgelesen und mit den bereits bestimmten Verschiebungen aus HNCA, CBCACOHNH oder HNCACB verglichen. Die Ergebnisse wurden durch analoge Analyse des  $^{15}\text{N}$ -NOESY Spektrums verifiziert.



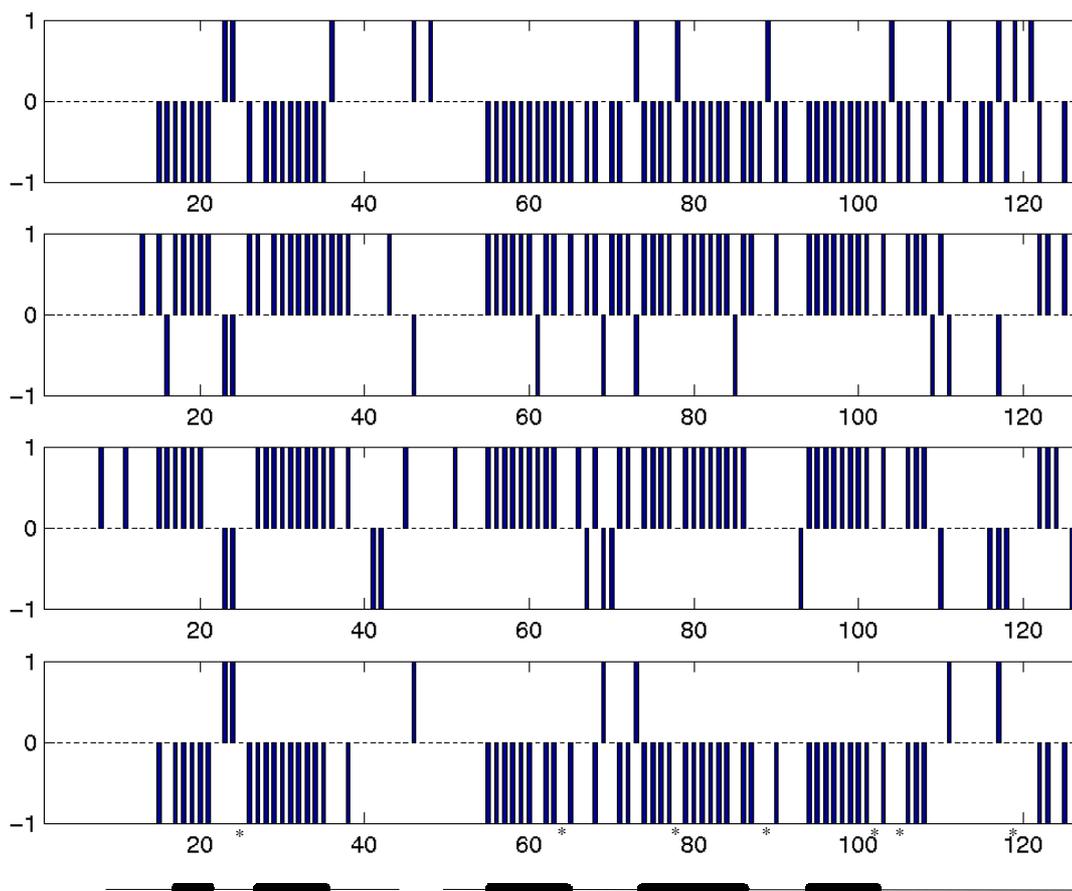
**Abb. 4.48:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -CTHSQC von prAra h 6.

Der Ausschnitt beinhaltet die Methylgruppenresonanzen der Methionine. Die Signale sind mit Aminosäuretyp, Sequenzposition und Protonentyp bezeichnet.

Zur Zuordnung der Protonenresonanzen der Aromatenringe wurden NOESY Experimente herangezogen (Kap. 3.9.2). Vor allem das  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC und das CNH-NOESY-HSQC liefert dabei hilfreiche Informationen. Die getroffene Zuordnung ist in Anhang 10.2 wiedergegeben.

### 4.7.3 Analyse der Sekundärstruktur auf Grundlage der chemischen Verschiebungen

Inhalt der bisherigen Auswertung war die Identifizierung der in den Spektren beobachtbaren Signale und deren Korrelation mit den entsprechenden Atomen der einzelnen Aminosäuren. Bereits auf Grund der chemischen Verschiebungen der  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^\alpha$  und CO Atome können ohne die explizite Berechnung einer Struktur erste strukturelle Informationen im Sinne einer Korrelation von Sekundärstrukturelementen mit Bereichen der Aminosäuresequenz gewonnen werden. Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte nach Wishart über die Erstellung eines so genannten Verschiebungsindex (Wishart & Sykes 1994; Kap. 3.9.4.2). In den chemischen Verschiebungsindizes (CSI) wurden die Differenzen der jeweiligen beobachteten Verschiebungen und der entsprechenden Werte in ungeordneten Strukturen (*random coil*) in Form von klassifizierten Werten (+1, -1) gegen die Sequenzposition aufgetragen (Abb. 4.49). Der Konsensusindex der chemischen Verschiebungen von  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^\alpha$  und CO für die Bereiche 15-21, 25-35, 55-65, 74-87 und 94-108 von Ara h 6 zeigt eine  $\alpha$ -helikale Tendenz an. Hinweise auf  $\beta$ -Faltblattstränge sind in keinem der Indizes zu beobachten.



**Abb. 4.49: Chemischer Verschiebungsindex (CSI) für prAra h 6 aus Erdnuss.**

Es sind folgende Indizes von oben nach unten dargestellt:  $H^\alpha$  (oben),  $C^\alpha$ , und CO sowie der daraus bestimmte Konsensus Index (unten). Die Balken unter dem Konsensus Index geben die abgeleitete Sekundärstruktur (Helix als Zylinder) an. Leucinreste, welche auf Grund fehlender  $^{13}\text{C}$ -Markierung keinen Wert im  $C^\alpha$ - und CO-Index aufweisen, sind mit Sternen markiert.

Für die Darstellung der abgeleiteten Sekundärstruktur wurde für Leucine dementsprechend nicht der Konsensus Index, sondern der  $H^\alpha$ -Index zu Grunde gelegt. Die durch Proteolyse teilweise fehlenden Sequenzabschnitte sind durch eine Unterbrechung in der Linie innerhalb der Darstellung der abgeleiteten Sekundärstruktur gekennzeichnet. Das Auftreten einer Helix (Zylinder) wurde angenommen, wenn mindestens viermal eine „-1“, aufeinander folgt bzw. dieser Wert mindestens aber viermal in fünf Aminosäuren auftritt.

#### 4.7.4 Experimentelle Strukturinformation

Aufbauend auf der Kenntnis der sequenziellen Zuordnung wurden nun strukturell relevante Daten im Sinne von Kernabständen, dihedralen Winkeln und Wasserstoffbrücken ermittelt.

##### 4.7.4.1 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J_{\text{HN H}\alpha}$ Kopplungskonstanten

Die Auswertung der  $^3J_{\text{HN H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten, welche entsprechend der Karplus-Beziehung (Karplus 1959, Pardi *et al.* 1984) vom Diederwinkel  $\Phi$  des Proteinrückgrates

abhängen, erfolgte auf der Grundlage des HNHA-Experimentes (Kap. 3.9.2). Dabei konnten 36 Kopplungskonstanten der 108 zugeordneten und weder Prolin noch Glycin darstellenden Aminosäuren bestimmt werden. Bei den verbleibenden Aminosäuren war die Auswertung auf Grund der ausgeprägten spektralen Überlappung der Diagonalresonanzen des HNHA nicht möglich. 23 der ermittelten 36 Kopplungskonstanten wiesen einen für  $\alpha$ -helikale Bereiche typischen Wert kleiner 6 Hz auf und wurden als Beschränkungen der Diederwinkel eingesetzt (Anhang 10.3.2). Kopplungskonstanten größer 8 Hz, welche typischerweise in  $\beta$ -Faltblattsträngen anzutreffen sind, wurden nicht aufgefunden.

#### 4.7.4.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken

Zur Identifizierung langsam austauschender Amidprotonen wurde ein  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{C}$ -markierten nach Gefriertrocknung in  $\text{D}_2\text{O}$  gelösten prAra h 6 Probe analysiert (Kap. 3.9.2). Im Spektrum konnten Resonanzen der 23 Amidprotonen identifiziert werden. Die langsam austauschenden Amidprotonen stellen mögliche Donoren von Wasserstoffbrücken dar und sind üblicherweise in regulären Sekundärstrukturelementen anzutreffen.

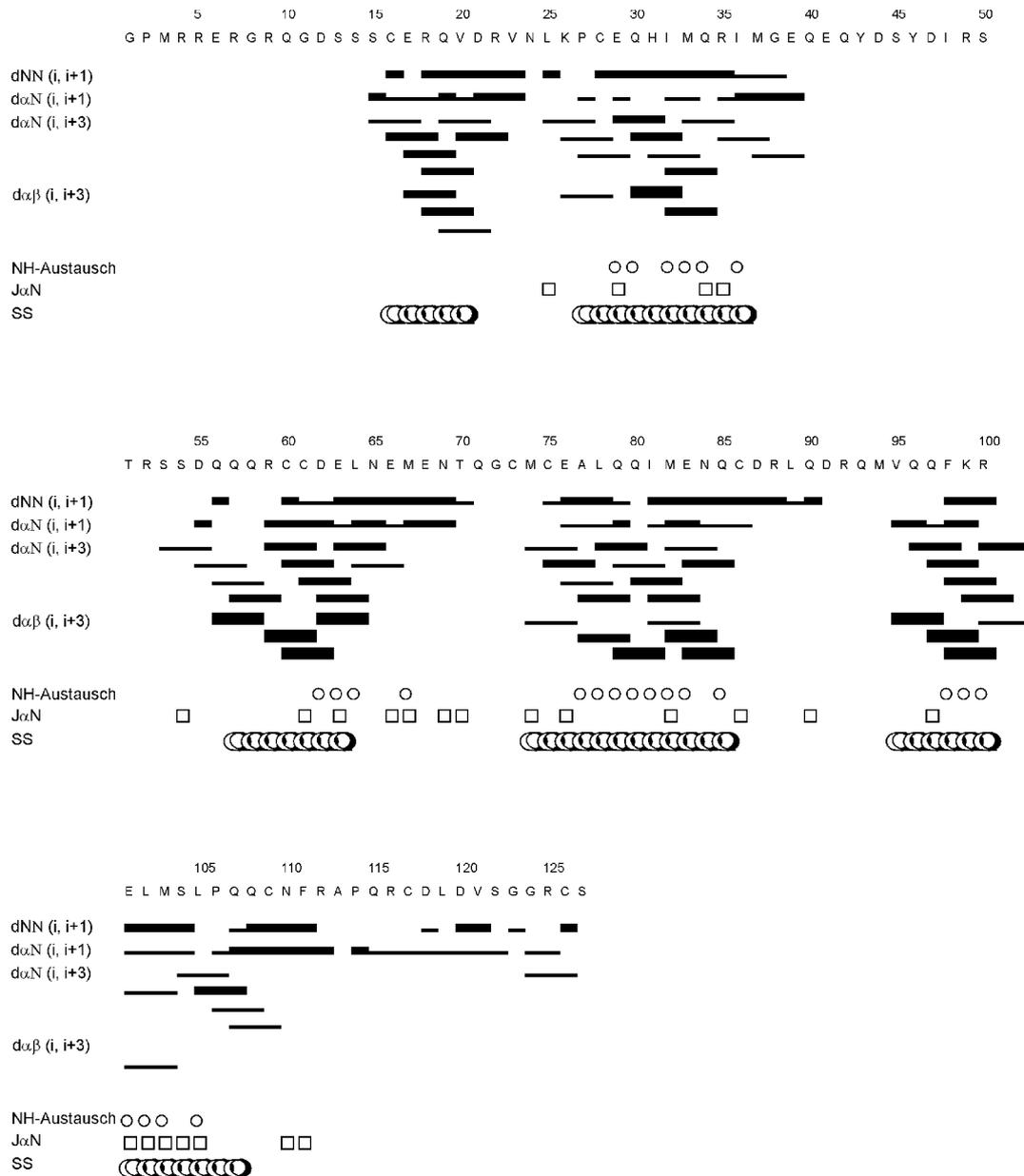
Für 22 langsam austauschende Amidprotonen konnte während iterativer Runden der Strukturberechnung der Akzeptor eindeutig identifiziert werden (Anhang 10.3.3).

#### 4.7.4.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Abstandsinformationen wurden aus den Intensitäten der Kreuzresonanzen der NOESY-Spektren gewonnen. Die im NOESY Experiment enthaltenen NOE Signale basieren auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins, dem so genannten Kern-Overhauser-Effekt. Dabei können Abstände zwischen räumlich nahen, aber auch sequenziell weit entfernten Protonen bestimmt werden. Die Intensität eines NOEs ist in erster Näherung proportional zu  $1/r^6$ , wobei  $r$  der Abstand zwischen den beteiligten Kernen darstellt. Zur Gewinnung von NOE-Daten standen folgende NOESY Spektren zur Verfügung: 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC, 3D- $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, 3D-CNH-NOESY, 3D-CCH-NOESY, 2D- $^{13}\text{C}$ -(aro)-editiertes-NOESY, 2D- $^{13}\text{C}$ -gefiltertes-NOESY (Kap. 3.9.2). Die einzelnen Abstandsinformationen wurden in der Regel den 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC und 3D- $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC Spektren entnommen. Das 3D-CNH-NOESY und das 3D-CCH-NOESY diente im wesentlichen zur Auflösung von Mehrdeutigkeiten in den erst genannten Spektren. Das 2D- $^{13}\text{C}$ -(aro)-editierte-NOESY und das 2D- $^{13}\text{C}$ -gefilterte-NOESY wurde zur Identifizierung von NOE-Signalen spezieller Aminosäuren wie Aromaten und Leucinen verwendet.

Aus der Analyse der Spektren wurden 384 Abstandsbeschränkungen ermittelt (Anhang 10.3.1). Diese teilen sich in 281 mittelreichweitige (d. h. die Aminosäuren der beiden Atome sind maximal 5 Sequenzpositionen voneinander entfernt) und sequenzielle (d.h. die Aminosäuren der beiden Atome sind in der Sequenz benachbart) sowie 103 langreichweitige Kontakte (Abstand > 5 Sequenzpositionen) auf. NOE-Kreuzresonanzen intraresidualer Art wurden nicht systematisch analysiert und dementsprechend auch nicht für Strukturrechnungen eingesetzt.

Die aus den experimentelle Daten (sekundärstrukturtypische NOEs,  $^3J_{\text{HN H}\alpha}$  Kopplungskonstanten, langsam austauschende Amidprotonen) abgeleiteten Informationen zur Sekundärstruktur des Proteins sind in Abb. 4.50 zusammengestellt und bestätigen weitestgehend die durch Analyse der chemischen Verschiebungen (Abb. 4.49) erhaltenen Befunde.

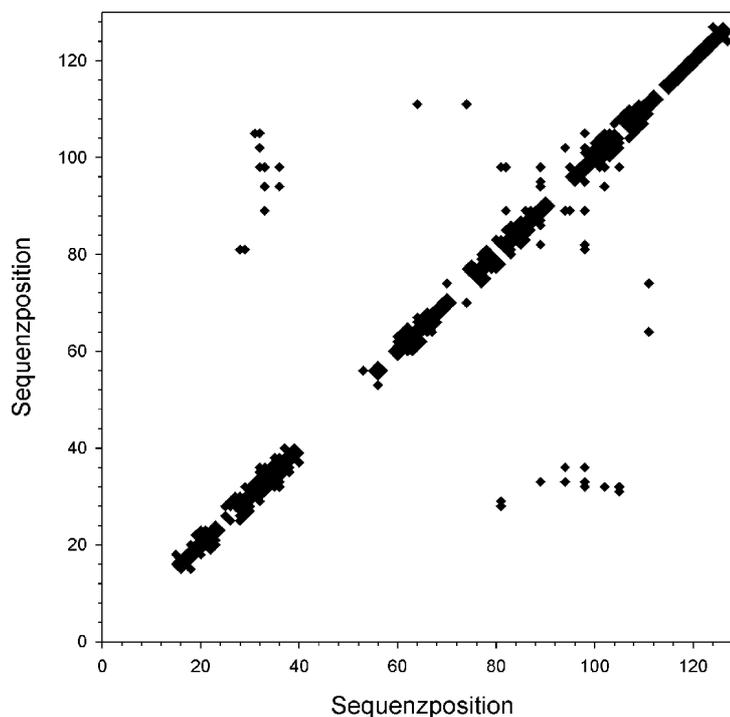


**Abb. 4.50: Schematische Darstellung der sekundärstrukturtypischen experimentellen Daten von prAra h 6.**

Angegeben sind von oben nach unten betrachtet die Aminosäuresequenz von Ara h 6, die sekundärstrukturtypischen NOEs (—), die langsam austauschenden Amidprotonen (o) und die  $^3J_{\text{HN H}\alpha}$  Kopplungskonstanten ( $\square$ ). Die Liniendicke der interresidualen NOEs ist proportional zur Intensität des NOE-Signals (stark, mittel, schwach). Sämtliche angegebene  $^3J_{\text{HN H}\alpha}$  Kopplungskonstanten weisen einen Wert  $< 6$  Hz auf. In der letzten Zeile ist die in den berechneten Strukturen zu beobachtende Abfolge der Sekundärstrukturelemente (Kap. 4.7.7) dargestellt.

Die ermittelten tertiärstrukturtypischen NOEs können Abb. 4.51 entnommen werden. In dieser Darstellungen sind sämtliche NOE-Kreuzresonanzen gegen die entsprechenden Sequenzpositionen in Form einer NOE-Kontaktkarte aufgetragen. Entsprechend des  $\alpha$ -helikalen Charakters des Proteins spiegelt sich ein Großteil der NOE-Kontakte innerhalb von

Parallelen zur Diagonalen des Spektrums wieder. Es handelt sich dabei hauptsächlich um sequenzielle ( $i, i+1$ ) und mittelreichweitige Kontakte ( $i, i+3$ ). Die außerhalb der Diagonalen anzutreffenden langreichweitigen Wechselwirkungen werden hauptsächlich von Leucin-, Methionin-, Valin- und Phenylalaninresten ausgebildet.



**Abb. 4.51: NOE-Kontaktkarte.**

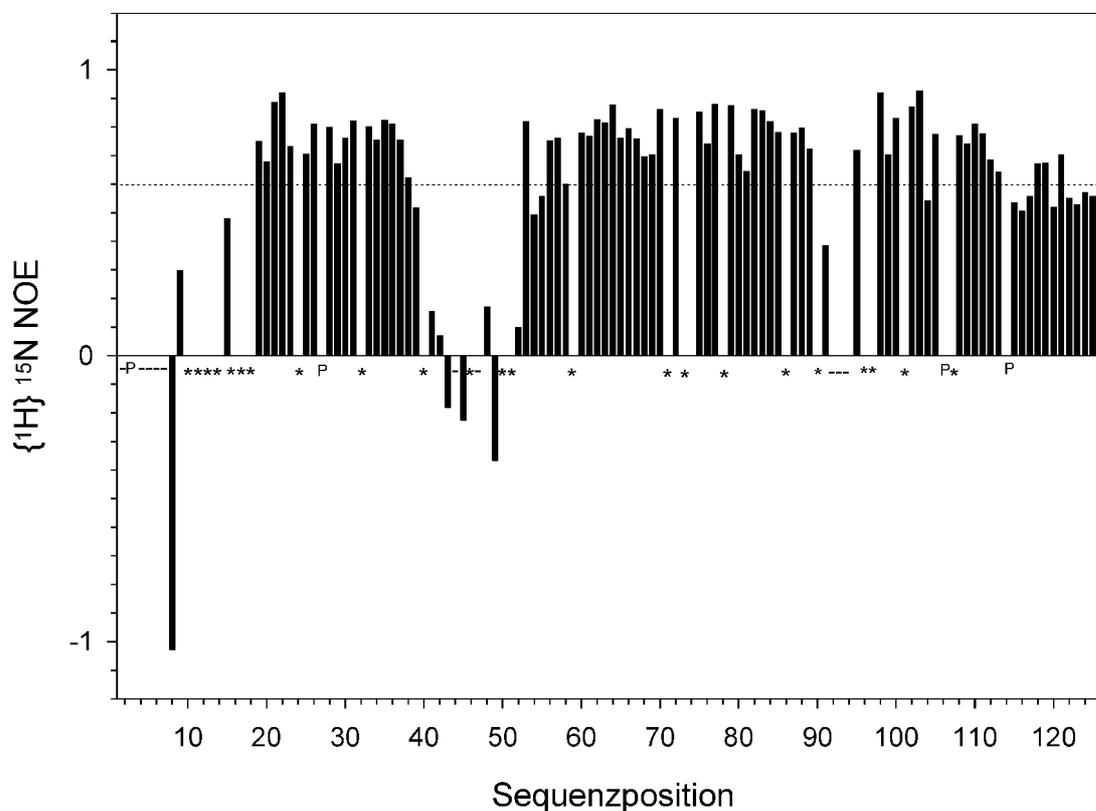
Die im Diagramm dargestellten Rauten stellen die paarweisen NOE-Kreuzresonanzen zwischen zwei Aminosäureresten dar. Eine Raute symbolisiert mindestens eine NOE-Kreuzresonanz.

#### 4.7.5 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE - Nachweis flexibler Proteinbereiche

Um Aussagen zur Beweglichkeit einzelner Proteinabschnitte auf der ps-ns Zeitskala als Maß für die Flexibilität zu erhalten, wurde der heteronukleare  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE bestimmt (Kap. 3.9.2). Der heteronukleare NOE ergibt sich aus dem Verhältnis der Intensitäten der Signale des gesättigten  $I_{\text{sat}}$  und des ungesättigten  $I_{\text{unsat}}$  Subspektrums ( $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE =  $I_{\text{sat}}/I_{\text{unsat}}$ ).

Für chymotryptisch und tryptisch verdautes Ara h 6 (prAra h 6) konnte der heteronukleare NOE bestimmt und als Funktion der Sequenzposition aufgetragen werden (Abb. 4.52). Der heteronukleare NOE nimmt am Aminoterminus und im Bereich zwischen Gln47 und Ser53 stark ab. Im letztgenannten Bereich, welcher mit dem Angriffspunkt der verwendeten Proteasen korreliert, weisen drei Aminosäuren einen negativen heteronuklearen NOE und vier

Werte unter 0,2 auf. Vor allem der negative NOE stellt ein klares Indiz für einen sehr beweglichen Bereich dar. Dies entspricht den Erwartungen für die auf Grund der Spaltung des Proteinrückgrates gebildeten amino- und carboxyterminalen Enden der großen und kleinen Untereinheiten. Der restliche Proteinanteil zeichnet sich durch eine geringe Flexibilität, wie heteronukleare NOE-Werte über 0,6 zeigen, aus. Damit kann von einer allgemeinen Starrheit des Proteinkerns ausgegangen werden. Eine Ausnahme stellte der Carboxyterminus dar, welcher eine Anzahl von Werten leicht unter 0,6 aufweist. Hier besteht ebenfalls eine Flexibilität der NH-Vektoren auf der ps-ns Zeitskala. Wie sich im Folgenden zeigen wird, weist dieser Bereich keine reguläre Sekundärstruktur auf, er ist jedoch durch eine Disulfidbrücke stabilisiert.



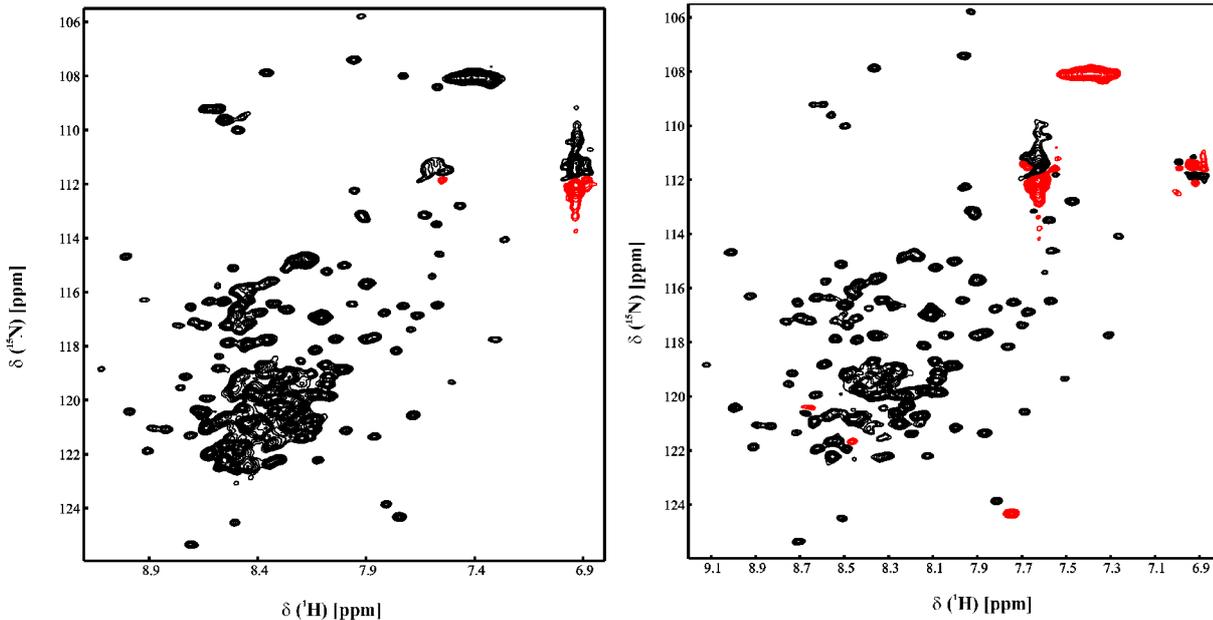
**Abb. 4.52:** Der heteronukleare  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE von prAra h 6 als Funktion der Aminosäuresequenz.

Prolinreste sind durch ein P gekennzeichnet. Sterne markieren Aminosäuren für die auf Grund von Signalüberlagerungen keine Intensitäten ermittelt werden konnten. Striche kennzeichnen nicht zugeordnete Aminosäuren.

Werte kleiner 0,6 (durch eine horizontale Linie markiert) zeigen bereits eine beträchtliche Flexibilität auf der ps-ns Zeitskala an, negative Werte beschreiben hochflexible Bereiche.

Um Aussagen zur Flexibilität der proteaselabilen Bereiche im unprozessierten Protein zu erhalten, wurde ein weiteres  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE Experiment von nicht proteolytisiertem rAra h 6

gemessen (Abb. 4.53). Dieses sollte qualitative Aussagen liefern, da eine Quantifizierung im Sinne der Ermittlung von  $I_{\text{sat}}/I_{\text{unsat}}$  ohne eine Zuordnung des unbehandelten Proteins nicht möglich ist. Auffällig ist der hohe Anteil an sehr breiten und überlappenden Signalen in einem Bereich um 8,3 ppm im ungesättigten Spektrum. Das gesättigte  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE Spektrum zeichnet sich durch eine enorme Abnahme der Signalintensität in diesem Bereich und das Auftreten von mindestens zwei negativen Resonanzen aus. Auch ohne die Bestimmung der individuellen heteronuklearen NOE-Werte, lässt sich leicht abschätzen, dass sich diese im negativen Bereich bzw. um den Wert 0 bewegen sollten. Werte des heteronuklearen NOE kleiner 0,6 zeigen hochfrequente Bewegungen des Proteinrückrates an (Kay *et al.* 1989). Damit wird deutlich, dass Ara h 6 in seiner unbehandelten Form über einen hohen Anteil stark flexibler Bereiche ohne reguläre Sekundärstruktur verfügt. Ein Vergleich mit der Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (Abb. 4.42) von unbehandeltem und proteolysiertem Protein macht deutlich, dass genau die Reste, welche einen positiven heteronuklearen NOE liefern, zum proteaseresistenten Kernbereich des Proteins gehören. Resonanzen, die mit Resten in instabilen Bereichen korrelieren und nach enzymatischer Proteolyse im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC nicht mehr zu beobachten sind, zeigen heteronukleare NOE Werte von 0 oder kleiner 0. Diese weisen eine Flexibilität auf der ps-ns Zeitskala, wie der heteronukleare NOE zeigte, als auch auf der  $\mu\text{s}$ -ms Zeitskala auf, welche mit einer konformationellen Heterogenität verbunden und im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC zu sehen ist und sind Angriffspunkt für proteolytische Reaktionen.



**Abb. 4.53:**  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE Subspektren von unbehandeltem Ara h 6 (rAra h 6) ohne (A) und mit einleitender 3 s Protonensättigung.

Rote Resonanzen entsprechen negativen Signalen der Rückgratamide. Diese zeigen eine beträchtliche Flexibilität auf der ps-ns Zeitskala einer Aminosäure an.

#### 4.7.6 Das Muster der Disulfidverbrückung von Ara h 6

Das Muster der Disulfidverbrückung sollte in Form von Abstandsbeschränkungen in die Strukturberechnung eingeführt werden.

Dabei wurde das Verknüpfungsmuster homologer 2S Albumine mit experimentell ermittelter Disulfidverbrückung zu Grunde gelegt (Abb. 4.54). Dieses ist entsprechend bisher vorhandener Daten innerhalb der Familie der 2S Albumine konsistent. Um dies zu verifizieren wurde für sämtliche Cysteinreste nach für Disulfidbindungen typischen NOE Kreuzsignalen ( $\text{C}^\beta\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$ ;  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$ ) gesucht (Klaus *et al.* 1993). Diese konnten für drei der vorhandenen Disulfidbrücken bestätigt werden. Eine Identifizierung der restlichen Kreuzsignale war auf Grund von Signalüberlagerungen nicht möglich.

Ara h 6 weist im Gegensatz zur Mehrheit der Mitglieder dieser Proteinfamilie nicht acht, sondern zehn Cysteinreste auf. Für die zusätzlichen zwei Reste wurde eine Verbrückung untereinander angenommen. Ein ungepaartes Vorliegen dieser Reste konnte durch Umsetzen mit DTNB, wodurch die Abwesenheit von freien Thiolgruppen im Protein nachgewiesen wurde, ausgeschlossen werden (Kap. 3.7.5). Die Identität der restlichen verbleibenden Disulfidbrücke ergibt sich durch den Ausschluss sämtlicher anderer Varianten.



**Abb. 4.54: Abgeleitete Disulfidverbrückung in Ara h 6 und Sequenzvergleich der 2S Albumine Ara h 6 (AAD56337), SFA8 (P23110), Bere 1 (P04403), HPS (P24337) und BnIb (1PNBA, 1PNBB).**

Dargestellt sind die Sequenzen von 2S Albuminen mit bekanntem Muster der Disulfidverknüpfung im Vergleich zu Ara h 6. Für SFA8, Bere 1 und HPS wurden Disulfidverknüpfungen mit Hilfe massenspektrometrischer Analyse proteolytisch gewonnener Fragmente nachgewiesen. Im Fall von BnIb wurden vorhandene Disulfidbindungen aus NMR-Strukturberechnungen abgeleitet. Die in den homologen Proteinen übereinstimmenden Verknüpfungsmuster wurden auf die Ara h 6-Sequenz übertragen und für diese dargestellt. Die Angaben zur Sequenzposition der Cysteine beziehen sich auf die Nummerierung der Reste innerhalb der Ara h 6 Sequenz. Ara h 6 ist mit den beiden initialen Aminosäuren Gly-Pro, wie sie in Folge einer PreScission-Protease Spaltstelle bei der in dieser Arbeit gewonnenen rekombinanten Form auftreten, dargestellt. Für die beiden in Ara h 6 zusätzlich auftretenden Cysteinreste (C86, C126) wurde eine Verknüpfung untereinander angenommen. Diese ist durch Doppelpfeile an den beteiligten Resten markiert.

#### 4.7.7 Berechnung der Tertiärstruktur

Die insgesamt 429 experimentellen Randbedingungen (Kap. 3.8.3, Anhang 10.3) dienen als Grundlage der Berechnung der Tertiärstruktur von prAra h 6. Neben den experimentellen Randbedingungen wurden entsprechende Abstandsbeschränkungen für die fünf vorhandenen Disulfidbindungen in die Rechnung einbezogen (Anhang 10.3).

Mit Hilfe einer Simulated-Annealing Strategie wurden unter Einbeziehung eines Datenbank-Termes 250 Strukturen berechnet (Kap. 3.9.5), von denen 20 Strukturen mit den

niedrigsten Energiewerten ( $E_{\text{tot}} < 63,7$  kcal/mol) als konvergierende Strukturen akzeptiert wurden. Bei diesen 20 Strukturen wurden keine systematischen Verletzungen einer Abstandsbeschränkung um mehr als  $0,17 \text{ \AA}$  verzeichnet. Die atomare Standardabweichung der 20 energieärmsten Strukturen von der mittleren Struktur beträgt für die Sekundärstrukturelemente: 16-20; 27-36; 57-63; 74-85; 95-107 für das Proteinerückgrat  $1,15 \text{ \AA}$  und für alle schweren Atome  $1,77 \text{ \AA}$ . Innerhalb der Sekundärstrukturelemente ist die Streuung der atomaren Koordinaten gering. Eine Überlagerung von 10 der Proteinerückgrate unter Ausschluss flexibler Bereiche macht dies deutlich und zeigt, dass die Struktur innerhalb der regulären Sekundärstrukturelemente, mit Ausnahme der sehr kurzen Helix I gut definiert ist (Abb. 4.55). Tab. 4.5 zeigt die Resultate der Strukturberechnung.

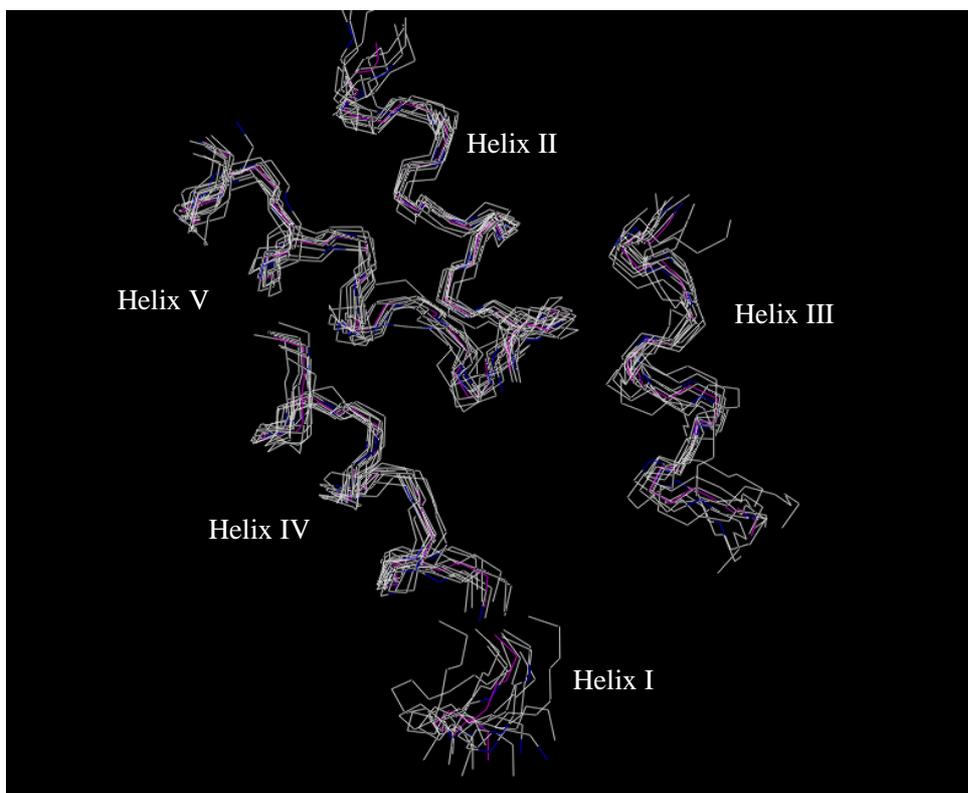
**Tab. 4.5 Zusammenfassung der Strukturberechnung.**

Die Angaben stellen mit Ausnahme der experimentellen Randbedingungen die Mittelwerte und Standardabweichungen über 20 akzeptierten Strukturen dar.

<b>Für die Strukturberechnung verwendeten experimentellen Randbedingungen</b>		
Interresiduale NOEs	sequenziell/mittelreichweitig	281
	langreichweitig	103
Beschränkung der Diederwinkel		23
Wasserstoffbrücken		22
<b>Statistik der Moleküldynamik-Simulation</b>		
Energien / kcal / mol	$E_{\text{tot}}$	$46.13 \pm 8.58$
	$E_{\text{bonds}}$	$2.21 \pm 0.66$
	$E_{\text{angles}}$	$24.67 \pm 2.85$
	$E_{\text{impropers}}$	$3.12 \pm 0.59$
	$E_{\text{vdw}}$	$6.78 \pm 1.60$
	$E_{\text{NOE}}$	$9.08 \pm 3.56$
	$E_{\text{cdih}}$	$0.27 \pm 0.21$
Standardabweichung von den idealen Abständen ( $\text{\AA}$ )	Bindungslängen	$0.001 \pm 0.00015$
	Abstandsbeschränkungen	$0.02 \pm 0.0004$
Standardabweichung von den idealen Winkeln ( $^\circ$ )	Bindungswinkel	$0.22 \pm 0.011$
	Diederwinkelbeschränkung	$0.4 \pm 0.19$
<b>Atomare Abweichung von der mittleren Struktur</b>		
Reguläre Sekundärstruktur <sup>1</sup>	Proteinerückgrat	Schwere Atome
	1,15	1,77

<sup>1</sup>Aminosäuren: 16-20; 27-36; 57-63; 74-85; 95-107

Wie bereits gezeigt, weist das Protein neben dem Aminoterminus der kleinen Untereinheit einen sehr beweglichen Bereich (Sequenzposition: 40-53) auf. Dieser wird durch die zwei Termini der großen bzw. kleinen Untereinheit gebildet. In diesem Bereich wurden erwartungsgemäß keinerlei langreichweitige oder mittlereichweitige NOEs beobachtet. Für den ca. 15 Reste umfassenden carboxyterminalen Abschnitt wurden ebenfalls keine langreichweitigen NOEs gefunden. Dieser besitzt zwar keine regulären Sekundärstrukturelemente, ist aber auf Grund zweier Disulfidbindungen fixiert und daher wohl in seiner Flexibilität auf der ps-ns Zeitskala eingeschränkt.

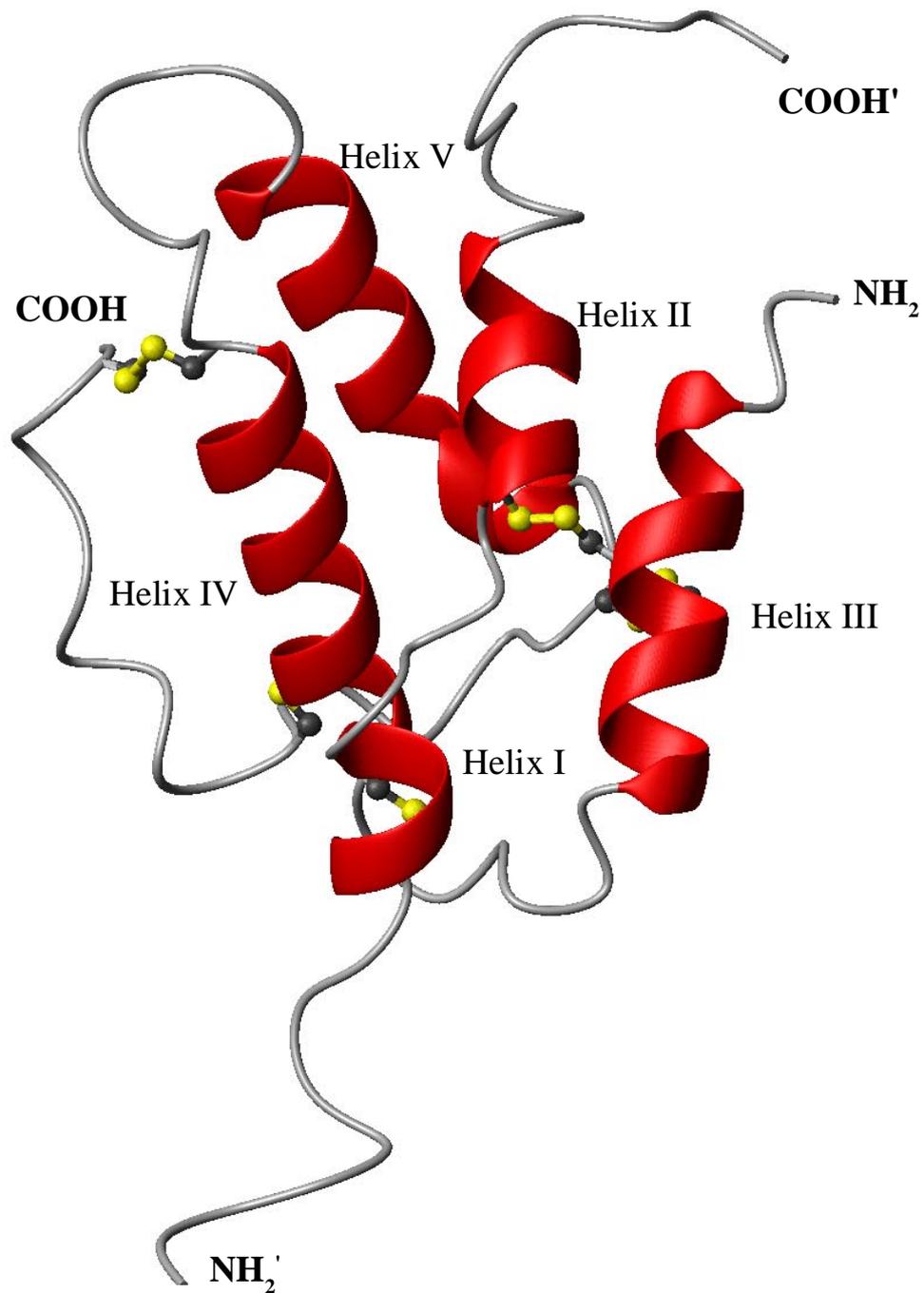


**Abb. 4.55:** Überlagerung der 10 energetisch günstigsten Strukturen von prAra h 6.

Dargestellt sind jeweils die Proteinrückgrate der Helices I (16-20), II (27-36), III (57-63), IV (74-85) und V (95-107) der 10 besten und einer Durchschnittsstruktur. Flexible Schleifen (21-26; 37-56; 64-73; 86-94) sowie der Amino- und Carboxyterminus (1-15; 108-127) wurden ausgespart. Die C-Atome sind grau farblich markiert, die N-Atome blau. Mit Ausnahme von Helix I der kleinen Untereinheit weisen die dargestellten Bereiche der 10 Strukturen einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. Die Abbildung wurde mit dem Programm SYBYL Version 6.5 erzeugt.

Eine repräsentative Struktur ist schematisch in Abb. 4.56 illustriert. Sie zeigt die aus den chemischen Verschiebungsindizes und mittel- bzw. kurzreichweitigen NOE Kreuzresonanzen abgeleiteten Sekundärstrukturelemente sowie deren relative Orientierung zueinander. Das auf Grund einer proteolytischen Behandlung resultierende heterodimere Protein besteht aus einer

kleinen und einer großen Untereinheit. Die kleine Untereinheit ist in zwei  $\alpha$ -Helices, welche durch ca. 6 Aminosäuren verbunden sind, unterteilt. Die zwischen den  $\alpha$ -Helices angeordnete Schleife ist über einem orthogonal verlaufenden und aus  $\alpha$ -Helix IV und V aufgebaute Bündel der großen Untereinheit lokalisiert. Helix III, die erste  $\alpha$ -Helix der aus insgesamt drei  $\alpha$ -Helices aufgebauten großen Untereinheit, verläuft antiparallel zu den Helices der kleinen Untereinheit. Nach einer kurzen Schleife schließt sich Helix IV an, welche durch drei Disulfidbindungen sowohl den aminoterminalen Bereich der kleinen Untereinheit als auch den Carboxyterminus der großen Untereinheit verankert (Cys 16 - Cys 73, Cys 86 - Cys 126, Cys 75 - Cys 117). Helix IV und V werden durch eine weiteren zehn Reste umfassende Schleife verbunden und verlaufen annähernd antiparallel. Am carboxyterminalen Ende der  $\alpha$ -Helix V schließt sich eine kurze  $3_{10}$ -Helix an. Die nach der letzten  $\alpha$ -Helix folgende Schleife zeigt keine reguläre Sekundärstruktur und wird durch zwei Disulfidbindungen an die Termini von Helix IV verankert. Insgesamt sind die fünf aufeinander folgenden Helices rechtshändig angeordnet.

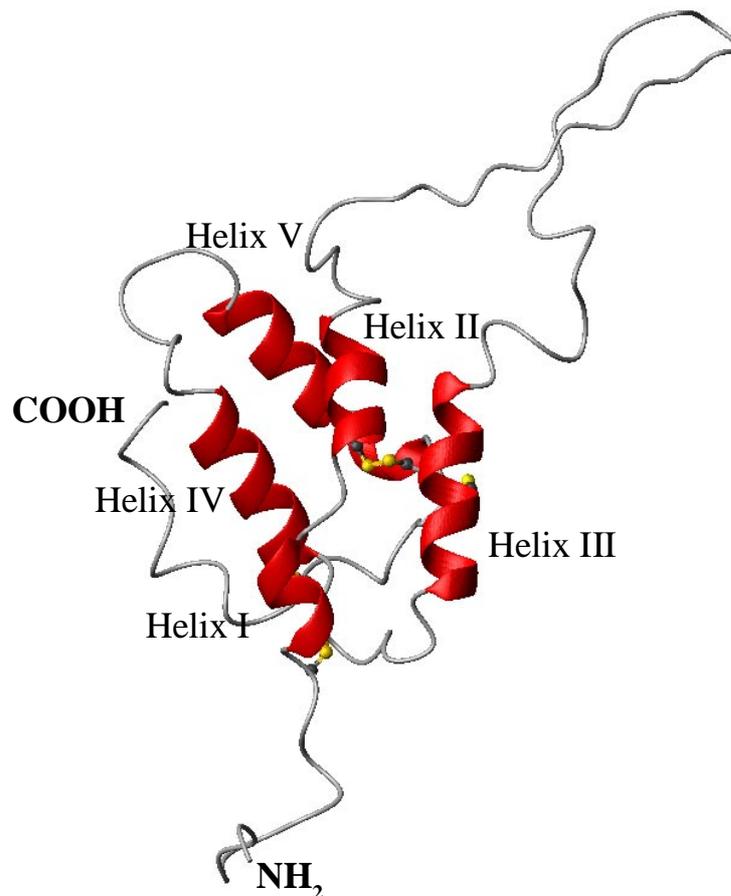


**Abb. 4.56:** Schematische Darstellung einer repräsentativen Struktur von prAra h 6.

Die Art und Lage der Sekundärstrukturelemente sowie die Disulfidbrücken (gelb) sind eingezeichnet. Der durch Proteolyse entfernte aminoternale Bereich (Gly1 bis Arg7) sowie der teilweise abwesende Schleifenabschnitt Asp44 bis Arg52 sind nicht dargestellt. Das resultierende Protein besteht aus einer kleinen (Helix 1 und Helix 2) und einer großen (Helix III, IV und V) Untereinheit, welche über zwei intermolekulare Disulfidbrücken (Cys 16-Cys 73, Cys 28-Cys 60) verbunden vorliegen. Der Amino- und Carboxyterminus der kleinen Untereinheit sind durch einen Oberstrich markiert. Innerhalb der großen Untereinheit befinden sich drei weitere Disulfidbrücken (Cys 61-Cys 109, Cys 75-Cys 117, Cys 86-Cys 127). Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol erstellt.

## 4.8 Die Homologie basierte Modellierung der Ara h 2 Tertiärstruktur

Basierend auf der experimentell ermittelten dreidimensionalen Struktur von prAra h 6 wurde ein Strukturmodell von Ara h 2 erstellt (Abb. 4.57). Beide Proteine weisen eine Sequenzidentität von 58,5 % auf. Das um 22 Aminosäurereste größere Ara h 2 wies generell eine schlechtere Qualität der NMR Spektren (Kap. 4.4, 4.7.2.4) mit höheren Anteilen stark überlappender Signale im „*random coil*“ Bereich auf und ist daher einer experimentellen Strukturbestimmung nur sehr schwer zugänglich. Das Strukturmodell zeigt ebenfalls eine rechtsgängige Anordnung von fünf  $\alpha$ -Helices. Das in Ara h 6 als hochflexibel nachgewiesene Schleifenelement zwischen den Helices II und III ist in Ara h 2 in seiner Ausdehnung nahezu verdoppelt. Im Unterschied zu Ara h 6 weist Ara h 2 nur vier Disulfidbrücken auf. Die fehlende Brücke (in Ara h 6: Cys 86-126) verhindert die Fixierung des Carboxyterminus, welcher höchstwahrscheinlich als flexibler Bereich ohne reguläre Sekundärstruktur in Erscheinung tritt.



**Abb. 4.57: Schematische Darstellung des Strukturmodells von Ara h 2.**

Die Art und Lage der Sekundärstrukturelemente sowie die Disulfidbrücken (gelb) sind eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol erstellt.

## 5 Diskussion

In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten ist das Verständnis der immunologischen Reaktionen während der Sensibilisierung als auch der klinischen Manifestationen allergischer Vorgänge stark verbessert worden. Unbeantwortet bleibt hingegen die Frage nach den Ursachen der Fähigkeit bestimmter Proteine, eine Sensibilisierung auslösen und allergische Reaktionen vermitteln zu können. Neben bestimmten biologischen Funktionen oder proteolytischer Enzymaktivität (Musu *et al.* 1997) werden vor allem die molekularen Charakteristika eines Allergens als Schlüssel für seine Allergenizität vermutet und dementsprechend analysiert (Rouvinen *et al.* 1999). So sind die immunogenen Eigenschaften eines Proteins, welche durch molekulare Charakteristika definiert werden, in Verbindung mit der immunologischen Reaktivität von genetisch prädisponierten Individuen wichtige Kriterien für die Ausprägung einer atopischen Allergie. Die molekularen Charakteristika reichen von der sequentiellen Strukturebene im Fall von T-Zell-Epitopen bis hin zur Tertiärstruktur bei B-Zell-Epitopen. So kann die dreidimensionale Struktur eines Allergens eine besonders entscheidende Rolle im allergischen Geschehen spielen. Ihre Kenntnis ist Voraussetzung zur Untersuchung von konformationellen Epitopen und strukturbasierten Kreuzreaktivitäten.

Erst die Kombination einer breiten Basis immunbiologischer und biochemischer bzw. struktureller Daten werden vermutlich ein Verständnis für die molekularen Ursachen für Allergenizität ermöglichen und damit wichtige Beiträge zur Nahrungsmittelsicherheit bei Einführung neuartiger Lebensmittel oder zur Prävention bzw. Therapie atopischer Erkrankungen beitragen.

Im Fokus dieser Arbeit steht die biochemische, biophysikalische und strukturelle Charakterisierung zweier Erdnussallergene vom 2S Albumintyp.

### 5.1 Eigenschaften des natürlichen Ara h 2 - einem Hauptallergen der Erdnuss

Das Protein Ara h 2, ein Hauptallergen der Erdnuss, war Gegenstand zahlreicher immunologischer Untersuchungen (Burks *et al.* 1994, Stanley *et al.* 1997, Burks *et al.* 1999a, Bannon *et al.* 2001). Ausgangsmaterial derartiger Experimente waren Erdnussrohextrakte, synthetische Peptide oder aus Erdnüssen gereinigtes Protein. In dieser Arbeit wurde eine weiterführende Charakterisierung des Proteins vor allem hinsichtlich struktureller Merkmale

vorgenommen. Diese sind nicht nur aus immunologischer Sicht sondern auch im Hinblick auf die Charakteristika der weit verbreiteten Gruppe der 2S Albumine von Interesse.

#### Das 2S Albumin Ara h 2 besteht aus einer kontinuierlichen Polypeptidkette

Ara h 2 weist eine maximale Sequenzidentität von 38 % zu den Vertretern der 2S Albuminfamilie auf (Kap. 1.4.4). Dies steht in Einklang mit den allgemeinen Merkmalen der Superfamilie, die sich durch eine limitierte Sequenzidentität auszeichnet (Shewry *et al.* 2002). Das konservierte Cysteinmuster C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-CC-X<sub>n</sub>-CXC-X<sub>n</sub>-C-X-C, welches ebenfalls bei Ara h 2 vorliegt, ist äußerst spezifisch und erlaubt trotz geringer Übereinstimmung der Primärsequenz eine eindeutige Klassifizierung (Kreis *et al.* 1985). Von einem Großteil bisher beschriebener Vertreter sind posttranslationale Modifikationsereignisse beschrieben (D'Hondt *et al.* 1993, Hara-Hishimura *et al.* 1993, Bashir *et al.* 1998, Barciszewski *et al.* 2000, Pastorello *et al.* 2001b). Die als Präproformen exprimierte Proteine werden während der posttranslationalen Reifung in zwei über Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten gespalten (Shewry *et al.* 2002). Es sollte geprüft werden, ob in der Erdnuss ebenfalls heterodimere Ara h 2 Formen im Sinne von alternativ prozessierten Varianten auftreten (Kap. 4.1.2.1). Das bisher beschriebene immunologisch relevante Ara h 2 (Burks *et al.* 1992), welches in der Erdnuss als durchgängige Polypeptidkette auftritt, könnte möglicherweise der Vorläufer für heterodimere Spezies sein. Durch aminoterminaler Sequenzanalyse (Abb. 4.4; Tab. 4.2) verschiedener im reduzierenden SDS-Gel nachweisbarer Peptide einer Molekularmasse kleiner 14 kDa wurden in dieser Arbeit Hinweise auf die Existenz von Ara h 2-, Ara h 3-, Ara h 6- und Ara h 7-Fragmenten gefunden (Abb. 4.5) Von Burks *et al.* (1998) wurden ebenfalls Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 Fragmente einer Größe unter 14 kDa beobachtet, Eigenmann *et al.* (1996) weist auf die Existenz von mit Patientenserum reaktiven 5 kDa Peptiden in Erdnussextrakten hin. Denkbar wäre ein von verschiedenen Entwicklungsstadien abhängiges Auftreten unterschiedlicher Varianten ein und desselben Vorläuferproteins. So wurden beispielsweise in einem Leguminpräproprotein multiple sequenzabhängige vakuoläre „targeting“ Informationen nachgewiesen, die möglicherweise durch alternative Spaltungen des Vorläuferproteins zur Ausprägung kommen können (Saalbach *et al.* 1991).

Ob es sich bei den beobachteten Peptiden tatsächlich um die Untereinheiten von alternativen heterodimeren Formen handelt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Offenbar ist hingegen, dass es sich bei dem aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten klinisch relevanten Ara h 2 um das dominierende Protein in der Erdnuss handelt. Unprozessiertes

Ara h 2 konnte in den verwendeten Erdnussextrakten durch aminoterminaler Sequenzanalyse (Abb. 4.4; Tab. 4.2) eindeutig nachgewiesen werden. Außer in der Erdnuss wurden ebenfalls in der Sonnenblume 2S Albumine, welche nicht aus zwei Untereinheiten, sondern aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, nachgewiesen (Alcocer *et al.* 2002).

Für weitere Untersuchungen wurde Ara h 2 nach einer modifizierten Methode nach Burks *et al.* (1992) mit Ausbeuten bis zu 8 mg Protein/ 100 mg Erdnussrohmaterial aus der Erdnuss gereinigt (Kap. 4.1.1). Um die Authentizität des isolierten Proteins zu gewährleisten, wurde im Gegensatz zu den meisten beschriebenen Verfahren auf eine Entfettungsprozedur im Vorfeld der Proteinextraktion verzichtet.

#### Das Erdnussallergen Ara h 2 ist kein Glykoprotein

Vor allem hinsichtlich struktureller Untersuchungen war es bedeutsam, den Glykosylierungszustand des Proteins zu klären. Kohlenhydratstrukturen sind zwar ein Merkmal vieler Lebensmittelallergene (Burks *et al.* 1998) und repräsentieren häufig kreuzreagierende IgE Epitope (Fötisch *et al.* 1999), stellen jedoch keine kritischen Determinanten für den allergenen Charakter eines Proteins dar (Bredehorst & David 2001; Kap. 1.4.3.3). So beinhaltet beispielsweise die Lipocalinfamilie eine Reihe nicht glykosylierter Allergene (Rouvinen *et al.* 1999). Auch im Fall der eng verwandten Allergene vom 2S Albumintyp wurde für einige Vertreter eine Glykosylierung ausgeschlossen. Dazu gehört beispielsweise das 2S Albumin aus Sesam (*Sesamum indicum*) und Ber e 1, ein schwefelreiches 2S Albumin aus Paranuss (Ampe *et al.* 1986, Pastorello *et al.* 2001b). Aussagen über den Anteil glykosylierter Spezies unter den Allergenen vom 2S Albumintyp können auf Grund der unzureichenden Datenlage nicht getroffen werden. Unter den Erdnussallergenen wurde bislang nur der Glykananteil des zu den Vicilinen der Samenspeicherproteine gehörenden Ara h 1 charakterisiert (Kolarich & Altmann 2000). Mit einer auf MALDI-Massenspektrometrie basierenden Methode wurden fünf verschiedene N-Glykan Spezies identifiziert, unter denen sowohl oligomannosidische als auch xylosylierte, komplexe N-Glykane zu finden sind. Alle weiteren bisher beschriebenen Erdnussallergene mit Ausnahme von Ara h 2 wurden ausschließlich rekombinant dargestellt und nicht aus ihrer natürlichen Quelle gereinigt, was eine Untersuchung des Glykosylierungszustandes ausschließt.

Ara h 2 wurde ursprünglich von Burks *et al.* (1992) als Glykoprotein mit einem 20 %igen Kohlenhydratanteil beschrieben. Der Umstand, dass Ara h 2 in Übereinstimmung mit sämtlichen Literaturdaten im SDS-Polyacrylamidgel als nicht zu trennende Doppelbande mit

identischem Aminoterminus erscheint, wurde ebenfalls bisweilen als Ausdruck sich unterscheidender Glykananteile des Proteins gewertet (Burks *et al.* 1992, de Jong *et al.* 1998, Koppelman *et al.* 2001). Ara h 2 konnte auch in der vorliegenden Arbeit ausschließlich als Gemisch benannter Spezies gewonnen werden, ihre Identität als Glykoproteine konnte jedoch nicht nachvollzogen werden (Kap. 4.1.1; 4.1.2.2). Enzymatische Deglykosylierungsversuche mit N-Glykosidasen (PNGase F, PNGase A) verliefen negativ (Abb. 4.8). PNGase F hydrolysiert sämtliche N-Glykane mit Ausnahme derer, welche  $\alpha$ -1,3-verknüpfte Fucosereste aufweisen. PNGase A hydrolysiert praktisch alle N-glykosidisch verknüpften Zuckerketten (Maley *et al.* 1989, Tretter *et al.* 1991, Plummer & Tarentino 1991). Für O-verknüpfte Oligosaccharide existiert kein universelles Enzym. Die Abspaltung der Zuckerreste mittels Glykosidasen führt zu einer Abnahme der Molekularmasse und sollte dementsprechend in einem unterschiedlichen Laufverhalten enzymatisch behandelter und unbehandelter Ara h 2-Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel deutlich werden. Dies konnte im Fall von Ara h 2 nicht beobachtet werden (Abb. 4.8). Somit konnte die Abwesenheit von N-Glykanen ausgeschlossen werden. Das gereinigte Protein lieferte außerdem weder im 1D  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abb. 4.11A) noch im MALDI Massenspektrum (Abb. 4.7) Hinweise auf vorhandene Kohlenhydratketten. Komplexe Glykane weisen eine Reihe typischer NMR Signale auf. Dazu gehören neben den Peaks der Ringprotonen ( $\delta = 3,5 - 4,0$  ppm), die mit Proteinsignalen überlappen, relativ charakteristische Signale im Bereich zwischen  $\delta = 4,0 - 5,5$  ppm (anomere Protonen, H-2 der Mannosen) und  $\delta = 1,5 - 3,0$  ppm (unter anderem Methylgruppen der Acetylgruppen). Keines dieser Signale sind im 1D  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von aus der Erdnuss gereinigtem Ara h 2 zu beobachten, was insbesondere bei vergleichender Betrachtung von Spektren des natürlichen und rekombinanten Proteins deutlich wird (Abb. 4.25). Schließlich zeigt das gemessene MALDI Massenspektrum (Abb. 4.7) zwar die Existenz zweier Spezies an, deren Molekularmassen decken sich jedoch nahezu mit den aus zwei Datenbanknukleinsäuresequenzen direkt abgeleiteten Molekularmassen (Genbank: L77197; Genbank: L77197). Dabei handelt es sich einerseits um die von Stanley *et al.* (1997) publizierte Sequenz des in der offiziellen Allergenliste geführten Erdnussallergens Ara h 2 und andererseits um eine erst vor kurzem durch die Isolation von cDNA charakterisierte Isoform Ara h 2.02 (Chatel *et al.* 2003). Damit ist die Identität der zweiten im SDS-Gel zu beobachtende Ara h 2 Spezies als besagte Isoform sehr wahrscheinlich. Das Vorliegen von Glykananteilen kann demnach - zumindest bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben - ausgeschlossen werden.

### Ara h 2 ist ein vornehmlich $\alpha$ -helikales Protein

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur des gereinigten Proteins aus der Erdnuss wurden Fern-UV-CD- und NMR-Spektroskopie (Abb. 4.10; Abb. 4.11) angewendet. Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden weisen auf eine stark  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur des Proteins hin. Das Ara h 2 CD Spektrum mit seinen zwei Elliptizitätsminima bei 208 und 222 nm und dem Maximum unterhalb 195 nm ähnelt stark den publizierten Spektren der 2S Albumine Ber e 1, SFA-8 (Alcocer *et al.* 2002) und BnIb (Krzyzaniak *et al.* 1998).

## **5.2 Ein *E. coli* basiertes Protokoll zur rekombinanten Darstellung der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 für strukturelle Untersuchungen**

Die Identität der Allergene Ara h 2 und Ara h 6 als Cystin-haltige Proteine eukaryotischer Herkunft machen sie für strukturelle Untersuchungen, welche hohe Anforderungen an Proteinmenge und Homogenität der Probe stellen sowie vielfach eine Isotopenmarkierung fordern, äußerst schwer handhabbar. Dementsprechend eignet sich der Großteil bisher publizierter Expressions- und Reinigungsstrategien von Proteinen vom 2S Albumintyp nicht für eine NMR basierte Strukturbestimmung. Die bisher in der Literatur beschriebenen Herstellungsverfahren basieren auf Hefe, Insektenzellen und *E. coli* Expressionssystemen (Tab. 5.1) bzw. auf der Extraktion aus der entsprechenden natürlichen Quelle des Proteins. Die Eignung von Pflanzensamen als Rohmaterial für die Gewinnung von 2S Albuminen ist insbesondere auf Grund des bei dieser Proteinklasse zu beobachtenden Polymorphismus stark limitiert. Vielfach besteht zwar die Möglichkeit zur Gewinnung von Proteinmengen im Milligrammbereich, die gereinigten Proben stellen sich jedoch als heterogene Mischung verschiedenster Isoformen dar und sind damit sowohl für funktionelle als auch für strukturelle Fragestellungen nur bedingt geeignet (Polya *et al.* 1993, Rico *et al.* 1996). Diese Problematik stellt sich auch im Fall des Erdnussallergens Ara h 2, welches als Gemisch von 2 Isomeren in Erscheinung tritt (Abb. 4.3), dessen Bestandteile weder über Ionenaustauschchromatographie noch über Umkehrphasenchromatographie separiert werden konnten (Burks *et al.* 1992, de Jong *et al.* 1998; Koppelman *et al.* 2001). Die rekombinante Darstellung, als grundsätzlich effizienter Weg zur Gewinnung großer Proteinmengen, ist durch den hohen Anteil disulfidverbrückter Cysteinreste und den häufig auftretenden posttranslationalen Modifikationen innerhalb dieser Proteinklasse erschwert. Neben Glykosylierungen ist vor allem die posttranslationale proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins wie sie für eine

Vielzahl der 2S Albumine beschrieben wurde, ein entscheidendes Hindernis für die Anwendung bakterieller Expressionssysteme. Dementsprechend steht in neueren Arbeiten die Entwicklung von Hefesystemen zur Expression von 2S Albuminen im Vordergrund. So wurden für ein allergenes Paranuss 2S Albumin (Ber e 1), dem Sonnenblumenalbumin 8 (SFA8) und einem Napin aus Raps (BnIb) effiziente auf *Pichia pastoris* basierende Expressionsstrategien etabliert (Tab. 5.1). Im Vergleich zu leicht handhabbaren bakteriellen Systemen erfordert die Hefeexpression häufig sehr zeitaufwendige Optimierungsschritte während des Klonierungs- als auch Fermentationsprozesses. Ein zusätzliches Problem vor allem im Hinblick auf strukturelle Untersuchungen stellen häufig beschriebene Glykosylierungen von in *Pichia pastoris* produzierten Proteinen dar. Im Hinblick auf NMR basierende Anwendungen sind es vor allem wirtschaftliche Faktoren, die eine Verwendung derartiger Systeme limitieren. Die für größere Proteine unverzichtbare <sup>15</sup>N und <sup>13</sup>C Markierung erfordert die Zuführung von entsprechend markierten Ausgangsverbindungen, die auf Grund längerer Kultivierungszeiten und eines erhöhten Nährstoffbedarfs im Fall der Hefen eine beträchtliche Kostenerhöhung verursachen.

Im Fall der immunologisch relevanten Ara h 2-Form konnten weder Hinweise auf Glykosylierungen, noch auf posttranslationale Modifizierungen gefunden werden (Kap. 4.1.2.1; 4.1.2.2). Daher scheint eine *E. coli* basierte Expression prinzipiell geeignet.

**Tab. 5.1 Zusammenstellung rekombinanter Darstellungsverfahren verschiedener 2S Albumine.**

<i>Rekombinantes 2S Albumin</i>	<i>Fusions-partner</i>	<i>Organismus</i>	<i>Bemerkung</i>	<i>Referenz</i>
Jug r (19 kDa, <i>Juglans regia</i> )	nicht spezifiziert	<i>E. coli</i>	-	Teuber <i>et al.</i> 1998
Sin a 1 ( <i>Sinapis alba</i> )	C-LYTA	<i>E. coli</i>	-	González de la Peña <i>et al.</i> 1993
Sin a 1 ( <i>Sinapis alba</i> )	GST	<i>E. coli</i>	98 % des Proteins akkumulierte in unlöslicher Form	González de la Peña <i>et al.</i> 1996
AT2S3 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Expression von 0,032 % (vom Gesamtprotein) 2S Albumin	Pal & Biswas 1995
Napin ( <i>Brassica napus</i> )	-	Baculoviren	-	Murén & Rask 1996
Napin ( <i>Brassica napus</i> )	-	<i>Pichia pastoris</i>	löslich	Palomares <i>et al.</i> 2002
SFA8 ( <i>Helianthus annuus</i> )	-	<i>Pichia pastoris</i>	löslich	Alcocer <i>et al.</i> 2002
Ber e 1 ( <i>Bertholletia excelsa</i> )	-	<i>Pichia pastoris</i>	löslich	Alcocer <i>et al.</i> 2002
Ara h 2 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	(His) <sub>6</sub>	<i>E. coli</i>	Protein akkumulierte nahezu komplett in unlöslicher Form	Kleber Janke & Becker 2000
Ara h 2 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	-	<i>E. coli</i>	98 % des Proteins akkumulierte in unlöslicher Form	diese Arbeit
Ara h 2 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Trx	<i>E. coli</i> Origami (DE3)	50 % im löslichen Überstand	diese Arbeit
Ara h 6 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	(His) <sub>6</sub>	<i>E. coli</i>	Protein akkumulierte in unlöslicher Form	Kleber Janke & Becker 2000
Ara h 6 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Trx	<i>E. coli</i> Origami (DE3)	50 % im löslichen Überstand	diese Arbeit

<sup>1</sup>Im Unterschied zu speziellen Stämmen wie Origami(DE3) wurden herkömmliche *E. coli* Stämme nicht spezifiziert.

Bisherige Versuche einer *E. coli* basierten Expression von 2S Albuminen waren von geringem Erfolg (Tab. 5.1). Das Vorläuferpolypeptide des Allergens Sin a 1 aus Senf (*Sinapis alba*) wurde in Form unterschiedlicher Fusionsproteine in *E. coli DH5α* exprimiert. Das rekombinant exprimierte Protein zeigte jedoch eine starke Aggregationstendenz, nur 2 % des gesamten Fusionsproteins konnte selbst nach Anwendung denaturierender Agenzien in löslicher Form erhalten werden (González de la Peña *et al.* 1993, González de la Peña *et al.* 1996). Ähnliche Befunde wurden mit Ole e 1 einem Pollenallergen des Olivenbaumes erhalten. Nach *E. coli* Expression lag ein Großteil des Protein in Form höherer Aggregaten vor, nur 1% des gewonnen Proteins zeigt immunologische Aktivität (Villalba *et al.* 1994). Derartige Phänomene sind für eukaryotische und insbesondere disulfidverbrückte Proteine keine Seltenheit (Marston 1986, Le & Trotta 1991). Es ist naheliegend, dass Oligomerisierung

und Akkumulation auf Grund einer ungeordneter Ausbildung unterschiedlicher inter- und intramolekularer Disulfidisomere eine Folge des Verlustes der reduzierenden Umgebung des Cytoplasmas während des Zellaufschlusses ist.

### Reduktionsdefiziente *E. coli* Stämme und die Koexpression unterrepräsentierter tRNAs führen zu heterologem löslichen Ara h 2 und Ara h 6

Mittlerweile existieren zwei unterschiedliche Strategien um die Ausbildung von Disulfidbindung in *E. coli* bereits *in vivo* zu ermöglichen. Dazu zählt einerseits der periplasmatische Export, wobei es entweder während der Translokation der Polypeptidkette durch die Membran oder aber im Periplasma selbst zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbindungen kommt und andererseits die Anwendung modifizierter *E. coli* Stämme, welche ein oxidatives Cytoplasma aufweisen und die Cystinbildung fördern (Derman *et al.* 1993, Prinz *et al.* 1997).

Mit der erstgenannten Strategie konnten in Rahmen dieser Arbeit im Fall von Ara h 2 keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielt werden.

Um das Potenzial letztgenannter Strategie für eine effiziente Expression von authentisch gefalteten Erdnuss 2S Albuminen zu prüfen, wurden am Beispiel von Ara h 2 zwei *E. coli* Stämme mit erhöhtem Oxidationspotential einem konventionellen Stamm gegenüber gestellt (Tab. 4.3; Abb. 4.17). Um einer bereits beschriebenen Ineffizienz der Expression auf Grund der großen Anzahl von in *E. coli* selten verwendeten Codons innerhalb der Ara h 2 Nukleotidsequenz wirksam zu begegnen, wurden allen verwendeten Stämmen die in *E. coli* unterrepräsentierten tRNAs koexprimiert (Kleber-Janke & Becker 2000). Sowohl Expressionsraten als auch Aufschlusseffektivitäten zeigten eine starke Abhängigkeit vom verwendeten *E. coli* Stamm und Fusionspartner des Zielproteins (Abb. 4.17; Tab. 4.4). Wie bereits von Kleber-Janke & Becker (2002) gezeigt, resultiert die Koexpression zusätzlicher *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA in einer effizienten Expression von Ara h 2. Das Protein zeigt jedoch übereinstimmend mit anderen in *E. coli* exprimierten 2S Albuminen eine sehr starke Aggregationstendenz und konnte bei Anwendung nicht denaturierender Verfahren zu maximal 5 % in löslicher Form gewonnen werden. Die Expression von Ara h 2 in Stämmen mit defekten Reduktionssystemen lieferte hingegen unter der Voraussetzung der Anwendung eines Thioredoxinfusionspartners Ausbeuten von mindestens 50 % an löslichem Protein (Tab. 4.4). Dabei scheint Thioredoxin als Fusionspartner von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies steht im Einklang mit einer möglichen Funktion von Thioredoxin als Katalysator der Disulfidverbrückung in Stämmen mit defekter Reduktionsmaschinerie (Stewart *et al.* 1998).

Der Einsatz reduktionsdefizienter *E. coli* Stämme in dieser Arbeit ermöglichte eine signifikante Steigerung der Ausbeuten an löslichem Ara h 2. Das Protein konnte daher bei Verzicht jeglicher denaturierender und vor allem reduzierender Schritte aus *E. coli* Zellen extrahiert und gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte über zwei Co<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographieschritte (Kap. 4.2.2). Der Fusionspartner Thioredoxin und der aminoternale Hexahistidinanhang konnten durch eine PreScission-Proteasespaltung effektiv und ohne unspezifische Nebenreaktionen von Ara h 2 entfernt werden. Bei der Präparation von markiertem Protein war teilweise die Anwendung eines terminalen Umkehrphasenchromatographieschrittes erforderlich. Die authentische Faltung derartig präparierter Proteine wurde durch den NMR-spektroskopischen Vergleich mit Proben, welche ohne Umkehrphasenschritt hergestellt wurden, verifiziert. Mit Ausbeuten bis zu 13 mg Protein / l Kulturmedium kann das etablierte Expressions- und Reinigungsprotokoll als für NMR spektroskopische Untersuchungen geeignet eingeschätzt werden (Kap. 4.2.2.3).

Sämtliche für Ara h 2 optimierten Expressions- und Reinigungsschritte wurden erfolgreich auf die rekombinante Darstellung des homologen Ara h 6 übertragen (Kap. 4.5). Rekombinantes Ara h 6 konnte in Ausbeuten bis zu 10 mg/l Kultur rein gewonnen werden.

#### Die etablierte Expressions- und Reinigungsstrategie für Ara h 2 führt zu einem rekombinanten Protein mit Eigenschaften des homologen Proteins aus Erdnussextrakt

Selbst im Fall einer vollständig nativen Präparation kann *a priori* nicht auf die strukturelle und funktionelle Identität des rekombinanten und natürlichen Proteins geschlossen werden. Insbesondere bei in *E. coli* produzierten eukaryotischen und hochgradig disulfidverbrückten Proteinen erscheint der Nachweis der strukturellen und funktionellen Identität von rekombinanten und natürlichem Protein von entscheidender Bedeutung. Die Integrität der Faltung des rekombinanten Proteins konnte durch CD und NMR Spektroskopie nachgewiesen werden. Die Spektren beider Verfahren zeigen für die natürliche und rekombinante Form einen hohen Grad an Übereinstimmung auf Sekundärstrukturebene und die Existenz der zu hohem Feld verschobenen Methylgruppenresonanzen lassen auf vorhandene Tertiärstruktur in beiden Formen schließen (Abb. 4.24; Abb. 4.25). Auf eine Identität des Disulfidmusters konnte auf Grund des identischen Retentionsverhaltens beider Formen während analytischer Umkehrphasenchromatographien geschlossen werden (Abb. 4.26). Westernblotanalysen mit Patientensera bestätigten zusätzlich die immunologische Identität beider Proteinformen (Abb. 4.23)

### 5.3 Molekulare Stabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6

Auch wenn bisher kein allgemein gültiges Merkmal als Voraussetzung für die Allergenizität eines Proteins identifiziert werden konnte, ist Stabilität gegenüber den unterschiedlichsten Verarbeitungsprozeduren von Lebensmitteln und gegenüber proteolytischen Vorgängen im Verdauungstrakt ein wichtiges Kriterium für das allergene Potenzial eines Proteins (Aalberse 2000). Die Eigenschaft Stabilität wird daher auch genutzt, um ein mögliches allergenes Risiko bei der Einführung neuartiger Proteine in Nutzpflanzen abzuschätzen (Astwood *et al.* 1996). Grundvoraussetzung ist dabei die Annahme, dass das Erreichen der intestinalen Mucosa von größeren Proteinfragmenten eine notwendige Bedingung für die Entfaltung von Allergenizität eines Lebensmittelallergens darstellt. Für ein unter proteolytischen und sauren Bedingungen stabiles Protein besteht dementsprechend eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt mit der intestinalen Mucosa und damit für die Absorption des Proteins.

Für eine Anzahl von Lebensmittelallergenen wurden Stabilitätstests in einer die gastrointestinalen Bedingungen simulierenden Umgebung (*simulated gastric fluid* (SGF)) durchgeführt (Astwood *et al.* 1996). Außerdem existieren für verschiedene Lebensmittel Studien zur Abhängigkeit allergener Eigenschaften von Prozessierungsparametern wie trockenem Erhitzen, Rösten oder Sieden (Besler *et al.* 2001). All diese Studien erlauben die Demonstration der Eigenschaft Stabilität häufig im Sinne der Erhaltung des allergenen Charakters eines Lebensmittels gegenüber verschiedenster Parameter, sie liefern jedoch keine Erklärung über molekulare Ursachen derartiger Phänomene. Ebenso unbekannt sind häufig die biophysikalischen und insbesondere strukturellen Merkmale der behandelten Proteine und damit der für die Immunantwort letztlich relevanten Spezies.

In dieser Arbeit wurden Aspekte zur Stabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 unter besonderer Berücksichtigung struktureller Eigenschaften untersucht (Kap. 4.6). Voraussetzung war dabei die Verfügbarkeit der Proteine in größeren Mengen, gereinigter Form und authentischer Faltung. Dies konnte durch das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur heterologen Darstellung dieser Allergene gewährleistet werden (Kap. 4.2; 4.3; 4.6; 5.2).

#### Im oxidierten Zustand zeigen Ara h 2 und Ara h 6 eine hohe Thermostabilität

Aus den mittels CD-Spektroskopie ermittelten Daten resultiert eine ausgeprägte und disulfidabhängige Thermostabilität der Proteine Ara h 2 (Abb. 4.33) und Ara h 6 (Abb. 4.34). In einem Bereich von 20 bis 100 °C konnte bei Proben mit intakter Disulfidverbrückung kein kooperativer Übergang beobachtet werden, der auf eine mögliche Entfaltung hindeutet. Die

Proteine zeigen selbst bei 90 °C ein kaum verändertes typisch  $\alpha$ -helikales CD Spektrum mit Elliptizitätsminima bei 208 und 222 nm. Die beobachtete thermische Stabilität zeigt eine enge Korrelation mit dem Oxidationszustand der vorhandenen Cysteinreste und wird durch Reduktion der Disulfidbrücken stark vermindert. Sowohl Ara h 2 als auch Ara h 6 weisen im reduzierten Zustand eine Mittelpunktstemperatur  $T_m$  des thermischen Übergangs von ca. 62° C auf. Die bei 90 °C und nach Abkühlen der Proben gemessenen CD Spektren sind deckungsgleich und weisen die typischen Merkmale eines Proteins ohne reguläre Sekundärstruktur auf. Somit erfolgt während des Schmelzvorganges ein irreversibler Verlust der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur. Disulfidbrücken gelten allgemein als ein die native Proteinstruktur stabilisierender Faktor (Matsumura & Matthews 1989).

Der Einfluss von hohen Temperaturen auf Erdnussproteine wurde bisher einzig an Hand von IgE Bindungsaktivitäten in Abhängigkeit verschiedener Verarbeitungsparameter untersucht. Nordlee *et al.* (1981) konnte keine Unterschiede der IgE Bindungsaktivität in gerösteten Erdnüssen im Vergleich zu unbehandelten Proben finden. Ähnliche Ergebnisse erzielte Koppelman *et al.* (1999) durch ELISA Inhibitionstests mit aus hitzebehandelten Erdnüssen isoliertem Ara h 1. Burks *et al.* (1992) untersuchte die IgE Reaktivität von aus gerösteten Erdnüssen gewonnenen Extrakten und gereinigtem Ara h 1 und Ara h 2 nach einer 60 minütigen Kochprozedur. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede in der IgE-Bindung durch RAST Inhibitionsexperimente nachgewiesen. Diese Beobachtungen allein erlaubten im Fall der Erdnussallergene jedoch keine Ableitung auf eine thermischen Stabilität der Proteinstruktur. Beide Allergene weisen zahlreiche über die Primärsequenz verteilte lineare Epitope auf, deren IgE Bindung völlig unabhängig von der strukturellen Authentizität des Gesamtproteins verläuft und demnach auch nach einer partiellen Zerstörung des Proteins nachweisbar ist. Die gewonnenen CD spektroskopischen Daten belegen nun für Ara h 2 und Ara h 6, welches bisher nicht untersucht wurde, eine tatsächliche thermische Stabilität der Proteinstruktur bis mindestens 100 °C. Es ist daher wahrscheinlich, dass wenigstens zwei Erdnussallergene möglicherweise gemeinsam mit dem signifikant homologen 2S Albumin Ara h 7 verschiedene Verarbeitungsprozesse wie Kochen, Backen oder Dämpfen strukturell unbeschadet überstehen.

### Ara h 2 und Ara h 6 sind resistent gegenüber proteolytischem Verdau

Die Stabilität gegenüber Proteasen wurde exemplarisch an Hand der Enzyme Trypsin und Chymotrypsin demonstriert (Kap. 4.6.2; Abb. 4.35). Ara h 2 und Ara h 6 weisen insgesamt 42 bzw. 36 relativ gleichmäßig über die Aminosäuresequenz verteilte potentielle Trypsin- und Chymotrypsinspaltstellen auf. Für beide Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen stabile Fragmente bei einer maximalen Inkubationszeit von 12 h nachgewiesen (Abb. 4.35). Durch vergleichende Untersuchungen von unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführten Elektrophoresen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den proteaseresistenten Spezies um heterodimere Proteine handelt, welche aus je zwei disulfidverbrückten Untereinheiten aufgebaut sind. Die heterodimeren protease-resistenten Proteine zeigten Reaktivität mit drei verschiedenen Patientenseren und sind dementsprechend immunologisch aktiv (Abb. 4.40). Die Untereinheiten weisen für beide Proteine einer Molekularmasse von ca. 10 bzw. ca. 4 kDa auf. Ara h 2 und Ara h 6 besitzen in ihrer unbehandelten rekombinanten Form Molekularmassen von 16791 bzw. 14960 Da. Die Ara h 2 Struktur weist dementsprechend einen wesentlich größeren proteaselabilen Anteil als Ara h 6 auf. Die Aminotermini beider Untereinheiten konnten durch Sequenzanalyse ermittelt werden, die Größe der Untereinheiten konnte grob an Hand ihrer Masse abgeschätzt werden (Abb. 4.36; Abb. 4.37). Ein Sequenzvergleich beider Proteine, welche eine Identität von 56 % aufweisen, zeigt, dass die proteaselabilen Bereiche in sich entsprechenden Sequenzabschnitten anzutreffen sind (Abb. 5.1). Das sind zum einen die N-Termini beider Proteine und ein Bereich, welcher 8 bis 10 Reste aminoterminal des für 2S Albumine hochkonservierten CC-Motivs gelegen ist. In diesem Abschnitt befindet sich eine ausschließlich in Ara h 2 vorkommende 14 Reste (PYSPSQDPYSPSPY) umfassende Insertion. Dieser Bereich wird in Ara h 2 mit hoher Wahrscheinlichkeit proteolytisch entfernt, wie eine Angleichung der Molekularmassen der prozessierten heterodimeren Proteine bei unterschiedlichen Massen der Ausgangsproteine zeigt.

Die entscheidende Bedeutung einer intakten Disulfidverbrückung wurde für Ara h 2 von Sen *et al.* (2002) für die proteolytische Stabilität und letztlich in dieser Arbeit im Hinblick auf thermische Stabilität von Ara h 2 und Ara h 6 beschrieben.

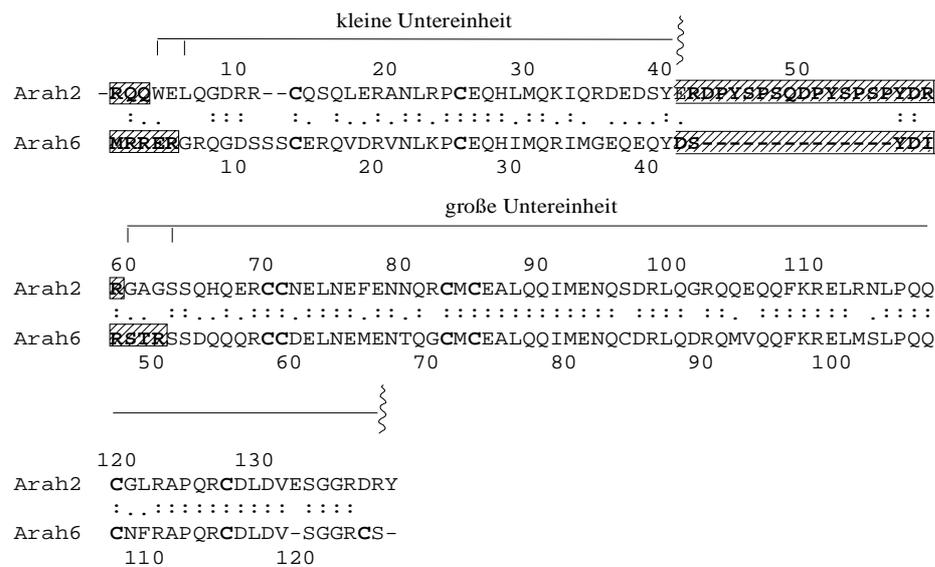


Abb. 5.1: **Lokalisation der proteaselabilen Bereiche innerhalb der Ara h 2- und Ara h 6-Primärstrukturen.**

Proteaselabile Sequenzbereiche sind durch schraffierte Kästchen gekennzeichnet. Die Aminotermini der entstehenden Untereinheiten wurden durch Proteinsequenzierung identifiziert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm T-COFFE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) erstellt.

Die Nahrung und mit ihr auch vorhandene allergene Proteine sind neben den pankreatischen Enzymen zusätzlich der im stark sauren Bereich aktiven Endopeptidase Pepsin ausgesetzt. Pepsinverdautests waren nicht Gegenstand dieser Arbeit, wurden jedoch für Ara h 2 von Sen *et al.* (2002) in Kombination mit Chymotrypsin und Trypsin, wenn auch ohne Charakterisierung der Endprodukte beschrieben. Der zusätzliche Pepsinverdau führte zu keinem weiteren Abbau des Proteins. Von Astwood *et al.* (1996) wurde die Stabilität von aus der Erdnuss gewonnenem Ara h 2 gegenüber Pepsin mit einem SGF System (*simulated gastric fluid*) gezeigt.

Wie bereits erwähnt, scheint die Stabilität der untersuchten Erdnussallergene mit einer intakten Disulfidverbrückung der Proteine zu korrelieren. Vergleichende NMR spektroskopische Untersuchungen dieser Arbeit mit prozessierten und unbehandelten Proteinen zeigen, dass die Proteine einen durch vier bzw. fünf Cystinbindungen stabilisierten hochstrukturierten Kernbereich, welcher einer proteolytischen Hydrolyse nicht zugänglich ist, besitzen (Abb. 4.41; 4.42).

Vor allem  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren der unbehandelten Proteine weisen bei Ara h 6 (Abb. 4.42) einen kleinen und bei Ara h 2 (Abb. 4.41) einen höheren Anteil von Signalen im „*random coil*“ Bereich auf, als auf Grund der Proteingröße erwartet. Dies weist auf das Vorliegen von heterogenen Konformationen in einem internen Proteinabschnitt ohne reguläre

Sekundärstruktur hin. Diese konformationelle Heterogenität wird durch chymotryptische und tryptische Hydrolyse entscheidend reduziert. Die globale Faltung des hochstrukturierten, disulfidverbrückten Kernbereichs der Proteine erfährt, wie aus Vergleich der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren der unbehandelten und prozessierten Formen abzuleiten ist, durch Proteolyse keine signifikanten Änderungen (Abb. 4.41; 4.42).

## **5.4 Die dreidimensionale Struktur eines Erdnussallergens vom 2S Albumintyp**

Bei einer Gesamtzahl von mehreren Hundert als Allergene beschriebenen Proteinen sind von nicht mehr als 20 Vertretern molekulare Details zur dreidimensionalen Struktur bekannt (Kap. 1.6.2). Die enge Abhängigkeit allergischer Mechanismen von der dreidimensionalen Struktur eines allergenen Proteins wie sie bei der Bindung eines Allergens an auf Mastzellen exprimierten IgE-Antikörpern oder im Fall der IgE-Bindung von konformationellen B-Zell-Epitopen gegeben ist, macht die Bedeutung der Kenntnis einer möglichst großen Bandbreite von Allergenstrukturen deutlich. Die Familie der 2S Albumine beinhaltet eine große Zahl sehr potenter Allergene (Pastorello *et al.* 2001a). Dennoch liegen wenig strukturelle Daten für Vertreter dieser Familie vor. Die Bestimmung einer hochaufgelösten NMR-Struktur eines Vertreters dieser Familie kann als Grundlage für theoretische Vorhersagen der Strukturen weiterer Vertreter dieser ubiquitär in Pflanzen vorkommenden Familie dienen. Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines geeigneten allergenen Vertreters der 2S Albumine aus Erdnuss. Bislang steht keine hochaufgelöste Struktur eines Vertreters dieser Proteinfamilie zur Verfügung. Von einem 2S Albumin aus Raps konnte nur die globale Faltung mit NMR spektroskopischen Methoden ermittelt werden (Rico *et al.* 1996). Die Strukturbestimmung war dabei insbesondere durch die Isoformenzusammensetzung der aus der Pflanze extrahierten Probe als auch durch den Verzicht auf Isotopenmarkierung erschwert.

### **5.4.1 Die Eignung von Ara h 2, Ara h 6 und ihrer prozessierten Varianten für die NMR basierten Strukturaufklärung**

Anhand von 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren (Abb. 4.41; 4.42) von Ara h 2, prAra h 2, Ara h 6 und prAra h 6 sollte geklärt werden, inwieweit sich die entsprechenden Proteine prinzipiell für eine Strukturbestimmung mittels NMR eignen. Zu den Kriterien für ein qualitativ hochwertiges Spektrum zählt in erster Instanz ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis,

welches besonders für die für eine spätere Strukturbestimmung notwendigen weniger sensitiven NMR-Experimente von außerordentlicher Bedeutung ist. Des Weiteren ist eine Einheitlichkeit der dem Molekulargewicht entsprechenden Linienbreiten der Resonanzen gefordert. Schließlich ist eine hinreichend gute spektrale Dispersion der Resonanzen eine wichtige Voraussetzung für die Strukturbestimmung des Proteins. Eine schlechte Dispersion erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Überlappung von Signalen.

Die Spektren des unbehandelten Erdnussallergens Ara h 2 waren unabhängig von den verwendeten Präparations- und Expressionsverfahren von erheblichen Unzulänglichkeiten geprägt. Besonders auffällig war die Anhäufung von breiten nicht aufgelösten Signalen in der Mitte des Spektrums (Abb. 4.28; 4.41). Derartige Merkmale werden allgemein entweder auf die Aggregation des Proteins oder auf das Vorliegen von konformationeller Heterogenität auf der Milli- bis Mikrosekundenzeitskala zurückgeführt (Rehm *et al.* 2002). Die Qualität des Spektrums verbesserte sich nach proteolytischem Verdau des Proteins erheblich (Abb. 4.41). Dieser Befund spricht für das Vorliegen heterogener Konformere innerhalb unstrukturierter Regionen im unbehandelten Protein. Diese können durch eine interne Spaltung des Proteinerückgrates stark reduziert werden. Wie aus der Erhaltung der Resonanzen außerhalb des *random coil* Bereiches abzuleiten ist, sind die globalen Faltungen beider Formen sehr ähnlich (Abb. 4.41).

Ähnliche Eigenschaften zeigen die Spektren von unbehandeltem und verdaulichem Ara h 6. Ara h 2 und Ara h 6 unterscheiden sich jedoch stark in der Ausprägung des proteaselabilen Bereiches, der im Fall von Ara h 2 durch Sekundärstrukturvorhersagen und bei Ara h 6 durch experimentelle Befunde als unstrukturiert klassifiziert wurde. Dieser ist im Fall von Ara h 2 annähernd um einen Faktor 2 länger und stellt bei beiden Proteinen Hauptangriffspunkt des proteolytischen Verdau dar. Auch im Fall von Ara h 6 ist eine Verbesserung der Spektrenqualität nach tryptischer und chymotryptischer Behandlung zu konstatieren. (Abb. 4.42). Hier zeichnet sich jedoch bereits das  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der unverdaulichen Form durch einen im Vergleich zu Ara h 2 geringen Anteil an konformationellen Heterogenitäten aus. Die konformationelle Heterogenität konnte nach proteolytischer Spaltung der Polypeptidkette weiter reduziert werden.

Entsprechend dieser Beobachtungen wurde für die Strukturaufklärung eines 2S Albumins aus Erdnuss eine  $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$  markierte Probe von tryptisch und chymotryptisch behandeltem Ara h 6 (prAra h 6) verwendet. Die Probe zeichnete sich durch eine Homogenität bezüglich der Konformation, einer sehr guten Löslichkeit, einer der Größe des Proteins entsprechenden einheitlichen Linienform und einer für  $\alpha$ -helikale Proteine guten Dispersion aus. Das

prozessierte immunologisch reaktive Protein (Abb. 4.40) stellt auf Grund seine Identität als Lebensmittelallergen letztlich die immunologisch relevante Form dar. Durch die Behandlung mit den beiden Proteasen Trypsin und Chymotrypsin wurden die bei der Aufnahme des Allergens im Körper stattfindenden Verdauungsvorgänge simuliert. Somit scheint die Strukturiertheit des Proteins eine für die Allergenizität wichtige Determinante darzustellen.

#### 5.4.2 Die Struktur von prAra h 6

Von sämtlichen Vertretern der 2S Albuminfamilie, welche als Speicherproteine in Pflanzensamen weit verbreitet sind, stand bislang nur eine einzige dreidimensionale Struktur zur Verfügung. Es handelt sich dabei um BnIb, ein Napin aus Rapssamen (Rico *et al.* 1996). Für NMR spektroskopische Experimente kam eine aus der natürlichen Quelle extrahierte Probe zum Einsatz, welche sich durch Inhomogenitäten auf Grund eines Anteils von Isoformen oder Varianten des Proteins auszeichnete. Die Auswertung der homonuklearen Spektren war daher mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. So konnte insgesamt nur ein über 10 Strukturen ermittelter RMSD der schweren Atome des Proteinrückgrates der Bereiche mit regulärer Sekundärstruktur von 2,4 Å erzielt werden, woraus letztlich nur die globale Faltung des Proteins abzuleiten war. Im Fall von Ara h 6 konnten mit einer <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-markierten Probe 384 langreichweitige, mittelreichweitige und sequentielle NOE-Kreuzresonanzen aufgefunden werden (Kap. 4.7.4; Tab. 4.5; Anhang 10.3). Die berechneten 20 besten Strukturen wiesen einen paarweise RMSD der schweren Atome des Proteinrückgrates unter Ausschluss der Schleifenbereiche von 1,1 Å auf. Die Struktur stellt damit eine wesentliche Verbesserung zur Napinstruktur dar und kann als Vertreter der großen Gruppe der 2S Albumine eine zuverlässige Basis komparativer Modellierungen bilden. So konnte für das um 22 Aminosäurereste größere Ara h 2, welches generell eine wesentlich schlechtere Qualität der NMR Spektren aufwies und möglicherweise einer experimentellen Strukturbestimmung nicht zugänglich ist, ein Strukturmodell erstellt werden (Abb. 4.57). Die resultierenden Strukturen bestehen aus einer Anordnung von fünf  $\alpha$ -Helices, die eine rechtsgängige Superhelix ausbilden (Abb. 4.56; 4.57).

## 5.5 Epitope - konformationell oder linear?

Mit dem Vorliegen einer zuverlässigen dreidimensionalen Struktur von Ara h 6 und einem Homologie basierten Modell des sehr ähnlichen Ara h 2 (Kap. 4.8) ist es nun möglich, Aussagen zur Lokalisation und Struktur der bekannten IgE Epitope zu treffen (Abb. 5.2).

Ara h 2 als sehr potentes Hauptallergen war bisher Gegenstand zahlreicher immunologischer Studien. Von Stanley *et al.* wurden drei verschiedenen lineare Hauptepitope (Aminosäurepositionen: 9-18, 39-48, 47-55) mittels überlappender synthetischer Peptide identifiziert (Stanley *et al.* 1997). Wie die Einfärbung der betreffenden Reste in dem Strukturmodell von Ara h 2 (Abb. 5.2) zeigt, sind diese Reste an der Oberfläche lokalisiert und erstrecken sich hauptsächlich über zwei hochflexible Bereiche. Dies ist zum einen ein aminoterminaler Abschnitt, der teilweise die erste sehr kurze Helix einbezieht und zum anderen ein Großteil der sich über mehr als 30 Reste erstreckenden Schleife zwischen den Helices II und III. Der durch eine Anordnung von fünf  $\alpha$ -Helices kompakte und disulfidverbrückte Bereich enthält auf seiner Oberfläche nahezu keine Anteile linearer Epitope. Detaillierte Untersuchungen zur Epitopstruktur weiterer allergener 2S Albumine sind kaum beschrieben. Einzig von Jug r 1, einem Allergen aus Walnuss, wurde ein IgE bindendes lineares Epitop identifiziert (Robotham *et al.* 2002). Dieses befindet sich ebenfalls innerhalb eines Schleifenelementes, allerdings zwischen den Helices III und IV. Von den Autoren wird ein zusätzliches Auftreten konformationeller Epitope vermutet.

Überraschenderweise korrespondieren zwei der drei Epitop-haltigen Sequenzabschnitte mit den äußerst proteaselabilen Strukturabschnitten. Entsprechend der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse (Abb. 5.1; 5.2) werden die Epitope 2 und 3, welche in der die Helices II und III verbindenden Schleife lokalisiert sind, weitestgehend durch tryptischen und chymotryptischen Verdau entfernt. Beide Epitope beinhalten das hexamere Peptid DPSPSP, welches als ein wesentliches Motiv für die IgE Bindung gilt. Eine vor kurzen durch Klonierung komplementärer DNA charakterisierte Ara h 2 Isoform (Ara h 2.02) weist eine zusätzliche Insertion (12 Aminosäuren) innerhalb der bereits sehr großen Schleife auf und enthält ein drittes DPSPSP Motiv. (Chatel *et al.* 2003). Das Fehlen von Sekundärstruktur als auch die daraus abzuleitende Flexibilität dieses Schleifenelements (Kap. 4.7.5) bietet kaum Schutz vor proteolytischen Abbau.

Bei Ara h 6 konnten bisher keine IgE bindenden Epitope mit linearen Peptidbibliotheken identifiziert werden (W.-M. Becker, persönliche Mitteilung). Wenn eine Identifizierung von IgE reaktiven Allergenfragmenten negativ verläuft, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das

Allergen konformationelle Epitope aufweist oder dass authentisch gefaltete Peptide Voraussetzung für IgE Antikörper-Bindung darstellen (Schneider *et al.* 1994, Zeiler *et al.* 1997). Im ersten Fall resultiert aus der Fragmentierung eine Dissoziation der Epitopuntereinheiten, während im zweiten Fall die Zerstörung der Faltung des Epitops die Ursache für das Fehlen der IgE Bindung darstellt. Beides wäre im Fall von Ara h 6 denkbar. Auffällig ist, dass die in Ara h 2 als Epitope 2 und 3 identifizierten Sequenzabschnitte einschließlich des DPSPSP Motivs im homologen Ara h 6 nicht anzutreffen sind. Die Aminosäurezusammensetzung der betreffenden Schleife ist völlig divergent, außerdem ist ihre Größe in Ara h 6 um ca. die Hälfte reduziert.

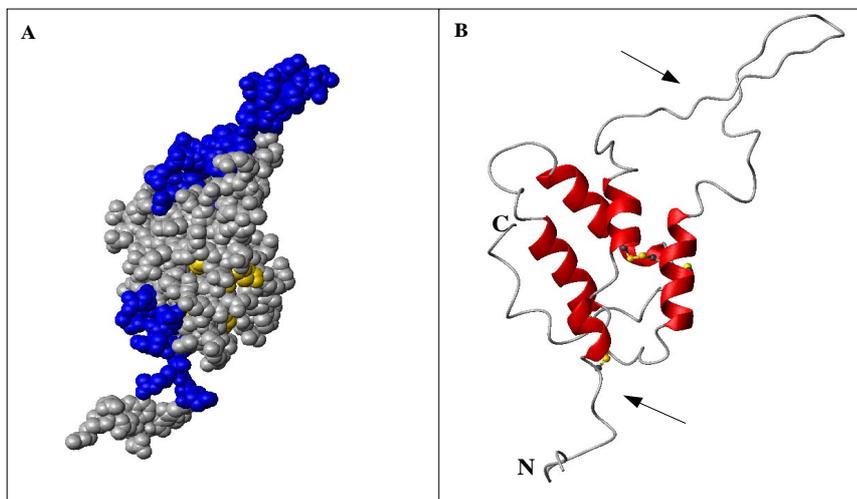


Abb. 5.2: Lokalisation der Hauptepitope im Strukturmodell von Ara h 2.

(A) Raumerfüllende Darstellung von Ara h 2. Die drei Hauptepitope sind blau dargestellt, Schwefelatome der Disulfidbrücken gelb.

(B) Schematische Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente. Die Schwefelatome der Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol erstellt.

Die Erdnussallergie nimmt auf Grund der Stärke der ausgelösten Symptome eine Sonderstellung innerhalb der Lebensmittelallergien ein. Die Intensität einer durch ein Allergen ausgelösten physiologischen Reaktion kann weder durch IgE Bindungstests mit Peptidfragmenten noch mit kompletten Allergenmolekülen analysiert werden, sondern erfordert Histaminfreisetzungsversuche mit Mastzellen oder Basophilen. Derartige Studien zeigten, dass die Konzentration an ausgeschütteten Mediatoren als auch die Initiation der Mastzelldegranulation stark mit der Multivalenz eines Liganden korreliert ist (Marone *et al.* 1981). Ein durchschnittliches Allergen von etwa 20 kDa kann, wie aus kristallographischen Daten abgeleitet, bis zu 10 Immunglobulinmoleküle binden (Padlan 1996). Daraus ist leicht zu folgern, dass Peptide, selbst wenn eine bivalente Interaktion möglich ist, was

Voraussetzung für eine Mastzellausschüttung darstellt, im Vergleich zu intakten Allergenen außerordentlich ineffektiv wirken. Ein vor Verdauungsenzymen geschützter kompakt gefalteter Kernbereich, wie er in dieser Arbeit für Ara h 2 und Ara h 6 nachgewiesen wurde, wäre ein hervorragender multivalenter Ligand unter der Voraussetzung der Existenz konformationeller Epitope. Die instabilen linearen Epitope sind sehr schlechte Kandidaten für eine effiziente Mediatorausschüttung, die letztlich im Fall der Erdnussallergie zu systemischen und lebensbedrohlichen Reaktionen führen kann. Möglicherweise existieren in Ara h 2 neben den bekannten linearen, zusätzliche konformationelle Epitope, während Ara h 6 ausschließlich letztgenannte aufweist. Hinweise auf die Existenz von konformationellen Epitopen wurden ebenfalls bei einem verwandten 2S Albumin Jug r 1 beobachtet (Robotham *et al.* 2002). Der Nachweis konformationeller Epitope wäre durch verschiedene Ansätze denkbar. Einerseits werden Inhibitionstests der proteolysierten Allergene mit natürlichen Proteinen Aufschluss auf noch vorhandenen IgE Reaktivität geben, andererseits sollen Untersuchungen mit denaturierten und nativen Proteinen weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der intakten Faltung liefern. Für letzteres ist vor allem Ara h 6 geeignet. Das zusätzliche Auftreten von linearen Epitopen, wie im Fall von Ara h 2, erschwert den Nachweis von konformationellen Epitopen. Letztlich können erst Histaminfreisetzungstests mit Mastzellen die Reaktionen *in vivo* adäquat beschreiben.

## 5.6 Ara h 6 im Vergleich mit verwandten Proteinstrukturen

Ara h 6 stellt neben BnIb aus Raps das zweite Beispiel einer dreidimensionalen Struktur aus der Familie der 2S Albumine dar (Rico *et al.* 1996). BnIb ist nach der SCOP Datenbank in die Klasse der „all alpha“ Proteine einzuordnen, welcher als strukturnächste Verwandte die Superfamilien der bifunktionellen Inhibitoren und nichtspezifischen Lipidtransferproteine (ns-LTPs) angehören (Murzin *et al.* 1995). Von folgenden Vertretern der beiden letztgenannten Superfamilien stehen dreidimensionale Strukturen zur Verfügung: RBI (Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitor aus Indischer Fingerhirse; Gourinath *et al.* 1999, 2000),  $\alpha$ -Amylase Inhibitor aus Weizen (Oda *et al.* 1997), HPS (hydrophobes Protein aus Sojabohne; Baud *et al.* 1993), ns-LTP (nichtspezifisches LTP) aus Weizen (Gincel *et al.* 1994), Mais (Shin *et al.* 1995, Gomar *et al.* 1996), Gerste (Heinemann *et al.* 1996), Reis (Lee *et al.* 1998, Samuel *et al.* 2002) und Zwiebel (Tassin *et al.* 1998). Die Sequenzidentität unter den Vertretern der 2S Albumine einerseits und zu LTPs oder den Proteinase/ $\alpha$ -Amylase Inhibitoren andererseits ist außerordentlich gering. Sie liegt im ersten Fall im Bereich von ca. 20 % und übersteigt bei

letztgenannten selten einen Wert von 17 %. Die auffälligste Gemeinsamkeit unter diesen Proteinen ist das gemeinsame Muster der 8 Cysteine (...C...C.../.CC...CXC...C...C) und die übereinstimmende Organisation ihrer Disulfidbrücken (Abb. 5.3). In Einzelfällen variiert die Anzahl der Cysteine (zehn oder sechs), das Cysteinmuster und insbesondere die äußerst spezifischen Motive CC...CXC bleiben jedoch erhalten. HPS (hydrophobes Protein aus Sojabohne) und ns-LTPs bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und weisen Molekularmassen zwischen 9 und 10 kDa auf (Pastorello *et al.* 2001a). 2S Albumine sind hingegen in ihrer Größe divergenter, jedoch meist wesentlich größer (14 bis 20 kDa) als LTPs und bestehen bis auf wenige Ausnahmen (Pandya *et al.* 2000) aus zwei Polypeptidketten auf Grund posttranslationaler Modifizierung. Im folgenden soll die Ara h 6 NMR Struktur zunächst mit dem 2S Albumin BnIb und anschließend mit Vertretern der Superfamilien der nach SCOP (Murzin *et al.* 1995) als „4 helices; folded leaf; right-handed superhelix“ klassifizierten Gruppe der Klasse der „all alpha“ Proteine vergleichend betrachtet werden (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Sequenzvergleich repräsentativer 2S Albumine und Mitglieder der Superfamilien der ns-LTPs und bifunktionellen Inhibitoren.**

Der Sequenzvergleich wurde zunächst mit dem Programm T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) erstellt und anschließend unter Berücksichtigung der konservierten Cysteinreste und der Sekundärstrukturelemente modifiziert. Die Sequenzen sind mit Ausnahme von Ara h 6 durch ihre jeweiligen PDB-Kennung der entsprechenden Strukturen bezeichnet. Helices sind in Form schwarzer Zylinder dargestellt. Die Beschriftung oberhalb der Sequenzen (HI bis HIV/HV) entspricht die Nummerierung der Helices.

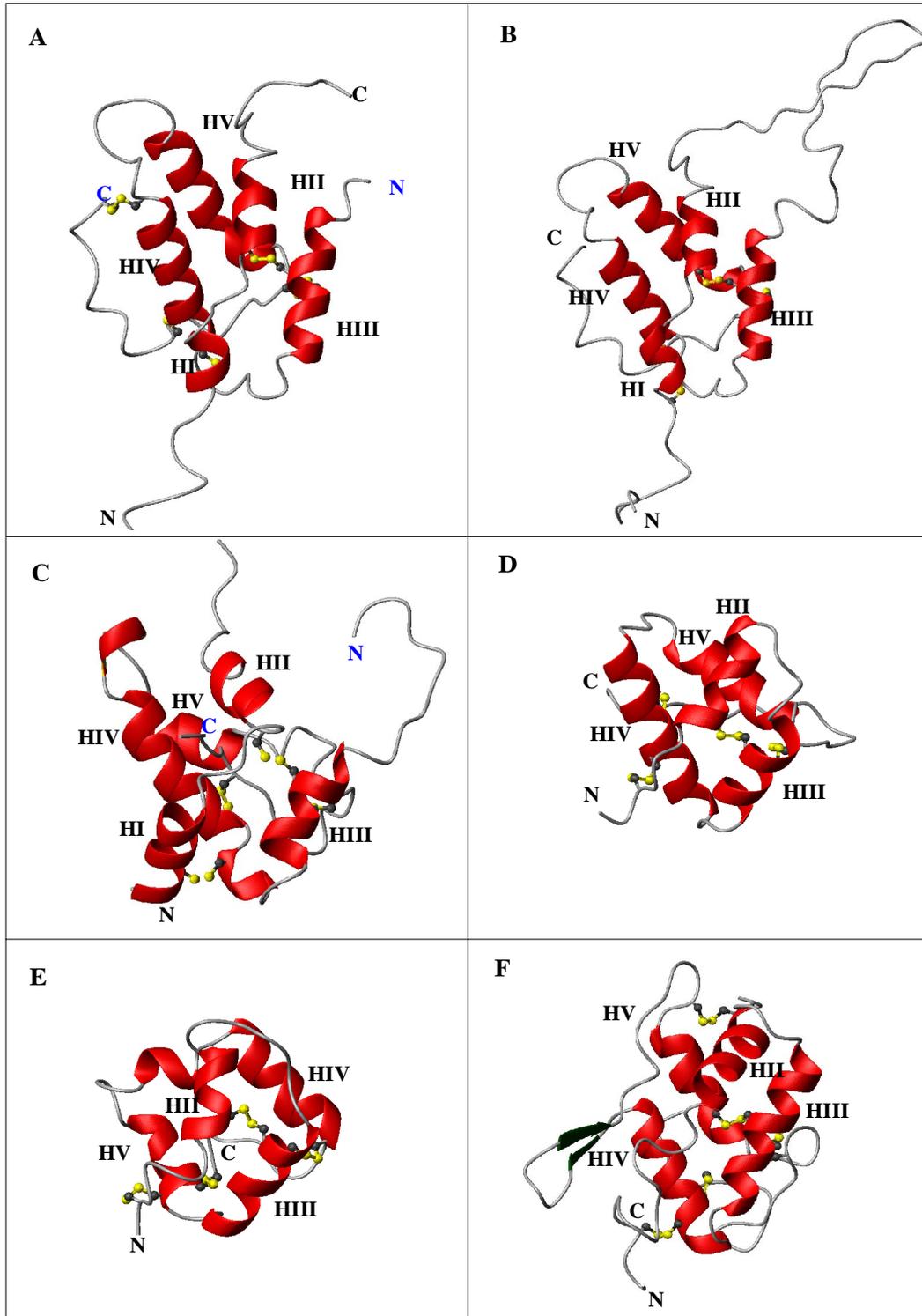
1B1U: bifunktioneller Inhibitor aus indischer Fingerhirse, 1BE2: ns-LTP aus Gerste, 1AFH: ns-LTP aus Mais, 1PNB: BnIb (Napin, 2S Albumin) aus Raps, 1HYP: hydrophobes Protein aus Sojabohne.

Die 2S Albumine Ara h 6 (Abb. 5.4A) und BnIb (Abb. 5.4C; Rico *et al.* 1996) zeigen ähnliche globale Faltungen. Beide Strukturen bestehen aus einer rechtsgängigen Anordnung von fünf durch zahlreiche Schleifen unterbrochene  $\alpha$ -Helices. Auf Grund der schlechten Qualität der BnIb Struktur ist vor allem die Definition der fünf  $\alpha$ -helikalen Elemente unzulänglich und erlaubt nur eingeschränkt eine vergleichende Betrachtung. Auffällig ist vor allem ein Größenunterschied in der aminoterminalen  $\alpha$ -Helix der kleinen Untereinheit. Diese zeigt bei Ara h 6 eine erhöhte Flexibilität und ist im Vergleich zu BnIb stark verkürzt. Auch ist der Winkel der Helices I und II (kleine Untereinheit), die bei BnIb annähernd ein sehr weites V beschreiben und die Helices III und IV (große Untereinheit) ansatzweise umklammern, in Ara h 6 weniger stark ausgeprägt. Dies führt in Ara h 6 zu einer antiparallelen Anordnung der  $\alpha$ -Helices II und V, welche in BnIb eher orthogonal verlaufen. Die  $\alpha$ -Helices III und IV sind in Ara h 6 im Unterschied zu BnIb koplanar angeordnet. Der in BnIb außerordentlich ausgeprägte und flexible Carboxyterminus liegt in Ara h 6 auf Grund einer zusätzlichen Disulfidbrücke (Cys86-Cys126) fest verankert vor. Diese fixiert die vorletzte Aminosäure (Cys126) am carboxyterminalen Ende der ersten  $\alpha$ -Helix der großen Untereinheit (Helix III).

Trotz sehr geringer Sequenzhomologie bestehen wesentliche Gemeinsamkeiten unter den dreidimensionalen Strukturen der 2S Albumine (Abb. 5.4 A,B,C), ns-LTPs (Abb. 5.4E), HPS (Abb. 5.4D) und Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitoren (Abb. 5.4F). Die Lokalisation und Ausdehnung der letzten vier  $\alpha$ -Helices ist sehr ähnlich und führt zur Ausbildung einer rechtsgängigen Superhelix (Murzin *et al.* 1995). Eine abgegrenzte erste aminoterminalen  $\alpha$ -Helix tritt hingegen ausschließlich in 2S Albuminen (Ara h 6: Abb. 5.4A, BnIb: Abb. 5.4B, Ara h 2: Abb. 5.4C (Strukturmodell) auf. Eine zusammenfassende Betrachtung der Lokalisation, Ausdehnung und relativen Orientierung der  $\alpha$ -Helices lässt einen höheren Grad an Übereinstimmung zwischen 2S Albuminen und dem Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitor als zu HPS und ns-LTPs folgern. Die dritte  $\alpha$ -Helix ist bei dem betrachteten ns-LTP und HPS in Richtung Aminoternus verschoben und schließt mittig das konservierte CXC Motiv ein, welches bei beiden 2S Albuminen und dem Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitor am aminoterminalen Ende selbiger  $\alpha$ -Helix lokalisiert ist (Abb. 5.3; 5.4). Die  $\alpha$ -Helices II und III sowie IV und V (Nummerierung nach Ara h 6) sind bei Ara h 6 und Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitor jeweils antiparallel orientiert und koplanar angeordnet, beide Helixpaare sind leicht gegeneinander verdreht (Abb. 5.4). Die Verdrillung der einzelnen Helices bei HPS und dem ns-LTP ist hingegen wesentlich ausgeprägter. Eine Konsequenz davon könnte die Ausprägung einer internen Höhle bei ns-LTPs sein.

Bei einer sehr guten Übereinstimmung der helikalen Elemente bei Ara h 6 und dem Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor (Abb. 5.4A und Abb. 5.4.F), sind wesentliche Unterschiede in der Länge der die  $\alpha$ -Helices verbindenden Schleifenelemente festzustellen. Während  $\alpha$ -Helix II und III in Ara h 6 durch eine ausgeprägte Schleife von 17 Resten, welche als sehr anfällig gegenüber proteolytischem Verdau nachgewiesen wurden, verbunden sind, findet man im Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor nur 8 Aminosäuren zwischen den beiden entsprechenden Helices (Abb. 5.3). Dieser Bereich (Cys29-Ala36) wurde im Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor als Trypsin-Bindungsloop identifiziert (Gourinath *et al.* 1999). Die Länge der die Helices IV und V (Nummerierung nach Ara h 6) verbindenden Schleifen stellen sich genau entgegengesetzt dar. Hier findet sich im Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor eine 30 Reste umfassende ausgedehnte Schleife, welche zwei kleine antiparallele  $\beta$ -Faltblätter enthält, bei Ara h 6 jedoch nur sieben Aminosäuren umfasst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ara h 6 nicht nur die wesentlichen Strukturmerkmale der 2S Albumine, sondern auch der  $\alpha$ -helikalen bifunktionellen Inhibitoren und LTPs teilt. Ihnen allen ist eine aus vier oder fünf  $\alpha$ -Helices aufgebaute Superhelix und ein bis auf wenige Ausnahmen konserviertes Disulfidverbrückungsmuster gemein. Unterschiede sind vor allem lokaler Natur und bestehen in der Neigung und Verdrillung der Helices untereinander sowie in der Länge der flexiblen Schleifenelemente.



**Abb. 5.4: Dreidimensionale Strukturen von 2S Albuminen und Verwandten.**

(A) Ara h 6 [diese Arbeit], (B) Ara h 2 [Strukturmodell, diese Arbeit], (C) BnIb [1PNB; Rico *et al.* 1996], (D) HPS [HYP; Baud *et al.* 1993], (E) ns-LTP aus Weizen [1N89], (F) Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitor aus indische Fingerhirse [1B1U; Gourinath *et al.* 2000]

## 5.7 Struktur-Funktions Beziehungen

Für die Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 wurden bisher keine enzymatischen Aktivitäten oder Funktionen beschrieben. Auf Grund ihrer Mitgliedschaft zur Familie der 2S Albumine (Kap. 1.4.4) und dem hohen Anteil an Schwefel- und Stickstoff-reichen Aminosäuren, ist eine Funktion als Schwefel- und Stickstoffdonor, wie sie für andere 2S Albumine publiziert wurde (Youle & Huang 1979, Barciszewski *et al.* 2000), naheliegend. Die ermittelte dreidimensionale Struktur von Ara h 6 soll im Folgenden mit Strukturen verwandter Proteine (Abb. 5.4) mit bekannter Aktivität verglichen werden, um Rückschlüsse auf mögliche Aktivitäten der untersuchten Proteine zu erhalten.

Die Aktivität der ns-LTPs als Lipid- und Fettsäure-Transporter wurde in der Literatur umfangreich dokumentiert. Von ns-LTPs aus Mais, Roggen und Weizen liegen Komplexstrukturen mit Palmitat, Palmitoyl CoA, Prostaglandin B2 und einem Phospholipid vor (Shin *et al.* 1995, Lerche *et al.* 1997, Charvolin *et al.* 1999, Tassin-Moindrot *et al.* 2000). Die auffälligste strukturelle Eigenschaft dieser Proteinfamilie liegt in der Existenz einer das Molekül durchspannenden hydrophoben Höhle, welche im Fall der ns-LTP1 Proteine eine tunnelartige Gestalt einnimmt und bei einem ns-LTP2 aus Reis einen triangularen Hohlraum bildet (Samuel *et al.* 2002).

Für eine mögliche Funktion der 2S Albumine als Lipid-transportierende Moleküle liegen bisher keinerlei Hinweise vor. Bei einer sehr ähnlichen globalen Faltung fehlen bei Ara h 6 einige in den ns-LTPs. hochkonservierte und für die Lipidbindung entscheidenden Motive. Dazu gehört zum einen ein zwischen den Motiven CC und CXC angeordneter hydrophiler Bereich mit konservierten Threonin- und Serinresten. Dieser Bereich ist in Ara h 6 wesentlich kürzer und weist lediglich ein Threonin an einer nicht analogen Sequenzposition auf. Ein weiterer bedeutender Unterschied liegt im Fehlen eines am carboxyterminalen Ende der ns-LTP Proteine lokalisierten und konservierten Tyrosinrestes. Dieser Rest interagiert mit seiner Hydroxylgruppe mit der Carboxylat- oder Carbonylgruppe des gebundenen Lipids, außerdem wird ihm eine Schlüsselrolle im Mechanismus der Lipidinsertion zugesprochen (Gomar *et al.* 1996). Der Carboxyterminus von Ara h 6 weist keinen Tyrosinrest auf, außerdem ist dieser auf Grund einer zusätzlichen Disulfidbindung zwischen Cystein 86 und 126 am carboxyterminalen Ende von Helix IV fixiert und damit weit von einer möglichen Lipidbindungsstelle entfernt positioniert. Das Fehlen des konservierten Tyrosinrestes, als auch die Eigenschaften der die Motive CC und CXC verbindenden Bereiche hat Ara h 6 mit dem 2S Albumin BnIb (Rico *et al.* 1996), dem hydrophoben Protein aus Sojabohne (Baud *et*

al. 1993) und den  $\alpha$ -Amylase/Trypsininhibitoren (Oda *et al.* 1997, Gourinath *et al.* 1999) gemein. Über die Existenz einer hydrophoben Höhle liegen im Fall von HPS widersprüchliche Angaben vor (Baud *et al.* 1993; Gomar *et al.* 1996), bei BnIb aus Raps wurde von einem Fehlen selbiger ausgegangen (Rico *et al.* 1996). In Ara h 6 formieren die Mehrheit aller hydrophoben Reste einen hydrophoben Kernbereich. Die vorliegende dreidimensionale Struktur soll als Grundlage für weitere Untersuchungen, beispielsweise in Form von Homologiemodellierungen mit möglichen Liganden dienen, um die Existenz eines Tunnels oder Hohlraumes zu klären.

Von einer in Getreidesamen gefundenen Inhibitorfamilie ( $\alpha$ -Amylase und/oder Trypsininhibitoren) wurden bisher von zwei Vertretern eine dreidimensionale Struktur publiziert (Strobl *et al.* 1995, Oda *et al.* 1997, Gourinath *et al.* 1999, 2000). Wie bereits erwähnt unterscheidet sich Ara h 6 vor allem in der Größe der in RBI beschriebenen Trypsinbindungsschleife, welche eine definierte kanonische Konformation einnimmt und in vielen Serinproteaseinhibitoren beobachtet wird (Bode & Huber 1992). Diese ist in Ara h 6 um ca. zehn Reste verlängert und entsprechend der ermittelten heteronuklearen NOE Daten äußerst flexibel. Außerdem handelt es sich gerade bei dieser Schleife um den sehr proteaselabilen Bereich im Protein, eine Trypsininhibitorfunktion kann also ausgeschlossen werden.

Der Mechanismus der  $\alpha$ -Amylaseinhibition konnte mit Hilfe der Komplexstruktur aus RBI und  $\alpha$ -Amylase genauer charakterisiert werden (Strobl *et al.* 1998). Dabei sind Teile des Aminoterminus, die Schleife zwischen der dritten und vierten Helix und mehrere Reste am Carboxyterminus an der Bindung beteiligt. Der Bindungsbereich liegt damit genau an der gegenüberliegenden Seite der Trypsinbindungsregion. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich Ara h 6 und RBI gerade sehr stark in der benannten Schleife, welche in Ara h 6 stark verkürzt vorliegt und im Carboxyterminus, welcher bei Ara h 6 durch eine zusätzliche Disulfidbrücke fixiert wird. Bisher wurden ebenfalls keine Hinweise für die Funktion eines 2S Albumins in der Literatur beschrieben.

## 5.8 Die dreidimensionale Struktur - eine Determinante für Allergenizität?

Eine der wichtigsten Frage im Zusammenhang mit atopischen Phänomenen ist: welche Eigenschaften bestimmen den allergenen Charakter eines Proteins oder anders ausgedrückt was macht ein Protein zum Allergen? Es ist bekannt, dass einige Aspekte der Proteinstruktur relevant für Allergenizität sein können. Dazu gehören Größe, Löslichkeit, Kompaktheit,

Stabilität und wahrscheinlich auch die Fähigkeit zur Interaktion mit Membranlipiden (Aalberse *et al.* 2000). Diese Eigenschaften ermöglichen einerseits das Überdauern von Nahrungsmittel-Verarbeitungsprozeduren, andererseits den Transport über mucosale Membranen und einen Schutz vor Proteasen, was letztlich den unbeschadeten Weg des Proteins zum Zielort erlaubt (Astwood *et al.* 1996). Aspekte wie Größe und Löslichkeit scheinen für inhalative Allergene von größerer Bedeutung zu sein. Stabilität und Kompaktheit ist hingegen für Nahrungsmittelallergene außerordentlich relevant.

In Einzelfällen scheinen biologische Aktivitäten selbst einen Einfluss auf die Allergenizität auszuüben. So verbessert Der p 1, eine Cystein Protease, seine eigene Permeabilität im bronchialen Epithelium auf Grund proteolytischer Aktivität (Gough *et al.* 1999). Andere Allergene weisen Nuklease-, Phospholipase-A2-, Hyaluronidase- oder Lysozym-Aktivität auf (Bufe *et al.* 1998). Für einen Großteil der allergenen Proteine wurde bisher jedoch keine enzymatische Aktivität beschrieben, dazu gehören auch die hier untersuchten 2S Albumine.

Die hier beschriebenen 2S Albuminallergene erfüllen nahezu alle für die Allergenizität eines Lebensmittelallergens genannten Kriterien. Sie weisen eine beachtliche thermische als auch proteolytische Stabilität auf. Die Strukturen bestehen abgesehen von mehr oder weniger stark ausgeprägten flexiblen Schleifen aus einem globulären und sehr kompakten Kernbereich, welcher vor proteolytischem Abbau geschützt ist. Außerdem zeichnen sie sich durch eine sehr gute Löslichkeit aus und ihre Molekularmassen (ca. 14 kDa Ara h 6, 17 kDa Ara h 2) liegen in dem typischerweise für Allergene beschriebenen Bereich. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit der beobachteten schweren und teilweise lebensbedrohlichen klinischen Symptomatik der Erdnussallergie. Die Erdnuss enthält allergene Proteine mit sehr kompakten dreidimensionalen Strukturen, die eine Voraussetzung für eine lange Lebensdauer im Gastrointestinaltrakt darstellen. Damit können sehr große Bereiche des Allergens von der intestinalen Mucosa absorbiert werden, auf Grund ihrer Multivalenz eine effektive Meditatorausschüttung bewirken und letztlich schwerste allergische Reaktionen hervorrufen.

## 6 Zusammenfassung

Die Erdnussallergie stellt auf Grund ihrer Verbreitung und der Stärke der ausgelösten Reaktionen ein ernsthaftes Gesundheitsproblem dar. Die derzeit einzige Möglichkeit zum Schutz vor den erdnusstypischen Hypersensitivitätsreaktionen besteht in einem absoluten Verzicht auf erdnusshaltige Lebensmittel. Folglich stellt die Charakterisierung von Erdnussallergenen eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Ansätzen dar. In der vorliegenden Arbeit wurden biophysikalische und biochemische Eigenschaften der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 untersucht und deren dreidimensionale Strukturen mittels NMR-Spektroskopie und komparativer Modellierung ermittelt.

Als Grundlage für biochemische und biophysikalische Studien wurde eine rekombinante Expressionsstrategie zur Herstellung von authentisch gefaltetem Ara h 2 und Ara h 6 in dieser Arbeit entwickelt (Lehmann *et al.* 2003). Diese Strategie zur effizienten Präparation großer Mengen Protein basiert auf der Anwendung spezieller *E. coli* Stämme mit oxidativem Cytoplasma und eignet sich zur Expression nativ gefalteter und disulfidverbrückter rekombinanter Erdnussallergene vom 2S Albumintyp und mit hoher Wahrscheinlichkeit weiterer Mitglieder dieser Proteinfamilie. Die erzielten Ausbeuten sind ausreichend für strukturelle Studien in atomarer Auflösung auf Basis der mehrdimensionalen NMR Spektroskopie. Die Integrität der Sekundär- und Tertiärstruktur, der Disulfidverbrückung und der immunologischen Reaktivität der rekombinanten Proteine wurde am Beispiel von Ara h 2 mit Hilfe von natürlichem Protein aus der Erdnuss verifiziert. Die Verfügbarkeit von authentischen rekombinanten Erdnussallergenen eröffnet neue Möglichkeiten für eine verfeinerte Diagnose allergischer Erkrankungen und für die Entwicklung von spezifischen Immuntherapien.

Im Mittelpunkt erster biophysikalischer Untersuchungen stand die thermische und proteolytische Stabilität von Ara h 6 und Ara h 2. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die Allergene Ara h 2 und Ara h 6 durch eine außerordentliche Stabilität gegenüber thermaler Denaturierung und proteolytischem Abbau auszeichnen. Durch CD spektroskopische Studien wurde eine Stabilität der Sekundärstruktur bis 373 K eindeutig nachgewiesen. Der Verlust der thermischen Stabilität in Gegenwart eines Reduktionsmittels weist auf die Bedeutung der vorhandenen Disulfidbrücken für die Proteinestabilität hin.

Die Resistenz gegenüber Verdauungsreaktionen wurde an Hand der Enzyme Trypsin und Chymotrypsin untersucht. Der proteolytische Verdau von Ara h 2 und Ara h 6 resultierte in

der Ausbildung heterodimerer Produkte, deren immunologische Aktivität in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Durch aminoterminal Ansequenzierung wurde gezeigt, dass der proteolytische Angriff innerhalb zweier definierter Bereiche, dem Aminoterminal und innerhalb einer internen Schleife, erfolgt. Die resistenten Kernbereiche der Proteine beinhalten eine Reihe von vor Proteolyse geschützten Schnittstellen. Wie durch NMR spektroskopische Studien nachgewiesen werden konnte, sind die Faltungen der unverdauten Proteine und der proteaseresistenten Kernbereiche nahezu identisch. Mittels NMR Spektroskopie wurde ebenfalls gezeigt, dass die proteaselablen Bereiche keine reguläre Sekundärstruktur aufweisen und von einer signifikanten Flexibilität geprägt sind.

Die für die Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 nachgewiesene Stabilität stellt ein wichtiges Merkmal der Lebensmittelallergene dar. Je länger ein möglichst großer Proteinabschnitt intakt bleibt, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Immunantwort ausgelöst werden kann und umso stärker wird diese ausfallen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Lösungsstruktur des proteaseresistenten Ara h 6-Kerns bestimmt und charakterisiert werden. Die resultierende Struktur besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices, die einen vor enzymatischer Spaltung geschützten kompakten Kernbereich ausbilden. Die ermittelte Struktur stellt die erste experimentell bestimmte dreidimensionale Struktur eines Erdnussallergens und die erste hochaufgelöste Struktur eines 2S Albumins dar. Die globale Faltung von Ara h 6 aus der Erdnuss ähnelt weiteren Pflanzenproteinen: den nichtspezifischen Lipidtransferproteinen, den Amylase/Trypsin-Inhibitoren und dem hydrophoben Protein aus Sojabohne. Die Hauptunterschiede zwischen diesen Gruppen betreffen die Ausdehnung und Lokalisation der die vier oder fünf Helices verbindenden Schleifen. Einzelne strukturelle Unterschiede lassen bei den untersuchten Allergenen keine Amylase/Trypsin-Inhibitor- oder Lipidtransfer-Aktivität vermuten.

Eine wichtige Frage betrifft die Lokalisation der IgE bindenden Epitope. In früheren Studien konnten in Ara h 6 keine linearen IgE reaktiven Epitope identifiziert werden, für Ara h 2 wurden hingegen drei immunodominante Regionen beschrieben. Um die Frage nach der Lokalisation dieser Epitope innerhalb der dreidimensionalen Struktur von Ara h 2 zu klären, wurde ein molekulares Modell des Proteins auf der Basis der experimentell gelösten Ara h 6 Struktur erstellt. Sämtliche Epitope befinden sich in einem ausgedehnten Schleifenbereich und am aminoterminalen Ende des Proteins. Dieser Befund weist in Kombination mit dem Kenntnis, dass die Multivalenz eines Allergens eine Voraussetzung für das Auslösen einer allergischen Antwort darstellt und mit ihrer Intensität korreliert, stark auf die Existenz von konformationellen Epitopen in Ara h 6 und Ara h 2 hin. Die Präsentation von stabilen,

konformationellen Epitopen auf Mastzellen führt im Allgemeinen zu einer effizienteren und stärkeren Mediatorausschüttung. Dies ist mit den beobachteten starken klinischen Symptomen bei Patienten mit Erdnussallergie konsistent.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Stabilität und Kompaktheit der Struktur sowie das potentielle Vorhandensein von konformationellen Epitopen eine Erklärung für die extreme Allergenizität der Erdnussallergene liefern kann. Die Identifizierung von IgE-bindenden Epitopen auf der Basis der dreidimensionalen Struktur der Erdnussallergene liefert eine Grundlage für die Entwicklung von veränderten Proteinen mit reduzierter Allergenizität, dem Verständnis von Kreuzallergien und der Entwicklung neuer Therapieformen.

## 7 Summary

Peanut allergy is a significant health problem because of the prevalence and severity of the reaction. The only therapeutic option currently available for the prevention of a peanut hypersensitivity reaction is food avoidance. Therefore, the characterization of peanut allergens is important for developing diagnostic and therapeutic capabilities. The 2S albumins Ara h 2 and Ara h 6 represent a major and a minor allergen among at least six allergenic components in peanut. In this work biophysical and biochemical properties of these two peanut allergens were investigated, and the three-dimensional structures of Ara h 6 and Ara h 2 were determined by NMR spectroscopy and homology modelling, respectively. Results of these studies offer a likely explain the extreme allergenicity exhibited by these proteins.

As a basis for the biochemical and biophysical studies of the two allergenic proteins, a recombinant expression strategy of authentically folded Ara h 2 and Ara h 6 was established in this work (Lehmann *et al.* 2003). This efficient large-scale method exploiting on special *E. coli* strains with an oxidizing cytoplasm is clearly suited for recombinant expression of properly folded and disulfide bridged peanut 2S albumins and highly likely other members of this protein family in quantities sufficient for structural studies at atomic resolution by multidimensional NMR-spectroscopy. The intact secondary and tertiary structure, correct disulfide pattern and immunological reactivity of the recombinant proteins was confirmed using the native Ara h 2 protein from peanut as a reference. The availability of authentic recombinant peanut allergens presented in this work may open new opportunities for refined allergic diagnosis and the development of specific immunotherapies.

In the present work first biophysical studies focused on the thermal and proteolytic stability of Ara h 6 and Ara h 2. It could be shown that Ara h 2 and Ara h 6 are extremely stable proteins resistant to thermal denaturation and to proteolytic digestion. CD spectroscopic studies showed clearly that the secondary structure of Ara h 2 and Ara h 6 is stable until 373 K. This thermal stability is lost in the presence of a reduction agent which indicates that it is mediated by the disulfide bridge connections.

Resistance to digestion was demonstrated using trypsin and chymotrypsin. The protease-resistant cores of Ara h 2 and Ara h 6 were characterized. The digestion results in the creation of heterodimeric proteins that could be shown as immunological active. Aminoterminal sequencing of the subunits revealed that digestion occurs at two distinct regions in the

proteins: the aminoterminal and an internal loop. Only a very small part of Ara h 2 and Ara h 6 are accessible to protease cleavage. The resistant protein cores containing several potential enzyme cleavage sites are protected from digestion. The folding of the protease-resistant cores of Ara h 2 and Ara h 6 is nearly identical to the undigested protein as evidenced by NMR. As demonstrated by NMR spectroscopic studies of these undigested proteins in comparison with the protease-resistant cores, the protease-labile parts are regions without regular secondary structure and with a significant flexibility. The stable nature of proteins is thought to be an important characteristic of food allergens because the longer significant portions of the protein remain intact the more likely it is to trigger an immune response.

Furthermore, in the present work the solution structure of the protease-resistant Ara h 6 core has been determined by NMR spectroscopy. The resulting compact structure consists of a right handed superhelix formed by five  $\alpha$ -helices. This structure represents the first experimentally solved three-dimensional structure of a peanut allergen and the first high resolution structure of a 2S albumin. The global fold of Ara h 6 from peanut is similar to that of other classes of plant proteins: non-specific lipid transfer proteins, amylase/trypsin-inhibitors and the hydrophobic protein from soybean. The major differences between these groups are manifested in the length and location of loops connecting the four or five helices. Subtle structural differences suggest a function different from that of amylase/trypsin-inhibitors and non-specific lipid transfer proteins.

One major question concerns to the localization of epitopes. Whereas no linear IgE reactive epitopes were identified in Ara h 6, three immunodominant regions were defined in Ara h 2 in earlier studies. The question, where these linear epitopes are located in the three-dimensional structure was addressed by building a molecular model of Ara h 2 on the basis of the experimentally solved structure of Ara h 6. All epitopes are clustered in an extended loop and in the aminoterminal area of the protein. As it could be shown in this work both regions are highly sensitive to proteolytic digestion. These findings, in combination with the knowledge that allergens must be multivalent to elicit an allergic response, point strongly toward the existence of conformational epitopes in Ara h 6 and Ara h 2 as well. The presentation of stable, conformational epitopes to mast cells generally results in a more efficient and dramatic release of mediators, consistent with severe clinical symptoms observed in patients with peanut hypersensitivity.

Taken in total, the very stable nature of the compact structure and the likely existence of conformational epitopes offers an explanation for the extreme allergenicity of these peanut

allergens. Identification of IgE-binding epitopes on the basis of the three-dimensional structures of these peanut allergens provides the basis for the development of altered proteins with reduced allergenicity, the explanation of cross reactivity and for novel designs of allergy treatment.

## 8 Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
Ap	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C18	octadecyl
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cm	Chloramphenicol
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CSI	<i>Chemical Shift Index</i>
CT-HSQC	<i>Constant Time Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
d	Küvettschichtdicke
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FT	Fourier Transformation
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton

LB	Luria Bertani
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LTP	Lipidtransferproteine
m/z	Quotient aus der Masse eines Iones in amu und seiner Ladung
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MW	molecular weight
nAra h 2	natürliches Ara h 2
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMR	magnetische Kernresonanz
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PNGase	Peptide-N-glykosidase
prAra h 2	proteolytisch behandeltes Ara h 2
prAra h 6	proteolytisch behandeltes Ara h 6
rAra h 2	rekombinantes Ara h 2
rAra h 6	rekombinantes Ara h 6
RAST	Radio-Allergosorbent-Test
rbs	Ribosomenbindungsstelle
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
srAra h 2	durch ein synthetisches Gen kodiertes rekombinantes Ara h 2
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPPI	<i>Time Proportion Phase Incrementation</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
Trx	Thioredoxin
TTBS	Tween 20/Tris <i>buffered saline</i>
U	Einheit
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	sichtbares Licht
w/v	Gewicht pro Volumen

## 9 Literatur

- Aalberse, R.C., Koshte, V. & Clemens, J.G. (1981) Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and *Hymenoptera* venom. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **68**, 356-64.
- Aalberse, R.C. & van Ree, R. (1996) Cross-reactive carbohydrate determinants. *Monogr. Allergy*, **32**, 78-83.
- Aalberse, R.C. & van Ree, R. (1997) Crossreactive carbohydrate determinants. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 375-87.
- Aalberse, R.C. (2000) Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 228-38.
- Alcocer, M.J., Murtagh, G.J., Bailey, K., Dumoulin, M., Meseguer, A.S., Parker, M.J. & Archer, D.B. (2002) The disulphide mapping, folding and characterisation of recombinant Ber e 1, an allergenic protein, and SFA8, two sulphur-rich 2S plant albumins. *J. Mol. Biol.*, **324**, 165-75.
- Ampe, C., Van Damme, J., de Castro, L.A., Sampaio, M.J., Van Montagu, M. & Vandekerckhove, J. (1986) The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Eur. J. Biochem.*, **159**, 597-4.
- Astwood, J.D., Leach, J.N. & Fuchs, R.L. (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1269-73.
- Ball, G., Shelton, M.J., Walsh, B.J., Hill, D.J., Hosking, C.S. & Howden, M.E. (1994) A major continuous allergenic epitope of bovine beta-lactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clin. Exp. Allergy.*, **24**, 758-64.
- Ball, T.M., Castro-Rodriguez, J.A., Griffith, K.A., Holberg, C.J., Martinez, F.D. & Wright, A.L. (2000) Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 538-43.
- Ballmer-Weber, B.K., Scheurer, S., Fritsche, P., Enrique, E., Cistero-Bahima, A., Haase, T. & Wüthrich, B. (2002) Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**, 167-73.
- Bannon, G.A., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C.M., Helm, R., Stanley, J.S., King, N., Rabjohn, P., Sampson, H.A. & Burks, A.W. (2001) Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*,

124, 70-2.

Barciszewski, J., Szymanski, M. & Haertle, T. (2000) Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *J Protein Chem*, **19**, 249-54.

Barnett, D. & Howden, M.E. (1986) Partial characterization of an allergenic glycoprotein from peanut (*Arachis hypogaea L.*). *Biochim. Biophys. Acta*, **882**, 97-105.

Barnett, D., Bonham, B. & Howden, M.E. (1987) Allergenic cross-reactions among legume foods--an in vitro study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **79**, 433-8.

Bashir, M.E., Hubatsch, I., Leinenbach, H.P., Zeppezauer, M., Panzani, R.C. & Hussein, I.H. (1998) Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationships. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **115**, 73-82.

Baud, F., Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C., Odani, S. & Lehmann, M.S. (1993) Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. *J. Mol. Biol.*, **231**, 877-87.

Beasley, R., Lai, C.K., Crane, J. & Pearce, N. (1998) The video questionnaire: one approach to the identification of the asthmatic phenotype. *Clin. Exp. Allergy.*, 28 Suppl 1, 8-12; discussion 32-6.

Becker, W.-M & Reese, G. (2001) Immunological identification and characterization of individual food allergens. *J. Chromogr. B*, **756**, 131-140.

Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. & Vliegenthart, J.F. (1982) Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. *Experientia*, **38**, 1129-62.

Bernhisel-Broadbent, J. & Sampson, H.A. (1989) Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 435-40.

Besler, M., Steinhart, H. & Paschke, A. (2001) Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 207-28.

Biesiadka, J., Bujacz, G., Sikorski, M.M. & Jaskolski, M. (2002) Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine. *J. Mol. Biol.*, **319**, 1223-34.

Bock, S.A. (1982) The natural history of food sensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **69**, 173-7.

- Bock, S.A. & Atkins, F.M. (1989) The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 900-4.
- Bocskei, Z., Groom, C.R., Flower, D.R., Wright, C.E., Phillips, S.E., Cavaggioni, A., Findlay, J.B. & North, A.C. (1992) Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **360**, 186-8.
- Bode, W. & Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433-51.
- Bodner, C., Godden, D. & Seaton, A. (1998) Family size, childhood infections and atopic diseases. The Aberdeen WHEASE Group. *Thorax*, **53**, 28-32.
- Braunschweiler, L. & Ernst, R.R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Res.*, **53**, 521-528.
- Bredhorst, R. & David, K. (2001) What establishes a protein as an allergen? *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 33-40.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.*, **4**, 187-217.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C. & Sawyer, L. (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure*, **5**, 481-95.
- Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Bjorksten, B., Moneret-Vautrin, D. & Wüthrich, B. (1995) Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy*, **50**, 623-35.
- Brünger, A.T. (1993). *X-PLOR Version 3.1*, Howard Hughes Medical Institute & Yale University, New Haven, CT.
- Bufe, A. (1998) The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **117**, 215-9.
- Burks, A.W., Cockrell, G., Connaughton, C., Guin, J., Allen, W. & Helm, R.M. (1994) Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 143-9.
- Burks, A.W., Williams, L.W., Helm, R.M., Connaughton, C., Cockrell, G. & O'Brien, T.

(1991a) Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172-9.

Burks, A.W., Williams, L.W., Helm, R.M., Connaughton, C., Cockrell, G. & O'Brien, T. (1991b) Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172-9.

Burks, A.W., Williams, L.W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T.J. & Helm, R.M. (1992) Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 962-9.

Burks, A.W., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M. & Bannon, G.A. (1995) Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1715-21.

Burks, A.W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M. & Bannon, G.A. (1997) Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 334-9.

Burks, W., Sampson, H.A. & Bannon, G.A. (1998) Peanut allergens. *Allergy*, **53**, 725-30.

Burks, A.W., King, N. & Bannon, G.A. (1999a) Modification of a major peanut allergen leads to loss of IgE binding. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **118**, 313-4.

Burks, W., Bannon, G.A., Sicherer, S. & Sampson, H.A. (1999b) Peanut-induced anaphylactic reactions. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **119**, 165-72.

Carraway, K.L. & Hull, S.R. (1989) O-glycosylation pathway for mucin-type glycoproteins. *Bioessays*, **10**, 117-21.

Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G. & Skelton, N.J. (1996) Protein NMR Spectroscopy. Academic Press, New York, NY.

Charvolin, D., Douliez, J.P., Marion, D., Cohen-Addad, C. & Pebay-Peyroula, E. (1999) The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 562-8

Chatel, J.M., Bernard, H. & Orson, F.M. (2003) Isolation and Characterization of Two Complete Ara h 2 Isoforms cDNA. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **131**, 14-8.

Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M. & Ryan, C.A. (1987) Three-Dimensional

Structure of Potato Carboxypeptidase Inhibitor in Solution. A Study Using Nuclear Magnetic Resonance, Distance Geometry, and Restrained Molecular Dynamics. *Biochemistry*, **26**, 8012-8023.

Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1998) New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5891-5898.

Da Silva, J.G. Jr., Machado, O.L., Izumi, C., Padovan, J.C., Chait, B.T., Mirza, U.A. & Greene, L.J. (1996) Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **336**, 10-8.

Dayie, K.T. & Wagner, G. (1994) Relaxation-rate measurements of  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways. *J. Magn. Reson.*, **111A**, 121-126.

De Blay, F., Pauli, G. & Bessot, J.C. (1991) Cross-reactions between respiratory and food allergens. *Allergy Proc.*, **12**, 313-7.

De Blay, F., Hoyet, C., Candolfi, E., Thierry, R. & Pauli, G. (1994) Identification of alpha livetin as a cross reacting allergen in a bird-egg syndrome. *Allergy Proc.*, **15**, 77-8.

De Jong, E.C., Van Zijverden, M., Spanhaak, S., Koppelman, S.J., Pellegrom, H. & Penninks, A.H. (1998) Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 743-51.

De Marino, S., Morelli, M.A., Fraternali, F., Tamborini, E., Musco, G., Vrtala, S., Dolecek, C., Arosio, P., Valenta, R. & Pastore, A. (1999) An immunoglobulin-like fold in a major plant allergen: the solution structure of Phl p 2 from timothy grass pollen. *Structure Fold Des.*, **7**, 943-52.

Delphin, S. & Stavnezer, J. (1995) Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J. Exp. Med.*, **181**, 181-92.

Derewenda, U., Li, J., Derewenda, Z., Dauter, Z., Müller, G.A., Rule, G.S. & Benjamin, D.C. (2002) The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J. Mol. Biol.*, **318**, 189-97.

Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**, 1744-7.

- D'Hondt, K., Bosch, D., Van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. & Krebbers, E. (1993) An aspartic proteinase present in seeds cleaves *Arabidopsis* 2 S albumin precursors *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20884-91.
- Diercks, T., Coles, M. & Kessler, H. (1999) An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments, *J. Biomol. NMR*, **15**, 177-180.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-45.
- Dreborg, S. (1988) Food allergy in pollen-sensitive patients. *Ann. Allergy*, **61**, 41-6.
- Düx, P., Whitehead, B., Boelens, R., Kaptein, R. & Vuister, G. W. (1997) Measurement of  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  coupling constants in uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein, *J. Biomol. NMR*, **10**, 301-306.
- Eigenmann, P.A., Burks, A.W., Bannon, G.A. & Sampson, H.A. (1996) Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 969-78.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Emmett, S.E., Angus, F.J., Fry, J.S. & Lee, P.N. (1999) Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members. *Allergy*, **54**, 380-5.
- Emsley, L. & Bodenhausen, G. (1990) Guassian pulse cascades: New analytical functions for rectangular selective inversion and in-phase excitation in NMR. *Chem. Phys. Lett.*, **165**, 469-476.
- Emson, C.L., Bell, S.E., Jones, A., Wisden, W. & McKenzie, A.N. (1998) Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. *J. Exp. Med.*, **188**, 399-404.
- Ewan, P.W. (1996) Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations [see comments]. *BMJ*, **312**, 1074-8.
- Fedorov, A.A., Ball, T., Mahoney, N.M., Valenta, R. & Almo, S.C. (1997a) The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*, **5**, 33-45.

- Fedorov, A.A., Ball, T., Valenta, R. & Almo, S.C. (1997b) X-ray crystal structures of birch pollen profilin and Phl p 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **113**, 109-13.
- Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A.S., Sample, J.V. & Paul, W.E. (1988) IL-4 is required to generate and sustain *in vivo* IgE responses. *J. Immunol.*, **141**, 2335-41.
- Fluckiger, S., Mittl, P.R., Scapozza, L., Fijten, H., Folkers, G., Grutter, M.G., Blaser, K. & Cramer, R. (2002) Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *J. Immunol.*, **168**, 1267-72.
- Fötisch, K., Altmann, F., Hausteiner, D. & Vieths, S. (1999) Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 30-42.
- Fötisch, K. & Vieths, S. (2001) N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj. J.*, **18**, 373-90.
- Foucard, T. & Malmheden Yman, I. (1999) A study on severe food reactions in Sweden--is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis? *Allergy*, **54**, 261-5.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., Joost van Neerven, R.J., Schou, C., Lowenstein, H. & Spangfort, M.D. (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 1040-5.
- Gall, H., Kalveram, K.J., Forck, G. & Sterry, W. (1994) Kiwi fruit allergy: a new birch pollen-associated food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 70-6.
- Gehrig, P.M. & Biemann, K. (1996) Assignment of the disulfide bonds in napin, a seed storage protein from *Brassica napus*, using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Pept. Res.*, **9**, 308-14.
- Georgiou, G., & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 190-7.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.

- Gincel, E., Simorre, J.P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M. & Vovelle, F. (1994) Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional  $^1\text{H}$ -NMR data. A new folding for lipid carriers. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 413-22.
- Gomar, J., Petit, M.C., Sodano, P., Sy, D., Marion, D., Kader, J.C., Vovelle, F. & Ptak, M. (1996) Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci.*, **5**, 565-77.
- González de la Peña, M.A., Menendez-Arias, L., Monsalve, R.I. & Rodriguez, R. (1991) Isolation and characterization of a major allergen from oriental mustard seeds, BrajI. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **96**, 263-70.
- González de la Peña, M.A., Villalba, M., Garcia-Lopez, J.L. & Rodriguez, R. (1993) Cloning and expression of the major allergen from yellow mustard seeds, Sin a I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 648-53.
- González de la Peña, M.A., Monsalve, R.I., Batanero, E., Villalba, M. & Rodriguez R. (1996) Expression in *Escherichia coli* of Sin a 1, the major allergen from mustard. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 827-32.
- Gough, L., Schulz, O., Sewell, H.F., Shakib, F. (1999) The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J. Exp. Med.*, **190**, 1897-902.
- Gounni, A.S., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J.P. & Capron, M. (1994) High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*, **367**, 183-6.
- Gourinath, S., Srinivasan, A. & Singh, T.P. (1999) Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and alpha-amylase from ragi seeds at 2.9 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**, 25-30.
- Gourinath, S., Alam, N., Srinivasan, A., Betzel, C. & Singh, T.P. (2000) Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and alpha-amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56**, 287-93.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. & Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 4645-9.
- 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.

Grzesiek, S. & Bax, A. (1992a) Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31 kDa Protein, *J. Magn. Reson.*, **96**, 432-440.

Grzesiek, S. & Bax, A. (1992b) Correlating Backbone Amide and Side Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6291-6293.

Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. (1993) Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched Proteins by Isotropic Mixing of  $^{13}\text{C}$  Magnetization, *J. Magn. Res. B*, **101**, 114-119.

Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-23.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.

Hara-Hishimura, I., Takeuchi, Y., Inoue, K. & Nishimura, M. (1993) Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *Plant J.*, **4**, 793-800.

Heinemann, B., Andersen, K.V., Nielsen, P.R., Bech, L.M. & Poulsen, F.M. (1996) Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci.*, **5**, 13-23.

Helm, R.M., Cockrell, G., Connaughton, C., Sampson, H.A., Bannon, G.A., Beilinson, V., Nielsen, N.C. & Burks A.W. (2000) A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **123**, 213-9.

Herian, A.M., Taylor, S.L. & Bush, R.K. (1990) Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **92**, 193-8.

Higgins, J.A., Thorpe C.J., Hayball, J.D., O'Hehir, R.E., Lamb, J.R. (1994) Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **93**, 891-9.

Holgate, S.T. (1999) The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, **402**, B2-4.

Holt, P.G. (1996) Infections and the development of allergy. *Toxicol. Lett.*, **86**, 205-10.

Hong, S.J., Michael, J.G., Fehring, A. & Leung, D.Y. (1999) Pepsin-digested peanut

- contains T-cell epitopes but no IgE epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 473-8.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brasseur, M. & McKnight, S.L. (1994) An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*, **265**, 1701-6.
- Hounsell, E.F., Davies, M.J. & Renouf, D.V. (1996) O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.*, **13**, 19-26.
- Hourihane, J.O., Dean, T.P. & Warner, J.O. (1996) Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ*, **313**, 518-21.
- Hourihane, J.B., Kilburn, S.A., Nordlee, J.A., Hefle, S.L., Taylor, S.L. & Warner, J.O. (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 596-600.
- Hourihane, J.O., Roberts, S.A. & Warner, J.O. (1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ*, **316**, 1271-5.
- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Yuuki, T., Iwamoto, N., Kojima, S., Nishiyama, C., Ogura, K., Okumura, Y. & Inagaki, F. (1998) Solution structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J. Biol. Chem.*, **273**, 356-60.
- Iciek, L.A., Delphin, S.A. & Stavnezer, J. (1997) CD40 cross-linking induces Ig epsilon germline transcripts in B cells via activation of NF-kappaB: synergy with IL-4 induction. *J. Immunol.*, **158**, 4769-79.
- Ikura, M., Bax, A., Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1990) Detection of Nuclear Overhauser Effects between Degenerate Amide Proton Resonances by Heteronuclear Three-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9020-9022.
- Ikura, M., Kay, L.E. & Bax, A. (1991) Improved three-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  correlation spectroscopy of a  $^{13}\text{C}$ -labeled protein using constant-time evolution, *J. Biomol. NMR*, **1**, 299-304.
- Irwin, S.D., Keen, J.N., Findlay, J.B. & Lord, J.M. (1990) The *Ricinus communis* 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 400-8.

- Jakobsson, I. & Lindberg, T. (1979) A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants. *Acta Paediatr. Scand.*, **68**, 853-9.
- Jankiewicz, A., Aulepp, H., Baltés, W., Bogl, K.W., Dehne, L.I., Zuberbier, T. & Vieths, S. (1996) Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **111**, 268-78.
- Jankovic, D., Aslund, L., Oswald, I.P., Caspar, P., Champion, C., Pearce, E., Coligan, J.E., Strand, M., Sher, A. & James, S.L. (1996) Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, **157**, 806-14.
- Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R. (1979) Investigation of exchange process by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546-4553.
- Johnson, B.A. & Blevins, R.A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, **4**, 603-614.
- Jones, S.M., Magnolfi, C.F., Cooke, S.K. & Sampson, H.A. (1995) Immunologic cross-reactivity among cereal grains and grasses in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 341-51.
- Kahlert, H., Petersen, A., Becker, W.-M. & Schlaak, M. (1992) Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE. *Mol. Immunol.*, **29**, 1191-201.
- Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.*, **6**, 494-500.
- Kapsenberg, M.L., Wierenga, E.A., Bos, J.D. & Jansen, H.M. (1991) Functional subsets of allergen-reactive human CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunol. Today*, **12**, 392-5.
- Karplus, M. (1995) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.*, **30**, 11-15.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Kikutani, H. (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, **1**, 167-78.

- Kay, L.E., Torchia, D.A. & Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **28**, 8972-8979.
- Keane-Myers, A.M., Gause, W.C., Finkelman, F.D., Xhou, X.D. & Wills-Karp, M. (1998) Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. *J. Immunol.*, **160**, 1036-43.
- Kemp, S.F., Lockey, R.F., Wolf, B.L. & Lieberman, P. (1995) Anaphylaxis. A review of 266 cases. *Arch. Intern. Med.*, **155**, 1749-54.
- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C. & Shore, V.C. (1960) Structure of myoglobin. *Nature*, **185**, 422-427.
- Kinet, J.P. (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 931-72.
- King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A. & Thomas, W. (1995) Allergen nomenclature. *Allergy*, **50**, 765-74.
- Klaus, W., Broger, C., Gerber, P. & Senn, H. (1993) Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. *J. Mol. Biol.*, **232**, 897-906.
- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M. & Becker, W.-M. (1999) Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **119**, 265-74.
- Kleber-Janke, T. & Becker, W.-M. (2000) Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.*, **19**, 419-24.
- Ko, T.P., Ng, J.D. & McPherson, A. (1993) The three-dimensional structure of concanavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol.*, **101**, 729-44.
- Kolarich, D. & Altmann, F. (2000) N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1. *Anal. Biochem.*, **285**, 64-75.
- Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Hessing, M. & de Jongh, H.H. (1999) Heat-

induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4770-7.

Koppelman, S.J., Vlooswijk, R.A., Knippels, L.M., Hessing, M., Knol, E.F., van Reijssen, F.C. & Bruijnzeel-Koomen, C.A. (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, *Allergy*, **56**, 132-7.

Krämer, M.H., Donadi, E.A., Tambascia, M.A., Magna, L.A. & Prigenzi, L.S. (1998) Relationship between HLA antigens and infectious agents in contributing towards the development of Graves' disease. *Immunol. Invest.*, **27**, 17-29.

Kreis, M., Forde, B.G., Rahman, S., Miflin, B.J. & Shewry, P.R. (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.*, **183**, 499-502.

Krzyzaniak, A., Burova, T., Haertlé, T. & Barciszewski, J. (1998) The structure and properties of Napin-seed storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Nahrung*, **42**, 201-204.

Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. & Bax, A. (1994) Measurements of HN-H $\alpha$  J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water flip-back methods. *J. Biomol. NMR*, **4**, 871-878.

Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. & Glimcher, L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, **80**, 707-18.

Kundrot, C.E. & Richards, F.M. (1987) Crystal structure of hen egg-white lysozyme at a hydrostatic pressure of 1000 atmospheres. *J. Mol. Biol.*, **193**, 157-70.

Kuszewski, J., Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. (1996) Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases. *Protein Sci.*, **5**, 1067-1080.

Landt, O., Grunert, H.P. & Hahn, U. (1990) A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene*. **96**, 125-8.

Larsen, J.N. & Lowenstein, H. (1996) Allergen nomenclature. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 577-8.

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.
- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss D.S. & Thornton J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., & McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology N. Y.*, **11**, 187-93.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J. & Colman, P.M. (1994) Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.*, **238**, 748-76.
- Le, H.V. & Trotta, P.P. (1991) Purification of secreted recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Bioprocess. Technol.*, **12**, 163-81.
- Lee, J.Y., Min, K., Cha, H., Shin, D.H., Hwang, K.Y. & Suh, S.W. (1998) Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J. Mol. Biol.*, **276**, 437-48.
- Lee, S.Y., Huang, C.K., Zhang, T.F., Schofield, B.H., Burks, A.W., Bannon, G.A., Sampson, H.A. & Li, X.M. (2001) Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. *Clin. Immunol.*, **101**, 220-8.
- Lehmann, K., Hoffmann, S., Neudecker, P., Suhr, M, Becker, W.-M. & Rösch, P. (2003) High-yield expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr. Purif.*, in press.
- Lehrer, S.B., Horner, W.E. & Reese, G. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 553-64.
- Lerche, M.H., Kragelund, B.B., Bech, L.M. & Poulsen, F.M. (1997) Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure*, **5**, 291-306.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.C., Gomord, V. & Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant. Mol. Biol.*, **38**, 31-48.

- Li, X., Huang, C.K., Schofield, B.H., Burks, A.W., Bannon, G.A., Kim, K.H., Huang, S.K. & Sampson, H.A. (1999) Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *J. Immunol.*, **162**, 3045-52.
- Li, X.M., Zhang, T.F., Huang, C.K., Srivastava, K., Teper, A.A., Zhang, L., Schofield, B.H. & Sampson, H.A. (2001) Food Allergy Herbal Formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, 639-46.
- Linehan, L.A., Warren, W.D., Thompson, P.A., Grusby, M.J. & Berton, M.T. (1998) STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J. Immunol.*, **161**, 302-10.
- Locksley, R.M. (1994) Th2 cells: help for helminths. *J. Exp. Med.*, **179**, 1405-7.
- Maleki, S.J., Kopper, R.A., Shin, D.S., Park, C.W., Compadre, C.M., Sampson, H., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (2000) Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.*, **164**, 5844-9.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L. & Plummer, T.H. Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.*, **180**, 195-204.
- Mari, A., Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G. & Pini, C. (1999) Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 1005-11.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin R. & Bax, A. (1989) Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Applications to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins, *J. Magn. Reson.*, **85**, 393 - 399.
- Markley, J.L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C.W., Kaptein, R., Sykes, B.D., Wright, P.E. & Wüthrich, K. (1998) Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids - IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **12**, 1-23.
- Markovic-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Muller, U. & Schirmer, T. (2000) Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure Fold Des.*, **8**, 1025-35.
- Marone, G., Kagey-Sobotka, A., & Lichtenstein, L.M. (1981). IgE-mediated histamine release

from human basophils: differences between antigen E- and anti-IgE-induced secretion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **65**, 339-48.

Marston, F.A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12.

Matricardi, P.M., Rosmini, F., Ferrigno, L., Nisini, R., Rapicetta, M., Chionne, P., Stroffolini, T., Pasquini, P. & D'Amelio, R. (1997) Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ*, **314**, 999-1003.

Matricardi, P.M., Rosmini, F., Riondino, S., Fortini, M., Ferrigno, L., Rapicetta, M. & Bonini, S. (2000) Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ*, **320**, 412-7.

Matsumura, M. & Matthews, B.W. (1989) Control of enzyme activity by an engineered disulfide bond. *Science*, **243**, 792-4.

McDonald, C.C. & Phillips, W.D. (1970) In: Fasman, G.D. & Timasheff, S.N. (Hrsg.): Fine structure of Proteins and Nucleic acids. Dekker, New York.

McKenna, C. & Klontz, K.C. (1997) Systemic allergic reaction following ingestion of undeclared peanut flour in a peanut-sensitive woman. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **79**, 234-6.

Menendez-Arias, L., Moneo, I., Dominguez, J. & Rodriguez, R. (1988) Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *Eur. J. Biochem.*, **177**, 159-66.

Menendez-Arias, L., Dominguez, J., Moneo, I. & Rodriguez, R. (1990) Epitope mapping of the major allergen from yellow mustard seeds, Sin a I. *Mol. Immunol.*, **27**, 143-50.

Metzger, H. (1992) The receptor with high affinity for IgE. *Immunol. Rev.*, **125**, 37-48.

Metzler, W.J., Valentine, K., Roebber, M., Friedrichs, M.S., Marsh, D.G. & Mueller, L. (1992) Determination of the three-dimensional solution structure of ragweed allergen Amb t V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **31**, 5117-27.

Meyer, O., & Schlegel, H.G. (1983) Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 277-310.

Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C.,

- Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B. & et al. (1993) Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, **362**, 248-50.
- Moneret-Vautrin, D.A., Rance, F., Kanny, G., Olsewski, A., Gueant, J.L., Dutau, G. & Guerin, L. (1998) Food allergy to peanuts in France--evaluation of 142 observations. *Clin. Exp. Allergy.*, **28**, 1113-9.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., O'Neil Johnson, M. & van Zijl, P.C.M. (1995) Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation, *J. Magn. Reson.*, **B108**, 94-98.
- Müller, G.A., Benjamin, D.C. & Rule, G.S. (1998) Tertiary structure of the major house dust mite allergen Der p 2: sequential and structural homologies. *Biochemistry*, **37**, 12707-14.
- Muntz, K., Christov, V., Saalbach, G., Saalbach, I., Waddell, D., Pickardt, T., Schieder, O. & Wustenhagen, T. (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung*, **42**, 125-7.
- Muren, E. & Rask, L. (1996) Processing in vitro of pronapin, the 2S storage-protein precursor of *Brassica napus* produced in a baculovirus expression system. *Planta*, **200**, 373-9.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, **247**, 536-40.
- Musu, T., Gregoire, C., David, B. & Dandeu, J.P. (1997) The relationships between the biochemical properties of allergens and their immunogenicity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **15**, 485-98.
- Mygind, N., Dahl, R., Pedersen, S. & Thestrup-Pedersen, K. (2000) *Allergologie: Textbuch und Farbatlas*, Bechtermünz Verlag, Augsburg.
- Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A. & Leung, D. (1997) Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 744-51.
- Nettis, E., Colanardi, M.C., Ferrannini, A. & Tursi, A. (2002) Latex hypersensitivity: personal data and review of the literature. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **24**, 315-34.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. & Rösch, P.

(2001a) Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22756-63.

Neudecker, P., Sticht, H. & Rösch, P. (2001b) Improving the efficiency of the Gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures. *J. Biomol. NMR.*, **21**, 373-5.

Nielsen, N.C., Dickinson, C.D., Cho, T.J., Thanh, V.H., Scallan, B.J., Fischer, R.L., Sims, T.L., Drews, G.N. & Goldberg, R.B. (1989) Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*, **1**, 313-28.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural. Syst.*, **8**, 581-99.

Nilges, M. (1996) Structure calculation from NMR data. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 617-23.

Nordlee, J.A., Taylor, S.L., Jones, R.T. & Yunginger, J.W. (1981) Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **68**, 376-82.

O'Brien, R.M., Thomas, W.R. & Tait, B.D. (1994) An immunogenetic analysis of T-cell reactive regions on the major allergen from the house dust mite, Der p I, with recombinant truncated fragments. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **93**, 628-34.

Oda, Y., Matsunaga, T., Fukuyama, K., Miyazaki, T. & Morimoto, T. (1997) Tertiary and quaternary structures of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry*, **36**, 13503-11.

Ortolani, C., Pastorello, E.A., Farioli, L., Ispano, M., Pravettoni, V., Berti, C., Incorvaia, C. & Zanussi, C. (1993) IgE-mediated allergy from vegetable allergens. *Ann. Allergy*, **71**, 470-6.

Padlan, E.A. (1996) X-ray crystallography of antibodies. *Adv. Protein Chem.*, **49**, 57-133.

Pal, M. & Biswas B.B. (1995) Expression of the *Arabidopsis thaliana* 2S albumin gene 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **153**, 175-8.

Palomares, O., Monsalve, R.I., Rodriguez, R. & Villalba, M. (2002) Recombinant pronapin precursor produced in *Pichia pastoris* displays structural and immunologic equivalent properties to its mature product isolated from rapeseed. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2538-45.

Pandya, M.J., Sessions, R.B., Williams, P.B., Dempsey, C.E., Tatham, A.S., Shewry, P.R. & Clarke, A.R. (2000) Structural characterization of a methionine-rich, emulsifying protein from

sunflower seed. *Proteins*, **38**, 341-9.

Pardi, A., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton-  $\text{C}\alpha$  proton coupling constants,  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ , in a globular protein. *J. Mol. Biol.*, **180**, 741-751.

Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A. & Romagnani, S. (1991) Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 4538-42.

Pastorello, E.A., Ortolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Incorvaia, C., Berti, C. & Zanussi, C. (1994) Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an *in vivo* and *in vitro* study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 699-707.

Pastorello, E.A., Pompei, C., Pravettoni, V., Brenna, O., Farioli, L., Trambaioli, C. & Conti, A. (2001a) Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy*, **56 Suppl 67**, 45-7.

Pastorello, E.A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., Fortunato, D., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Robino, A., Calamari, A.M., Lacava, L., Conti, A. (2001b) The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 85-93.

Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J.Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., Banchereau, J. & et al. (1988) IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **85**, 6880-4.

Perutz, M.F., Rossman, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. & North, A.C.T. (1960) Structure of haemoglobin. *Nature*, **185**, 416-422.

Pervaiz, S. & Brew, K. (1987) Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *Faseb. J.*, **1**, 209-14.

Petersen, A., Vieths, S., Aulepp, H., Schlaak, M. & Becker, W.M. (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 805-15.

Pike, A.C., Brew, K. & Acharya, K.R. (1996) Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are

significant for its action in lactose synthase. *Structure*, **4**, 691-703.

Plummer, T.H. Jr. & Tarentino, A.L. (1991) Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology*, **3**, 257-63.

Polya, G.M., Chandra, S. & Condrón, R. (1993) Purification and sequencing of radish seed calmodulin antagonists phosphorylated by calcium-dependent protein kinase. *Plant Physiol.*, **101**, 545-51.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-9.

Powell, M.J.D. (1977) Restart procedures for conjugate gradient method. *Mathem. Progr.*, **12**, 241-254 .

Prenner, C., Mach, L., Glossl, J. & Marz, L. (1992) The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine. *Biochem J*, **284**, 377-80.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15661-7.

Pumphrey, R.S. & Stanworth, S.J. (1996) The clinical spectrum of anaphylaxis in north-west England. *Clin. Exp. Allergy.*, **26**, 1364-70.

Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R. & de Vries, J.E. (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 3730-4.

Qiu, G. & Stavnezer, J. (1998) Overexpression of BSAP/Pax-5 inhibits switching to IgA and enhances switching to IgE in the I.29 mu B cell line. *J. Immunol.*, **161**, 2906-18.

Rabjohn, P., Helm, E.M., Stanley, J.S., West, C.M., Sampson, H.A., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (1999) Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J. Clin. Invest.*, **103**, 535-42.

Rabjohn, P., West, C.M., Connaughton, C., Sampson, H.A., Helm, R.M., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (2002) Modification of peanut allergen Ara h 3: effects on IgE binding and T

- cell stimulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128**, 15-23.
- Rajashankar, K. R., Bufer, A., Weber, W., Eschenburg, S., Lindner, B. & Betzel, Ch. (2002) Structure of the Functional Domain of the Major Grass-Pollen Allergen Phlp 5B. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 1175-81
- Rehm, T., Huber, R. & Holak, T.A. (2002) Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure (Camb)*, **10**, 1613-8.
- Rico, M., Bruix, M., Gonzalez, C., Monsalve, R.I. & Rodriguez, R. (1996) <sup>1</sup>H NMR assignment and global fold of napin BnIb, a representative 2S albumin seed protein. *Biochemistry*, **35**, 15672-82.
- Rihs, H.P., Chen, Z., Rueff, F., Petersen, A., Rozynek, P., Heimann, H. & Baur, X. (1999) IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 1293-301.
- Ring, J., Brockow, K. & Behrendt, H. (2001) Adverse reactions to foods. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 3-10.
- Robotham, J.M., Teuber, S.S., Sathe, S.K. & Roux, K.H. (2002) Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r 1. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **109**, 143-9.
- Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A. & Mantyljarvi, R. (1999) Probing the molecular basis of allergy. three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2337-43.
- Roy, K., Mao, H.Q., Huang, S.K. & Leong, K.W. (1999) Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.*, **5**, 387-91.
- Rozycki, M.D., Myslik, J.C., Schutt, C.E. & Lindberg, U. (1994) Structural aspects of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 87-95.
- Saalbach, G., Jung, R., Kunze, G., Saalbach, I., Adler, K. & Muntz, K. (1991) Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell*, **3**, 695-708.
- Sachs, M.I., Jones, R.T. & Yunginger, J.W. (1981) Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **67**, 27-34.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N.

- (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampson, H.A. (1983) Role of immediate food hypersensitivity in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 473-80.
- Sampson, H.A. & Albergo, R. (1984) Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **74**, 26-33.
- Sampson, H.A. & Scanlon, S.M. (1989) Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.*, **115**, 23-7.
- Sampson, H.A., Mendelson, L. & Rosen, J.P. (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.*, **327**, 380-4.
- Samuel, D., Liu, Y.J., Cheng, C.S. & Lyu, P.C. (2002) Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.*, **277**, 35267-73.
- Sayle, R. (1995) RasMol V2.6, Glaxo Wellcome Research and Development.
- Scheurer, S., Son, D.Y., Boehm, M., Karamloo, F., Franke, S., Hoffmann, A., Hausteiner, D. & Vieths, S. (1999) Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol. Immunol.*, **36**, 155-67.
- Schneider, T., Lang, A.B., Carballido, J.M., Santamaria Babi, L.F., Dudler, T., Kagi, M.K., Blaser, K. & Suter, M. (1994) Human monoclonal or polyclonal antibodies recognize predominantly discontinuous epitopes on bee venom phospholipase A2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 61-70.
- Schwartz, R.H. (1992) Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, **71**, 1065-8.
- Schweimer, K. (1997) Linear Prediction, spektrale Dekonvolution und digitale Filter - Hilfsmittel zur Prozessierung mehrdimensionaler NMR-Daten. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Schweimer, K., Sticht, H., Nerkamp, J., Boehm, M., Breitenbach, M., Vieths, S. & Rösch, P. (1999) NMR Spectroscopy Reveals Common Structural Features of the Birch Pollen Allergen

- Bet v 1 and the Cherry Allergen Pru a 1. *Applied Magnetic Resonance*, **17**, 449-446.
- Schweimer K. (2000) Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des *Guillardia theta* Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus *Halobacterium salinarum*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H. & Sigler, P.B. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science*, **250**, 1563-6.
- Scott, M.P., Jung, R., Muntz, K. & Nielsen, N.C. (1992) A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **15**, 658-62.
- Sen, M., Kopper, R., Pons, L., Abraham, E.C., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (2002) Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J. Immunol.*, **169**, 882-7.
- Shaka, A.J., Keeler, J., Frenkiel, T. & Freeman, R. (1983) An improved sequence for broadband decoupling: Waltz-16. *J. Mag. Reson.*, **52**, 335-338.
- Shanti, K.N., Martin, B.M., Nagpal, S., Metcalfe, D.D. & Rao, P.V. (1993) Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.*, **151**, 5354-63.
- Shewry, P.R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S. & Mills, E.N. (2002) Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 906-10.
- Shin, D.H., Lee, J.Y., Hwang, K.Y., Kim, K.K. & Suh, S.W. (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure*, **3**, 189-99.
- Shin, D.S., Compadre, C.M., Maleki, S.J., Kopper, R.A., Sampson, H., Huang, S.K., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (1998) Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13753-9.
- Sicherer, S.H., Burks, A.W. & Sampson, H.A. (1998) Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*, **102**, e6.
- Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Burks, A.W. & Sampson, H.A. (1999) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 559-62.

- Sicherer, S.H., Morrow, E.H. & Sampson, H.A. (2000) Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 582-6.
- Sicherer, S.H. (2002) Clinical update on peanut allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **88**, 350-61; quiz 361-2, 394.
- Son, D.Y., Scheurer, S., Hoffmann, A., Haustein, D. & Vieths, S. (1999) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur. J. Nutr.*, **38**, 201-15.
- Stanley, J.S., King, N., Burks, A.W., Huang, S.K., Sampson, H., Cockrell, G., Helm, R.M., West, C.M. & Bannon, G.A. (1997) Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 244-53.
- Stewart, E.J., Aslund, F., & Beckwith, J. (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *Embo J.*, **17**, 5543-50.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, **75**, 687-706.
- Strobl, S., Muhlhahn, P., Bernstein, R., Wiltscheck, R., Maskos, K., Wunderlich, M., Huber, R., Glockshuber, R., Holak, T.A. (1995) Determination of the three-dimensional structure of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from ragi seeds by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 8281-93.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-30.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, **219**, 37-44.
- Talluri, S. & Wagner, G. (1996) An Optimized 3D NOESY-HSQC, *J. Magn. Reson.*, **B112**, 200-205.
- Tassin, S., Broekaert, W.F., Marion, D., Acland, D.P., Ptak, M., Vovelle, F. & Sodano, P. (1998) Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry*, **37**, 3623-37.

- Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Douliez, J.P., Marion, D. & Vovelle F. (2000) The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1117-24.
- Terras, F.R., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R.W., Vanderleyden, J., Cammue, B.P. & Broekaert, W.F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, **316**, 233-40.
- Teuber, S.S., Dandekar, A.M., Peterson, W.R. & Sellers, C.L. (1998) Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 807-14.
- Thomas, M.R. (1994) Simple, effective cleanup of DNA ligation reaction prior to electrotransformation of *E. coli*. *BioTechniques*, **16**, 988-990.
- Tretter, V., Altmann, F. & Marz, L. (1991) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 647-52.
- Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., Marz, L. & Becker, W.M. (1993) Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **102**, 259-66.
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelman, H., Kraft, D. & et al. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.*, **175**, 377-85.
- Van der Veen, M.J., van Ree, R., Aalberse, R.C., Akkerdaas, J., Koppelman, S.J., Jansen, H.M. & Van der Zee, J.S. (1997) Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 327-34.
- Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 538-51.
- Van Neerven, R.J., van de Pol, M.M., van Milligen, F.J., Jansen, H.M., Aalberse R.C. & Kapsenberg, M.L. (1994) Characterization of cat dander-specific T lymphocytes from atopic patients. *J. Immunol.*, **152**, 4203-10.
- Van Ree, R., Fernandez-Rivas, M., Cuevas, M., van Wijngaarden, M. & Aalberse, R.C.

- (1995) Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 726-34.
- Van Ree, R. & Aalberse, R.C. (1999) Specific IgE without clinical allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 1000-1.
- Van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L. & Lerouge, P. (2000) Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11451-8.
- Van Ree, R. (2002) Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 189-97.
- Verdino, P., Westritschnig, K., Valenta, R. & Keller, W. (2002) The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *Embo J.*, **21**, 5007-16.
- Vieths, S., Frank, E., Scheurer, S., Meyer, H.E., Hrazdina, G. & Haustein, D. (1998) Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods. *Scand. J. Immunol.*, **47**, 263-72.
- Vieths, S., Scheurer, S. & Ballmer-Weber, B. (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **964**, 47-68.
- Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C. & Rodriguez, R. (1994) Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15217-22.
- Viquez, O.M., Summer, C.G. & Dodo, H.W. (2001) Isolation and molecular characterization of the first genomic clone of a major peanut allergen, Ara h 2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **107**, 713-7.
- Virtanen, T. (2001) Lipocalin allergens. *Allergy*, **56 Suppl 67**, 48-51.
- Von Mutius, E., Martinez, F.D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G. & Thiemann, H.H. (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **149**, 358-64.
- Vuister, G.W. & Bax, A. (1992) Resolution Enhancement and Spectral Editing of Uniformly <sup>13</sup>C-Enriched Proteins by Homonuclear Broadband <sup>13</sup>C Decoupling. *J. Magn. Reson.*, **98**, 428-435.

- Vuister, G.W. & Bax, A. (1993) Quantitative J Correlation: A New Approach for Measuring Homonuclear Three-Bond J(HNH $\alpha$ ) Coupling Constants in  $^{15}\text{N}$ -Enriched Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7772-7777.
- Wal, J.M. (2001) Structure and function of milk allergens. *Allergy*, **56 Suppl 67**, 35-8.
- Warren, W.D., Roberts, K.L., Linehan, L.A. & Berton, M.T. (1999) Regulation of the germline immunoglobulin Cgamma1 promoter by CD40 ligand and IL-4: dual role for tandem NF-kappaB binding sites. *Mol. Immunol.*, **36**, 31-44.
- Wellhausen, A., Schoning, B., Petersen, A. & Vieths, S. (1996) IgE binding to a new cross-reactive structure: a 35 kDa protein in birch pollen, exotic fruit and other plant foods. *Z. Ernährungswiss.*, **35**, 348-55.
- Wierenga, E.A., Snoek, M., de Groot, C., Chretien, I., Bos, J.D., Jansen, H.M. & Kapsenberg, M.L. (1990) Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.*, **144**, 4651-6.
- Williamson, M.P., Havel, T.F. & Wüthrich, K. (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.*, **182**, 295-315.
- Wilson, I.B. & Altmann, F. (1998) Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. *Glycoconj. J.*, **15**, 1055-70.
- Wishart, D. S. & Sykes, B.D. (1994) Chemical Shifts as a Tool for Structure Determination, in: James, T.L. & Oppenheimer, N.J. (Hrsg.): Nuclear Magnetic Resonance. *Methods in Enzymology*, **239**, 363-392.
- Wittekind, M. & Mueller, L. (1993) HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins, *J. Magn. Reson.*, **B101**, 201-205.
- Wüthrich, B., Schindler, C., Leuenberger, P. & Ackermann-Liebrich, U. (1995) Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **106**, 149-56.
- Xiang, P., Beardslee, T.A., Zeece, M.G., Markwell, J. & Sarath, G. (2002) Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **408**, 51-7.

- Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., Komiyama, T., Kitagawa, K., Akasawa, A. & Ikezawa, Z. (1998) Plant defense-related enzymes as latex antigens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 379-85.
- Yagami, T. (2002) Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128**, 271-9.
- Yang, X. & Moffat, K. (1996) Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin. *Structure*, **4**, 837-52.
- Yocum, M.W. & Khan, D.A. (1994) Assessment of patients who have experienced anaphylaxis: a 3-year survey. *Mayo Clin. Proc.*, **69**, 16-23.
- Youle, R.J. & Huang, A.H. (1979) Albumin storage protein and allergens in cottonseeds. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 500-3.
- Yssel, H., Johnson, K.E., Schneider, P.V., Wideman, J., Terr, A., Kastelein, R. & De Vries, J.E. (1992) T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones. *J. Immunol.*, **148**, 738-45.
- Yunginger, J.W., Sweeney, K.G., Sturner, W.Q., Giannandrea, L.A., Teigland, J.D., Bray, M., Benson, P.A., York, J.A., Biedrzycki, L., Squillace, D.L. & et al. (1988) Fatal food-induced anaphylaxis. *Jama*, **260**, 1450-2.
- Zeiler, T., Taivainen, A., Rytönen, M., Rautiainen, J., Karjalainen, H., Mantylarvi, R., Tuomisto, L. & Virtanen, T. (1997) Recombinant allergen fragments as candidate preparations for allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 721-7.
- Zhang, W., Smithgall, T.E. & Gmeiner, W.H. (1997) Three-dimensional structure of the Hck SH2 domain in solution. *J. Biomol. NMR*, **10**, 263-272.

## 10 Anhang

### 10.1 Nukleinsäuresequenzen

#### ■ pBluescript-Arah2

```

1  CAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA 60
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCAGTGTGCAACATTTGCTGCCGGTCACCTAACATTATGCTGAGTGATATCCCGCTT
a  Q  S  R  R  C  K  T  T  A  S  E  L  *  Y  D  S  L  *  G  E  -

                                     EcoRI
61  TTGGAGCTCCACCGGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAA 120
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACCTCGAGGTGGCGCCACCGCGGCGAGATCTTGATCACCTAGGGGGCCCGACGTCCTT
a  L  E  L  H  R  G  G  G  R  S  R  T  S  G  S  P  G  L  Q  E  -

                                     NcoI
121  TTCACCATGGCGCGTCAGCAGTGGAACTCCAAGGAGACAGAAGATGCCAGAGCCAGCTC 180
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTGGTACCGCGCAGTCGTCACCCTTGAGGTTCTCTGTCTTCTACGGTCTCGGTTCGAG
a  F  T  M  A  R  Q  Q  W  E  L  Q  G  D  R  R  C  Q  S  Q  L  -

181  GAGAGGGCGAACCTTAGGCCCTGCGAGCAACATCTCATGCAGAAAATCCAACGTGACGAG 240
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTCCCGCTTGAATCCGGGACGCTCGTTGTAGAGTACGCTTTTTAGGTTGCACTGCTC
a  E  R  A  N  L  R  P  C  E  Q  H  L  M  Q  K  I  Q  R  D  E  -

241  GATTCATATGAACGGGATCCGTACAGCCCTAGTCAGGACCCGTACAGCCCTAGTCCATAT 300
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAAGTATACTTGCCTTAGGCATGTGCGGATCAGTCCTGGGCATGTGCGGATCAGGTATA
a  D  S  Y  E  R  D  P  Y  S  P  S  Q  D  P  Y  S  P  S  P  Y  -

301  GATCGGAGAGGGCTGGATCCTCTCAGCACCAAGAGAGGTGTGCAATGAGCTGAACGAG 360
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGCCTCTCCGCGACCTAGGAGAGTCGTGGTTCTCTCCACAACGTTACTCGACTTGCTC
a  D  R  R  G  A  G  S  S  Q  H  Q  E  R  C  C  N  E  L  N  E  -

361  TTTGAGAACAACCAAAGGTGCATGTGCGAGGCATTGCAACAGATAATGGAGAACCAGAGC 420
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAACTCTTGTGGTTTCCACGTACACGCTCCGTAACGTTGTCTATTACCTCTTGGTCTCG
a  F  E  N  N  O  R  C  M  C  E  A  L  Q  Q  I  M  E  N  O  S  -

421  GATAGGTTGCAGGGGAGGCAACAGGAGCAACAGTTCAAGAGGGAGCTCAGGAACTTGCTT 480
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTATCCAACGTCCCTCCGTTGTCCTCGTTGTCAAGTCTCCCTCGAGTCTTGAACGGA
a  D  R  L  Q  G  R  Q  Q  E  Q  Q  F  K  R  E  L  R  N  L  P  -

481  CAACAGTGCGGCCTCAGGGCACACAGCGTTGCGACTTGGATGTCGAAAGTGGCGGCAGA 540
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGTCACGCCGAGTCCCGTGGTGTGCGAACGCTGAACCTACAGCTTTCACCGCCGTCT
a  Q  Q  C  G  L  R  A  P  Q  R  C  D  L  D  V  E  S  G  G  R  -

                                     HindIII
                                     Bpu1102I
541  GACAGATACTAAGCTGAGCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGTAC 600
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGTCTATGATTGACTCGTTCGAATAGCTATGGCAGCTGGAGCTCCCCCGGGCCATG
a  D  R  Y  *  A  E  Q  A  Y  R  Y  R  R  P  R  G  G  A  R  Y  -

601  CAGCTTTTGTTCCTTTTGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCA 655
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGAAAACAAGGGAAATCACTCCAATTAAGCTCGAACCGCATTAGTACCAGT
a  Q  L  L  F  P  L  V  R  V  N  F  E  L  G  V  I  M  V  -

```

## ■ pET32a-Trx-His-PR-Arah2

```

      CCATATGCACCATCATCATCATCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTCTGGTATGAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      GGTATACGTGGTAGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCATACTT

b      H M H H H H H H S S G L V P R G S G M K -

                                     BglIII
                                     |
      AGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGCTGGAAGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      TCTTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCTGTACCTGTTCGGGTCTAGACGACCTTCA

b      E T A A A K F E R Q H M D S P D L L E V -

      GCTGTTTCAGGGCCCGCTCAGCAGTGGAACTCCAAGGAGACAGAAGATGCCAGAGCCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      CGACAAAGTCCCAGGCGCAGTCGTACCCCTTGAGGTTCTCTGTCTTCTACGGTCTCGGT

b      L F Q G P R Q Q W E L Q G D R R C Q S Q -

      GCTCGAGAGGGCGAACCTTAGGCCCTGCGAGCAACATCTCATGCAGAAAATCCAACGTGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      CGAGCTCTCCCGCTTGAATCCGGGACGCTCGTTGTAGAGTACGTCTTTTAGGTTGCACT

b      L E R A N L R P C E Q H L M Q K I Q R D -

      CGAGGATTTCATATGAACGGGATCCGTACAGCCCTAGTCAGGACCCGTACAGCCCTAGTCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      GCTCCTAAGTATACTTGCCCTAGGCATGTCCGGATCAGTCTGGGCATGTCCGGATCAGG

b      E D S Y E R D P Y S P S Q D P Y S P S P -

      ATATGATCGGAGAGGGCGCTGGATCCTCTCAGCACCAAGAGAGGTGTTGCAATGAGCTGAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      TATACTAGCCTCTCCGCGACCTAGGAGAGTCGTGGTTCTCTCCACAACGTTACTCGACTT

b      Y D R R G A G S S O H Q E R C C N E L N -

      CGAGTTTGAGAACAACCAAGGTGCATGTGCGAGGCATTGCAACAGATAATGGAGAACCA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      GCTCAAACCTCTTGTGGTTTCCACGTACAGCTCCGTAACGTTGTCTATACCTCTTGGT

b      E F E N N Q R C M C E A L Q Q I M E N Q -

      GAGCGATAGGTTGCGAGGGAGGGCAACAGGAGCAACAGTTCAGAGGGAGCTCAGGAACTT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      CTCGCTATCCAACGTCCCCTCCGTTGTCTCGTTGTCAAGTTCTCCCTCGAGTCTTGAA

b      S D R L Q G R Q Q E Q Q F K R E L R N L -

      GCCTCAACAGTGCGGCCTCAGGGCACCACAGCGTTGCGACTTGGATGTCGAAAGTGGCGG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      CGGAGTTGTACGCCGAGTCCCGTGGTGTGCAACGCTGAACCTACAGCTTTACCCGCC

b      P Q Q C G L R A P Q R C D L D V E S G G -

                                     Bpu1102I
                                     |
      CAGAGACAGATACTAAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      GTCTCTGTCTATGATTGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTTGCCCA

b      R D R Y * A E Q * L A * P L G A S K R V -

      CTTGAGGGGTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 637
      GAACTCCCACAAAACGACTTTCCTCCTTGATATAGGC

b      L R G F C * K E E L Y P -

```

## ■ pET32a-Trx-His-EK-Arah2

```

      CCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      GGCCAAGACCAAGACCGGTATACGTGGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTG
c      G S G S G H M H H H H H S S G L V P R -
      GCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CGCCAAGACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGGCGTGTACCTGTTCGG
c      G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P -
      BglII
      |
      CAGATCTGGACGACGACGACAAGCGTCAGCAGTGGGAAGTCCAAGGAGACAGAAGATGCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GTCTAGACCTGCTGCTGCTGTTTCGCAGTCGTACCCCTTGAGGTTCCCTGTCTTCTACGG
c      D L D D D D K R Q Q W E L Q G D R R C Q -
      AGAGCCAGCTCGAGAGGGCGAACCTTAGGCCCTGCGAGCAACATCTCATGCAGAAAATCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      TCTCGGTCGAGCTCTCCCGCTTGAATCCGGGACGCTCGTTGTAGAGTACGTCTTTTAGG
c      S Q L E R A N L R P C E O H L M Q K I Q -
      AACGTGACGAGGATTCATATGAACGGGATCCGTACAGCCCTAGTCAGACCCGTACAGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      TTGCACTGCTCCTAAGTATACTTGCCCTAGGCATGTCCGGATCAGTCTGGGCATGTCCGG
c      R D E D S Y E R D P Y S P S Q D P Y S P -
      CTAGTCCATATGATCGGAGAGGCGCTGGATCCTCTCAGCACCAAGAGAGGTGTTGCAATG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      GATCAGGTATACTAGCCTCTCCGCGACCTAGGAGAGTCTGGTTCTCTCCACAACGTTAC
c      S P Y D R R G A G S S O H Q E R C C N E -
      AGCTGAACGAGTTTGAGAACAACCAAAGGTGCATGTGCGAGGCATTGCAACAGATAATGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      TCGACTTGCTCAAACCTCTGTTGGTTTCCACGTACACGCTCCGTAACGTTGTCTATTACC
c      L N E F E N N O R C M C E A L O O I M E -
      AGAACCAGAGCGATAGGTTGCAGGGGAGGCAACAGGAGCAACAGTTCAAGAGGGAGCTCA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      TCTTGGTCTCGCTATCCAACGTCCCTCCGTTGTCTCGTTGTCAAGTTCTCCCTCGAGT
c      N O S D R L O G R Q O E O Q F K R E L R -
      GGAACTTGCCCTCAACAGTGCAGGCTCAGGGCACCACAGCGTTGCGACTTGGATGTGCGAAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      CCTTGAACGGAGTTGTACGCCGAGTCCCGTGGTGTGCGAACGCTGAACCTACAGCTTT
c      N L P Q Q C G L R A P Q R C D L D V E S -
      Bpu1102I
      |
      GTGGCGGACAGAGACAGATACTAAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      CACCGCGTCTCTGTCTATGATTCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGAACCCCGGAGATT
c      G R D R Y * A E Q * L A * P L G P L N -
      ACGGGTCTGAGGG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 613
      TGCCAGACTCCC
c      G S E -

```

## ■ pET32a-Trx-His-PR-Arah6

```

1  CCCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGG 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
c  L A G S G S G H M H H H H H S S G L V -
   TGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTGGAACGCCAGCATGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   ACGGTGCGCCAAGACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCTGTACC
c  P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D -
   BglII
   |
121 ACAGCCCAGATCTGCTGGAAGTGTGTTTCAGGGCCCGATGAGGCGGAGAGGGGGAGAC 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
c  S P D L L E V L F Q G P M R R E R G R Q -
   AGGGGGACTCATCAAGCTGCGAGAGGCAGGTAGACAGGGTTAACCTCAAGCCCTGCGAGC
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   TCCCCTGAGTAGTTCGACGCTCTCCGTCCATCTGTCCCAATTGGAGTTCGGGACGCTCG
c  G D S S S C E R Q V D R V N L K P C E Q -
   AGCACATAATGCAGAGGATCATGGGCGAGCAAGAGCAGTACGACTCCTACGATATTAGGA
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   TCGTGTATTACGTCTCCTAGTACCCGCTCGTTCTCGTCATGCTGAGGATGCTATAATCCT
c  H I M Q R I M G E Q E Q Y D S Y D I R S -
   GTACTCGATCCTCCGACCAGCAACAGAGGTGCTGCGATGAGCTGAACGAGATGGAGAACA
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   CATGAGCTAGGAGGCTGGTCTGTCTCCACGACGCTACTCGACTTGCTCTACCTCTTGT
c  T R S S D Q O Q O R C C D E L N E M E N T -
   CACAGGGATGCATGTGCGAGGCATTGCAGCAGATAATGGAGAACCAGTGCATAGGTTGC
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   GTGTCCCTACGTACACGCTCCGTAACGTCTATTACCTCTTGGTCACGCTATCCAACG
c  Q G C M C E A L Q O I M E N O C D R L Q -
   AGGACAGGCAAATGGTGCAGCAGTTCAAGAGAGAGCTCATGAGCTTGCCCAACAGTGTA
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   TCCTGTCCGTTTACCACGTCGTCAAGTTCTCTCGAGTACTCGAACGGGGTTGTCACAT
c  D R Q M V Q Q F K R E L M S L P Q Q C N -
   Bpu1102I
   |
481 ACTTTAGGGCACCCACAGCGTTGCGATTTGGACGTGAGTGGCGGCAGATGCAGTTAAGCTG 540
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
c  F R A P Q R C D L D V S G G R C S * A E -
   AGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGTA
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
   TCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAACGACT
c  Q * L A * P L G A S K R V L R G F L L K -
AA
601 -- 602
TT

```

## ■ pET32a-Trx-His-PR-Arah2\_SYN

```

CTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GACCGGTATACGTGGTAGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCAT
c      G H M H H H H H H S S G L V P R G S G M -

                                     BglII
                                     |
TGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGCTGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ACTTTCCTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCTGTACCTGTGCGGTCTAGACGACC
c      K E T A A A K F E R Q H M D S P D L L E -

AAGTGTCTGTTTCAGGGCCCGCCAGCAGTGGGAACGCAGGGCGATCGCCGCTGCCAGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TTCACGACAAAGTCCCGGGCGCGGTCTGTCACCTTGACGTCCCGCTAGCGGGCAGCGTCT
c      V L F Q G P R O Q W E L O G D R R C Q S -

GCCAGCTGGAACCGCGAACCTGCGCCCGTGCGAACAGCATCTGATGCAGAAAATTCAGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGGTCGACCTTGGCGGCTTGGACGCGGGCAGCCTTGTCTGACTACGTCTTTTAAGTCG
c      Q L E R A N L R P C E Q H L M Q K I O R -

GCGATGAAGATAGCTATGAACGCGATCCGTATAGCCGAGCCAGGATCCGTATAGCCCGA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGTACTTCTATCGATACTTGGCTAGGCATATCGGGCTCGTCTTAGGCATATCGGGCT
c      D E D S Y E R D P Y S P S Q D P Y S P S -

GCCCCTATGATCGCCGCGCGGGCAGCAGCCAGCATCAGGAACGCTGCTGCAACGAAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CGGGCATACTAGCGGCGCGCCCGTCTGCTCGTCTAGTCTTGGCAGACGTTGCTTG
c      P Y D R R G A G S S Q H Q E R C C N E L -

TGAAACGAATTTGAAAACAACCGCGCTGCATGTGCGAAGCGCTGCAGCAGATTATGGAAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACTTGTCTAAACTTTTGTGGTTCGCGACGTACACGCTTTCGCGACGCTCTAATACCTTT
c      N E F E N N Q R C M C E A L Q Q I M E N -

ACCAGAGCGATCGCCTGCAGGGCCGCCAGCAGGAACAGCAGTTTAAACGCGAACTGCGCA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TGGTCTCGCTAGCGGACGTCCCGCGGTCTCCTTGTCTCAAATTTGCGCTTGACGCGT
c      Q S D R L O G R O O E O O F K R E L R N -

ACCTGCCGAGCAGTGCAGCCTGCGCGCGCCCGCAGCGCTGCGATCTGGATGTGGAAGCG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TGGACGGCTCGTACGCGCGGACGCGCGGGGTGCGGACGCTAGACCTACACCTTTTCGC
c      L P O O C G L R A P O R C D L D V E S G -

                                     Bpu1102I
                                     |
GCGGCCGCGATCGCTATTAAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CGCCGGCGCTAGCGATAATTCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTG
c      G R D R Y * A E Q * L A * P L G A S K R -

GGTCTTGAGGGGTTTTTTTGTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCCAGAACTCCCAAAAAAAGACTTTCTCCTTGATATAGGCTAACCGCTTACCCTGC
c      V L R G F F A E R R N Y I R I G E W D A -

CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGG
661 -----+-----+-----+-----+ 690
GCGGGACATCGCCCGGTAATTCGCGCGCGC
c      P C S G A L S A A -

```

## 10.2 Chemische Verschiebungen

Die zugeordneten chemischen Verschiebungen sind im Format der BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) angegeben .

114	8	GLY	H	H	8.62	217	17	GLU	CB	C	29.20
115	8	GLY	HA2	H	-	218	17	GLU	CG	C	36.39
116	8	GLY	HA3	H	3.93	220	17	GLU	N	N	121.86
117	8	GLY	C	C	175.89	221	18	ARG	H	H	7.71
118	8	GLY	CA	C	45.45	222	18	ARG	HA	H	4.18
119	8	GLY	N	N	110.19	223	18	ARG	HB2	H	1.90
120	9	ARG	H	H	8.24	224	18	ARG	HB3	H	2.03
121	9	ARG	HA	H	4.38	225	18	ARG	HG2	H	-
122	9	ARG	HB2	H	1.80	226	18	ARG	HG3	H	1.72
123	9	ARG	HB3	H	1.80	227	18	ARG	HD2	H	-
124	9	ARG	HG2	H	-	228	18	ARG	HD3	H	3.25
125	9	ARG	HG3	H	1.63	234	18	ARG	C	C	178.80
126	9	ARG	HD2	H	-	235	18	ARG	CA	C	58.22
127	9	ARG	HD3	H	3.19	236	18	ARG	CB	C	29.89
133	9	ARG	C	C	176.53	237	18	ARG	CG	C	27.38
134	9	ARG	CA	C	56.26	238	18	ARG	CD	C	43.24
135	9	ARG	CB	C	30.92	240	18	ARG	N	N	117.45
136	9	ARG	CG	C	27.19	244	19	GLN	H	H	7.93
137	9	ARG	CD	C	43.32	245	19	GLN	HA	H	4.05
139	9	ARG	N	N	120.74	246	19	GLN	HB2	H	-
143	10	GLN	H	H	8.69	247	19	GLN	HB3	H	2.20
144	10	GLN	HA	H	4.33	248	19	GLN	HG2	H	2.42
145	10	GLN	HB2	H	2.06	249	19	GLN	HG3	H	2.61
146	10	GLN	HB3	H	2.06	250	19	GLN	HE21	H	-
147	10	GLN	HG2	H	-	251	19	GLN	HE22	H	-
148	10	GLN	HG3	H	2.38	252	19	GLN	C	C	179.27
149	10	GLN	HE21	H	-	253	19	GLN	CA	C	59.01
150	10	GLN	HE22	H	-	254	19	GLN	CB	C	28.86
151	10	GLN	C	C	175.50	255	19	GLN	CG	C	34.54
152	10	GLN	CA	C	56.24	257	19	GLN	N	N	118.46
153	10	GLN	CB	C	29.31	258	19	GLN	NE2	N	-
154	10	GLN	CG	C	33.85	259	20	VAL	H	H	8.27
156	10	GLN	N	N	122.04	260	20	VAL	HA	H	3.67
157	10	GLN	NE2	N	-	261	20	VAL	HB	H	2.13
158	11	GLY	H	H	8.47	262	20	VAL	HG1	H	0.99
159	11	GLY	HA2	H	3.99	263	20	VAL	HG2	H	0.90
160	11	GLY	HA3	H	3.99	264	20	VAL	C	C	177.46
161	11	GLY	C	C	176.48	265	20	VAL	CA	C	65.80
162	11	GLY	CA	C	45.31	266	20	VAL	CB	C	31.58
163	11	GLY	N	N	110.66	267	20	VAL	CG1	C	23.65
164	12	ASP	H	H	8.39	268	20	VAL	CG2	C	20.47
165	12	ASP	HA	H	4.66	269	20	VAL	N	N	119.42
166	12	ASP	HB2	H	-	270	21	ASP	H	H	7.61
167	12	ASP	HB3	H	-2.72	271	21	ASP	HA	H	4.51
168	12	ASP	C	C	176.88	272	21	ASP	HB2	H	2.68
169	12	ASP	CA	C	54.19	273	21	ASP	HB3	H	2.82
170	12	ASP	CB	C	41.35	274	21	ASP	C	C	177.04
172	12	ASP	N	N	120.66	275	21	ASP	CA	C	56.43
173	13	SER	H	H	8.46	276	21	ASP	CB	C	41.55
174	13	SER	HA	H	4.45	278	21	ASP	N	N	118.03
175	13	SER	HB2	H	-	279	22	ARG	H	H	7.17
176	13	SER	HB3	H	3.88	280	22	ARG	HA	H	4.30
178	13	SER	C	C	175.01	281	22	ARG	HB2	H	1.88
179	13	SER	CA	C	58.96	282	22	ARG	HB3	H	2.05
180	13	SER	CB	C	63.86	283	22	ARG	HG2	H	-
181	13	SER	N	N	116.88	284	22	ARG	HG3	H	1.86
182	14	SER	H	H	8.33	285	22	ARG	HD2	H	-
183	14	SER	HA	H	4.54	286	22	ARG	HD3	H	3.24
184	14	SER	HB2	H	3.92	292	22	ARG	C	C	176.67
185	14	SER	HB3	H	4.14	293	22	ARG	CA	C	56.56
187	14	SER	C	C	175.09	294	22	ARG	CB	C	31.22
188	14	SER	CA	C	58.67	295	22	ARG	CG	C	27.61
189	14	SER	CB	C	64.08	296	22	ARG	CD	C	43.73
190	14	SER	N	N	117.62	298	22	ARG	N	N	114.86
191	15	SER	H	H	8.44	302	23	VAL	H	H	7.49
192	15	SER	HA	H	4.36	303	23	VAL	HA	H	4.34
193	15	SER	HB2	H	3.99	304	23	VAL	HB	H	2.33
194	15	SER	HB3	H	4.12	305	23	VAL	HG1	H	0.91
196	15	SER	C	C	176.48	306	23	VAL	HG2	H	0.99
197	15	SER	CA	C	59.31	307	23	VAL	C	C	174.45
198	15	SER	CB	C	63.86	308	23	VAL	CA	C	61.05
199	15	SER	N	N	117.88	309	23	VAL	CB	C	33.47
200	16	CYS	H	H	8.97	310	23	VAL	CG1	C	22.10
201	16	CYS	HA	H	4.35	311	23	VAL	CG2	C	20.08
202	16	CYS	HB2	H	-	312	23	VAL	N	N	117.41
203	16	CYS	HB3	H	-	313	24	ASN	H	H	8.56
205	16	CYS	C	C	176.60	314	24	ASN	HA	H	4.89
206	16	CYS	CA	C	56.27	315	24	ASN	HB2	H	2.70
207	16	CYS	CB	C	36.08	316	24	ASN	HB3	H	2.96
208	16	CYS	N	N	119.59	317	24	ASN	HD21	H	-
209	17	GLU	H	H	8.74	318	24	ASN	HD22	H	-
210	17	GLU	HA	H	3.89	319	24	ASN	C	C	174.47
211	17	GLU	HB2	H	-	320	24	ASN	CA	C	51.35
212	17	GLU	HB3	H	2.06	321	24	ASN	CB	C	37.90
213	17	GLU	HG2	H	-	323	24	ASN	N	N	121.51
214	17	GLU	HG3	H	2.31	324	24	ASN	ND2	N	-
215	17	GLU	C	C	178.29	325	25	LEU	H	H	8.52
216	17	GLU	CA	C	60.38	326	25	LEU	HA	H	4.25

327	25	LEU	HB2	H	-	445	33	MET	C	C	178.94
328	25	LEU	HB3	H	-	446	33	MET	CA	C	57.18
329	25	LEU	HG	H	-	447	33	MET	CB	C	30.79
330	25	LEU	HD1	H	0.88	448	33	MET	CG	C	32.34
331	25	LEU	HD2	H	0.71	449	33	MET	CE	C	16.61
333	25	LEU	CA	C	-	450	33	MET	N	N	115.91
334	25	LEU	CB	C	-	451	34	GLN	H	H	8.23
335	25	LEU	CG	C	-	452	34	GLN	HA	H	3.99
336	25	LEU	CD1	C	-	453	34	GLN	HB2	H	2.10
337	25	LEU	CD2	C	-	454	34	GLN	HB3	H	2.23
338	25	LEU	N	N	120.75	455	34	GLN	HG2	H	2.40
339	26	LYS	H	H	7.88	456	34	GLN	HG3	H	2.61
340	26	LYS	HA	H	4.15	457	34	GLN	HE21	H	-
341	26	LYS	HB2	H	1.88	458	34	GLN	HE22	H	-
342	26	LYS	HB3	H	2.07	459	34	GLN	C	C	179.25
343	26	LYS	HG2	H	1.58	460	34	GLN	CA	C	58.76
344	26	LYS	HG3	H	1.73	461	34	GLN	CB	C	27.73
345	26	LYS	HD2	H	1.70	462	34	GLN	CG	C	34.35
346	26	LYS	HD3	H	1.70	464	34	GLN	N	N	118.61
347	26	LYS	HE2	H	2.86	465	34	GLN	NE2	N	-
348	26	LYS	HE3	H	2.97	466	35	ARG	H	H	7.69
351	26	LYS	CA	C	60.83	467	35	ARG	HA	H	3.93
352	26	LYS	CB	C	29.32	468	35	ARG	HB2	H	1.58
353	26	LYS	CG	C	25.02	469	35	ARG	HB3	H	1.84
354	26	LYS	CD	C	29.58	470	35	ARG	HG2	H	-
355	26	LYS	CE	C	41.88	471	35	ARG	HG3	H	1.33
356	26	LYS	N	N	121.79	472	35	ARG	HD2	H	2.85
358	27	PRO	HA	H	4.47	473	35	ARG	HD3	H	2.96
359	27	PRO	HB2	H	1.65	479	35	ARG	C	C	179.12
360	27	PRO	HB3	H	2.33	480	35	ARG	CA	C	58.17
361	27	PRO	HG2	H	1.94	481	35	ARG	CB	C	29.51
362	27	PRO	HG3	H	1.94	482	35	ARG	CG	C	26.88
363	27	PRO	HD2	H	3.41	483	35	ARG	CD	C	42.49
364	27	PRO	HD3	H	3.80	485	35	ARG	N	N	118.98
365	27	PRO	C	C	179.05	489	36	ILE	H	H	7.82
366	27	PRO	CA	C	65.91	490	36	ILE	HA	H	4.19
367	27	PRO	CB	C	31.34	491	36	ILE	HB	H	2.03
368	27	PRO	CG	C	28.58	492	36	ILE	HG12	H	-
369	27	PRO	CD	C	49.81	493	36	ILE	HG13	H	1.51
371	28	CYS	H	H	7.39	494	36	ILE	HG2	H	0.87
372	28	CYS	HA	H	4.53	495	36	ILE	HD1	H	0.94
373	28	CYS	HB2	H	3.22	496	36	ILE	C	C	177.34
374	28	CYS	HB3	H	2.95	497	36	ILE	CA	C	63.28
376	28	CYS	C	C	176.23	498	36	ILE	CB	C	38.19
377	28	CYS	CA	C	56.74	499	36	ILE	CG1	C	27.31
378	28	CYS	CB	C	40.87	500	36	ILE	CG2	C	17.74
379	28	CYS	N	N	113.49	501	36	ILE	CD1	C	14.69
380	29	GLU	H	H	8.10	502	36	ILE	N	N	114.00
381	29	GLU	HA	H	3.76	503	37	MET	H	H	8.08
382	29	GLU	HB2	H	2.17	504	37	MET	HA	H	4.52
383	29	GLU	HB3	H	2.45	505	37	MET	HB2	H	-
384	29	GLU	HG2	H	-	506	37	MET	HB3	H	2.14
385	29	GLU	HG3	H	2.44	507	37	MET	HG2	H	-
386	29	GLU	C	C	178.21	508	37	MET	HG3	H	2.67
387	29	GLU	CA	C	60.45	509	37	MET	HE	H	2.10
388	29	GLU	CB	C	30.38	510	37	MET	C	C	177.47
389	29	GLU	CG	C	37.68	511	37	MET	CA	C	56.18
391	29	GLU	N	N	120.69	512	37	MET	CB	C	32.55
392	30	GLN	H	H	8.39	513	37	MET	CG	C	32.54
393	30	GLN	HA	H	3.96	514	37	MET	CE	C	16.78
394	30	GLN	HB2	H	2.07	515	37	MET	N	N	118.70
395	30	GLN	HB3	H	2.07	516	38	GLY	H	H	7.85
396	30	GLN	HG2	H	2.38	517	38	GLY	HA2	H	4.00
397	30	GLN	HG3	H	2.46	518	38	GLY	HA3	H	4.00
398	30	GLN	HE21	H	-	519	38	GLY	C	C	174.29
399	30	GLN	HE22	H	-	520	38	GLY	CA	C	46.12
400	30	GLN	C	C	178.38	521	38	GLY	N	N	108.17
401	30	GLN	CA	C	58.74	522	39	GLU	H	H	8.18
402	30	GLN	CB	C	28.57	523	39	GLU	HA	H	4.27
403	30	GLN	CG	C	34.04	524	39	GLU	HB2	H	1.93
405	30	GLN	N	N	115.77	525	39	GLU	HB3	H	2.06
406	30	GLN	NE2	N	-	526	39	GLU	HG2	H	-
407	31	HIS	H	H	8.15	527	39	GLU	HG3	H	2.25
408	31	HIS	HA	H	3.14	528	39	GLU	C	C	176.60
409	31	HIS	HB2	H	1.59	529	39	GLU	CA	C	56.79
410	31	HIS	HB3	H	1.59	530	39	GLU	CB	C	30.37
412	31	HIS	HD2	H	6.62	531	39	GLU	CG	C	36.17
413	31	HIS	HE1	H	7.69	533	39	GLU	N	N	120.01
415	31	HIS	C	C	176.43	534	40	GLN	H	H	8.30
416	31	HIS	CA	C	59.51	535	40	GLN	HA	H	4.30
417	31	HIS	CB	C	31.37	536	40	GLN	HB2	H	1.96
419	31	HIS	CD2	C	116.90	537	40	GLN	HB3	H	2.11
421	31	HIS	N	N	119.58	538	40	GLN	HG2	H	-
424	32	ILE	H	H	7.82	539	40	GLN	HG3	H	2.35
425	32	ILE	HA	H	3.10	540	40	GLN	HE21	H	-
426	32	ILE	HB	H	1.58	541	40	GLN	HE22	H	-
427	32	ILE	HG12	H	1.33	543	40	GLN	CA	C	55.91
428	32	ILE	HG13	H	1.21	544	40	GLN	CB	C	29.30
429	32	ILE	HG2	H	0.06	545	40	GLN	CG	C	33.77
430	32	ILE	HD1	H	0.57	547	40	GLN	N	N	120.71
431	32	ILE	C	C	178.02	548	40	GLN	NE2	N	-
432	32	ILE	CA	C	64.60	549	41	GLU	H	H	8.35
433	32	ILE	CB	C	36.49	550	41	GLU	HA	H	-
434	32	ILE	CG1	C	27.90	551	41	GLU	HB2	H	-
435	32	ILE	CG2	C	18.05	552	41	GLU	HB3	H	-
436	32	ILE	CD1	C	13.05	553	41	GLU	HG2	H	-
437	32	ILE	N	N	116.46	554	41	GLU	HG3	H	-
438	33	MET	H	H	7.97	555	41	GLU	C	C	175.91
439	33	MET	HA	H	4.40	556	41	GLU	CA	C	56.80
440	33	MET	HB2	H	2.06	557	41	GLU	CB	C	30.44
441	33	MET	HB3	H	2.18	558	41	GLU	CG	C	-
442	33	MET	HG2	H	2.70	560	41	GLU	N	N	121.96
443	33	MET	HG3	H	2.80	561	42	GLN	H	H	8.21
444	33	MET	HE	H	2.03	562	42	GLN	HA	H	-

563	42	GLN	HB2	H	-	697	52	ARG	H	H	8.32
564	42	GLN	HB3	H	-	698	52	ARG	HA	H	4.34
565	42	GLN	HG2	H	-	699	52	ARG	HB2	H	-
566	42	GLN	HG3	H	-	700	52	ARG	HB3	H	1.83
567	42	GLN	HE21	H	-	701	52	ARG	HG2	H	-
568	42	GLN	HE22	H	-	702	52	ARG	HG3	H	1.63
569	42	GLN	C	C	174.54	703	52	ARG	HD2	H	-
570	42	GLN	CA	C	55.56	704	52	ARG	HD3	H	3.18
571	42	GLN	CB	C	29.86	710	52	ARG	C	C	176.76
572	42	GLN	CG	C	-	711	52	ARG	CA	C	56.62
574	42	GLN	N	N	121.12	712	52	ARG	CB	C	30.75
575	42	GLN	NE2	N	-	713	52	ARG	CG	C	27.15
576	43	TYR	H	H	7.77	714	52	ARG	CD	C	43.33
577	43	TYR	HA	H	-	716	52	ARG	N	N	123.17
578	43	TYR	HB2	H	-	720	53	SER	H	H	8.41
579	43	TYR	HB3	H	-	721	53	SER	HA	H	4.54
580	43	TYR	HD1	H	-	722	53	SER	HB2	H	-
581	43	TYR	HD2	H	-	723	53	SER	HB3	H	3.92
582	43	TYR	HE1	H	6.80	725	53	SER	C	C	174.84
583	43	TYR	HE2	H	6.80	726	53	SER	CA	C	58.72
585	43	TYR	C	C	-	727	53	SER	CB	C	63.88
586	43	TYR	CA	C	59.12	728	53	SER	N	N	117.34
587	43	TYR	CB	C	39.53	729	54	SER	H	H	8.54
594	43	TYR	N	N	126.79	730	54	SER	HA	H	4.52
595	44	ASP	H	H	-	731	54	SER	HB2	H	3.91
596	44	ASP	HA	H	-	732	54	SER	HB3	H	4.03
597	44	ASP	HB2	H	-	734	54	SER	C	C	174.86
598	44	ASP	HB3	H	-	735	54	SER	CA	C	58.57
599	44	ASP	C	C	-	736	54	SER	CB	C	64.17
600	44	ASP	CA	C	-	737	54	SER	N	N	118.12
601	44	ASP	CB	C	-	738	55	ASP	H	H	8.41
603	44	ASP	N	N	-	739	55	ASP	HA	H	4.55
604	45	SER	H	H	7.66	740	55	ASP	HB2	H	-
605	45	SER	HA	H	-	741	55	ASP	HB3	H	2.74
606	45	SER	HB2	H	-	742	55	ASP	C	C	177.33
607	45	SER	HB3	H	-	743	55	ASP	CA	C	55.71
609	45	SER	C	C	176.21	744	55	ASP	CB	C	40.98
610	45	SER	CA	C	63.70	746	55	ASP	N	N	123.06
611	45	SER	CB	C	72.30	747	56	GLN	H	H	8.45
612	45	SER	N	N	125.04	748	56	GLN	HA	H	4.03
613	46	TYR	H	H	8.57	749	56	GLN	HB2	H	-
614	46	TYR	HA	H	-	750	56	GLN	HB3	H	2.21
615	46	TYR	HB2	H	-	751	56	GLN	HG2	H	-
616	46	TYR	HB3	H	-	752	56	GLN	HG3	H	2.53
617	46	TYR	HD1	H	-	753	56	GLN	HE21	H	-
618	46	TYR	HD2	H	-	754	56	GLN	HE22	H	-
619	46	TYR	HE1	H	6.80	755	56	GLN	C	C	178.63
620	46	TYR	HE2	H	6.80	756	56	GLN	CA	C	59.02
622	46	TYR	C	C	-	757	56	GLN	CB	C	28.60
623	46	TYR	CA	C	-	758	56	GLN	CG	C	34.07
624	46	TYR	CB	C	43.96	760	56	GLN	N	N	120.11
631	46	TYR	N	N	126.01	761	56	GLN	NE2	N	-
632	47	ASP	H	H	-	762	57	GLN	H	H	7.98
633	47	ASP	HA	H	-	763	57	GLN	HA	H	4.04
634	47	ASP	HB2	H	-	764	57	GLN	HB2	H	2.42
635	47	ASP	HB3	H	-	765	57	GLN	HB3	H	2.07
636	47	ASP	C	C	-	766	57	GLN	HG2	H	2.33
637	47	ASP	CA	C	-	767	57	GLN	HG3	H	2.48
638	47	ASP	CB	C	-	768	57	GLN	HE21	H	-
640	47	ASP	N	N	-	769	57	GLN	HE22	H	-
641	48	ILE	H	H	8.44	770	57	GLN	C	C	177.06
642	48	ILE	HA	H	4.20	771	57	GLN	CA	C	59.06
643	48	ILE	HB	H	1.87	772	57	GLN	CB	C	28.22
644	48	ILE	HG12	H	1.45	773	57	GLN	CG	C	34.01
645	48	ILE	HG13	H	1.20	775	57	GLN	N	N	120.06
646	48	ILE	HG2	H	0.90	776	57	GLN	NE2	N	-
647	48	ILE	HD1	H	0.85	777	58	GLN	H	H	8.29
648	48	ILE	C	C	176.21	778	58	GLN	HA	H	2.83
649	48	ILE	CA	C	61.86	779	58	GLN	HB2	H	1.64
650	48	ILE	CB	C	38.79	780	58	GLN	HB3	H	1.91
651	48	ILE	CG1	C	27.40	781	58	GLN	HG2	H	-
652	48	ILE	CG2	C	17.80	782	58	GLN	HG3	H	-
653	48	ILE	CD1	C	13.32	783	58	GLN	HE21	H	-
654	48	ILE	N	N	125.30	784	58	GLN	HE22	H	-
655	49	ARG	H	H	8.40	785	58	GLN	C	C	177.79
656	49	ARG	HA	H	4.36	786	58	GLN	CA	C	59.07
657	49	ARG	HB2	H	-	787	58	GLN	CB	C	28.92
658	49	ARG	HB3	H	1.80	788	58	GLN	CG	C	33.27
659	49	ARG	HG2	H	-	790	58	GLN	N	N	120.01
660	49	ARG	HG3	H	1.62	791	58	GLN	NE2	N	-
661	49	ARG	HD2	H	-	792	59	ARG	H	H	7.96
662	49	ARG	HD3	H	3.18	793	59	ARG	HA	H	4.13
668	49	ARG	C	C	176.53	794	59	ARG	HB2	H	-
669	49	ARG	CA	C	56.35	795	59	ARG	HB3	H	1.84
670	49	ARG	CB	C	30.77	796	59	ARG	HG2	H	-
671	49	ARG	CG	C	27.16	797	59	ARG	HG3	H	1.77
672	49	ARG	CD	C	43.47	798	59	ARG	HD2	H	-
674	49	ARG	N	N	124.45	799	59	ARG	HD3	H	3.27
678	50	SER	H	H	8.33	805	59	ARG	C	C	178.45
679	50	SER	HA	H	4.51	806	59	ARG	CA	C	58.85
680	50	SER	HB2	H	-	807	59	ARG	CB	C	29.85
681	50	SER	HB3	H	3.91	808	59	ARG	CG	C	27.81
683	50	SER	C	C	175.06	809	59	ARG	CD	C	43.12
684	50	SER	CA	C	58.63	811	59	ARG	N	N	117.58
685	50	SER	CB	C	63.81	815	60	CYS	H	H	7.92
686	50	SER	N	N	117.04	816	60	CYS	HA	H	4.26
687	51	THR	H	H	8.21	817	60	CYS	HB2	H	3.17
688	51	THR	HA	H	4.34	818	60	CYS	HB3	H	2.72
689	51	THR	HB	H	4.26	820	60	CYS	C	C	175.31
691	51	THR	HG2	H	1.21	821	60	CYS	CA	C	58.82
692	51	THR	C	C	176.51	822	60	CYS	CB	C	38.14
693	51	THR	CA	C	62.17	823	60	CYS	N	N	115.71
694	51	THR	CB	C	69.81	824	61	CYS	H	H	8.38
696	51	THR	N	N	116.26	825	61	CYS	HA	H	4.42

826	61	CYS	HB2	H	2.76	939	71	GLN	H	H	8.47
827	61	CYS	HB3	H	3.16	940	71	GLN	HA	H	3.93
829	61	CYS	C	C	177.29	941	71	GLN	HB2	H	-
830	61	CYS	CA	C	56.15	942	71	GLN	HB3	H	2.10
831	61	CYS	CB	C	33.87	943	71	GLN	HG2	H	-
832	61	CYS	N	N	116.78	944	71	GLN	HG3	H	2.37
833	62	ASP	H	H	8.85	945	71	GLN	HE21	H	-
834	62	ASP	HA	H	4.43	946	71	GLN	HE22	H	-
835	62	ASP	HB2	H	2.71	947	71	GLN	C	C	177.21
836	62	ASP	HB3	H	2.94	948	71	GLN	CA	C	58.63
837	62	ASP	C	C	179.28	949	71	GLN	CB	C	28.81
838	62	ASP	CA	C	57.83	950	71	GLN	CG	C	34.32
839	62	ASP	CB	C	40.18	952	71	GLN	N	N	117.00
841	62	ASP	N	N	120.98	953	71	GLN	NE2	N	-
842	63	GLU	H	H	7.95	954	72	GLY	H	H	7.85
843	63	GLU	HA	H	4.14	955	72	GLY	HA2	H	4.04
844	63	GLU	HB2	H	2.20	956	72	GLY	HA3	H	3.83
845	63	GLU	HB3	H	2.20	957	72	GLY	C	C	175.94
846	63	GLU	HG2	H	2.71	958	72	GLY	CA	C	46.61
847	63	GLU	HG3	H	2.83	959	72	GLY	N	N	106.00
848	63	GLU	C	C	180.11	960	73	CYS	H	H	7.82
849	63	GLU	CA	C	59.15	961	73	CYS	HA	H	5.38
850	63	GLU	CB	C	29.40	962	73	CYS	HB2	H	3.33
851	63	GLU	CG	C	35.54	963	73	CYS	HB3	H	2.67
853	63	GLU	N	N	120.40	965	73	CYS	C	C	-
854	64	LEU	H	H	8.18	966	73	CYS	CA	C	52.58
855	64	LEU	HA	H	3.98	967	73	CYS	CB	C	36.48
856	64	LEU	HB2	H	-	968	73	CYS	N	N	116.46
857	64	LEU	HB3	H	-	969	74	MET	H	H	-
858	64	LEU	HG	H	-	970	74	MET	HA	H	4.30
859	64	LEU	HD1	H	0.87	971	74	MET	HB2	H	1.96
860	64	LEU	HD2	H	0.69	972	74	MET	HB3	H	2.26
861	64	LEU	C	C	-	973	74	MET	HG2	H	2.24
862	64	LEU	CA	C	-	974	74	MET	HG3	H	2.64
863	64	LEU	CB	C	-	975	74	MET	HE	H	1.60
864	64	LEU	CG	C	-	976	74	MET	C	C	177.99
865	64	LEU	CD1	C	-	977	74	MET	CA	C	57.24
866	64	LEU	CD2	C	-	978	74	MET	CB	C	31.00
867	64	LEU	N	N	117.58	979	74	MET	CG	C	31.65
868	65	ASN	H	H	8.30	980	74	MET	CE	C	16.50
869	65	ASN	HA	H	4.56	981	74	MET	N	N	-
870	65	ASN	HB2	H	2.96	982	75	CYS	H	H	8.89
871	65	ASN	HB3	H	3.05	983	75	CYS	HA	H	4.36
872	65	ASN	HD21	H	-	984	75	CYS	HB2	H	-
873	65	ASN	HD22	H	-	985	75	CYS	HB3	H	3.01
874	65	ASN	C	C	175.91	987	75	CYS	C	C	175.68
875	65	ASN	CA	C	55.26	988	75	CYS	CA	C	57.96
876	65	ASN	CB	C	39.58	989	75	CYS	CB	C	35.56
878	65	ASN	N	N	116.34	990	75	CYS	N	N	115.37
879	65	ASN	ND2	N	-	991	76	GLU	H	H	8.74
880	66	GLU	H	H	7.56	992	76	GLU	HA	H	4.07
881	66	GLU	HA	H	4.20	993	76	GLU	HB2	H	1.86
882	66	GLU	HB2	H	-	994	76	GLU	HB3	H	2.08
883	66	GLU	HB3	H	2.18	995	76	GLU	HG2	H	-
884	66	GLU	HG2	H	-	996	76	GLU	HG3	H	2.28
885	66	GLU	HG3	H	2.47	997	76	GLU	C	C	179.19
886	66	GLU	C	C	178.06	998	76	GLU	CA	C	60.64
887	66	GLU	CA	C	57.12	999	76	GLU	CB	C	28.14
888	66	GLU	CB	C	29.48	1000	76	GLU	CG	C	37.62
889	66	GLU	CG	C	35.84	1002	76	GLU	N	N	120.27
891	66	GLU	N	N	117.35	1003	77	ALA	H	H	7.79
892	67	MET	H	H	7.26	1004	77	ALA	HA	H	4.02
893	67	MET	HA	H	4.18	1005	77	ALA	HB	H	1.43
894	67	MET	HB2	H	-	1006	77	ALA	C	C	178.77
895	67	MET	HB3	H	2.02	1007	77	ALA	CA	C	55.70
896	67	MET	HG2	H	2.33	1008	77	ALA	CB	C	17.28
897	67	MET	HG3	H	2.65	1009	77	ALA	N	N	122.29
898	67	MET	HE	H	1.95	1010	78	LEU	H	H	8.21
899	67	MET	C	C	175.74	1011	78	LEU	HA	H	4.30
900	67	MET	CA	C	57.15	1012	78	LEU	HB2	H	-
901	67	MET	CB	C	33.96	1013	78	LEU	HB3	H	-
902	67	MET	CG	C	32.26	1014	78	LEU	HG	H	-
903	67	MET	CE	C	17.15	1015	78	LEU	HD1	H	0.86
904	67	MET	N	N	118.57	1016	78	LEU	HD2	H	0.76
905	68	GLU	H	H	8.00	1017	78	LEU	C	C	-
906	68	GLU	HA	H	4.00	1018	78	LEU	CA	C	-
907	68	GLU	HB2	H	-	1019	78	LEU	CB	C	-
908	68	GLU	HB3	H	1.84	1020	78	LEU	CG	C	-
909	68	GLU	HG2	H	-	1021	78	LEU	CD1	C	-
910	68	GLU	HG3	H	2.22	1022	78	LEU	CD2	C	-
911	68	GLU	C	C	177.30	1023	78	LEU	N	N	116.26
912	68	GLU	CA	C	58.78	1024	79	GLN	H	H	8.79
913	68	GLU	CB	C	29.51	1025	79	GLN	HA	H	4.06
914	68	GLU	CG	C	36.13	1026	79	GLN	HB2	H	2.09
916	68	GLU	N	N	122.82	1027	79	GLN	HB3	H	2.39
917	69	ASN	H	H	8.56	1028	79	GLN	HG2	H	2.33
918	69	ASN	HA	H	4.83	1029	79	GLN	HG3	H	2.54
919	69	ASN	HB2	H	2.73	1030	79	GLN	HE21	H	-
920	69	ASN	HB3	H	3.20	1031	79	GLN	HE22	H	-
921	69	ASN	HD21	H	-	1032	79	GLN	C	C	178.53
922	69	ASN	HD22	H	-	1033	79	GLN	CA	C	59.22
923	69	ASN	C	C	174.75	1034	79	GLN	CB	C	28.12
924	69	ASN	CA	C	51.56	1035	79	GLN	CG	C	34.25
925	69	ASN	CB	C	37.99	1037	79	GLN	N	N	117.09
927	69	ASN	N	N	117.53	1038	79	GLN	NE2	N	-
928	69	ASN	ND2	N	-	1039	80	GLN	H	H	7.93
929	70	THR	H	H	7.91	1040	80	GLN	HA	H	3.97
930	70	THR	HA	H	3.62	1041	80	GLN	HB2	H	-
931	70	THR	HB	H	3.66	1042	80	GLN	HB3	H	2.11
933	70	THR	HG2	H	0.65	1043	80	GLN	HG2	H	-
934	70	THR	C	C	174.47	1044	80	GLN	HG3	H	2.32
935	70	THR	CA	C	66.40	1045	80	GLN	HE21	H	-
936	70	THR	CB	C	69.33	1046	80	GLN	HE22	H	-
938	70	THR	N	N	116.61	1047	80	GLN	C	C	177.99

1048	80	GLN	CA	C	58.60	1167	89	LEU	HD2	H	0.34
1049	80	GLN	CB	C	28.50	1168	89	LEU	C	C	-
1050	80	GLN	CG	C	34.10	1169	89	LEU	CA	C	-
1052	80	GLN	N	N	119.81	1170	89	LEU	CB	C	-
1053	80	GLN	NE2	N	-	1171	89	LEU	CG	C	-
1054	81	ILE	H	H	7.99	1172	89	LEU	CD1	C	-
1055	81	ILE	HA	H	3.62	1173	89	LEU	CD2	C	-
1056	81	ILE	HB	H	2.17	1174	89	LEU	N	N	119.99
1057	81	ILE	HG12	H	1.18	1175	90	GLN	H	H	8.05
1058	81	ILE	HG13	H	1.45	1176	90	GLN	HA	H	4.06
1059	81	ILE	HG2	H	1.01	1177	90	GLN	HB2	H	1.70
1060	81	ILE	HD1	H	0.82	1178	90	GLN	HB3	H	1.85
1061	81	ILE	C	C	177.49	1179	90	GLN	HG2	H	2.36
1062	81	ILE	CA	C	66.37	1180	90	GLN	HG3	H	2.36
1063	81	ILE	CB	C	37.60	1181	90	GLN	HE21	H	-
1064	81	ILE	CG1	C	30.20	1182	90	GLN	HE22	H	-
1065	81	ILE	CG2	C	18.66	1183	90	GLN	C	C	175.65
1066	81	ILE	CD1	C	13.73	1184	90	GLN	CA	C	58.13
1067	81	ILE	N	N	120.33	1185	90	GLN	CB	C	29.68
1068	82	MET	H	H	7.83	1186	90	GLN	CG	C	33.98
1069	82	MET	HA	H	4.14	1188	90	GLN	N	N	120.39
1070	82	MET	HB2	H	-	1189	90	GLN	NE2	N	-
1071	82	MET	HB3	H	2.23	1190	91	ASP	H	H	7.51
1072	82	MET	HG2	H	-	1191	91	ASP	HA	H	3.99
1073	82	MET	HG3	H	2.79	1192	91	ASP	HB2	H	-
1074	82	MET	HE	H	2.03	1193	91	ASP	HB3	H	-
1075	82	MET	C	C	178.10	1194	91	ASP	C	C	-
1076	82	MET	CA	C	58.68	1195	91	ASP	CA	C	53.40
1077	82	MET	CB	C	33.55	1196	91	ASP	CB	C	-
1078	82	MET	CG	C	31.90	1198	91	ASP	N	N	116.24
1079	82	MET	CE	C	19.38	1199	92	ARG	H	H	-
1080	82	MET	N	N	117.13	1200	92	ARG	HA	H	-
1081	83	GLU	H	H	8.49	1201	92	ARG	HB2	H	-
1082	83	GLU	HA	H	3.92	1202	92	ARG	HB3	H	-
1083	83	GLU	HB2	H	-	1203	92	ARG	HG2	H	-
1084	83	GLU	HB3	H	2.10	1204	92	ARG	HG3	H	-
1085	83	GLU	HG2	H	-	1205	92	ARG	HD2	H	-
1086	83	GLU	HG3	H	2.33	1206	92	ARG	HD3	H	-
1087	83	GLU	C	C	179.08	1212	92	ARG	C	C	-
1088	83	GLU	CA	C	59.43	1213	92	ARG	CA	C	-
1089	83	GLU	CB	C	29.35	1214	92	ARG	CB	C	-
1090	83	GLU	CG	C	36.16	1215	92	ARG	CG	C	-
1092	83	GLU	N	N	119.50	1216	92	ARG	CD	C	-
1093	84	ASN	H	H	8.38	1218	92	ARG	N	N	-
1094	84	ASN	HA	H	4.44	1222	93	GLN	H	H	-
1095	84	ASN	HB2	H	2.92	1223	93	GLN	HA	H	-
1096	84	ASN	HB3	H	3.00	1224	93	GLN	HB2	H	-
1097	84	ASN	HD21	H	-	1225	93	GLN	HB3	H	-
1098	84	ASN	HD22	H	-	1226	93	GLN	HG2	H	-
1099	84	ASN	C	C	177.53	1227	93	GLN	HG3	H	-
1100	84	ASN	CA	C	54.83	1228	93	GLN	HE21	H	-
1101	84	ASN	CB	C	38.10	1229	93	GLN	HE22	H	-
1103	84	ASN	N	N	117.21	1230	93	GLN	C	C	175.07
1104	84	ASN	ND2	N	-	1231	93	GLN	CA	C	-
1105	85	GLN	H	H	7.46	1232	93	GLN	CB	C	-
1106	85	GLN	HA	H	4.36	1233	93	GLN	CG	C	-
1107	85	GLN	HB2	H	1.44	1235	93	GLN	N	N	-
1108	85	GLN	HB3	H	2.12	1236	93	GLN	NE2	N	-
1109	85	GLN	HG2	H	2.02	1237	94	MET	H	H	8.30
1110	85	GLN	HG3	H	2.28	1238	94	MET	HA	H	4.24
1111	85	GLN	HE21	H	-	1239	94	MET	HB2	H	1.82
1112	85	GLN	HE22	H	-	1240	94	MET	HB3	H	2.04
1113	85	GLN	C	C	177.17	1241	94	MET	HG2	H	2.25
1114	85	GLN	CA	C	54.92	1242	94	MET	HG3	H	2.25
1115	85	GLN	CB	C	29.89	1243	94	MET	HE	H	2.18
1116	85	GLN	CG	C	33.01	1244	94	MET	C	C	178.49
1118	85	GLN	N	N	115.27	1245	94	MET	CA	C	56.55
1119	85	GLN	NE2	N	-	1246	94	MET	CB	C	33.85
1120	86	CYS	H	H	7.82	1247	94	MET	CG	C	-
1121	86	CYS	HA	H	3.92	1248	94	MET	CE	C	17.54
1122	86	CYS	HB2	H	3.10	1249	94	MET	N	N	120.02
1123	86	CYS	HB3	H	3.28	1250	95	VAL	H	H	7.97
1125	86	CYS	C	C	175.74	1251	95	VAL	HA	H	3.54
1126	86	CYS	CA	C	59.73	1252	95	VAL	HB	H	2.22
1127	86	CYS	CB	C	40.17	1253	95	VAL	HG1	H	1.01
1128	86	CYS	N	N	118.40	1254	95	VAL	HG2	H	0.92
1129	87	ASP	H	H	8.60	1255	95	VAL	C	C	176.87
1130	87	ASP	HA	H	4.37	1256	95	VAL	CA	C	67.58
1131	87	ASP	HB2	H	-	1257	95	VAL	CB	C	31.71
1132	87	ASP	HB3	H	2.63	1258	95	VAL	CG1	C	23.78
1133	87	ASP	C	C	177.04	1259	95	VAL	CG2	C	21.84
1134	87	ASP	CA	C	56.30	1260	95	VAL	N	N	119.42
1135	87	ASP	CB	C	40.08	1261	96	GLN	H	H	8.01
1137	87	ASP	N	N	117.29	1262	96	GLN	HA	H	3.76
1138	88	ARG	H	H	7.71	1263	96	GLN	HB2	H	-
1139	88	ARG	HA	H	4.27	1264	96	GLN	HB3	H	-
1140	88	ARG	HB2	H	1.82	1265	96	GLN	HG2	H	-
1141	88	ARG	HB3	H	1.93	1266	96	GLN	HG3	H	-
1142	88	ARG	HG2	H	-	1267	96	GLN	HE21	H	-
1143	88	ARG	HG3	H	1.69	1268	96	GLN	HE22	H	-
1144	88	ARG	HD2	H	-	1269	96	GLN	C	C	178.04
1145	88	ARG	HD3	H	3.20	1270	96	GLN	CA	C	58.90
1151	88	ARG	C	C	176.73	1271	96	GLN	CB	C	29.94
1152	88	ARG	CA	C	56.23	1272	96	GLN	CG	C	-
1153	88	ARG	CB	C	30.68	1274	96	GLN	N	N	117.64
1154	88	ARG	CG	C	27.35	1275	96	GLN	NE2	N	-
1155	88	ARG	CD	C	43.23	1276	97	GLN	H	H	8.06
1157	88	ARG	N	N	117.45	1277	97	GLN	HA	H	4.03
1161	89	LEU	H	H	7.41	1278	97	GLN	HB2	H	2.13
1162	89	LEU	HA	H	4.34	1279	97	GLN	HB3	H	2.27
1163	89	LEU	HB2	H	-	1280	97	GLN	HG2	H	2.49
1164	89	LEU	HB3	H	-	1281	97	GLN	HG3	H	2.60
1165	89	LEU	HG	H	-	1282	97	GLN	HE21	H	-
1166	89	LEU	HD1	H	0.60	1283	97	GLN	HE22	H	-

1284	97	GLN	C	C	178.06	1408	105	LEU	CA	C	-
1285	97	GLN	CA	C	59.34	1409	105	LEU	CB	C	-
1286	97	GLN	CB	C	28.73	1410	105	LEU	CG	C	-
1287	97	GLN	CG	C	34.06	1411	105	LEU	CD1	C	-
1289	97	GLN	N	N	120.17	1412	105	LEU	CD2	C	-
1290	97	GLN	NE2	N	-	1413	105	LEU	N	N	124.56
1291	98	PHE	H	H	8.77	1414	106	PRO	HA	H	3.97
1292	98	PHE	HA	H	3.76	1415	106	PRO	HB2	H	-
1293	98	PHE	HB2	H	3.05	1416	106	PRO	HB3	H	-
1294	98	PHE	HB3	H	3.34	1417	106	PRO	HG2	H	-
1295	98	PHE	HD1	H	7.09	1418	106	PRO	HG3	H	-
1296	98	PHE	HD2	H	7.09	1419	106	PRO	HD2	H	-
1297	98	PHE	HE1	H	7.17	1420	106	PRO	HD3	H	-
1298	98	PHE	HE2	H	7.17	1421	106	PRO	C	C	178.80
1299	98	PHE	HZ	H	6.99	1422	106	PRO	CA	C	67.47
1300	98	PHE	C	C	177.20	1423	106	PRO	CB	C	30.31
1301	98	PHE	CA	C	61.99	1424	106	PRO	CG	C	29.13
1302	98	PHE	CB	C	40.15	1425	106	PRO	CD	C	48.68
1309	98	PHE	N	N	121.72	1427	107	GLN	H	H	8.22
1310	99	LYS	H	H	8.59	1428	107	GLN	HA	H	4.31
1311	99	LYS	HA	H	3.84	1429	107	GLN	HB2	H	-
1312	99	LYS	HB2	H	1.93	1430	107	GLN	HB3	H	2.19
1313	99	LYS	HB3	H	1.93	1431	107	GLN	HG2	H	2.42
1314	99	LYS	HG2	H	1.43	1432	107	GLN	HG3	H	2.56
1315	99	LYS	HG3	H	1.43	1433	107	GLN	HE21	H	-
1316	99	LYS	HD2	H	1.71	1434	107	GLN	HE22	H	-
1317	99	LYS	HD3	H	1.71	1435	107	GLN	C	C	180.39
1318	99	LYS	HE2	H	2.86	1436	107	GLN	CA	C	58.93
1319	99	LYS	HE3	H	2.98	1437	107	GLN	CB	C	28.42
1321	99	LYS	C	C	178.06	1438	107	GLN	CG	C	34.25
1322	99	LYS	CA	C	60.99	1440	107	GLN	N	N	116.24
1323	99	LYS	CB	C	32.96	1441	107	GLN	NE2	N	-
1324	99	LYS	CG	C	26.87	1442	108	GLN	H	H	8.04
1325	99	LYS	CD	C	30.19	1443	108	GLN	HA	H	4.02
1326	99	LYS	CE	C	42.06	1444	108	GLN	HB2	H	2.11
1327	99	LYS	N	N	117.76	1445	108	GLN	HB3	H	2.30
1329	100	ARG	H	H	7.76	1446	108	GLN	HG2	H	2.35
1330	100	ARG	HA	H	3.96	1447	108	GLN	HG3	H	2.61
1331	100	ARG	HB2	H	1.95	1448	108	GLN	HE21	H	-
1332	100	ARG	HB3	H	1.95	1449	108	GLN	HE22	H	-
1333	100	ARG	HG2	H	1.58	1450	108	GLN	C	C	177.66
1334	100	ARG	HG3	H	1.79	1451	108	GLN	CA	C	59.21
1335	100	ARG	HD2	H	3.21	1452	108	GLN	CB	C	28.59
1336	100	ARG	HD3	H	3.21	1453	108	GLN	CG	C	34.57
1342	100	ARG	C	C	179.57	1455	108	GLN	N	N	121.29
1343	100	ARG	CA	C	59.74	1456	108	GLN	NE2	N	-
1344	100	ARG	CB	C	29.83	1457	109	CYS	H	H	7.50
1345	100	ARG	CG	C	27.32	1458	109	CYS	HA	H	4.74
1346	100	ARG	CD	C	43.32	1459	109	CYS	HB2	H	2.21
1348	100	ARG	N	N	118.31	1460	109	CYS	HB3	H	3.03
1352	101	GLU	H	H	7.97	1462	109	CYS	C	C	173.72
1353	101	GLU	HA	H	3.91	1463	109	CYS	CA	C	51.83
1354	101	GLU	HB2	H	1.98	1464	109	CYS	CB	C	36.86
1355	101	GLU	HB3	H	1.84	1465	109	CYS	N	N	114.15
1356	101	GLU	HG2	H	-	1466	110	ASN	H	H	7.82
1357	101	GLU	HG3	H	2.27	1467	110	ASN	HA	H	4.29
1358	101	GLU	C	C	180.07	1468	110	ASN	HB2	H	2.71
1359	101	GLU	CA	C	58.58	1469	110	ASN	HB3	H	3.01
1360	101	GLU	CB	C	29.53	1470	110	ASN	HD21	H	-
1361	101	GLU	CG	C	35.62	1471	110	ASN	HD22	H	-
1363	101	GLU	N	N	119.42	1472	110	ASN	C	C	174.05
1364	102	LEU	H	H	8.79	1473	110	ASN	CA	C	54.79
1365	102	LEU	HA	H	3.84	1474	110	ASN	CB	C	36.86
1366	102	LEU	HB2	H	-	1476	110	ASN	N	N	114.00
1367	102	LEU	HB3	H	-	1477	110	ASN	ND2	N	-
1368	102	LEU	HG	H	-	1478	111	PHE	H	H	8.21
1369	102	LEU	HD1	H	0.99	1479	111	PHE	HA	H	4.89
1370	102	LEU	HD2	H	0.87	1480	111	PHE	HB2	H	2.58
1371	102	LEU	C	C	-	1481	111	PHE	HB3	H	3.27
1372	102	LEU	CA	C	-	1482	111	PHE	HD1	H	7.07
1373	102	LEU	CB	C	-	1483	111	PHE	HD2	H	7.07
1374	102	LEU	CG	C	-	1484	111	PHE	HE1	H	7.28
1375	102	LEU	CD1	C	-	1485	111	PHE	HE2	H	7.28
1376	102	LEU	CD2	C	-	1486	111	PHE	HZ	H	-
1377	102	LEU	N	N	122.52	1487	111	PHE	C	C	175.38
1378	103	MET	H	H	7.86	1488	111	PHE	CA	C	55.68
1379	103	MET	HA	H	4.34	1489	111	PHE	CB	C	40.49
1380	103	MET	HB2	H	2.67	1496	111	PHE	N	N	117.07
1381	103	MET	HB3	H	2.15	1497	112	ARG	H	H	8.63
1382	103	MET	HG2	H	2.80	1498	112	ARG	HA	H	4.30
1383	103	MET	HG3	H	2.80	1499	112	ARG	HB2	H	-
1384	103	MET	HE	H	2.09	1500	112	ARG	HB3	H	1.72
1385	103	MET	C	C	177.81	1501	112	ARG	HG2	H	1.69
1386	103	MET	CA	C	56.52	1502	112	ARG	HG3	H	1.69
1387	103	MET	CB	C	31.11	1503	112	ARG	HD2	H	3.20
1388	103	MET	CG	C	32.47	1504	112	ARG	HD3	H	3.20
1389	103	MET	CE	C	16.32	1510	112	ARG	C	C	176.42
1390	103	MET	N	N	112.99	1511	112	ARG	CA	C	55.74
1391	104	SER	H	H	7.53	1512	112	ARG	CB	C	30.80
1392	104	SER	HA	H	4.72	1513	112	ARG	CG	C	27.34
1393	104	SER	HB2	H	3.94	1514	112	ARG	CD	C	43.35
1394	104	SER	HB3	H	4.13	1516	112	ARG	N	N	119.99
1396	104	SER	C	C	174.71	1520	113	ALA	H	H	8.58
1397	104	SER	CA	C	58.80	1521	113	ALA	HA	H	4.36
1398	104	SER	CB	C	64.51	1522	113	ALA	HB	H	1.40
1399	104	SER	N	N	113.75	1523	113	ALA	C	C	-
1400	105	LEU	H	H	7.71	1524	113	ALA	CA	C	50.50
1401	105	LEU	HA	H	4.22	1525	113	ALA	CB	C	17.69
1402	105	LEU	HB2	H	-	1526	113	ALA	N	N	125.98
1403	105	LEU	HB3	H	-	1527	114	PRO	HA	H	4.52
1404	105	LEU	HG	H	-	1528	114	PRO	HB2	H	1.89
1405	105	LEU	HD1	H	0.99	1529	114	PRO	HB3	H	2.30
1406	105	LEU	HD2	H	0.84	1530	114	PRO	HG2	H	1.97
1407	105	LEU	C	C	-	1531	114	PRO	HG3	H	1.97

1532	114	PRO	HD2	H	3.72	1613	120	ASP	HB3	H	2.66
1533	114	PRO	HD3	H	3.72	1614	120	ASP	C	C	176.64
1534	114	PRO	C	C	176.49	1615	120	ASP	CA	C	54.23
1535	114	PRO	CA	C	62.54	1616	120	ASP	CB	C	40.78
1536	114	PRO	CB	C	32.01	1618	120	ASP	N	N	120.46
1537	114	PRO	CG	C	27.34	1619	121	VAL	H	H	7.88
1538	114	PRO	CD	C	49.69	1620	121	VAL	HA	H	4.13
1540	115	GLN	H	H	8.60	1621	121	VAL	HB	H	2.17
1541	115	GLN	HA	H	4.17	1622	121	VAL	HG1	H	0.91
1542	115	GLN	HB2	H	-	1623	121	VAL	HG2	H	0.88
1543	115	GLN	HB3	H	2.05	1624	121	VAL	C	C	176.42
1544	115	GLN	HG2	H	-	1625	121	VAL	CA	C	62.16
1545	115	GLN	HG3	H	2.42	1626	121	VAL	CB	C	32.58
1546	115	GLN	HE21	H	-	1627	121	VAL	CG1	C	21.51
1547	115	GLN	HE22	H	-	1628	121	VAL	CG2	C	20.41
1548	115	GLN	C	C	175.91	1629	121	VAL	N	N	119.54
1549	115	GLN	CA	C	56.77	1630	122	SER	H	H	8.45
1550	115	GLN	CB	C	29.53	1631	122	SER	HA	H	4.36
1551	115	GLN	CG	C	34.02	1632	122	SER	HB2	H	3.86
1553	115	GLN	N	N	121.98	1633	122	SER	HB3	H	3.86
1554	115	GLN	NE2	N	-	1635	122	SER	C	C	176.47
1555	116	ARG	H	H	8.32	1636	122	SER	CA	C	59.05
1556	116	ARG	HA	H	4.21	1637	122	SER	CB	C	63.48
1557	116	ARG	HB2	H	1.78	1638	122	SER	N	N	118.63
1558	116	ARG	HB3	H	1.78	1639	123	GLY	H	H	8.39
1559	116	ARG	HG2	H	1.55	1640	123	GLY	HA2	H	3.96
1560	116	ARG	HG3	H	1.55	1641	123	GLY	HA3	H	3.96
1561	116	ARG	HD2	H	3.20	1642	123	GLY	C	C	175.10
1562	116	ARG	HD3	H	3.20	1643	123	GLY	CA	C	45.89
1568	116	ARG	C	C	174.96	1644	123	GLY	N	N	110.70
1569	116	ARG	CA	C	55.95	1645	124	GLY	H	H	8.23
1570	116	ARG	CB	C	30.08	1646	124	GLY	HA2	H	3.96
1571	116	ARG	CG	C	27.27	1647	124	GLY	HA3	H	3.96
1572	116	ARG	CD	C	43.33	1648	124	GLY	C	C	175.00
1574	116	ARG	N	N	118.69	1649	124	GLY	CA	C	45.65
1578	117	CYS	H	H	8.48	1650	124	GLY	N	N	108.55
1579	117	CYS	HA	H	4.83	1651	125	ARG	H	H	8.47
1580	117	CYS	HB2	H	2.75	1652	125	ARG	HA	H	4.24
1581	117	CYS	HB3	H	2.75	1653	125	ARG	HB2	H	-
1583	117	CYS	C	C	172.72	1654	125	ARG	HB3	H	1.86
1584	117	CYS	CA	C	54.47	1655	125	ARG	HG2	H	1.67
1585	117	CYS	CB	C	37.49	1656	125	ARG	HG3	H	1.86
1586	117	CYS	N	N	121.34	1657	125	ARG	HD2	H	-
1587	118	ASP	H	H	8.76	1658	125	ARG	HD3	H	3.21
1588	118	ASP	HA	H	4.66	1664	125	ARG	C	C	176.72
1589	118	ASP	HB2	H	2.49	1665	125	ARG	CA	C	57.44
1590	118	ASP	HB3	H	2.75	1666	125	ARG	CB	C	30.73
1591	118	ASP	C	C	176.03	1667	125	ARG	CG	C	27.60
1592	118	ASP	CA	C	54.08	1668	125	ARG	CD	C	43.29
1593	118	ASP	CB	C	40.87	1670	125	ARG	N	N	121.50
1595	118	ASP	N	N	127.92	1674	126	CYS	H	H	8.56
1596	119	LEU	H	H	8.38	1675	126	CYS	HA	H	4.63
1597	119	LEU	HA	H	4.64	1676	126	CYS	HB2	H	3.01
1598	119	LEU	HB2	H	-	1677	126	CYS	HB3	H	3.40
1599	119	LEU	HB3	H	-	1679	126	CYS	C	C	173.22
1600	119	LEU	HG	H	-	1680	126	CYS	CA	C	56.98
1601	119	LEU	HD1	H	0.89	1681	126	CYS	CB	C	41.22
1602	119	LEU	HD2	H	0.73	1682	126	CYS	N	N	117.13
1603	119	LEU	C	C	-	1683	127	SER	H	H	7.58
1604	119	LEU	CA	C	-	1684	127	SER	HA	H	4.15
1605	119	LEU	CB	C	-	1685	127	SER	HB2	H	3.81
1606	119	LEU	CG	C	-	1686	127	SER	HB3	H	3.81
1607	119	LEU	CD1	C	-	1688	127	SER	C	C	-
1608	119	LEU	CD2	C	-	1689	127	SER	CA	C	60.33
1609	119	LEU	N	N	124.86	1690	127	SER	CB	C	64.69
1610	120	ASP	H	H	8.34	1691	127	SER	N	N	121.21
1611	120	ASP	HA	H	4.67	1691	127	SER	N	N	121.21
1612	120	ASP	HB2	H	2.66	1691	127	SER	N	N	121.21

## 10.3 Experimentelle Randbedingungen

Die experimentellen Randbedingungen sind in einem verkürzten X-PLOR-Format angegeben.

### 10.3.1 Abstandsbeschränkungen aus NOESY Spektren

```
(resid 19 and name HA ) (resid 22 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 19 and name HA ) (resid 22 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 26 and name HA ) (resid 29 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 32 and name HA ) (resid 35 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 32 and name HA ) (resid 35 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 74 and name HA ) (resid 77 and name HB ) 0.0 0.0 5.0
(resid 77 and name HA ) (resid 80 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 82 and name HA ) (resid 85 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 83 and name HA ) (resid 86 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 83 and name HA ) (resid 86 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 95 and name HA ) (resid 98 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HA ) (resid 98 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HA ) (resid 101 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 100 and name HA ) (resid 103 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 101 and name HA ) (resid 104 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 16 and name HN ) (resid 15 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 17 and name HN ) (resid 16 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 18 and name HN ) (resid 17 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 18 and name HN ) (resid 15 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 19 and name HN ) (resid 18 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 20 and name HN ) (resid 19 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 20 and name HN ) (resid 18 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 21 and name HN ) (resid 20 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 22 and name HN ) (resid 21 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 22 and name HN ) (resid 20 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 22 and name HN ) (resid 19 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 23 and name HN ) (resid 22 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 23 and name HN ) (resid 20 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 23 and name HN ) (resid 21 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 24 and name HN ) (resid 23 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 28 and name HN ) (resid 25 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 28 and name HN ) (resid 27 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 29 and name HN ) (resid 26 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 30 and name HN ) (resid 27 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 30 and name HN ) (resid 29 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 33 and name HN ) (resid 32 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 34 and name HN ) (resid 33 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 36 and name HN ) (resid 33 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 36 and name HN ) (resid 35 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 37 and name HN ) (resid 36 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 38 and name HN ) (resid 37 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 38 and name HN ) (resid 35 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
```

(resid 38 and name HN ) (resid 36 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 39 and name HN ) (resid 38 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 40 and name HN ) (resid 37 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 40 and name HN ) (resid 39 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 56 and name HN ) (resid 53 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 56 and name HN ) (resid 55 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 60 and name HN ) (resid 59 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 61 and name HN ) (resid 60 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 62 and name HN ) (resid 61 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 63 and name HN ) (resid 62 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 63 and name HN ) (resid 60 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 65 and name HN ) (resid 64 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 65 and name HN ) (resid 62 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 66 and name HN ) (resid 65 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 67 and name HN ) (resid 66 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 67 and name HN ) (resid 64 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 64 and name HN ) (resid 63 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 64 and name HN ) (resid 61 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 64 and name HN ) (resid 62 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 68 and name HN ) (resid 67 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 69 and name HN ) (resid 68 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 70 and name HN ) (resid 69 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 77 and name HN ) (resid 74 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 77 and name HN ) (resid 76 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 78 and name HN ) (resid 77 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 79 and name HN ) (resid 78 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 82 and name HN ) (resid 81 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 83 and name HN ) (resid 82 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 84 and name HN ) (resid 83 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 85 and name HN ) (resid 84 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 86 and name HN ) (resid 85 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 87 and name HN ) (resid 86 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 96 and name HN ) (resid 95 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 97 and name HN ) (resid 96 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 98 and name HN ) (resid 97 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HN ) (resid 98 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 100 and name HN ) (resid 99 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 102 and name HN ) (resid 101 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 103 and name HN ) (resid 102 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 104 and name HN ) (resid 101 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 104 and name HN ) (resid 103 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 105 and name HN ) (resid 104 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 107 and name HN ) (resid 104 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 107 and name HN ) (resid 106 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 108 and name HN ) (resid 105 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 108 and name HN ) (resid 107 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 108 and name HN ) (resid 106 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 109 and name HN ) (resid 106 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 109 and name HN ) (resid 108 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 110 and name HN ) (resid 109 and name HA ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 110 and name HN ) (resid 107 and name HA ) 0.0 0.0 5.0

---

(resid 113 and name HN	) (resid 112 and name HA	) 0.0 0.0 3.5
(resid 116 and name HN	) (resid 115 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 115 and name HN	) (resid 114 and name HA	) 0.0 0.0 3.5
(resid 112 and name HN	) (resid 111 and name HA	) 0.0 0.0 3.5
(resid 111 and name HN	) (resid 110 and name HA	) 0.0 0.0 3.5
(resid 117 and name HN	) (resid 116 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 118 and name HN	) (resid 117 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 119 and name HN	) (resid 118 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 120 and name HN	) (resid 119 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 121 and name HN	) (resid 120 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 122 and name HN	) (resid 121 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 123 and name HN	) (resid 122 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 125 and name HN	) (resid 124 and name HA2	) 0.0 0.0 5.0
(resid 125 and name HN	) (resid 124 and name HA1	) 0.0 0.0 5.0
(resid 126 and name HN	) (resid 125 and name HA	) 0.0 0.0 5.0
(resid 127 and name HN	) (resid 124 and name HA1	) 0.0 0.0 5.0
(resid 127 and name HN	) (resid 124 and name HA2	) 0.0 0.0 5.0
(resid 17 and name HA	) (resid 20 and name HB	) 0.0 0.0 3.5
(resid 18 and name HA	) (resid 21 and name HB	) 0.0 0.0 3.5
(resid 30 and name HA	) (resid 33 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 32 and name HA	) (resid 35 and name HB	) 0.0 0.0 3.5
(resid 56 and name HA	) (resid 59 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 59 and name HA	) (resid 62 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 60 and name HA	) (resid 63 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 62 and name HA	) (resid 65 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 77 and name HA	) (resid 80 and name HB	) 0.0 0.0 3.5
(resid 79 and name HA	) (resid 82 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 81 and name HA	) (resid 84 and name HB	) 0.0 0.0 5.0
(resid 82 and name HA	) (resid 85 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 83 and name HA	) (resid 86 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 95 and name HA	) (resid 98 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 97 and name HA	) (resid 100 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 98 and name HA	) (resid 101 and name HB	) 0.0 0.0 2.7
(resid 16 and name HA	) (resid 19 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 17 and name HA	) (resid 20 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 18 and name HA	) (resid 21 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 29 and name HA	) (resid 32 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 30 and name HA	) (resid 33 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 31 and name HA	) (resid 34 and name HN	) 0.0 0.0 5.0
(resid 32 and name HA	) (resid 35 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 55 and name HA	) (resid 58 and name HN	) 0.0 0.0 5.0
(resid 56 and name HA	) (resid 59 and name HN	) 0.0 0.0 5.0
(resid 57 and name HA	) (resid 60 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 59 and name HA	) (resid 62 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 60 and name HA	) (resid 63 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 61 and name HA	) (resid 64 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 62 and name HA	) (resid 65 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 63 and name HA	) (resid 66 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 75 and name HA	) (resid 78 and name HN	) 0.0 0.0 3.5
(resid 76 and name HA	) (resid 79 and name HN	) 0.0 0.0 5.0
(resid 77 and name HA	) (resid 80 and name HN	) 0.0 0.0 3.5

```
(resid 78 and name HA ) (resid 81 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 79 and name HA ) (resid 82 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 80 and name HA ) (resid 83 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 79 and name HA ) (resid 80 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 81 and name HA ) (resid 84 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 82 and name HA ) (resid 85 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 83 and name HA ) (resid 86 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 96 and name HA ) (resid 99 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 97 and name HA ) (resid 100 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HA ) (resid 101 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 99 and name HA ) (resid 102 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 100 and name HA ) (resid 103 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 18 and name HN ) (resid 19 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 16 and name HN ) (resid 17 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 19 and name HN ) (resid 20 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 20 and name HN ) (resid 21 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 20 and name HN ) (resid 22 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 21 and name HN ) (resid 22 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 22 and name HN ) (resid 23 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 23 and name HN ) (resid 24 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 25 and name HN ) (resid 26 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 26 and name HN ) (resid 28 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 28 and name HN ) (resid 29 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 28 and name HN ) (resid 30 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 29 and name HN ) (resid 30 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 29 and name HN ) (resid 32 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 30 and name HN ) (resid 31 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 30 and name HN ) (resid 32 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 31 and name HN ) (resid 32 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 31 and name HN ) (resid 33 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 32 and name HN ) (resid 33 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 32 and name HN ) (resid 34 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 33 and name HN ) (resid 34 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 33 and name HN ) (resid 35 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 34 and name HN ) (resid 35 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 34 and name HN ) (resid 36 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 35 and name HN ) (resid 36 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 35 and name HN ) (resid 37 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 36 and name HN ) (resid 37 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 37 and name HN ) (resid 38 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 38 and name HN ) (resid 39 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 56 and name HN ) (resid 57 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 60 and name HN ) (resid 61 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 60 and name HN ) (resid 62 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 61 and name HN ) (resid 62 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 62 and name HN ) (resid 64 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 62 and name HN ) (resid 63 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 63 and name HN ) (resid 64 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 64 and name HN ) (resid 65 and name HN ) 0.0 0.0 3.5
(resid 64 and name HN ) (resid 66 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 64 and name HN ) (resid 67 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
```



(resid 111 and name HN ) (resid 112 and name HN ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 118 and name HN ) (resid 119 and name HN ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 120 and name HN ) (resid 121 and name HN ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 121 and name HN ) (resid 122 and name HN ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 123 and name HN ) (resid 124 and name HN ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 126 and name HN ) (resid 127 and name HN ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 29 and name HB2 ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 33 and name HA ) (resid 94 and name HE\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 78 and name HD2\* ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 94 and name HE\* ) (resid 36 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 20 and name HG1\* ) (resid 73 and name HB1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 20 and name HG1\* ) (resid 77 and name HA ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 70 and name HG2\* ) (resid 64 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 70 and name HG2\* ) (resid 64 and name HD2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 86 and name HB1 ) (resid 98 and name HD\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 29 and name HA ) (resid 32 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 29 and name HA ) (resid 81 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 80 and name HN ) (resid 23 and name HG1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 77 and name HB\* ) (resid 23 and name HG1\* ) 0.0 0.0 2.7  
(resid 77 and name HA ) (resid 23 and name HG1\* ) 0.0 0.0 2.7  
(resid 77 and name HB\* ) (resid 23 and name HG2\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 81 and name HG2\* ) (resid 32 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 20 and name HG1\* ) (resid 77 and name HB ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 28 and name HB1\* ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 28 and name HB2\* ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 28 and name HA ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 28 and name HA ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 28 and name HN ) (resid 81 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 28 and name HN ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 29 and name HN ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 29 and name HN ) (resid 81 and name HG2\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 29 and name HA ) (resid 81 and name HG2\* ) 0.0 0.0 3.5  
(resid 29 and name HA ) (resid 81 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 31 and name HN ) (resid 32 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 31 and name HN ) (resid 32 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 35 and name HN ) (resid 36 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 35 and name HN ) (resid 36 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 111 and name HN ) (resid 74 and name HE\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 64 and name HN ) (resid 67 and name HE\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 64 and name HN ) (resid 70 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 70 and name HG2\* ) (resid 67 and name HN ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HN ) (resid 89 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HN ) (resid 89 and name HD2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HN ) (resid 36 and name HD1\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HN ) (resid 36 and name HG2\* ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HE2 ) (resid 95 and name HG2 ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HE1 ) (resid 95 and name HG2 ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HD1 ) (resid 95 and name HG2 ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HD2 ) (resid 95 and name HG2 ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HA ) (resid 102 and name HD1 ) 0.0 0.0 5.0  
(resid 99 and name HA ) (resid 102 and name HD2 ) 0.0 0.0 5.0

```
(resid 61 and name HN ) (resid 62 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HN ) (resid 32 and name HG2* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 102 and name HN ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HD1* ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HD1* ) (resid 32 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HD2* ) (resid 105 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HD1* ) (resid 94 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 102 and name HD2* ) (resid 94 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 105 and name HD2* ) (resid 102 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 105 and name HD1* ) (resid 102 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 105 and name HD1* ) (resid 32 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 105 and name HD1* ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 105 and name HN ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD1* ) (resid 95 and name HG1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 89 and name HD1* ) (resid 95 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 89 and name HD1* ) (resid 94 and name HE* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 89 and name HD1* ) (resid 94 and name HG1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 89 and name HD1* ) (resid 86 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD1* ) (resid 86 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD1* ) (resid 86 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD2* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD2* ) (resid 95 and name HG1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 89 and name HD2* ) (resid 95 and name HA ) 0.0 0.0 2.7
(resid 89 and name HD2* ) (resid 94 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD2* ) (resid 86 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD2* ) (resid 86 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 89 and name HD2* ) (resid 86 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 31 and name HD2 ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 31 and name HD2 ) (resid 105 and name HD2* ) 0.0 0.0 2.7
(resid 31 and name HD2 ) (resid 105 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HN ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 32 and name HG2* ) 0.0 0.0 2.7
(resid 98 and name HD* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HD* ) (resid 102 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HD* ) (resid 105 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 89 and name HD2* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HD* ) (resid 33 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 82 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 33 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HD* ) (resid 82 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 32 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HE* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 89 and name HD2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 102 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HE* ) (resid 105 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HE* ) (resid 33 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 33 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
```

```

(resid 98 and name HE* ) (resid 82 and name HE* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HE* ) (resid 82 and name HA ) 0.0 0.0 3.5
(resid 98 and name HZ* ) (resid 32 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 105 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 102 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 82 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 33 and name HE* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 82 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 81 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HZ* ) (resid 81 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 111 and name HE* ) (resid 64 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 111 and name HE* ) (resid 64 and name HD2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 33 and name HE* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 33 and name HE* ) (resid 89 and name HD2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 74 and name HE* ) (resid 111 and name HD* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 74 and name HE* ) (resid 111 and name HE* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 74 and name HE* ) (resid 111 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 74 and name HE* ) (resid 70 and name HG2* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 82 and name HE* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 82 and name HE* ) (resid 89 and name HD2* ) 0.0 0.0 3.5
(resid 36 and name HD1* ) (resid 98 and name HA ) 0.0 0.0 5.0
(resid 36 and name HD1* ) (resid 98 and name HB1 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 36 and name HD1* ) (resid 98 and name HB2 ) 0.0 0.0 5.0
(resid 81 and name HD1* ) (resid 28 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 81 and name HG2* ) (resid 28 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 32 and name HG2* ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 86 and name HA ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 95 and name HG1* ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HN ) (resid 36 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HN ) (resid 36 and name HG1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 98 and name HE* ) (resid 33 and name HN ) 0.0 0.0 5.0
(resid 95 and name HN ) (resid 89 and name HD1* ) 0.0 0.0 5.0
(resid 95 and name HN ) (resid 89 and name HD2* ) 0.0 0.0 5.0

```

### 10.3.2 Beschränkung der Diederwinkel aus J-Kopplungskonstanten

```

(resid 25 and name c ) (resid 26 and name n)
(resid 26 and name ca) (resid 26 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 29 and name c ) (resid 30 and name n)
(resid 30 and name ca) (resid 30 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 34 and name c ) (resid 35 and name n)
(resid 35 and name ca) (resid 35 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 35 and name c ) (resid 36 and name n)
(resid 36 and name ca) (resid 36 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 35 and name c ) (resid 36 and name n)
(resid 36 and name ca) (resid 36 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 54 and name c ) (resid 55 and name n)

```

```
(resid 55 and name ca) (resid 55 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 61 and name c ) (resid 62 and name n)
(resid 62 and name ca) (resid 62 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 63 and name c ) (resid 64 and name n)
(resid 64 and name ca) (resid 64 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 66 and name c ) (resid 67 and name n)
(resid 67 and name ca) (resid 67 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 67 and name c ) (resid 68 and name n)
(resid 68 and name ca) (resid 68 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 69 and name c ) (resid 70 and name n)
(resid 70 and name ca) (resid 70 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 74 and name c ) (resid 75 and name n)
(resid 75 and name ca) (resid 75 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 76 and name c ) (resid 77 and name n)
(resid 77 and name ca) (resid 77 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 82 and name c ) (resid 83 and name n)
(resid 83 and name ca) (resid 83 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 86 and name c ) (resid 87 and name n)
(resid 87 and name ca) (resid 87 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 90 and name c ) (resid 91 and name n)
(resid 91 and name ca) (resid 91 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 97 and name c ) (resid 98 and name n)
(resid 98 and name ca) (resid 98 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 101 and name c ) (resid 102 and name n)
(resid 102 and name ca) (resid 102 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 102 and name c ) (resid 103 and name n)
(resid 103 and name ca) (resid 103 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 103 and name c ) (resid 104 and name n)
(resid 104 and name ca) (resid 104 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 104 and name c ) (resid 105 and name n)
(resid 105 and name ca) (resid 105 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 110 and name c ) (resid 111 and name n)
(resid 111 and name ca) (resid 111 and name c) 1.0 -60 20 2
(resid 111 and name c ) (resid 112 and name n)
(resid 112 and name ca) (resid 112 and name c) 1.0 -60 20 2
```

### 10.3.3 Abstandsbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken

```
(resid 29 and name HN ) (resid 25 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 29 and name N ) (resid 25 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 30 and name HN ) (resid 26 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 30 and name N ) (resid 26 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 32 and name HN ) (resid 28 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 32 and name N ) (resid 28 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 33 and name HN ) (resid 29 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 33 and name N ) (resid 29 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 34 and name HN ) (resid 30 and name O ) 0.0 0.0 2.3
```

```
(resid 34 and name N ) (resid 30 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 62 and name HN ) (resid 58 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 62 and name N ) (resid 58 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 63 and name HN ) (resid 59 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 63 and name N ) (resid 59 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 64 and name HN ) (resid 60 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 64 and name N ) (resid 60 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 77 and name HN ) (resid 73 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 77 and name N ) (resid 73 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 78 and name HN ) (resid 74 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 78 and name N ) (resid 74 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 79 and name HN ) (resid 75 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 79 and name N ) (resid 75 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 80 and name HN ) (resid 76 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 80 and name N ) (resid 76 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 81 and name HN ) (resid 77 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 81 and name N ) (resid 77 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 82 and name HN ) (resid 78 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 82 and name N ) (resid 78 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 83 and name HN ) (resid 79 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 83 and name N ) (resid 79 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 85 and name HN ) (resid 81 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 85 and name N ) (resid 81 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 98 and name HN ) (resid 94 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 98 and name N ) (resid 94 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 99 and name HN ) (resid 95 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 99 and name N ) (resid 95 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 100 and name HN ) (resid 96 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 100 and name N ) (resid 96 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 102 and name HN ) (resid 98 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 102 and name N ) (resid 98 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 103 and name HN ) (resid 99 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 103 and name N ) (resid 99 and name O ) 0.0 0.0 3.3
(resid 105 and name HN ) (resid 101 and name O ) 0.0 0.0 2.3
(resid 105 and name N ) (resid 101 and name O ) 0.0 0.0 3.3
```

## 10.4 X-PLOR Protokolle

### ■ generate\_structure.inp\_new

```
! generiert structure-output fuer koordinaten-generation

topology
@../PARAMETER/topallhdg_new.hs
end
```

```
parameter
  @../PARAMETER/parallhdg_new.hs
end

segment
  name=""
  chain
  @./toph19.pep
    link pept head - * tail + * end
    first prop tail + pro end      ! special n-ter for PRO
    first nter      tail + * end
    last cter head - *      end
    sequence @../PSF/arah6.seq end
  end
end

patch DISU      {*cluster and the protein. *}
  reference=1=( resid 16 )
  reference=2=( resid 73 )
end

patch DISU      {*cluster and the protein. *}
  reference=1=( resid 28 )
  reference=2=( resid 60 )
end

patch DISU      {*cluster and the protein. *}
  reference=1=( resid 61 )
  reference=2=( resid 109 )
end

patch DISU      {*cluster and the protein. *}
  reference=1=( resid 75 )
  reference=2=( resid 117 )
end

patch DISU      {*cluster and the protein. *}
  reference=1=( resid 86 )
  reference=2=( resid 126 )
end

write structure output=../PSF/arah6.psf end

stop
```

**■ sa\_arah6\_Lauf33KL.inp**

```
remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 250)

evaluate ($iniseed = 100046)
!evaluate ($iniseed = 554321) !changed HS

evaluate ($init_t = 2000) {* initial simulated annealing temperature *}
evaluate ($high_steps = 20000) !20000
evaluate ($cool1_steps = 30000) !30000
evaluate ($cool2_steps = 15000) !15000

evaluate ($fileroot = "../results/Lauf30KL/arah6_310503_")
!evaluate ($reference = "il8_n.pdb")
evaluate ($template = "../input/arah6_new.pdb")

structure @@../input/arah6.psf end
parameter @@../input/parallhdg_new.hs end

parameter nbfix S S 462 13.6 462 13.6 end
parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

noe
  reset
  nrestraints = 5000 ! allocate space for NOEs
  ceiling 100

  class dist @../input/arah6.noe
    @../input/arah6.hbond

  set echo on message on end

  averaging * sum
  potential * soft
  scale * 1.0
  sqconstant * 1.0
  sqexponent * 2
  soexponent * 1
  rswitch * 1.0
  sqoffset * 0.0
  asymptote * 2.0
end

restraints dihedral
  nassign=1000
  @../input/dihangles.list
```

```
end

noe
  assign (resid 16 and name SG)(resid 73 and name SG) 2.02 0.1 0.1
  assign (resid 28 and name SG)(resid 60 and name SG) 2.02 0.1 0.1
  assign (resid 61 and name SG)(resid 109 and name SG) 2.02 0.1 0.1
  assign (resid 75 and name SG)(resid 117 and name SG) 2.02 0.1 0.1
  assign (resid 86 and name SG)(resid 126 and name SG) 2.02 2.02 0.1
end

evaluate ($ramacoff = -0.5*10.0**2)
evaluate ($krama = 0.0)

rama
  nres=10000
  cutoff=$ramacoff
  @../PARAMETER/gaussians/shortrange_gaussians.tbl
  @../PARAMETER/gaussians/new_shortrange_force.tbl
end

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

set echo false message false end

vector do (fbeta=10) (all)  { * friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps *}
vector do (mass=100) (all)

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
  scale=$kcdih
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)
  coor @$template
  evaluate ($seed =$count*$iniseed)
  set seed $seed end
```

```

@sa_l_randomchain.xplor

evaluate ($cpul = $cpu)

evaluate ($final1_t = 1000)      { K }
evaluate ($final2_t = 100)      { K }
evaluate ($tempstep = 50)       { K }

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final1_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))

@@sa_l_initial_values_08.xplor
parameter
  angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end

parameter nbonds
  atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
  rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end

@@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

constraints
  interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end

{* 1 ===== initial minimization *}
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

{* 2 ===== high temperature dynamics *}

@sa_cyto_hightemp.xplor

{* 3 ===== cooling 1 *}

@sa_cyto_cool1.xplor

{* 4 ===== cooling 2 *}

@sa_cyto_cool2.xplor

{* 5 ===== final minimization *}

evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
@swap15v.xplor
flags include bond angl impr vdw noe cdih coup rama end

minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

```

```
flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup end

minimize powell nstep=1000 drop=10.0 nprint=25 end

{* 6 ===== write out the final structure(s) *}

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")

print threshold=0.3 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_improppers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $coup
remarks =====
remarks          bonds,angles,improppers,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_improppers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (all) output =$filename end
evaluate ($fname="./results/Lauf30KL/arah6_310503_"+encode($count)+".prt")
set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end

end loop main

stop
```



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2000 bis Juli 2003 am Lehrstuhl Biopolymere der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt. Ihm möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten sowie sein Interesse am Fortgang und Gelingen dieser Arbeit danken.

Bei Dr. Wolf-Meinhard Becker (Forschungszentrum Borstel) bedanke ich mich für die Überlassung der Vektoren pET16b-His-Arah2.02 und pMalc-2-Arah6. Dr. Martin Suhr (Forschungszentrum Borstel) und Dr. Marco Pöppelmann (Forschungszentrum Borstel) möchte ich für die unproblematische Zusammenarbeit sowie für die Westernblots mit Patientensera danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Silke Hoffmann für die Einführung in die Laborarbeit, für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft und nicht zu letzt für ihre zahlreichen motivierenden Worte.

Ebenso danken möchte ich Dr. Kristian Schweimer für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie für die Einführung in die Auswertung NMR-spektroskopischer Daten. Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich gleichfalls Philipp Neudecker.

Ganz besonders danken möchte ich Prof. Dr. Heinrich Sticht für die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen sowie für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge. Mein besonderer Dank gilt ebenso Dr. Sabine Schwarz, die mir nicht nur mit ihrem wissenschaftlichen Rat zur Seite stand, sondern auch so manche trübsinnige Stunde aufzuhellen vermochte.

Bei Nadine Herz möchte ich mich für ihre großartige technische Unterstützung bedanken. Ulrike Herzing, Petra Deuerling, Andrea Hager danke ich für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und für die Aufheiterung des Laboralltags. Vielen Dank auch an Reiner Hofmann, Gudrun Wagner und Angela Rössler für die Lösung sämtlicher Computer- und Verwaltungsprobleme.

Bei Thomas Lauber, Anke Eisenmann und Finn Bauer bedanke ich mich für die hilfreichen Tipps zu den vielen großen und kleinen Problemen mit Strukturen, Spektren und Rechnern.

Dr. Jörg Nerkamp, meinem langjährigen Schreibtischnachbarn, danke ich für die Einführung in viele nichtwissenschaftliche Fragestellungen und für die Auflockerung der Büroatmosphäre.

Allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe danken.

Schließlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung bedanken.



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 08.07.2003

Katrin Lehmann