

**Strukturbestimmung
des Birkenpollenallergens Bet v 4**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

Jörg Nerkamp

aus Ulm

Bayreuth 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1997 bis April 2000 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der 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 20.02.2002

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums 14.06.2002

Erster Gutacher: Prof. Dr. Paul Rösch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Krauss

Diese Arbeit ist all denen gewidmet, die immer für mich da sind.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Eine Allergie ist eine fehlgeleitete Immunantwort..... | 1 |
| 1.2 Historie der Allergieforschung..... | 1 |
| 1.2.1 Die Erforschung der Allergie begann erst im 19. Jahrhundert..... | 1 |
| 1.2.2 Die molekularen und zellulären Vorgänge von allergischen Reaktionen werden seit Mitte des 20. Jahrhunderts erforscht..... | 3 |
| 1.3 Mechanismus und Therapie allergischer Erkrankungen..... | 4 |
| 1.3.1 Es gibt verschiedene Typen von allergischen Reaktionen..... | 4 |
| 1.3.2 Die zellulären und molekularen Vorgänge bei der anaphylaktischen Reaktion sind sehr komplex | 5 |
| 1.3.3 Die ursprüngliche Funktion der IgE-vermittelten Immunabwehr ist die Eliminierung von Wurmparasiten..... | 8 |
| 1.3.4 Neben einer vererbaren Prädisposition für Allergien spielen v.a. Umweltfaktoren eine Rolle bei der Ausprägung allergischer Krankheiten..... | 8 |
| 1.3.5 Heuschnupfen und andere allergische Erkrankungen sind in Wohlstandsländern weit verbreitet und stellen einen enormen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar..... | 9 |
| 1.3.6 Der zur Zeit effektivste therapeutische Ansatz zur Behandlung von Heuschnupfen ist die spezifische Immuntherapie..... | 10 |
| 1.3.7 B-Zellepitope sind konformationelle oder sequenzielle Epitope, während bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort ausschließlich sequenzielle Epitope erkannt werden..... | 11 |
| 1.4 Birkenpollenallergene..... | 13 |
| 1.4.1 Ein großer Teil der Heuschnupfen-Patienten reagiert auf Birkenpollen allergisch..... | 13 |
| 1.4.2 Bet v 4 ist ein Calcium bindendes Allergen aus Birkenpollen | 14 |
| 2. Ziele der Arbeit..... | 19 |
| 3. Materialien und Methoden..... | 20 |
| 3.1 Geräte und Chemikalien..... | 20 |
| 3.1.1 Geräte..... | 20 |
| 3.1.2 Verbrauchs- und Hilfsmittel..... | 22 |
| 3.1.3 Chemikalien..... | 22 |
| 3.1.4 Nährmedien..... | 23 |
| 3.2 Klonierung | 25 |
| 3.2.1 Bakterienstämme..... | 25 |
| 3.2.2 Plasmide..... | 26 |
| 3.2.3 Strategie zur Klonierung von Bet v 4 mit NH ₂ -terminaler Hexahistidin-Fusion..... | 30 |
| 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese..... | 32 |
| 3.2.5 Reinigung von Plasmid-DNA..... | 33 |
| 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 33 |
| 3.2.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 35 |
| 3.2.8 Restriktionsverdau von DNA..... | 35 |
| 3.2.9 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA..... | 35 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.10 | Reinigung von DNA aus enzymatisch behandelten Ansätzen..... | 35 |
| 3.2.11 | Ligation..... | 36 |
| 3.2.12 | Sequenzierung von DNA..... | 36 |
| 3.2.13 | Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α durch Elektroporation..... | 36 |
| 3.2.14 | Kolonie-PCR..... | 37 |
| 3.2.15 | Transformation von <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit der CaCl ₂ -Methode..... | 38 |
| 3.2.16 | Dauerkulturen..... | 39 |
| 3.3 | Zellanzucht und Proteinexpression | 39 |
| 3.3.1 | Bestimmung der Bakteriendichte..... | 39 |
| 3.3.2 | Untersuchung auf Überexpression..... | 39 |
| 3.3.3 | Zellkultivierung..... | 40 |
| 3.3.4 | Nachweis der exprimierten Proteine im löslichen Überstand | 40 |
| 3.4 | Proteinreinigung..... | 41 |
| 3.4.1 | Chromatographie-Säulen..... | 41 |
| 3.4.2 | Reinigung von Bet v 4 mittels Nickelionen-Affinitäts-Chromatographie..... | 42 |
| 3.4.3 | Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatographie..... | 44 |
| 3.4.4 | Reinigung von Bet v 4 durch Anionenaustauscher-Chromatographie..... | 46 |
| 3.4.5 | Reinigung von Bet v 4 mittels Chromatofokussierung..... | 47 |
| 3.4.6 | Reinigung von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von <i>E. coli</i> -Proteinen..... | 49 |
| 3.4.7 | Reinigung der Apo-Form..... | 49 |
| 3.4.8 | Herstellung eines wässrigen Extrakts von Birkenpollen..... | 49 |
| 3.5 | Proteincharakterisierung..... | 50 |
| 3.5.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli..... | 50 |
| 3.5.2 | Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow..... | 51 |
| 3.5.3 | Silberfärbung zum Nachweis geringer Proteinmengen..... | 52 |
| 3.5.4 | Blaue Native Gelelektrophorese..... | 52 |
| 3.5.5 | UV/VIS-Spektroskopie..... | 53 |
| 3.5.6 | Proteinbestimmung mit BCA..... | 54 |
| 3.5.7 | Circulardichroismus-Spektropolarimetrie..... | 55 |
| 3.5.8 | Messung von Temperaturkurven..... | 56 |
| 3.5.9 | ESI-Massenspektrometrie..... | 57 |
| 3.6 | NMR-Spektroskopie..... | 57 |
| 3.6.1 | Spektrometer..... | 57 |
| 3.6.2 | Allgemeine Meßbedingungen..... | 57 |
| 3.6.3 | NMR-Proben..... | 58 |
| 3.6.4 | Aufnahme der Spektren..... | 58 |
| 3.6.5 | Datenprozessierung..... | 60 |
| 3.6.6 | Software, Rechner..... | 60 |
| 3.6.7 | Auswertung dreidimensionaler NMR-Spektren..... | 60 |
| 3.6.8 | Sequenzielle Zuordnung..... | 61 |
| 3.6.9 | Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart..... | 62 |
| 3.6.10 | Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 durch NMR-Diffusionsmessungen..... | 62 |
| 3.7 | Gewinnung der Distanzbeschränkungen für die Strukturberechnung..... | 64 |
| 3.7.1 | Aus NOEs abgeleitete Distanzbeschränkungen..... | 64 |
| 3.7.2 | Einschränkung der dihedralen Winkel..... | 65 |
| 3.7.3 | Wasserstoffbrücken als Distanzbeschränkungen..... | 67 |
| 3.8 | Strukturberechnung mit Hilfe der Moleküldynamik..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| 4. Experimente und Ergebnisse..... | 69 |
| 4.1 Reinigung von Bet v 4 | 69 |
| 4.1.1 Expression und Reinigung von Bet v 4 als GST-Fusionsprotein..... | 69 |
| 4.1.2 Präparation von Bet v 4 als His-tag-Fusionsprotein | 75 |
| 4.1.3 Reinigung von Bet v 4 durch Anionenaustauscher-Chromatographie..... | 78 |
| 4.1.4 Reinigung von Bet v 4 durch Chromatofokussierung..... | 79 |
| 4.1.5 Reinigung von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von E. coli-Proteinen..... | 82 |
| 4.1.6 Extraktion von Birkenpollen..... | 83 |
| 4.2 Spektroskopische Charakterisierung von Bet v 4..... | 84 |
| 4.2.1 UV-Spektroskopie an Bet v 4..... | 84 |
| 4.2.2 Circular dichroismus-Spektroskopie an Bet v 4..... | 85 |
| 4.2.3 Thermische Stabilität von Bet v 4..... | 87 |
| 4.2.4 ESI-Massenspektrometrie..... | 91 |
| 4.3 Experimente zum Oligomerisierungsgrad von Bet v 4..... | 92 |
| 4.3.1 Analytische Größenausschluss-Chromatographie..... | 93 |
| 4.3.2 Blaue native Gelelektrophorese..... | 95 |
| 4.3.3 Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 über NMR-Diffusionsmessungen..... | 96 |
| 4.4 NMR-Spektroskopie an Bet v 4..... | 98 |
| 4.4.1 ¹ H-1D-Spektren von Bet v 4..... | 98 |
| 4.4.2 Homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie..... | 100 |
| 4.4.3 NMR-Spektroskopie an Isotopen markiertem Bet v 4..... | 102 |
| 4.4.4 Zuordnung der Resonanzen von Bet v 4..... | 105 |
| 4.4.5 Analyse der Sekundärstruktur anhand experimenteller Daten..... | 110 |
| 4.4.6 Wasserstoffbrücken..... | 114 |
| 4.5 Die Struktur von Bet v 4 und ihre Güte..... | 116 |
| 5. Diskussion..... | 123 |
| 5.1 Die Präparation von Bet v 4..... | 123 |
| 5.1.1 Die Reinigung von Bet v 4 mittels Affinitäts-Chromatographie erbrachte nur geringe Proteinausbeuten..... | 124 |
| 5.1.2 Es konnten effektive Strategien zur Reinigung von Bet v 4 ohne Affinitätsfusion etabliert werden..... | 125 |
| 5.2 Charakterisierung von Bet v 4..... | 127 |
| 5.2.1 Der Oligomerisierungsgrad von Bet v 4..... | 127 |
| 5.2.2 Bet v 4 ist ein stark α -helikales Protein mit ausgeprägter Thermostabilität..... | 129 |
| 5.3 Die Struktur des Birkenpollenallergens Bet v 4..... | 130 |
| 5.3.1 Bet v 4 hat eine leicht ellipsoide Gestalt..... | 130 |
| 5.3.2 Die Struktur von Bet v 4 in Lösung – Vergleich mit den Relaxationsdaten..... | 130 |
| 5.3.3 Die Polcalcine Bet v 4 und Phl p 7 unterscheiden sich in ihrer dreidimensionalen Struktur beträchtlich..... | 131 |
| 5.4 Der Entzug von Calcium hat eine starke konformationelle Änderung von Bet v 4 zur Folge..... | 134 |
| 5.5 Überlegungen zur physiologischen Funktion von Bet v 4..... | 136 |
| 5.6 Ausblick..... | 139 |
| 6. Zusammenfassung..... | 141 |
| 7. Summary..... | 142 |

| | |
|---|-----|
| 8. Abkürzungsverzeichnis..... | 143 |
| 9. Literaturverzeichnis..... | 146 |
| 10. Anhang..... | 166 |
| 10.1 Klone..... | 166 |
| 10.2 Experimentelle Randbedingungen für die Strukturrechnung..... | 166 |
| 10.2.1 Distanzbeschränkungen für die Strukturberechnung..... | 166 |
| 10.2.2 Distanzbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken..... | 171 |
| 10.2.3 Dihedrale Winkelbeschränkungen für die Strukturberechnung..... | 172 |
| 10.3 X-PLOR-Protokolle und Topologie- bzw. Parameter-Dateien..... | 173 |
| 11. Danksagung..... | 181 |
| 12. Erklärung..... | 183 |

1. Einleitung

1.1 Eine Allergie ist eine fehlgeleitete Immunantwort

Eine Allergie ist eine Abwehrreaktion des Körpers gegen Substanzen aus der Umwelt – die Allergene –, die an sich harmlos sind. Die Krankheitssymptome eines Allergikers liegen allein in der übersteigerten Reaktion des Immunsystems begründet. Man spricht deswegen auch von Überempfindlichkeit oder Hyperreaktivität.

Der Begriff Allergie stammt aus dem Griechischen *állos* „anders“ und *érgon* „Arbeit“.

Etwa 20 % der Bevölkerung in industriell entwickelten Ländern sind von Allergien vom Typ I betroffen (Lundback 1998). Allergien werden z.B. hervorgerufen durch Gräser- und Baumpollen, Nahrungsmittel, Hausstaub (insbesondere Exkremate von Hausstaubmilben) und Tierhaare. Häufig beobachtet man auch das gleichzeitige Auftreten mehrerer Allergien, z.B. gegen Birkenpollen und Steinobst (Kelso 2000). Der Grund für die sogenannte Kreuzreaktivität sind strukturell eng verwandte Allergene (Neudecker *et al.* 2000, de Blay *et al.* 1991).

1.2 Historie der Allergieforschung

1.2.1 Die Erforschung der Allergie begann erst im 19. Jahrhundert

Schon in früherer Zeit wurden allergische Reaktionen beschrieben. Der wahrscheinlich älteste dokumentierte Fall einer allergischen Reaktion ist der Tod des ägyptischen Pharaos Menes, der 2640 v. Chr. in Folge eines Wespenstichs starb.

Im Lauf der Geschichte wurden sporadisch allergische Reaktionen beschrieben, so auch von Hippokrates (um 460 – um 377 v. Chr.).

Es dauerte jedoch bis Mitte des 19. Jahrhunderts, bis man den Ursachen der Überempfindlichkeit näher auf den Grund ging.

Der englische Arzt John Bostock (1773 – 1846) berichtete 1819 vor der *Royal Medical Society of London* von einer Krankheit, von der er selbst seit seiner Kindheit betroffen war. Wiederholt litt er an Augenbrennen, laufender Nase, Husten und Atemnot. Er selbst nannte die „periodisch auftretende Affektion der Augen und der Brust“ als *Catarrhus aestivus* oder Sommerkatarrh. Er

konnte zeigen, dass die Erkrankung durch Ausdünstungen von frischem Heu verursacht wurde (Finn 1992). So setzte sich der Name „Heuschnupfen“ durch.

Auch Charles Blackley (1820 – 1900), ein Arzt aus Manchester, hatte Heuschnupfen. Er wies eindeutig nach, dass Heuschnupfen durch Pollen verursacht wird, indem er Pollen in Kratzwunden seines Unterarms rieb und dadurch Hautreaktionen hervorrief (Waite 1995).

Ende des 18. Jahrhunderts wurde die Schutzimpfung zur Immunisierung gegen infektiöse Krankheiten eingeführt. Hierzu werden die Krankheitserreger in abgeschwächter Form in den Körper eingeführt, um ihn so dagegen unempfindlich zu machen.

Charles Richet (1850 – 1935) und Paul Portier (1866 – 1962) hatten die Idee, eine Immunisierung gegen das Gift der Quallenart *Physalia physalis* (Portugiesischen Galeere) zu entwickeln. Sie führten das Experiment zunächst an einem Hund durch. Die erste Injektion des Giftes vertrug das Tier ohne besondere Reaktion. Nach 22 Tagen bekam der Hund eine zweite Injektion, ein Zehntel der tödlichen Dosis. Wider Erwarten geriet der Hund in einen Schockzustand und verstarb kurz darauf. Richet und Portier hatten die schwerste allergische Reaktion überhaupt entdeckt, den anaphylaktischen Schock (May 1985). Der Hund sollte durch eine Prophylaxe vor dem Quallengift geschützt werden, eingetreten ist aber das Gegenteil, die Anaphylaxie. Richet wurde 1913 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Ähnliches beobachtete von Behring (1854 – 1917). Er immunisierte Versuchstiere mit Diphtherie- oder Tetanustoxin und stellte fest, dass einige Tiere nach der niedrigeren Zweitdosis sehr heftig reagierten. Er prägte den Begriff Überempfindlichkeit (von Behring & Kitasato 1991).

1902 zeigte Nicholas-Maurice Arthus (1862 – 1945), dass anaphylaktische Reaktionen auch durch nicht toxische Substanzen hervorgerufen werden können. Er injizierte Kaninchen Pferdeserum. Nach der ersten Injektion kam es zu keiner Reaktion. Nach der zweiten Injektion eine Woche später beobachtete er eine starke lokale Reaktion. Das Gewebe entzündete sich und starb zum Teil ab. Diese lokale anaphylaktische Reaktion nennt man Arthus-Reaktion (Sindo 1973, Unger & Harris 1974).

Der Österreicher von Pirquet (1874 – 1924) und der Ungar Shick (1877 – 1967) publizierten 1905, dass bei einigen Kindern, denen wiederholt von Pferden stammendes Serum gegen Streptokokken-Antitoxin injiziert wurde, Fieber, geschwollene Drüsen und Nesselsucht beobachtet wurden. Man sprach von der Serumkrankheit. Sie schlugen für diese Reaktion den Begriff „Allergie“ vor (Silverstein 2000).

1923 prägten die beiden amerikanischen Forscher Coca (1875 – 1959) und Cooke (1880 – 1960) den Begriff Atopie („Ungewöhnliches“). Der Serumfaktor, der für die allergische Reaktion verantwortlich ist, wurde von Coca und Cooke als „Reagin“ bezeichnet (Zenner 1987).

Carl Prausnitz (1876 – 1963) veranschaulichte 1921 in einem Selbstversuch, dass Allergien durch Serumfaktoren übertragen werden. Er injizierte sich Serum seines Patienten Heinz Küstner, der an einer Fischallergie litt, in den Unterarm. Am nächsten Tag erhielt Prausnitz eine Injektion von Fischextrakt an dieselbe Hautstelle und zeigte zum ersten Mal in seinem Leben eine positive Hautreaktion auf Fisch (Zenner 1987). Diese Reaktion wurde Prausnitz–Küstner–Reaktion genannt. Sie wurde durch das Reagin übertragen.

1.2.2 Die molekularen und zellulären Vorgänge von allergischen Reaktionen werden seit Mitte des 20. Jahrhunderts erforscht

Das Reagin rückte immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Untersuchungen zeigten, dass das Reagin ein Antikörper war, der aber andere Eigenschaften aufwies als die Antikörper gegen Mikroorganismen. Es konnte mit den üblichen Präzipitationsmethoden nicht nachgewiesen werden, war hitzelabil und hatte die Fähigkeit, sich lange an die Haut zu heften und dort Schwellungen und Rötungen hervorzurufen. Reagin konnte keiner der bekannten Immunglobulin–Klassen IgG, IgM, IgA oder IgD zugeordnet werden.

1967 konnte das Ehepaar Ishizaka reaginreiches Serum von einem Patienten gewinnen, der an einer starken Allergie gegen Traubenkraut (*Ambrosia trifida*) litt. Kaninchen wurde das Patientenserum injiziert, und sie bildeten Antikörper gegen Reagin und die anderen humanen Immunglobuline. Dem Kaninchenantiserum wurde menschliches IgG, IgM, IgA und IgD zugegeben, was zu einer Präzipitation von Ig–Anti–Ig–Antikörper–Komplexen führte. Der Überstand sollte keine Antikörper mehr gegen bekannte Immunglobulinklassen enthalten. Die Zugabe des reaginreichen Serums führte aber zu einer schmalen Präzipitationslinie. Das reaginhaltige Präzipitat ging eine Bindung mit isotopenmarkiertem Traubenkraut–Allergen ein, was seine Antikörperaktivität nachwies. Die Ishizakas hatten damit nachgewiesen, dass das Reagin eine neue Immunglobulinklasse darstellte. Sie nannten sie γ –E–Globulin (Ishizaka & Ishizaka 1967).

Unabhängig von den Ishizakas entdeckten zur gleichen Zeit die beiden Biochemiker Johansson und Bennich ein Protein, das sich von den bislang bekannten Immunglobulinen unterschied (Johansson *et al.* 1968). Sie konnten das neue Immunglobulin mittels des Radioimmuno–Assay auch bei gesunden Menschen nachweisen. Bei Allergiepateinten stellten sie erhöhte Mengen des von ihnen

als IgND bezeichneten Proteins fest. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass das Reagin zu dieser neuen Immunglobulinklasse gehörte.

Die beiden Forscher trafen sich 1968 mit den Ishizakas. Sie stellten fest, dass sie dieselbe Immunglobulinklasse untersucht hatten. Sie einigten sich auf den Namen Immunglobulin E, kurz IgE (Bennich *et al.* 1968).

Damit war der erste Schritt getan, tiefere Einblicke in die Mechanismen der allergischen Reaktion zu gewinnen. Heute sind zahlreiche zelluläre und molekulare Mechanismen, die mit Allergien verknüpft sind, bekannt (Kapitel 1.3 und 1.4).

Allerdings ist noch nicht geklärt, was ein Protein zum Allergen macht. Einblicke darüber wird man nur durch strukturelle Daten gewinnen können.

1996 wurde die erste Struktur eines pflanzlichen Allergens, Bet v 1 aus Birkenpollen (Gajehde *et al.* 1996), aufgeklärt. Anfang des Jahres 2002 befanden sich in der Proteindatenbank die Koordinaten von 20 verschiedenen Allergenen (www.rcsb.org/pdb/).

2000 wurde die Struktur des Komplexes aus dem Birkenpollenallergen Bet v 1 mit einem Maus–IgG–Antikörper veröffentlicht (Mirza *et al.* 2000).

1.3 Mechanismus und Therapie allergischer Erkrankungen

1.3.1 Es gibt verschiedene Typen von allergischen Reaktionen

Man unterscheidet vier Typen von Allergien (Gell & Coombs 1963):

a) *Allergien vom Soforttyp, anaphylaktische Reaktion oder Typ I–Reaktion*

Beispiel hierfür sind Heuschnupfen oder allergisches Asthma (Atkinson & Kaliner 1992, Casolaro *et al.* 1996). Im folgenden Kapitel wird die Typ I–Reaktion eingehender erläutert.

b) *Cytotoxische oder Typ II–Reaktion*

Eine allergische Reaktion vom Typ II tritt dann auf, wenn das Antigen (z.B. ein Medikament oder Blutgruppenantigene) auf der Zellmembran lokalisiert ist. Es wird von zirkulierenden IgG– oder IgM–Antikörpern erkannt. Dadurch kommt es zur Zerstörung der Membran, die Komplementkaskade wird aktiviert und es kommt zur Zellyse. Die Reaktion wird erst 4 – 12 Stunden nach der Allergenexposition bemerkt. Transfusionsreaktionen oder Medikamenten induzierte hämolytische Anämien sind Beispiele für Typ II–Reaktionen (deShazo & Kemp 1997).

c) *Immunkomplexreaktionen oder Reaktionen vom Typ III*

Wie die Typ II–Reaktion ist auch die Allergie vom Typ III eine verzögerte Reaktion. Die Symptome treten erst eine Zeit lang nach dem Kontakt mit dem Allergen auf. Das zirkulierende Antigen wird von IgG, IgM oder IgE komplexiert. Dadurch wird die Komplementkaskade aktiviert und es kommt zur Infiltration von Neutrophilen. Diese setzen nach Phagozytose von Antigen–Immunglobulin–Komplexen Gewebe schädigende lysosomale Enzyme frei. Beispiele sind die Arthus–Reaktion und Medikamentenunverträglichkeiten (Vial *et al.* 1992).

d) *Zelluläre Immunreaktionen oder Typ IV–Reaktionen*

Bei der zellulären Immunreaktion sind im Gegensatz zu den anderen Typen allergischer Reaktionen keine Antikörper involviert (Gaspari 1996). Das zellgebundene Antigen wird von einer T–Helferzelle (T_H –Zelle) erkannt. Die T_H –Zelle setzt dabei Cytokine frei, die cytotoxische Zellen dazu animieren, an die Antigen tragende Zelle zu binden und diese zu zerstören. Außerdem werden durch die Cytokine Makrophagen, Monozyten und nicht sensibilisierte Lymphozyten an den Ort der Antigenbelastung gelockt. Es kommt zu Entzündungen und Gewebeschädigungen. Die Symptome der Typ IV–Reaktion treten erst 24 – 48 Stunden nach dem Antigenkontakt auf, weswegen die Reaktion auch Spättypreaktion genannt wird. Beispiele sind Reaktionen auf Kosmetika oder Chemikalien aus der Umwelt.

1.3.2 Die zellulären und molekularen Vorgänge bei der anaphylaktischen Reaktion sind sehr komplex

Allergene sind meist kleine, gut wasserlösliche Proteine oder Glykoproteine, die leicht über die Haut oder Schleimhäute in den Körper gelangen können, beim Heuschnupfen z.B. in den Hals–, Nasen– und Rachenraum, beim allergischen Asthma in das bronchiale Gewebe.

Beim ersten Kontakt mit dem Allergen wird es von Antigen präsentierenden Zellen (APC) durch Endozytose aufgenommen und durch lysosomale Enzyme in kleinere Peptide zerlegt (Abbildung 1.3–1, von Bubnoff *et al.* 2001). Diese Allergenfragmente werden an der Oberfläche der Antigen präsentierenden Zelle an *major histocompatibility complex* (MHC) Moleküle der Klasse II gebunden und den T–Helferzellen vom Typ II (T_H2) präsentiert.

In dieser Form wird das Allergen von T–Zell–Rezeptoren (TCR) erkannt, die auf der Membran von T_H2 –Zellen und anderen T–Lymphozyten lokalisiert sind. In Folge der Antigenbindung sezerniert die T_H2 –Zelle u.a. Interleukin 4 (IL–4) und IL–13.

Eine B–Zelle mit derselben Antigenespezifität kann an die T_H2 –Zelle binden. Der B–Lymphozyt

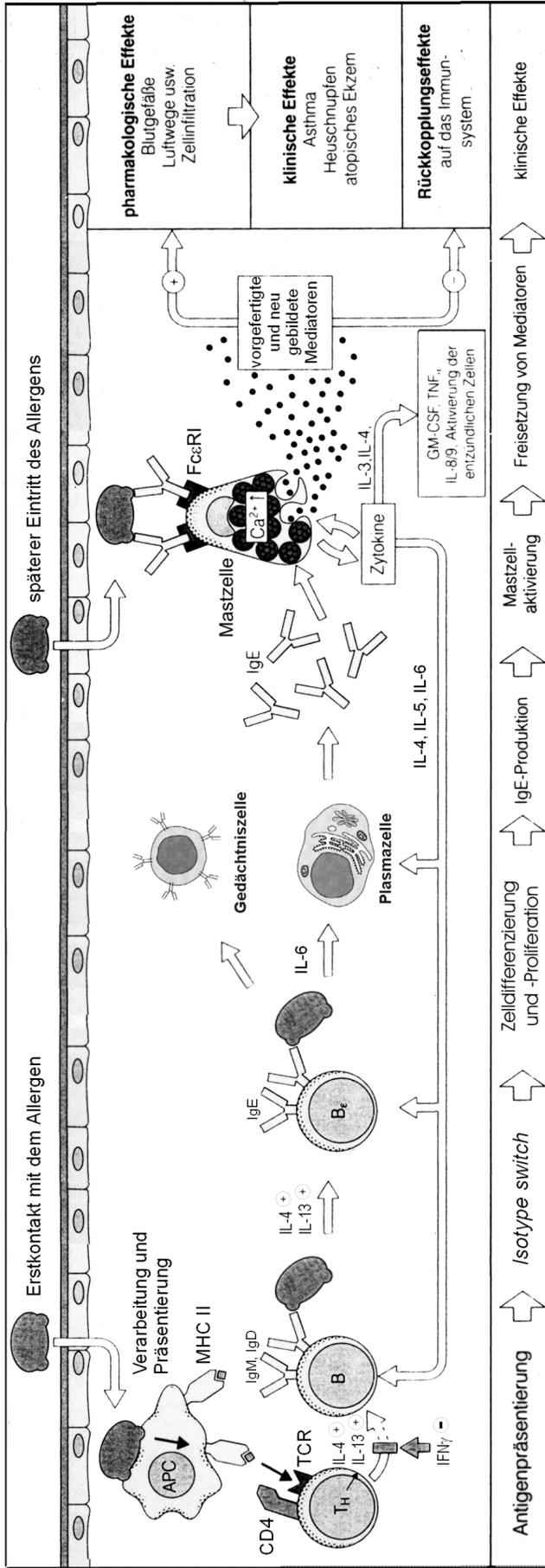


Abbildung 1.3-1: Immunantwort bei anaphylaktischen Reaktionen. Das Allergen wird beim ersten Eintritt in den Organismus von Antigen präsentierenden Zellen (APC) in Peptide fragmentiert und über den *major histability complex* (MHC II) den T-Helferzellen vom Typ II (T_H2) präsentiert. Die T_H2-Zelle erkennt das Allergenfragment über den T-Zell-Rezeptor (TCR) mit dem akzessorischen CD4-Corezeptor und sezerniert Interleukin 4 (IL-4). Ein B-Lymphozyt mit gleicher Antigenenerkennung kann an die aktivierte T_H2-Zelle binden. IL-4 erleichtert den Zell-Zell-Kontakt, während Interferon γ (IFN_γ) den Kontakt inhibiert. Virgine B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobulin der Klassen D und M (IgD und IgM). Nach Bindung eines Allergens, induziert durch IL-4 und IL-13, erfolgt ein Klassenwechsel (*isotype switch*) zu IgE. IL-6 stimuliert die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle und eine Proliferation durch klonale Expansion. Die Plasmazelle produziert IgE, das in das umliegende Gewebe gelangt. Dort kann IgE an spezifische IgE-membranständige Rezeptoren (FcεRI) von Mastzellen binden. Mastzellen sind reich an Granula, die Mediatoren wie Histamin und Cytokine enthalten. Die Quervernetzung von rezeptorgebundenen IgE-Molekülen durch das Allergen induziert einen Einstrom von Calcium-Ionen in die Mastzelle. Das führt zur Degranulation der Mastzelle und Freisetzung von vorgefertigten und neu gebildeten Mediatoren. Die Mediatoren können Entzündungsreaktionen, Gewebeschädigungen und Schleimabsonderung hervorrufen, die sich als klinische Symptome wie Heuschnupfen oder Asthma manifestieren. Die Differenzierung von ruhenden Gedächtniszellen zu Plasmazellen erlaubt bei einem Wiedereintritt des Allergens eine rasche Bildung von IgE mit nachfolgender Freisetzung Allergie vermittelnder Mediatoren. Verändert nach Brostoff, J. & Hall, T.: Hypersensitivity type I. In: Immunology, 4th ed. (Eds. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.), Mosby, London 1996, pp 22.3

wird durch den direkten Kontakt mit der T-Helfer-Zelle sowie durch IL-4 stimuliert. B-Zellen tragen im inaktiven Zustand an ihrer Oberfläche IgM und IgD Antikörpermoleküle, an die das Allergen bindet. IL-4 und IL-13 induzieren einen *isotype switch* zu IgE (McKenzie 2000). Der B-Lymphozyt differenziert zur Plasmazelle. Die reife Plasmazelle produziert und sezerniert IgE.

Aktive B-Zellen können sich durch den Verlust von Cytokin-Rezeptoren zu ruhenden Gedächtniszellen entwickeln, die bei einem erneuten Eintritt des Allergens zu Plasmazellen reifen und dadurch sehr rasch klinische Symptome hervorrufen.

Der Erstkontakt mit dem Allergen bleibt unbemerkt. Erst ein weiterer Kontakt mit dem Allergen löst eine allergische Reaktion aus. Das geschieht durch die Degranulation von Mastzellen und der Freisetzung von Entzündungsreaktionen vermittelnden Mediatoren. Mastzellen sind die primären, Entzündungsreaktionen vermittelnde Zellen IgE-abhängiger Reaktionen (McNeil & Austen 1995). Sie besitzen zahlreiche Granula, die biochemische Mediatoren wie Histamin und Cytokine enthalten. Andere Mediatoren, z.B. Prostaglandine und Leukotriene, werden unmittelbar vor ihrer Freisetzung in der Zellmembran synthetisiert. Mastzellen tragen an ihrer Zelloberfläche IgE-spezifische Membranrezeptoren (FcεRI) mit hoher Affinität für IgE (Garman *et al.* 1999). Die Degranulation der Mastzellen mit Freisetzung der Mediatoren erfolgt, wenn FcεRI-Rezeptoren mit gebundenem IgE-Antikörper durch Bindung eines Allergen-Moleküls quervernetzt werden (Abbildung 1.3-1). Ein Allergen muss demnach über mindestens zwei Antigen bindende Stellen (Epitope) verfügen.

Zu den freigesetzten Mediatoren gehören neben Histamin, das eine wichtige Rolle beim Heuschnupfen und der Linderung dessen Symptome (Antihistaminika) und den Arachidonsäuremetaboliten (Prostaglandin, Leukotriene und Thromboxane) auch Cytokine (Interleukine, Interferon γ) und Enzyme wie Kallikrein und Tryptase.

Die Mediatoren können chemotaktisch eine Infiltration weiterer Leukozyten induzieren und dadurch Entzündungsreaktionen hervorrufen oder zu anderen Organen gelangen und dort Reaktionen auslösen.

1.3.3 Die ursprüngliche Funktion der IgE-vermittelten Immunabwehr ist die Eliminierung von Wurmparasiten

Wozu dient eigentlich die IgE-vermittelte Immunantwort, da sie doch scheinbar nur negative Auswirkungen hat? Die ursprüngliche Aufgabe besteht in der Abwehr von parasitären Würmern (Helminthen): Faden-, Band- und Spulwürmer. Mehr als ein Viertel der Weltbevölkerung sind mit Würmern infiziert (Chan *et al.* 1994).

Im Laufe der T_H2 -Zell-abhängigen Immunreaktion wird Interleukin 5 freigesetzt (Abbildung 1.3-1), das Eosinophile anlockt. Die Eosinophilen setzen cytotoxische Enzyme frei, die zum Absterben des Parasiten führen (Else & Finkelman 1998, Finkelman & Urban Jr. 2001).

In industriell entwickelten Staaten treten Wurminfektionen hingegen kaum mehr auf. Im Gegenzug sind Allergien in weniger entwickelten Ländern, in denen Infektionen mit Würmern gehäuft auftreten, kaum verbreitet (Yazdanbakhsh *et al.* 2001).

1.3.4 Neben einer vererbaren Prädisposition für Allergien spielen v.a. Umweltfaktoren eine Rolle bei der Ausprägung allergischer Krankheiten

Durch zunehmende Hygiene in den Industrieländern spielen dort Wurminfektionen kaum mehr eine Rolle. Der wirkungsvolle Teil der IgE-vermittelten Immunabwehr wurde somit bedeutungslos und richtet sich nun gegen an sich harmlose Substanzen, die Allergene.

Eine Prädisposition für die Entwicklung von Allergien ist vererbbar. Kinder von Allergikern leiden weit häufiger an Heuschnupfen oder Asthma als Kinder von gesunden Eltern. Andererseits wurde beobachtet, dass nur in 20 % der Fälle bei eineiigen Zwillingen beide Kinder Allergien bekommen. Somit müssen Umweltfaktoren bei der Ausbildung allergischer Erkrankungen eine Rolle spielen.

Auffällig ist die unterschiedliche Verbreitung von Asthma und Heuschnupfen in der früheren DDR im Vergleich zur BRD bei den unter 40-Jährigen (Nicolai 1997). Die Allergieraten sind in Ostdeutschland deutlich niedriger. Dort besuchten 90 % der Kinder Kinderkrippen und waren weit häufiger mit Infektionskrankheiten als im Westen Deutschlands konfrontiert. Zudem war die Umweltbelastung in der DDR größer als in der BRD. Folglich war das Immunsystem der DDR-Bürger weit mehr gefordert. Im Gegensatz dazu beobachtet man in der BRD oft eine übertriebene Hygiene bei der Kinder- und Säuglingspflege.

Ein weiterer Faktor für höhere Allergieraten in Wohlstandsländern sind möglicherweise wärmeisolierende Maßnahmen. Sie verringern den Luftaustausch in den Wohnräumen und halten Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf einem hohen Niveau. Das sind optimale Voraussetzungen für Schimmelpilze und Hausstaubmilben, deren Ausscheidungen ein hohes allergenes Potenzial besitzen (Hirsch 1999).

Die Verschmutzung der Luft birgt ebenfalls ein erhöhtes Risiko (Riediker 2001). Eine ständige Reizung der Atemwege erhöht die Gefahr, Asthma zu entwickeln. Außerdem wurde gezeigt, dass Pollenallergene, die an Dieselrußpartikel gebunden sind, sehr potente Allergieauslöser sind (Knox *et al.* 1997).

1.3.5 Heuschnupfen und andere allergische Erkrankungen sind in Wohlstandsländern weit verbreitet und stellen einen enormen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar.

Etwa 20 % der Erwachsenen in industriell entwickelten Ländern leiden an Heuschnupfen, 1 – 20 % an Asthma (Lundback 1998). In den USA macht die Behandlung allergischer Erkrankungen mit den größten Teil der Gesundheitskosten aus.

Symptome der allergischen Rhinitis, so der medizinische Name für Heuschnupfen, sind Niesen, Ausfluss von Schleim und eine Verstopfung der Nase durch Schwellung der Nasenschleimhaut (Horak 2000). In akuten Phasen der pollenreichen Jahreszeit sind sogar asthmatische Reaktionen möglich.

Heuschnupfen tritt oftmals in Verbindung mit Nahrungsmittelallergien auf (Bircher *et al.* 1994, Eriksson *et al.* 1982). Grund hierfür ist die Kreuzreaktivität. In Nahrungsmitteln, z.B. Äpfeln, Birnen, Kirschen, Haselnüssen oder Sellerie finden sich Proteine, die sequenz- und strukturhomolog zu Proteinen aus Gräser- oder Baumpollen sind (Kapitel 1.4.1). Die kreuzreaktiven Allergene weisen dieselben Epitope an ihrer Oberfläche auf. Neben den Unannehmlichkeiten, die ein Heuschnupfen mit sich bringt, müssen zahlreiche Allergiekranke auf bestimmte Lebensmittel verzichten. Bei einem Verzehr ist nicht nur mit einem Jucken und Schwellen von Hals, Rachen und Zunge zu rechnen (Ortolani 1988), sondern es kann schlimmstenfalls zu einem anaphylaktischen Schock kommen, bei dem Kreislaufversagen unter Umständen zum Tod führen kann.

Asthmapatienten leiden meist unter einer chronischen Entzündung des Respirationstrakts. Dadurch ist die Atmung eingeschränkt. Eine verminderte Leistungsfähigkeit kann sogar zur Berufsunfähigkeit führen. Umweltreize können einen Asthmaanfall mit akuter Atemnot verursachen, der den Tod des Patienten herbeiführen kann, wenn nicht umgehend medikamentös eingegriffen wird.

Eine Heilung von Allergien ist nicht möglich. Die medikamentöse Behandlung von Allergiepateinten zieht sich deswegen meist über sehr große Zeiträume. Die spezifische Immuntherapie, die eine Symptomfreiheit für längere Zeit bewirken kann, ist sehr kostenaufwändig und wird meist nur bei schweren Allergierkrankungen durchgeführt.

1.3.6 Der zur Zeit effektivste therapeutische Ansatz zur Behandlung von Heuschnupfen ist die spezifische Immuntherapie

Die sicherste Therapie bei Allergien ist ein Vermeiden des Kontakts mit dem Allergen. Bei Lebensmittel- oder Tierhaarallergien ist diese Methode anwendbar, nicht jedoch bei einer Pollenallergie, da sich Patienten im Frühjahr und Sommer nicht im Freien aufhalten dürften. Deswegen versucht man bei Heuschnupfen-Patienten häufig, die Symptome zu bekämpfen. Meist geschieht das mit Hilfe sogenannter Antihistaminika (Marshall Jr. 2000). Diese binden an Histaminrezeptoren und verhindern dadurch die Mediatorwirkung des Histamin. Antihistaminika greifen aber erst am Ende der allergischen Reaktionskaskade ein und sind nicht in der Lage, Patienten von der Allergie zu heilen. Somit ist eine Anwendung zu jeder Pollensaison notwendig. Das gleiche gilt für andere Rezeptorantagonisten, die als Nasenspray eingesetzt werden, um die Verstopfung der Nase zu lösen.

Die bislang einzig wirksame Therapie, Allergie- und Asthmapatienten für lange Zeit von ihrer Krankheit zu befreien, ist die spezifische Immuntherapie (auch Desensibilisierung oder Hyposensibilisierung genannt; Bousquet *et al.* 1998, Jacobsen *et al.* 1997). Hierzu wird dem Patienten regelmäßig Allergenextrakt injiziert. Die Dosis des Allergens wird hierbei im Lauf der Zeit erhöht. Zunächst wird durch das Einbringen des Allergens eine allergische Reaktion ausgelöst, weswegen diese Art der Therapie nicht ohne Nebenwirkungen bleibt und im schlimmsten Fall zum anaphylaktischen Schock führt. Der Körper adaptiert sich durch den ständigen Kontakt an das Allergen. Das wird aber nicht dadurch erreicht, dass das Allergen nicht mehr von IgE erkannt wird, sondern an einem Wechsel von der B-Zell-abhängigen Immunantwort zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort, in deren Verlauf IgG-Antikörper produziert werden. Dieser Zweig der Immunantwort wird normalerweise bei der Infektion mit Bakterien oder Viren aktiviert.

IgG-Antikörper können als blockierende Antikörper fungieren, indem sie das Allergen abfangen. Ursache hierfür ist die 10^5 -fach höheren Konzentration von IgG im Vergleich zu IgE. Immunglobuline vom Typ E liegen im Körper nur in sehr geringen Konzentrationen vor (50 ng/ml). Bei Allergikern ist die Konzentration zwei- bis zehnfach erhöht. Im Vergleich dazu beträgt die Konzentration von IgG-Molekülen 12 mg/ml.

Ein weiterer Effekt ist die Bildung von T_{H1} -abhängigen Cytokinen, z.B. Interferon γ (IFN_γ). IFN_γ inhibiert die Bildung von T_{H2} -Lymphozyten aus Vorläuferzellen. Somit stehen weniger T_{H2} -Zellen zur Verfügung, die neben T_{H2} -Cytokinen (IL-4 und IL-13) zum Klassenwechsel von IgM und IgD zu IgE notwendig sind (Abbildung 1.3-1). Die T_{H1} -abhängigen Cytokine unterbinden außerdem die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und damit die Produktion von IgE. Des Weiteren wird die Degranulation von Mastzellen und die Freisetzung von Mediatoren unterbunden. Die Immuntherapie ist aber sehr aufwändig und kann bis zu 4 Jahre dauern.

Neuere Methoden der Immuntherapie umfassen die Verwendung von rekombinant hergestellten Allergenen. Durch die gezielte Veränderung von Aminosäuren können B-Zell-Epitope eliminiert werden, während T-Zell-Epitope erhalten bleiben, so dass nur mehr eine T-Zell-abhängige Immunantwort induziert wird und blockierende IgG-Antikörper gebildet werden. Anaphylaktische Nebenwirkungen können dadurch vermieden werden (Rolland *et al.* 2000, Akdis & Blaser 2000).

1.3.7 B-Zellepitope sind konformationelle oder sequenzielle Epitope, während bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort ausschließlich sequenzielle Epitope erkannt werden

Bislang ist noch nicht bekannt, was ein Protein zum Allergen macht. Ein Allergen muss T- und B-Zell-Epitope enthalten. T-Zell-Epitope sind zur Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor von T_{H2} -Helferzellen notwendig, während B-Zell-Epitope von den IgE-Antikörpern erkannt werden.

T-Zell-Epitope sind sequenzielle (kontinuierliche) Epitope. Antigen präsentierende Zellen fragmentieren Allergene in Peptide von mindestens 7-8 Aminosäuren, die vom T-Zell-Rezeptor erkannt werden (Rock *et al.* 1992).

B-Zell-Epitope können sequenziell oder konformationell (diskontinuierlich) sein. Es sind oberflächenexponierte Bereiche eines Proteins, an welche die IgE-Antikörper binden. Sequenzielle Epitope sind Bereiche von maximal 8 aufeinanderfolgenden, meist hydrophilen Aminosäuren (Godkin *et al.* 2001). Bei konformationellen B-Zell-Epitopen gelangen Bereiche von Aminosäureresten, die in der Aminosäuresequenz weit auseinanderliegen, durch die Faltung des Proteins in räumliche Nähe zueinander und werden in dieser Form von Antikörpern erkannt (van Regenmortel 1989). Bislang gibt es keinen zuverlässigen Algorithmus, mit dessen Hilfe B-Zell-

Epitope vorhergesagt werden können (Hopp & Woods 1983, Jameson & Wolf 1988).

Die T-Zell-Epitope eines Proteins können mit dem *epitope mapping* nachgewiesen werden. Dazu werden überlappende Peptidfragmente eines Protein mit einer Länge von 10 – 20 Aminosäureresten generiert und auf ihre Antikörperbindungseigenschaften hin untersucht.

Auf die gleiche Art und Weise können kontinuierliche B-Zell-Epitope nachgewiesen werden. Aufwändiger gestaltet sich der Nachweis von konformationellen B-Zell-Epitopen (Schramm *et al.* 2001). Hier werden zunächst lange Proteinfragmente auf ihre IgE-Bindung hin untersucht, bei denen die sequenziell auseinander liegenden Aminosäureabschnitte das Epitop formen können. Konformationelle B-Zell-Epitope werden durch eine weitere Fragmentierung der Peptide zerstört. Ein anderer Ansatz zur Identifikation von konformationellen B-Zell-Epitopen ist der gezielte Austausch von Aminosäureresten des Allergens durch gerichtete Mutagenese. Verliert ein Allergen durch den Austausch einer Aminosäureseitenkette die Eigenschaft IgE zu binden, kann diese Sequenzposition einem B-Zell-Epitop zugewiesen werden. Die Kenntnis der Molekülstruktur eines Allergens erleichtert hierbei die Auswahl der Reste, die potenziell einem B-Zell-Epitop zugehörig sind.

Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung von Protonenaustausch vom Allergen im Vergleich zum Allergen-Antikörper-Komplex mittels Kernmagnetischer Resonanz (NMR) Spektroskopie (Mueller 2001).

Der bislang einzige direkte Nachweis eines Epitopes erfolgte durch die Aufklärung der Struktur eines Antikörper-Allergen-Komplexes (Mirza *et al.* 2000).

Die Kenntnis vieler Allergenstrukturen und der Nachweis von Epitopen wird zeigen, welche strukturellen Eigenschaften B-Zell-Epitope aufweisen und wird ihre zuverlässige Vorhersage erlauben. Das wird zur gezielten Herstellung hypoallergener Proteine führen, die eine Immuntherapie ohne anaphylaktische Nebenwirkung ermöglichen.

1.4 Birkenpollenallergene

1.4.1 Ein großer Teil der Heuschnupfen–Patienten reagiert auf Birkenpollen allergisch

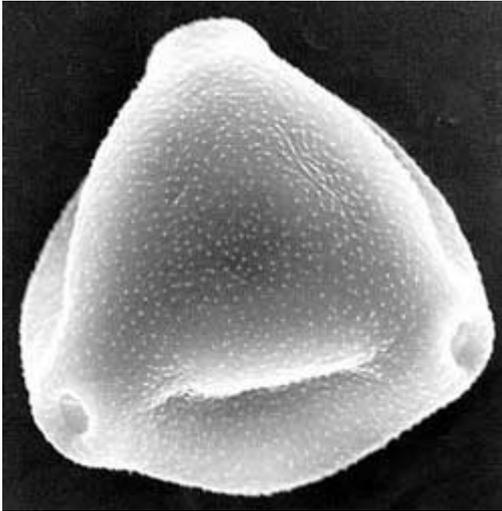


Abbildung 1.4–1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Birkenpollen (*Betula verrucosa*). Die Größe beträgt etwa 30 µm.

Neben Nahrungsmittelallergien sind Pollenallergien in industrialisierten Ländern am weitesten verbreitet. Quellen von Pollenallergenen sind Gräser, Büsche und Bäume. Zu den wichtigsten Verursachern von Pollenallergien gehören Birkenpollen (Abbildung 1.4–1). Sie enthalten mehrere Allergene, von denen bislang 6 charakterisiert wurden.

Das Hauptallergen der Birke (*Betula verrucosa*) ist Bet v 1. 96 % der Sera von Birkenpollenallergikern reagieren mit Bet v 1 (Jarolim *et al.* 1989). Es ist das am besten untersuchte Allergen. Die Struktur von Bet v 1 ist aufgeklärt (Gajehde *et al.* 1996, Schweimer *et al.* 1999), die physiologische Funktion ist aber bislang nicht bekannt. Seine Sequenzhomologie zu

stressinduzierten *pathogenesis related proteins* (Midoro–Horiuti *et al.* 2001) lässt eine Funktion bei der Pathogenabwehr vermuten. Die strukturelle Verwandtschaft zur START–Domäne des menschlichen MLN64–Proteins (Tsuchihata & Hurley 2000), das in den Steroidtransport involviert ist, lässt eine Bindung von Phytohormonen durch Bet v 1 und strukturverwandten Proteinen nicht unwahrscheinlich erscheinen. Zahlreiche Proteine aus Nahrungsmitteln, z.B. Kirschen, Äpfel, Sellerie oder Haselnüsse sind dem Bet v 1 sequenzhomolog und strukturell verwandt (Schöning *et al.* 1995, Scheurer *et al.* 1999, Neudecker *et al.* 2001). Die Folge sind Kreuzreaktivitäten. Birkenpollenallergiker zeigen deswegen häufig auch Überempfindlichkeitsreaktionen gegen verschiedene Obst– und Gemüsesorten (Eriksson *et al.* 1982, Bircher *et al.* 1994).

Birkenpollenprofilin, Bet v 2, (Fedorov *et al.* 1997) ist ein Aktin und Phosphoinositol bindendes Protein. Profiline sind in nahezu allen eukaryotischen Organismen vorhanden. Deswegen werden zahlreiche Kreuzreaktivitäten bei Birkenpollenprofilin–Allergikern beobachtet. Profiline werden daher auch Pan–Allergene genannt.

Bet v 3 ist ein Allergen mit drei Calcium bindenden Domänen vom EF–Hand–Typ. Der Verlust von Calcium hat eine stark verminderte IgE–Reaktivität zur Folge (Seiberler *et al.* 1994).

Bet v 4 ist ebenfalls ein Calcium bindendes Protein mit zwei Calciumbindungsstellen vom EF-Hand-Typ. Im folgenden Kapitel wird Bet v 4 detailliert vorgestellt (Kapitel 1.4.2).

Bet v 6 ist das bislang größte charakterisierte Birkenpollenallergen (33,5 kD). Es gehört zur Familie der Phenylcumaranbenzylether-Reduktasen. Auch hier wird eine Funktion bei der Pathogenabwehr vermutet (Karamloo *et al.* 2001).

Bet v 7 gehört zu den phylogenetisch konservierten Cyclophilinen. Man vermutet deshalb, dass Bet v 7 einer neuen Klasse von Pan-Allergenen angehört (Cadot *et al.* 2000, Fluckiger *et al.* 2002).

1.4.2 Bet v 4 ist ein Calcium bindendes Allergen aus Birkenpollen

Bet v 4 ist ein Calcium bindendes Protein aus Pollen der Weißbirke (*Betula verrucosa*). Es gehört zur Familie der Polcalcine. Bet v 4 wurde 1997 von zwei Arbeitsgruppen als Allergen aus Birkenpollenextrakt entdeckt und charakterisiert (Engel *et al.* 1997, Twardosz *et al.* 1997).

Aminosäuresequenz von Bet v 4

1 11 21 31 41 50

| | | | | |

ADDHPQDKAE RERIFKRFD A NGDGKISAAE LGEALKTLGS ITPDEVKHHM

AEIDTDGDGF ISFQEF TDFG RANRGLLKDV AKIF

| | | |

51 61 71 81

Zahl der Aminosäurereste: 84

Berechnetes Molekulargewicht: 9316,3 Da (Apo-Form)

Theoretischer isoelektrischer Punkt: 4,77

Abbildung 1.4–2: Bet v 4 ist ein kleines saures Protein mit einem Molekulargewicht von 9,3 kD (für die Calcium-freie Form) und einem berechneten isoelektrischen Punkt von 4,77 (berechnet mit dem ProtParam Tool des Expasy-Servers www.expasy.ch). Die Aminosäuresequenz ist in der SWISS-PROT-Datenbank (www.expasy.ch/sprot/) unter der Zugriffsnummer Q39419 abgelegt. Saure Aminosäurereste sind rot dargestellt, basische blau, Aminosäuren mit aromatischen und aliphatischen Seitenketten grün, solche mit polaren Seitenketten gelb.

Bet v 4 ist ein minores Allergen, nur etwa 5 – 20 % der Sera von Birkenpollenallergikern enthalten IgE-Antikörper gegen Bet v 4. Bedeutung erlangt dieses Allergen v.a. wegen zahlreicher Kreuzreaktivitäten mit Calcium bindenden Pollenproteinen aus anderen Pflanzen, die phylogenetisch nicht mit der Birke verwandt sind, die zur Familie der *Fagales* gehört. Dazu gehören Erle (Hayek *et al.* 1998), Olive (Ledesma *et al.* 1998), Flieder, Lilie (Engel *et al.* 1997), Steckrübe (Focke *et al.* 1998, Rozwadowski *et al.* 1999), Raps (Toriyama *et al.* 1995, Okada *et al.* 1999), Bermudagrass (Suphioglu *et al.* 1997, Smith *et al.* 1997) und Wiesenlischgras (Niederberger *et al.* 1999).

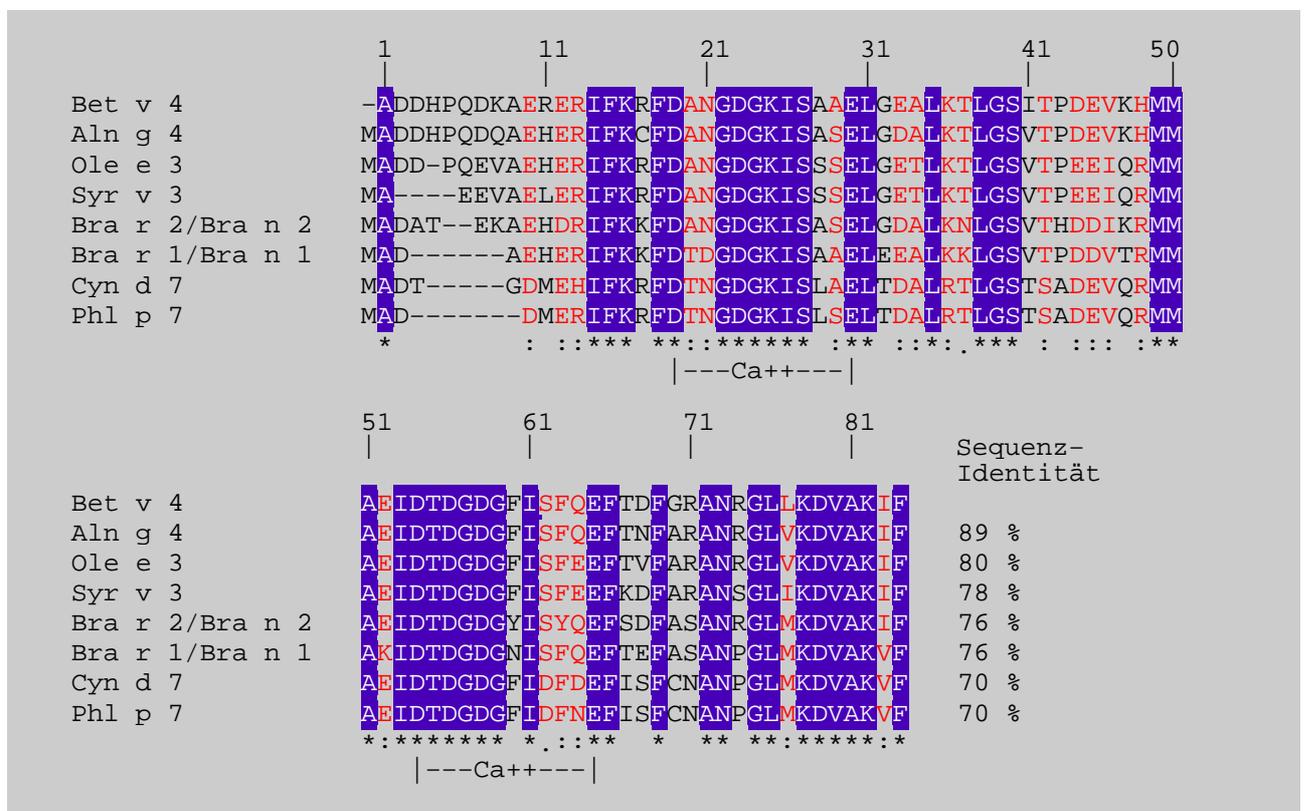


Abbildung 1.4–3: Sequenzalignment der Polcalcine aus Birke (Bet v 4, *Betula verrucosa*), Erle (Aln g 4, *Alnus glutinosa*, Hayek *et al.* 1998), Olive (Ole e 3, *Olea europaea*, Ledesma *et al.* 1998), Flieder (Syr v 3, *Syringa vulgaris*, SwissProt Datenbank, accession number P58171), Steckrübe [Bra n 1 (Toriyama *et al.* 1995) und Bra n 2, *Brassica napus*,], Raps (Bra r 1 und Bra r 2, *Brassica rapa*, Toriyama *et al.* 1995), Bermudagrass (Cyn d 7, *Cynodon dactylon*, Smith *et al.* 1997) und Wiesenlischgras (Phl p 7, *Phleum pratense*, Niederberger *et al.* 1999). Die Sequenzidentitäten mit Bet v 4 betragen 70 – 90 %. Die homologen Proteine wurden mittels einer PSI-Blast-Suche (Altschul *et al.* 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) ermittelt. Das *multiple alignment* wurde mit Hilfe des Programms ClustalW (Thompson *et al.* 1994; www2.ebi.ac.uk/clustalw/) durchgeführt. Identische Aminosäurereste sind blau hinterlegt, ähnliche Reste sind rot markiert. Die Sequenzhomologie erstreckt sich über die gesamte Aminosäuresequenz. Lediglich im aminoterminalen Bereich sind manche Polcalcine verkürzt. Die jeweils 12 Aminosäurereste langen Calcium-Bindungsregionen sind angezeichnet.

Sequenzhomologien bestehen auch zu anderen Calcium bindenden Proteinen wie dem Calciumspeicherprotein Calbindin und Calmodulin, das in eine Vielzahl regulatorischer Prozesse eingebunden ist (Abbildung 1.4–4). Die Homologien konzentrieren sich hier auf die Bereiche der Calcium-Bindungsstellen. Diese sind vom EF-Hand-Typ. Bet v 4 verfügt über zwei solcher EF-Hände.

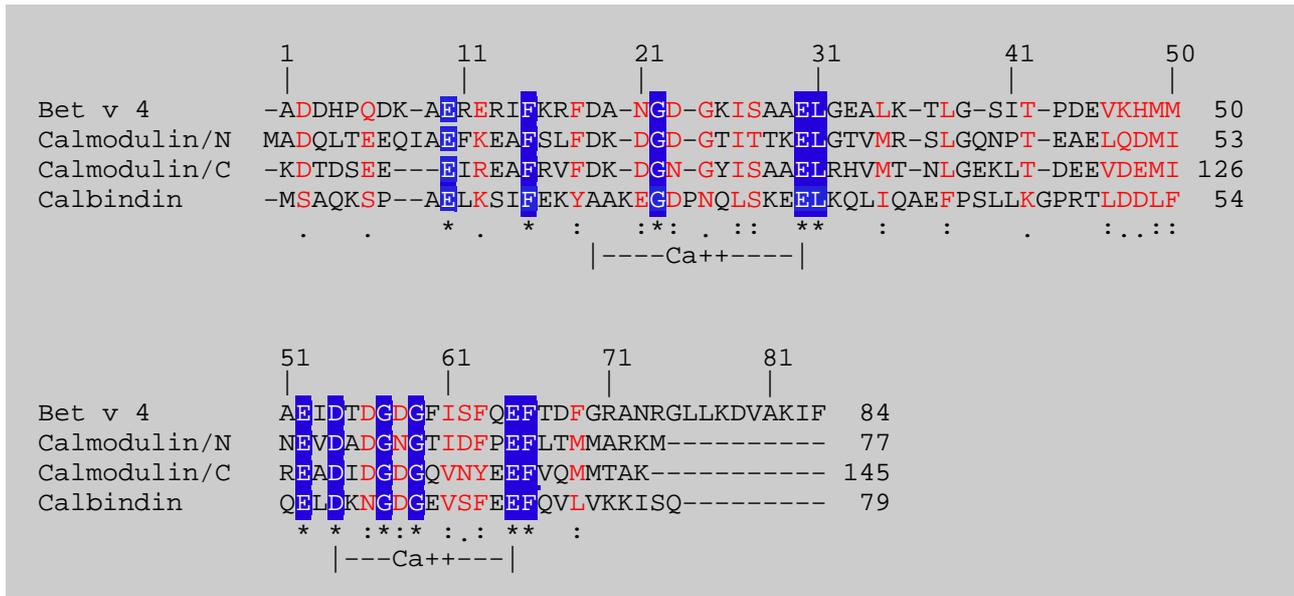


Abbildung 1.4–4: Bet v 4 zeigt Sequenzähnlichkeiten mit anderen Calcium bindenden Proteinen, z.B. Calmodulin und Calbindin D_{9k} . Gezeigt sind die amino- und carboxyterminale Domäne von menschlichem Calmodulin (Wawrzynczak & Perham 1984) und Calbindin aus Schwein (Jeung *et al.* 1992). Identische und ähnliche Aminosäuren sind blau bzw. rot markiert. Sequenzidentität findet sich v.a. im Bereich der Calciumbindungsstellen.

EF-Hände bestehen aus zwei senkrecht zueinander angeordneten α -Helices, die durch eine Schleife verbunden werden (Ikura 1996, Heizmann & Hunizker 1991). Die Schleife, die die eigentliche Calciumbindungsstelle darstellt, besteht in der Regel aus 12 Aminosäureresten. Calcium-Ionen werden von vier Carboxylat- oder Carboxamid-Gruppen von Seitenketten und einen Carbonyl-Sauerstoff des Proteinrückgrats bipyramidal koordiniert (Abbildung 1.4–5). Die sechste Koordinationstelle bildet entweder ein weiteres Sauerstoffatom einer Carboxylatgruppe oder ein Wassermolekül. Das EF-Hand-Motiv wurde erstmals bei Parvalbumin aus Karpfen, das ebenfalls ein Allergen ist (Bugajska-Schretter *et al.* 1998, 2000), strukturell charakterisiert (Kretsinger & Nockolds 1973, Kumar *et al.* 1989). Der Name EF-Hand rührt von der E- und F-Helix des Parvalbumins her.

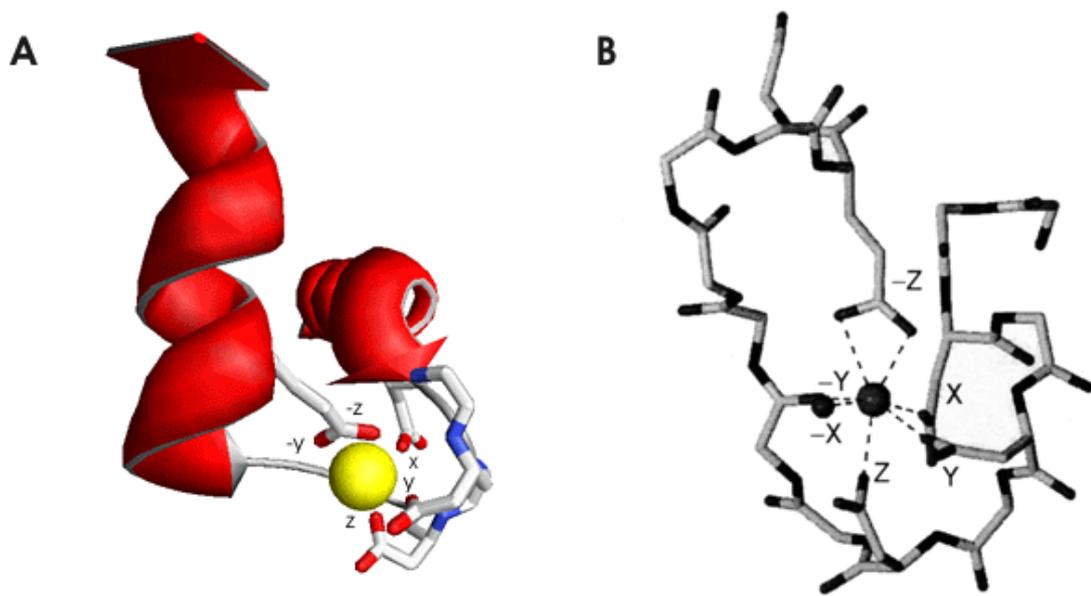


Abbildung 1.4-5 A: Schematische Darstellung einer EF-Hand. Zwei senkrecht zueinander stehende α -Helices sind durch eine Schleife verbunden. Aminosäureseitenketten der Schleife koordinieren das Ca^{2+} -Ion mittels Carboxylat- oder Carboxamid-Gruppen und einem Carbonyl-Sauerstoff des Proteinrückgrats.

(www.expasy.ch/swissmod/course/gifs/efhand.gif)

B: Bipyramidale Koordination des Ca^{2+} -Ions. Aus Lewit-Bentley & Réty (2000). Die Koordinationsstelle -x wird in manchen EF-Händen von einem Wassermolekül eingenommen.

Proteingebundenes Calcium scheint für die Allergenizität von Bet v 4 nicht unbedingt notwendig zu sein. Die IgE-Reaktivität von calciumfreiem Bet v 4 ist teilweise vermindert (Twardosz *et al.* 1997). Zum Teil findet man keine Bindung mehr von IgE, während andere Patientensera auf die Calcium- und die Apo-Form von Bet v 4 in gleicher Weise reagieren (Engel *et al.* 1997).

Durch Mutationsstudien konnten Engel *et al.* (1997) zeigen, dass die carboxyterminale Calciumbindungsstelle ein B-Zell-Epitop darstellt, während Twardosz *et al.* (1997) durch Deletion der ersten 16 Aminosäuren zeigten, dass die aminoterminalen α -Helix eine Antikörperbindungsstelle ist.

Calcium bindende Proteine sind in der Regel entweder Calcium-Speicherproteine oder haben eine regulatorische Funktion als Sensorproteine (Ikura 1996).

Seit langem ist bekannt, dass Calcium-Ionen eine wichtige Funktion bei der Keimung von Pollen und beim Wachstum von Pollenschläuchen inne haben (Brewbacker & Kwack 1963, Steer & Steer 1989). Die physiologische Funktion von Bet v 4 in Birkenpollen ist nicht bekannt. Dem Allergen konnte bislang keine enzymatische Funktion zugeordnet werden. Bet v 4 findet sich ausschließlich in reifen Birkenpollen, nicht in anderen pflanzlichen Geweben. Es ist im Cytosol, zwischen Vesikeln und Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums, in Mitochondrien und im generativen und vegetativen Zellkern lokalisiert (Grote *et al.* 1999).

Engel *et al.* führten Experimente zur physiologischen Funktion von Bet v 4 durch. Sie injizierten Bet v 4 und nicht Calcium bindende Mutanten in wachsende Pollenschläuche von Lilien. Für Birkenpollen existiert kein *in vitro* Keimungsverfahren, weswegen auf das Liliensystem zurückgegriffen wurde. Lilien enthalten ein Bet v 4 homologes Protein, das Kreuzreaktivität mit dem Birkenpollenprotein zeigt. Als Folge der Injektion von Bet v 4 stoppte in 30 % der Experimente die cytoplasmatische Strömung. Außerdem wurde eine leichte Depolarisation des Membranpotentials nachgewiesen. Die Injektion von Mutanten, die kein Calcium binden, führte zu keinem solchen Effekt. Das führte zu der Vermutung, das Bet v 4 ein Wachstumsinhibitor in ruhenden Pollenkörnern sein könnte. Bei der Hydrierung von Pollenkörnern gelangt Bet v 4 innerhalb von 30 – 60 s an die Pollenoberfläche (Grote *et al.* 1999). Die Auswaschung ist ein schneller Mechanismus zum Entfernen des potenziellen Wachstumsinhibitors.

2. Ziele der Arbeit

Die Präparation rekombinanter Allergene erlangt zunehmende Bedeutung. Sie werden künftig bei der Diagnose von Allergien zum Einsatz kommen. Nach gezielter Identifikation des Allergie auslösenden Proteins kann dieses bei der spezifischen Immuntherapie injiziert werden, um eine Desensibilisierung zu erzielen. Das erfordert große Mengen an rekombinanten Allergenen, so dass effektive Expressions- und Reinigungsstrategien etabliert werden müssen. Bei rekombinanten Allergenen können zudem gezielt einzelne oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht werden, um bekannte und potenzielle BZell-Epitope zu zerstören und damit zu identifizieren. Dadurch können Allergenvarianten kreiert werden, die bei der spezifischen Immuntherapie keine anaphylaktischen Nebenwirkungen mehr aufweisen, da nurmehr die T-Zell vermittelte Immunantwort aktiv wird. Die Kenntnis vieler Allergenstrukturen und die Identifikation von B-Zell-Epitopen stellt eine Voraussetzung für die Vorhersage von Antigenbindungsstellen dar.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand daher die Bestimmung der Struktur des Birkenpollenallergens Bet v 4 in Lösung mittels NMR-Spektroskopie. Zur Strukturbestimmung von Proteinen werden große Proteinmengen im Milligramm-Bereich benötigt. Für die Durchführung heteronuklearer NMR-Experimente, welche die Auswertung der Spektren größerer Proteine vereinfacht, ist die Markierung mit geeigneten Isotopen (^{15}N) notwendig. Die Expression und Reinigung von isotopenmarkiertem Bet v 4 musste etabliert werden.

Desweiteren sollte eine strukturelle Charakterisierung der Calcium-freien Form im Vergleich zu Calcium-gebundenem Bet v 4 durchgeführt werden, die möglicherweise Hinweise auf beobachtete verminderte IgE-Reaktivitäten geben kann.

Die Struktur des Bet v 4-homologen Allergens Phl p 7 aus Wiesenlischgras (*Phleum pratense*) wurde von Verdino *et al.* (2001) mittels Röntgenstruktur aufgeklärt. Die Strukturen beider Polcalcine sollten verglichen werden, soweit es ohne die Koordinaten von Phl p 7, die noch nicht zugänglich sind, möglich ist.

3. Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Bakterienanzucht

| | |
|---|---|
| BioEngineering Typ L1523–Fermenter | BioEngineering, Wald, Schweiz |
| C25KC Incubator Shaker | New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA |
| Inkubatorschüttler Certomat HK/R | B. Braun Biotech International, Melsungen |
| Brutschrank UE/BE200 | Memmert, Schwabach |
| Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe HS | Kendro, Hanau |

Autoklaven

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Varioklav Dampfsterilisator | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Autoklav 23 | Melag, Berlin |

Zentrifugen

| | |
|--|---------------------|
| Kühlzentrifuge Centrikon T–124 | Kontron, Eching |
| Kühlzentrifuge Centrikon T–324 | Kontron, Eching |
| Rotoren: A 6.9, KA 18.50 | |
| Ultrazentrifuge Centrikon T–1170 | Kontron, Eching |
| Rotor: TFT 70.38 | |
| Universal 30RF | Hettich, Tuttlingen |
| Tischzentrifuge Heraeus Biofuge Fresco | Kendro, Hanau |

Proteinreinigung

| | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| HPLC–Anlage | HPLC–Pumpe 420 | Kontron, Neufahrn |
| | Diode Array Detektor 440 | |
| | Frac–100 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

| | | |
|--------------|------------------------|--------------------------------------|
| FPLC–Anlagen | ÄKTA Purifier 10 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| | Programmer GP–250 Plus | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| | Unikord SII | |
| | Pumpe P–1 | |
| | Frac–100 | |

Gefriertrocknung

| | |
|---------------------|--|
| SpeedVac vacuubrand | ABM Graffenberger Antriebstechnik, Marktredwitz |
| Christ Alpha RCV | Christ, Osterode |
| Christ Alpha 1–4 | |
| Hochvakuumpumpe | Balzers Pfeiffer, Aßlar |

Gelelektrophorese

SDS–Gelelektrophorese und Blaue Native Gelelektrophorese

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Gelkammern Mighty Small SE250/260 | Hoefer, San Francisco, CA, USA |
| PowerPac 3000 | Bio–Rad, München |
| PowerPac 300 | Bio–Rad, München |
| Multidrive XL | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

Agarose–Gelelektrophorese

| | |
|--------------------------------------|---------------------|
| Gelkammer Agagel Maxi | Biometra, Göttingen |
| Gelkammer Agagel Mini | Biometra, Göttingen |
| Mini Sub Cell | Bio–Rad, München |
| Geldokumentationssystem Gel–Doc 2000 | Bio–Rad, München |

PCR

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| GeneAmp PCR System 9600 | Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA |
| GeneAmp PCR System 2400 | Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA |

Spektroskopie

| | |
|--|-----------------------------------|
| UV/VIS-Spektrometer Kontron 930 | Kontron, Neufahrn |
| Microplate Reader Model 550 | Bio-Rad, München |
| CD-Spektropolarimeter J-810 S mit Temperatur-Kontrolleinheit CDF-426S | JASCO International, Tokyo, Japan |
| NMR-Spektrometer DRX-600 mit inversem Vierachsenresonanzprobenkopf ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$) mit Dreiachsengradient | Bruker, Karlsruhe |
| NMR-Spektrometer AMX-400 | Bruker, Karlsruhe |

Weitere Geräte

| | |
|-------------------------------|---|
| 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 |
| -80 °C-Gefriertruhe ProfiLine | National Lab, Mölln |

3.1.2 Verbrauchs- und Hilfsmittel

| | |
|---|---|
| Quarz-Küvetten | Hellma, Müllheim |
| Sterilfilter | Sartorius, Göttingen |
| Dialysemembranen Spectra/Por 7, MWCO 1k | Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA |
| Ultra Precision NMR Sample Tubes 5 mm | Norell, Inc., Landisville, NJ, USA |

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, von Merck (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Sigma (St. Louis, MO, USA), Gerbu (Gaiberg), Serva (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und waren vom Reinheitsgrad reinst bzw. *pro analysi*.

Isotopenmarkierte Chemikalien¹⁵NH₄Cl (98 % ¹⁵N)

Campro Scientific, Berlin

D₂O (99,8 % D)

Eurisotop, Gif-sur-Yvette, Frankreich

3.1.4 Nährmedien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und 30 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Anzucht von Bakterien auf Agarplatten wurde den Nährmedien 15 – 20 g/l Agar zugesetzt. Für die Herstellung von Selektivmedien wurde den Medien nach Abkühlen auf etwa 50 °C sterilfiltriertes (0,2 µm Filter) Ampicilin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Luria Bertani (LB)–Medium

| | |
|-------------|-------------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Wasser | ad 1.000 ml |

SOC–Medium

SOC–Medium wurde bei der Transformation von Bakterien mittels Elektroporation verwendet.

| | |
|-------------|-------------|
| Trypton | 20 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 0,5 g |
| 250 mM KCl | 10 ml |
| Wasser | ad 1.000 ml |

Der pH–Wert wurde durch Zugabe von 5 M KOH–Lösung auf 7,0 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 10 ml SOC–Medium 50 µl 1 M MgSO₄ und 200 µl 1 M Glukose zugegeben.

Minimalmedium

Die Isotopenmarkierung mit ^{15}N ist durch die Bakterienanzucht in Minimalmedium möglich. Es wurde M9–Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet, das mit TS2–Spurenelementlösung (Meyer & Schlegel, 1983) und Vitamin B₁–Hydrochlorid ergänzt wurde.

| | | |
|----------------|---|--------------------|
| 5 x M9–Medium: | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 85,5 g |
| | KH_2PO_4 | 15,0 g |
| | NaCl | 2,5 g |
| | NH_4Cl bzw. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ | 5,0 g |
| | Wasser | <i>ad</i> 1.000 ml |
| TS2: | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 100 mg |
| | $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 30 mg |
| | H_3BO_3 | 300 mg |
| | $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 200 mg |
| | $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 20 mg |
| | $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 10 mg |
| | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 900 mg |
| | Na_2SeO_3 | 20 mg |
| Wasser | <i>ad</i> 1.000 ml | |

Zur Herstellung von 1 l Minimalmedium wurden 200 ml 5 x M9 mit 800 ml Wasser versetzt und autoklaviert. Dazu wurden folgende autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Lösungen gegeben:

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| 1 M MgSO_4 | 2,0 ml |
| TS2–Lösung | 2,0 ml |
| 10 mM Fe(III)citrat | 1,0 ml |
| 50 % (w/v) Glukose bzw. | 8,0 ml |
| 1 M CaCl_2 | 100 μl |
| 0,5 % (w/v) Vitamin B ₁ | 100 μl |

3.2 Klonierung

3.2.1 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich Bakterien der Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über den Genotyp der verwendeten *E. coli*-Stämme und dazugehörige Referenzen.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme mit Genotyp und dazugehörigen Referenzen.

| <i>E. coli</i> -Stamm | Genotyp | Referenz |
|-----------------------|--|---|
| DH5 α | F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^R), <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA</i> , <i>argF</i>)U169, <i>deoR</i> , (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15), <i>k</i> ⁻ | Promega (Mannheim) Hanahan (1985) Jessee (1986) |
| BL21(DE3) | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) | Stratagene (La Jolla, CA, USA) Studier & Moffat (1986) |
| BL21 | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> | Grodberg & Dunn (1988) |

***E. coli* DH5 α**

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α wurde bei Klonierungen und zur Gewinnung großer Plasmid-DNA-Mengen verwendet. Er zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus (Hannahan, 1985). Das Fehlen von Restriktionsenzymen (*hsdR17*) verhindert einen Abbau von Plasmid-DNA. Ein Einbau von Fremd-DNA in die chromosomale DNA oder eine Multimerisierung von Plasmiden ist in diesem rekombinationsnegativen Stamm (*recA1*) äußerst unwahrscheinlich. Der Marker ϕ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15 eröffnet zudem die Möglichkeit der α -Komplementation, wovon hier allerdings kein Gebrauch gemacht wurde.

***E. coli* BL21(DE3)**

E. coli BL21(DE3) (Studier und Moffat 1986, Grodberg & Dunn 1988) wurde als Wirtsstamm für die Überexpression von Bet v 4 und Bet v 4 mit (His)₆-Fusion verwendet.

Der Stamm – ein Derivat des *E. coli* B-Stammes – ist restriktionsnegativ (*hsdS_B*) und trägt auf dem Bakterienchromosom das DE3-Derivat der DNA des Bakteriophagen λ . In das *int*-Gen des λ -Lysogens sind das *lacI*-Gen und das Gen für T7 RNA-Polymerase inseriert, so dass der DE3-

Prophage nicht aus dem Bakterienchromosom ausscheren kann. Das Gen für T7 RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors sowie des *lacO*-Operators.

Das Gen für Bet v 4 stand unter Kontrolle des T7-Promotors und des *lacO*-Operators. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die T7 RNA-Polymerase induziert, die ihrerseits die Gene unter Kontrolle des T7-Promotors transkribierte. Ein großer Vorzug des Stammes *E. coli* BL21(DE3) ist das Vorliegen der *lon*- und *ompT*-Mutationen, so dass dieser Stamm weder die ATP-abhängige Lon-Protease noch die in der äußeren Membran vorliegende OmpT-Protease-Aktivität aufweist (Studier *et al.* 1990).

***E. coli* BL21**

E. coli BL21 diente als Wirt bei der Expression von Bet v 4 mit dem NH₂-terminalen Fusionspartner Glutathion-S-Transferase (GST). Wie *E. coli* BL21(DE3) ist auch der BL21-Stamm restriktionsnegativ; Lon- und OmpT-Protease werden nicht exprimiert. Die Expression des Zielgens erfolgt durch Induktion des *tac*-Promotors.

3.2.2 Plasmide

Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Plasmidkonstrukte.

Tabelle 3.2: Übersicht über die für diese Arbeit relevanten Plasmide mit Angabe der Antibiotikum-Resistenz, Eigenschaften und Herkunft der Plasmide.

| Plasmid | Resistenz | Eigenschaften | Herkunft |
|-----------------|------------|--|---------------------------------------|
| pET16b | Ampicillin | Expressionsvektor mit T7-Promotor, <i>lacO</i> -Operator und DNA-Sequenz für NH ₂ -terminalen Dekahistidin-Anhang | Novagen (Madison, WI, USA) |
| pET16b-betv4 | Ampicillin | Derivat von pET16b mit integriertem Gen für Bet v 4 | diese Arbeit |
| pGEX-6P-2 | Ampicillin | Expressionsvektor mit <i>tac</i> -Promotor, <i>lacI</i> und DNA-Sequenz für NH ₂ -terminale GST-Fusion | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) |
| pGEX-6P-2-betv4 | Ampicillin | Derivat von pGEX-6P-2 mit integriertem Gen für Bet v 4 | Silke Hoffmann, Bayreuth |
| pMW175-betv4 | Ampicillin | Expressionsvektor mit integriertem Gen für Bet v 4 | Fátima Ferreira, Salzburg, Österreich |

pET16b

Der Vektor pET16b (Novagen, Madison, WI, USA) ist ein 5,7 kb großes *low copy number*-Plasmid (Abbildung 3.2–1). Die pET-Vektoren wurden von Studier und Mitarbeitern (Studier und Moffat 1986, Studier *et al.* 1990) zur selektiven, starken Expression von Genen mit T7-Promotor durch die T7 RNA-Polymerase konstruiert. T7 RNA-Polymerase weist eine etwa fünfmal schnellere Elongationsgeschwindigkeit als die *E. coli* RNA-Polymerase auf. Dadurch produziert sie soviel mRNA, dass die Translationsmaschinerie der Zelle mit T7-Transkripten gesättigt wird. Hinter den T7-Promotor ist eine *lacUV5*-Operatorsequenz geschaltet. An die Operatorsequenz gebundener LacI-Repressor, dessen kodierende Region sich ebenfalls auf dem Plasmid befindet, verhindert die Transkription der nachfolgenden Gene. Die Expression kann durch IPTG induziert werden. IPTG wird vom Repressor gebunden, wodurch dieser seine Affinität zur Operatorregion verliert. Dahinter wurde eine sehr wirksame Ribosomen-Bindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) eingebaut, die eine effiziente Translation erlaubt. Das Ende der T7-Transkriptions- und Expressionsregion bildet ein T7-Terminator. Der Einbau des Gens für das zu exprimierende Protein erfolgt in einer erweiterten Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS). Bei pET16 findet sich stromaufwärts von der MCS eine Sequenz, die für einen Deka-Histidin-Anhang (*His-tag*) kodiert. Der *His-tag* ermöglicht die Reinigung des Fusionsproteins über immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie in einem Schritt (Porath 1992). Metallionen, z.B. Ni²⁺, Zn²⁺ oder Co²⁺, werden an Iminoacetat-Reste über einen *Spacer* an eine Sepharose-Matrix geknüpft. Die Metallionen vermögen die Imidazolseitenketten der aufeinanderfolgenden Histidin-Seitenketten über einen Chelat-Komplex an die Matrix zu binden, während zelluläre Proteine nur schwach gebunden werden. Das Zielprotein kann nach Abspaltung des *His-tag* und nochmaliger Chromatographie an einer Affinitätssäule in reiner Form erhalten werden.

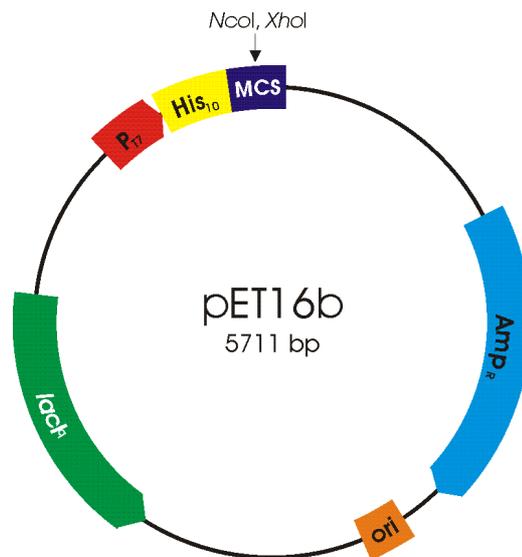


Abbildung 3.2–1: Plasmidkarte von pET16b (verändert nach pET *system manual*, Novagen, 1995). Das Plasmid verleiht der Wirtszelle eine Resistenz gegen Ampicillin (Amp^R). Die Replikation wird durch die *ori*-Region (*origin of replication*) ermöglicht. Das Gen wird über geeignete Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) eingebaut. Es steht dann unter Kontrolle eines T7-Promotors (P_{T7}) und des *lac*-Operators. Das Gen bleibt so lange reprimiert, bis der LacI-Repressor, der von *lacI* kodiert wird, durch Bindung von IPTG seine Affinität zu *lacO* verliert. Die Transkription durch die T7 RNA-Polymerase läuft bis zum T7-Terminator. Das gebildete Protein trägt aminoterminal einen His-tag (His₁₀), der eine Reinigung des Fusionsproteins durch immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie ermöglicht.

pET16b–betv4

Im Plasmid pET16b–betv4 wurde das Bet v 4 –Gen über *NcoI* und *EcoRI*-Schnittstellen mit dem Vektor pET16b ligiert. Bet v 4 wird mit aminoterminaler His-tag-Fusion exprimiert und kann über Metallionen-Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Spaltung mit der Protease Enterokinase liefert authentisches Bet v 4. Die Konstruktion des Plasmids ist in Kapitel 3.2.4 umrissen.

pGEX–6P–2

Die pGEX-Plasmide (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Abbildung 3.2–2) erlauben die Expression des Zielgens als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith & Johnson 1988). Der Einbau des Zielgens erfolgt über die *multiple cloning site* (MCS). Dem Zielgen vorgeschaltet ist die Gensequenz für GST und eine DNA-Sequenz, deren Peptidsequenz eine enzymatische Spaltung des exprimierten Fusionsproteins ermöglicht. Das GST-Gen steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacO*-Operators. Die pGEX-Plasmide kodieren desweiteren für den LacI-Repressor. LacI bindet an den *lacO*-Operator und verhindert die Transkription des Gens für das GST-Fusionsprotein. Die Proteinexpression kann durch die Zugabe von IPTG induziert werden. IPTG bindet an den LacI-Repressor, der dadurch seine

Affinität zum Operator verliert. Das *bla*-Gen kodiert für die β -Lactamase, die dem Wirtstamm eine Resistenz gegen Ampicillin verleiht. Die Antibiotikum-Resistenz erlaubt die Selektion von Zellen, die das Plasmid-Konstrukt enthalten.

Das GST-Fusionsprotein kann mittels Affinitäts-Chromatographie an immobilisiertem Glutathion erfolgen. Die enzymatische Spaltung des Fusionsproteins mit nachfolgender Abtrennung vom Fusionspartner mittels eines weiteren Affinitäts-Chromatographie-Schrittes liefert das gewünschte Protein.

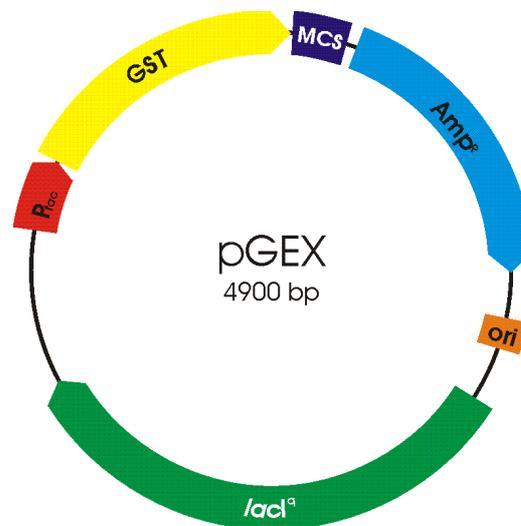


Abbildung 3.2-2: Die pGEX-Plasmide ermöglichen die Expression des Zielgens als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST). Die Reinigung kann über Affinitäts-Chromatographie an immobilisiertem Glutathion erfolgen. Das Gen wird über die *multiple cloning site* (MCS) in den Vektor eingebracht und steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors (P_{tac}) und des *lacO*-Operators. Das Gen *lacI*^q kodiert für den LacI-Repressor, der die Transkription durch die Bindung an den *lacO*-Operators reprimiert. Die Genexpression wird durch Zugabe von IPTG induziert, das an LacI bindet und dadurch die Bindung an *lacO* verhindert. Das *bla*-Gen verleiht dem Wirtstamm eine Resistenz gegen Ampicillin (Amp^R) und erlaubt eine Selektion auf Zellen, die das Plasmid tragen.

pGEX-6P-2-betv4

Das Plasmid pGEX-6P-2-betv4 wurde von Dr. Silke Hoffmann konstruiert. Es enthält das Gen für Bet v 4, das über *Bam*HI und *Xho*I-Schnittstellen in pGEX-6P-2 eingefügt wurde. Das Plasmidkonstrukt ermöglicht die Expression eines GST-Bet v 4-Fusionsproteins. Es wurde eine zusätzliche Erkennungssequenz für die Protease Enterokinase eingefügt.

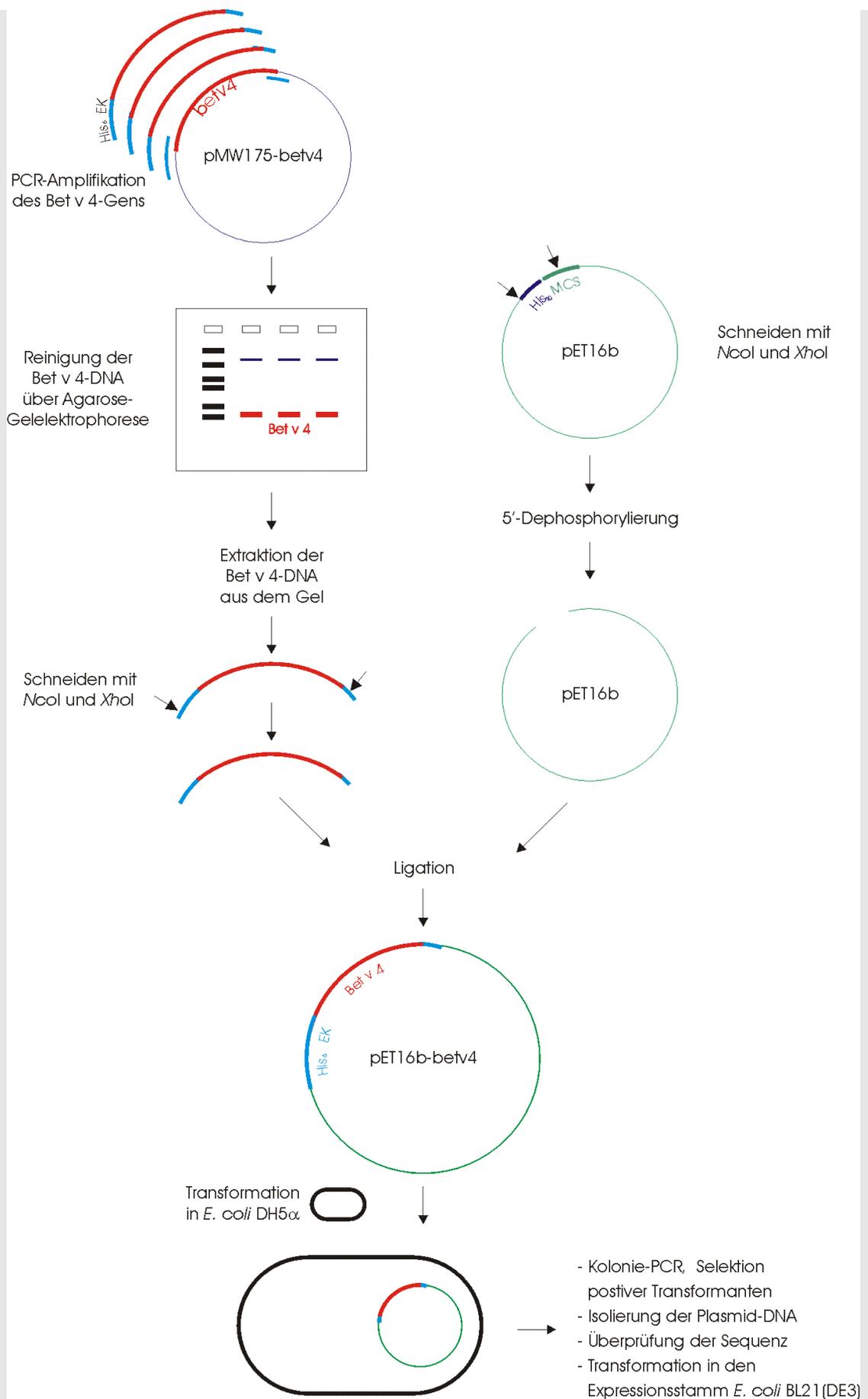
pMW175–betv4

Das Plasmid pMW175–betv4 (Engel *et al.* 1997) wurde freundlicherweise von Fátima Ferreira (Institut für Genetik und Allgemeine Biologie, Universität Salzburg, Österreich) zur Verfügung gestellt. Das Gen für Bet v 4 wurde über *NcoI* und *EcoRI*–Schnittstellen mit dem Vektor pMW175 ligiert. Nach Transformation des Expressionsplasmids pMW175–betv4 in *E. coli* BL21(DE3) konnte Bet v 4 als Nichtfusions–Protein überproduziert werden.

3.2.3 Strategie zur Klonierung von Bet v 4 mit NH₂–terminaler Hexahistidin–Fusion

Die Strategie zur Konstruktion des pET16b–betv4–Plasmids ist in Abbildung 3.2–3 (folgende Seite) umrissen. Das Bet v 4–Gen (rot) wurde ausgehend vom Plasmid pMW175–betv4 mittels PCR amplifiziert. Die Primer (grün) wurde so gewählt, dass ein Fusionsprotein exprimiert wird, dessen NH₂–terminaler His–tag durch die Protease Enterokinase abgespalten werden kann. Außerdem wurde *upstream* vom Bet v 4–Gen eine *XhoI*–Schnittstelle eingeführt. Die PCR–Fragmente wurden durch Agarose–Gelelektrophorese von den Primern und der Plasmid–DNA getrennt. Nach Extraktion aus dem Gel wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NcoI* geschnitten. Ebenso wurde mit pET16b–DNA verfahren. Zusätzlich wurde die linearisierte Plasmid–DNA 5′–dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Bet v 4–DNA und der geschnittene und dephosphorylierte Vektor wurden mit T4–DNA–Ligase ligiert.

pET16b–bet v 4 wurde anschließend in den Bakterien–Stamm *E. coli* DH5α transformiert, um große Mengen an Plasmid–DNA zu isolieren, die auf die Richtigkeit der DNA–Sequenz hin überprüft wurde, bevor das Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) eingebracht wurde.



3.2.4 Agarose–Gelelektrophorese

Zur Konzentrationsabschätzung von DNA–Isolationen, Auftrennung und Analyse von Restriktionsfragmenten und zur Reinigung von PCR–amplifizierten Fragmenten wurde die Agarose–Gelelektrophorese nach Sambrook (Sambrook *et al.* 1989) durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen von Agarose (Agarose NEEO, Roth, Karlsruhe) lagen in Abhängigkeit der zu trennenden Fragmentgrößen bei 0,8 – 1,5 % (w/v). Die Gele enthielten $5 \cdot 10^{-5}$ % (w/v) Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe), um DNA im UV–Licht sichtbar zu machen. Die DNA–Proben wurden mit 20 % (v/v) Auftragspuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde in TAE–Puffer bei konstanter Spannung (80 – 100 V) durchgeführt.

TAE–Puffer:

10 mM Tris/Acetat, pH 8,0
1 mM Na–EDTA

Auftragspuffer:

50 mM EDTA,
50 % (v/v) Glycerin
0,15 % (w/v) Bromphenolblau
0,15 % (w/v) Xylencyanol

DNA–Molekulargewichtsmarker:

| λ –DNA/ <i>Hind</i> III (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) | pUC19–DNA/ <i>Msp</i> I (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) | Gene Ruler 50 bp– <i>ladder</i> (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) |
|--|--|--|
| 23130 bp | 501 bp | 1.000 bp |
| 9416 bp | 489 bp | 900 bp |
| 6557 bp | 404 bp | 800 bp |
| 4361 bp | 331 bp | 700 bp |
| 2322 bp | 242 bp | 600 bp |
| 2027 bp | 190 bp | 500 bp |
| 565 bp | 147 bp | 400 bp |
| 125 bp | 111 bp | 300 bp |
| | 110 bp | 250 bp |
| | 67 bp | 200 bp |
| | | 150 bp |
| | | 100 bp |
| | | 50 bp |

3.2.5 Reinigung von Plasmid–DNA

Zur Präparation von Plasmid–DNA wurde das Nucleobond AX 20 oder 100 Kit von Macherey–Nagel (Düren) verwendet. Es basiert auf der Methode von Birnboim und Doly (1979). Bakterienzellen aus einer LB–Kultur (20 – 100 ml) werden in einer Lösung aus Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaOH lysiert. Chromosomale und Plasmid–DNA liegen unter basischen Bedingungen denaturiert vor. RNA wird durch RNase A hydrolysiert. Durch Zugabe von 2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1, werden chromosomale DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert, während Plasmid–DNA in Lösung bleibt und wieder in die doppelsträngige Form übergehen kann. Nach Zentrifugation wird der Überstand an einer Anionenaustauscher–Säule chromatographiert. Die Durchführung erfolgte nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers (Nucleobond AX, Properties and application, Macherey–Nagel, Düren), lediglich die Zentrifugation (13.000 rpm entsprechend 16.000 g, 4 °C) nach Zugabe von Kaliumacetat wurde von 15 auf 30 min verlängert. Die isolierte Plasmid–DNA wurde in 40 – 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei –20 °C aufbewahrt. Die Reinheit wurde mittels Agarose–Gelelektrophorese nachgewiesen.

3.2.6 Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase–Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven enzymatischen Anreicherung von DNA–Fragmenten *in vitro* (Saiki *et al.* 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von Bet v 4–DNA und zum Auffinden positiver Transformanten (Kolonie–PCR, Kapitel 3.2.13) durchgeführt.

Amplifikation des Bet v 4–Gens mittels PCR

Für die Klonierung von Bet v 4 als His–tag–Fusionsprotein sollte das Gen mit einer neuen 3′–terminalen *Xho*I–Schnittstellen versehen werden und eine Erkennungssequenz für Enterokinase sollte eingeführt werden (Kapitel 3.2.3). Es wurde die Methode der Polymerase–Kettenreaktion mit überstehenden Primern verwendet (Mullis *et al.* 1992).

Als Matrize zur Amplifikation des Bet v 4–Gens diente das pMW175–betv4–Plasmid von Engel *et al.* (1997). Folgende Primer wurden verwendet:

betv4pet5II (70–mer):

-NcoI- His His His His His His His | -- Enterokinase - | | ---> Bet v 4

5' GGA GGA ACC ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAC GAC GAC GAC AAG ATG GCT GAT GAT CCA CAG G 3'

betv4gex3 (34–mer):

-XhoI-- | STOP <-- Bet v 4

5' GGA GGA CTC GAG TTA AAA TAT CTT GGC AAC ATC C 3'

Die Primer wurden von BioTeZ, Berlin–Buch, synthetisiert.

Zur Amplifikation wurde die thermostabile *Vent*–Polymerase aus *Thermococcus litoralis* (New England Biolabs, Frankfurt/Main) verwendet.

Zusammensetzung des PCR–Reaktionsansatzes (50 µl):

| | |
|--------------------------------|--------|
| DNA–Matrize | 0,5 mg |
| betv4pet5II | 2 µM |
| betv4gex3 | 2 µM |
| dNTP–Mix ¹ | 200 µM |
| <i>Vent</i> –Polymerase | 3 U |
| <i>Vent</i> –Polymerase–Puffer | 1 x |

¹ Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X–100, 5 mM MgSO₄

PCR–Programm:

- 5 min 94 °C
- 25 Cyclen 30 s 94 °C (Aufschmelzen der DNA–Doppelstränge)
- 30 s 50 °C (*Annealing* der Primer)
- 40 s 72 °C (Polymerase–Reaktion)
- 2 min 72 °C
- 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung

Die Produkte der PCR–Reaktion wurden durch Agarose–Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4) analysiert. Das DNA–Fragment der gewünschten Länge wurde aus dem Gel extrahiert (Kapitel 3.2.7)

3.2.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Abtrennung von Matrizen-DNA und Primern wurden PCR-Ansätze (Kapitel 3.2.6) einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Die Bande mit dem DNA-Fragment gewünschter Länge wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) aus dem Gel extrahiert. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers (*QIAEX II Handbook*, QIAGEN, Hilden). Die DNA wurde in 40 µl Wasser aufgenommen.

3.2.8 Restriktionsverdau von DNA

Enzyme: *XhoI* MBI Fermentas, Vilna, Litauen

NcoI MBI Fermentas, Vilna, Litauen

Puffer: Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet.

Die Restriktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte entweder durch 10-minütige Inkubation des Restriktionsansatzes bei 65 °C mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm, 4 °C, 10 min (16.000 g) oder durch Reinigung der DNA wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben.

3.2.9 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Zur Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen wurde geschnittene Plasmid-DNA mit 1 U *calif intestine* Alkalischer Phosphatase (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) oder Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) pro µg DNA im mitgelieferten Dephosphorylierungspuffer versetzt und 4 – 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben.

3.2.10 Reinigung von DNA aus enzymatisch behandelten Ansätzen

DNA modifizierende Enzyme und Salze wurden durch den Einsatz von Ionenaustauschersäulen mit Silikagelmembranen (*QIAquick spin columns*) von der DNA abgetrennt. Die Reinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers (*QIAquick Spin Handbook*, QIAGEN, Hilden). Eluiert wurde mit 40 µl Wasser.

3.2.11 Ligation

Zur Ligation des PCR-Fragments mit der linearisierten pET16b-DNA wurden 50 – 100 ng Insert und Vektor im Verhältnis 1:1 bis 2:1 in T4-Ligase-Puffer gelöst und über Nacht bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, Karlsruhe) inkubiert.

Die DNA wurde anschließend durch Butanol-Präzipitation (Thomas 1994) entsalzt. Hierzu wurde der Ligationsansatz mit dem 10-fachen Volumen an 1-Butanol versetzt, 20 min bei 13.000 rpm (16.000 g), 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet schließlich an der Luft getrocknet und in 10 µl Wasser gelöst. Die DNA konnte in dieser Form für die Elektrottransformation in *E. coli* DH5α (Kapitel 3.2.13) eingesetzt werden.

3.2.12 Sequenzierung von DNA

Die Überprüfung der Sequenzen von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma TOPLAB (Martinsried) mittels *Cycle-Sequencing* mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminatoren auf einem ABI-System. Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI-PRISM-Software, Version 3.0.

3.2.13 Transformation von *E. coli* DH5α durch Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Präparation elektrokompetenter Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur (ÜNK) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 (Kapitel 3.3.1) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen immer auf Eis gehalten. Die Zellen wurden in vorgekühlten 50 ml-Reaktionsgefäßen (Greiner, Frickenhausen) durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5.000 rpm pelletiert. Das Medium wurde abgezogen. Salze wurden durch mehrmaliges Resuspendieren und Pelletieren mit abnehmenden Mengen von 10 % (v/v) Glycerinlösung (200 ml, 100 ml, 50 ml) entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml Glycerinlösung resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden bei –80 °C aufbewahrt.

Elektroporation

Das Einschleusen des Plasmids pET16b–betv4 in *E. coli* DH5 α erfolgte mittels Elektrotransformation (Dower *et al.*, 1988). Etwa 5 – 10 ng Plasmid–DNA in 2 μ l Wasser wurden mit 40 μ l elektrokompentente Zellen in gekühlten Elektroporationsküvetten (0,1 cm, Bio–Rad, München) vermischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Schlitten der Elektroporationsvorrichtung (*E. coli* Pulser, Bio–Rad, München) wurde ebenfalls vorgekühlt, dann wurden Schlitten und Küvetten in die Schockkammer eingesetzt und mit 1,8 kV gepulst. Die Küvette wurde sofort entnommen und die Suspension mit 1 ml SOC–Medium vermischt. Dann wurde der Ansatz aus der Küvette pipettiert und bei 37 °C und 200 rpm für 1 h geschüttelt. Danach wurde auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.14 Kolonie–PCR

Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie–PCR auf erfolgreiche Klonierung überprüft. Die Kolonie–PCR erlaubt das Auffinden positiver Klone ohne vorherige Plasmid–Präparation.

Gut separierte Kolonien wurden von der Selektionsplatte mit einer Pipettenspitze in je 50 μ l eines PCR–Reaktionsmix getaucht. Anschließend wurden 5 ml LB–Selektivmedium mit den auf der Pipettenspitze verbliebenen Bakterien angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt (200 rpm). Aus den Übernachtskulturen konnte bei positiven Transformanten DNA für die Sequenzierung und Transformation in einen Expressionsstamm präpariert werden.

Unmittelbar vor der PCR wurden jeweils 0,5 U *Taq*–Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermococcus aquaticus* (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) zugegeben.

Zusammensetzung des PCR– Reaktionsmix:

| | |
|-------------------------|-------------|
| 5'–Primer ¹ | 0,4 μ M |
| 3'–Primer ¹ | 0,4 μ M |
| dNTP–Mix | 0,2 mM |
| MgCl ₂ | 4 mM |
| Reaktionspuffer mit BSA | 1 x |

¹ Es wurden entweder die Klonierungs–Primer betv4pet5II und betv4gex3 oder T7–Promotor (5'–taa tac gac tca cta tag gg–3') bzw. Terminator–Primer (5'–ggg gtt atg cta gtt att gc–3') verwendet.

- PCR-Programm:**
- 5 min 95 °C (Lyse der Bakterien, Freisetzung und Aufschmelzen der Plasmid-DNA)
 - 30 Cyclen 30 s 95 °C (Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge)
 - 30 s 50 °C (*Annealing* der Primer)
 - 40 s 72 °C (Polymerase-Reaktion)
 - 2 min 72 °C
 - 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung

Eine Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4).

3.2.15 Transformation von *E. coli* BL21(DE3) mit der CaCl₂-Methode

Aus Kolonien, die bei der Kolonie-PCR ein PCR-Fragment der erwarteten Größe lieferten, wurde Plasmid-DNA präpariert und in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Hierbei wurde die vereinfachte CaCl₂-Methode nach Pope & Kent (1996) angewendet.

Herstellung normalkompetenter Zellen für die CaCl₂-Methode

Zur Präparation normal kompetenter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden 200 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 (Kapitel 3.3.1) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt (200 rpm). Die Zellen wurden in vorgekühlten 50 ml-Reaktionsgefäßen (Greiner, Frickenhausen) abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm, 4 °C). Das Medium wurde abgezogen und die Bakterien wurden mit 100 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) gewaschen. Die Zellen wurden in 10 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und mit 10 ml CaCl₂-Lösung gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis aufbewahrt, zentrifugiert und das Bakterienpellet in 3 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert. 50 µl-Aliquots wurden abgeteilt und bei -80 °C aufbewahrt.

Vereinfachte CaCl₂-Methode

50 µl der eiskalten kompetenten Zellen wurden mit 50–100 ng Plasmid-DNA gemischt und auf einer auf 37 °C vorgewärmte LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.16 Dauerkulturen

Einzelkolonien von Agarplatten mit Selektivmedium wurden in 5 ml Medium suspendiert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Dauerkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden durch Mischen von 850 µl Übernachtskultur mit 150 µl 87 % Glycerin bzw. 1,5 ml ÜNK mit 350 µl Glycerin bei Dauerkulturen für die Stammsammlung hergestellt. Die Kulturen wurden bei –80 °C aufbewahrt.

3.3 Zellanzucht und Proteinexpression

3.3.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Die optische Dichte (OD) der Bakterienkulturen wurde durch Streulichtmessungen bei 600 nm in Halbmikroküvetten aus Kunststoff (Sarstedt, Nürnberg) bestimmt. 1 Absorptionseinheit entspricht dabei etwa $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml. Bei Absorptionswerten $> 0,3$ wurden die Bakteriensuspensionen mit Medium verdünnt.

3.3.2 Untersuchung auf Überexpression

Expressionsversuche sollten zum einen Überexpression des gewünschten Genprodukts nach Induktion mit IPTG zeigen. Zum anderen sollten sie klären, ob die Expressionsstämme die jeweiligen Proteine auch in Minimalmedium mit NH_4Cl als Stickstoff-Quelle herstellen, so dass eine Isotopenmarkierung mit ^{15}N zur Durchführung heteronuklearer NMR-Experimente möglich ist.

5 ml Nährmedium mit Ampicillin wurden mit 50 µl (LB) bzw. 100 µl (M9) Dauerkultur des zu testenden Stammes inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln mit 200 rpm inkubiert. Mit der ÜNK wurden 50 – 100 ml Medium auf eine eine OD_{600} vom 0,1 (LB) bzw. 0,2 (M9) inokuliert. Die Expression des Zielgens wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 2 mM) bei einer OD_{600} zwischen 0,7 und 1,0 induziert. Unmittelbar vor der Induktion und zu verschiedenen Zeiten (1 bis 6 Stunden) nach Induktion wurde ein Aliquot entnommen, das einer OD_{600} von 1,0 entsprach. Die Zellen wurden durch 2-minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm (16.000 g) pelletiert, mit 50 µl 1x-Probenpuffer (Kapitel 3.5.1) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Je 10 µl der so bereiteten Proben wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Elektrophorese (Kapitel 3.5.1, 3.5.2) untersucht.

3.3.3 Zellkultivierung

Die Fermentation der Expressionsstämme zur Gewinnung rekombinanter Proteine erfolgte im 7 l-Maßstab im Fermenter oder mit 1 – 3 l Schüttelkultur im Schüttelinkubator. 5 ml Medium mit Ampicillin wurden mit 50 µl (LB-Medium) bzw. 100 µl (M9-Medium) einer Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die 5 ml-Kultur wurde zu 150 – 250 ml Medium gegeben und über Nacht (teilweise 60 Stunden bei Kultivierung in Minimalmedium) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 1 – 7 l Medium mit Ampicillin wurden mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 – 0,2 inokuliert und mit 3 l/min Druckluft, 300 rpm (Fermenter) bzw. 160 rpm (Schüttelkultur) bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,7 – 1,0 wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 2 mM induziert. Bei Kultivierung im Fermenter wurde die Luftzufuhr auf 7 l/min und das Rührwerk auf 700 rpm hochgeregelt. Vier bis sechs Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4 °C geerntet und das Nasszellgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden sofort weiterverarbeitet (Kapitel 3.4) oder bei –80 °C eingefroren. Die Überexpression des Zielproteins wurde durch Aliquotentnahme vor Induktion und vor dem Abernten überprüft (je 1,0 OD_{600} , vgl. Kapitel 3.3.2).

3.3.4 Nachweis der exprimierten Proteine im löslichen Überstand

Zur Lyse der Zellen wurden verschiedene Methoden des Zellaufschlusses angewandt, die bei der Proteinreinigung beschrieben sind (Kapitel 3.4).

Zur Kontrolle, ob die exprimierten Proteine löslich oder als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) vorlagen wurden die Zellysate zentrifugiert. Die pelletierte Fraktion wurden mit 6 M Harnstoff extrahiert. Aliquots des löslichen Überstandes und der Harnstoffextraktion wurden einer SDS-Gelelektrophorese zugeführt (Kapitel 3.5.1 und 3.5.2).

3.4 Proteinreinigung

3.4.1 Chromatographie–Säulen

Tabelle 3.3: Chromatographie–Säulen, die bei der Reinigung von Bet v 4 zum Einsatz kamen.

| Säule | Methode | Bett– volumen | Elution | Hersteller |
|---|--|------------------|-------------------------|----------------------------------|
| GST HiTrap | Affinitäts– chromatographie | 2 x 5ml | Glutathion– Gradient | Amersham Pharmacia Biotech |
| Sepharose 4B | | 10 ml | | |
| Chelating Sepharose Fast Flow ¹ | | 25 ml | Imidazol–Gradient | |
| HiLoad 26/60 Superdex 75 HR pg | Größenausschluss– Chromatographie | 319 ml | isokratisch | |
| Superdex 75 HR 10/30 Superdex 200 HR 10/30 | | 23,5 ml | | |
| PBE 94 ¹ | Chromato– fokussierung | 70 ml | pH–Gradient | |
| MonoP HR 5/20 | | 4 ml | | |
| Q–Sepharose Fast Flow ¹ | Anionenaustauscher– Chromatographie | 25 ml | NaCl–Gradient | |
| MonoQ HR 10/10 | | 10 ml | | |

¹ Das Säulenmaterial wurde in XK26/20 bzw. XK16/40 (PBE94) Säulenmäntel (Amersham Pharmacia Biotech) gefüllt.

3.4.2 Reinigung von Bet v 4 mittels Nickelionen–Affinitäts–Chromatographie

Puffer

| | |
|----------------|---|
| Lysispuffer | 1x PBS ¹ , 0,5µM PMSF ² , 1 mM EDTA, Lysozym (Serva, Heidelberg), DNase I (Fluka) |
| Loading Buffer | 50 mM NiSO ₄ |
| Binding Buffer | 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol |
| Wash Buffer | wie Binding Buffer, jedoch mit 100 mM Imidazol |
| Elute Buffer | wie Binding Buffer, jedoch mit 500 mM Imidazol |
| Strip Buffer | 200 mM EDTA ³ , pH 8,0 |
| EK–Spaltpuffer | 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ |

¹ PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3

² Phenylmethansulfonylfluorid (Merck, Darmstadt)

³ Ethylendiamintetraacetat (Roth, Karlsruhe)

Zellaufschluss

Die Zellpellets von *E. coli* BL21(DE3)/pET16b–betv4 wurden in 4 ml Lysispuffer je Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 48 Watt). Die Lösung wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C aufbewahrt. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher–Schuell, Dassel) entfernt.

Reinigung des His–tag–Fusionsproteins

Die Reinigung der Hexa–Histidin–Fusionsproteine erfolgte durch immobilisierte Nickelionen–Affinitäts–Chromatographie (Porath, 1992). Die *Chelating Sepharose*–Säule wurde mit einer P–1–Peristaltik–Pumpe mit 200 ml Wasser bei einer Flussrate von 5 ml/min gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Loading Buffer beladen und mit 150 ml Binding Buffer äquilibriert. Der Rohextrakt wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgebracht. Zelluläre Proteine wurden durch Waschen mit 200 ml Binding Buffer oder Washing Buffer entfernt. Es wurden jeweils Fraktionen à 50 ml gesammelt. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 100 ml

Elute Buffer. Um die Güte der Reinigung zu prüfen wurden 10 µl–Aliquots der Fraktionen entnommen und wie in Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 beschrieben einer SDS–Gelelektrophorese zugeführt. Die Nickelsäule wurde mit 100 ml Strip Buffer regeneriert.

Abspaltung des Fusionsanteils

Fraktionen, welche das Fusionsprotein enthielten, wurden vereint und gegen Enterokinase (EK)–Spaltpuffer dialysiert (MWCO 1000, mind. 6 Stunden, 4 °C). Enterokinase (Novagen, Madison, WI, USA) wurde nach Vorgaben des Herstellers zugegeben. Die Spaltung erfolgte für 48 Stunden bei Raumtemperatur.

Isolierung des Proteins ohne His–tag

Zur Trennung von Bet v 4 von Fusionsanteil, Enterokinase und Verunreinigungen wurden zwei Strategien verfolgt:

- a) eine weitere Nickelionen–Affinitäts–Chromatographie
- b) Größenausschluss–Chromatographie

Isolierung des Proteins ohne Histidin–Fusion mittels IMAC

Die Spaltansätze wurden auf eine Nickelsäule aufgetragen, die wie in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben präpariert war (Flussrate 2 ml/min). Die Säule wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min mit 200 ml Binding Buffer gewaschen. Nicht gespaltenes Fusionsprotein und abgespaltener Fusionsanteil wurden mit 100 ml Elutionspuffer eluiert. Fraktionen, welche gespaltenes Protein enthielten, wurden vereinigt, gegen 5 mM Ammoniumacetat, pH 7,0 dialysiert und schließlich lyophilisiert.

Isolierung von Bet v 4 mittels Größenausschluss–Chromatographie (SEC)

Maximal 20 ml eines Spaltansatzes wurden auf eine HiLoad 26/60 Superdex 75 HR pg–Säule aufgetragen und mit Enterokinase–Spaltpuffer am Kontron HPLC–System mit einer Flussrate von 1,5 ml/min eluiert.

3.4.3 Glutathion–Sepharose–Affinitäts–Chromatographie

Die Reinigung des des GST–Bet v 4–Fusionsproteins erfolgte durch Affinitäts–Chromatographie an immobilisierten Glutathion (Smith & Johnson 1988). Das Fusionsprotein bindet über den GST–Anteil an das Säulenmaterial, während zelluläre Proteine die Säule passieren. Die Elution von GST–Bet v 4 erfolgt durch reduziertes Glutathion, das Matrix gebundenes Glutathion kompetiert.

Puffer

| | |
|------------------------|---|
| Lysispuffer | 50 mM Tris/HCl, 0,1 % Triton X–100, 5 mM Dithiothreitol (DTT) ¹ , 2 mM CaCl ₂ , Protease–Inhibitor–Cocktail ohne EDTA ² , 20 µg/ml DNase I ³ , 20 µg/ml Lysozym ¹ , pH 7,3 |
| Bindungspuffer | 50 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,3 |
| Elutionspuffer | 50 mM Tris/HCl, 10 mM reduziertes Glutathion ¹ , 2 mM CaCl ₂ , pH 8,0 |
| Regenerationspuffer I | 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8,5 |
| Regenerationspuffer II | 100 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 4,5 |
| EK–Spaltpuffer | 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ |

¹ Sigma, St. Louis, MO, USA ²Roche Diagnostics, Mannheim ³Fluka, Taufkirchen

Herstellung des Rohextrakts

Die Zellpellets von *E. coli* BL21/pGEX–6P–2–betv4 wurden in 4 ml Lysispuffer je Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 48 Watt). Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 13.000 rpm, 4 °C, in einem KA 18.50 Rotor (25.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher–Schuell, Dassel) entfernt.

Reinigung des GST-Bet v 4-Fusionsproteins

Reinigung an Sepharose 4B durch gravity flow

Etwa 10 ml Sepharose 4B wurden in eine Kunststoffsäule (wiederverwendete Nucleobond AX 100-Säule, Machery-Nagel) gefüllt und mit 5 Säulenvolumina Bindungspuffer äquilibriert. Nach Auftrag des Proteinrohextraktes wurden zelluläre Proteine mit 4 Säulenvolumina Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 4 Säulenvolumina Elutionspuffer. Die Säule wurde durch fünfmaliges abwechselndes Waschen mit je 50 ml Regenerationspuffer I und II regeneriert.

Reinigung mit GST-HiTrap-Säulen am FPLC-System

Zwei GST-HiTrap-Säulen (5 ml Bettvolumen) wurden hintereinander geschaltet und mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer äquilibriert (Flussrate 0,5 ml/min). Nach Probenauftrag wurden zelluläre Proteine mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer von der Säule verdrängt. Das Fusionsprotein wurde mit 10 Säulenvolumina Elutionspuffer eluiert.

Die Regeneration der Säulen erfolgte durch fünfmaliges abwechselndes Waschen mit je 50 ml Regenerationspuffer I und II.

Enzymatische Spaltung

Zur enzymatischen Spaltung wurden Fraktionen, welche das Fusionsproteins enthielten, vereinigt und gegen Enterokinase-Spaltpuffer dialysiert. Eine kinetische Untersuchung mit unterschiedlichen Enzymmengen zeigte, dass zur Abspaltung des GST-Anteils bereits 1/100 der vom Hersteller empfohlenen Enzymmenge ausreicht. Die Spaltung erfolgte bei Raumtemperatur und 37 °C in gleicher Effektivität. Deswegen wurden 0,2 U Enterokinase je mg Fusionsprotein eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF zu einer Endkonzentration von 1 µM gestoppt.

Isolierung des Proteins ohne GST-Fusionsanteil mittels Affinitäts-Chromatographie

Die Spaltansätze wurden wie bei der Reinigung des Fusionsproteins beschrieben an immobilisierter Glutathion-Sepharose durch *gravity flow* oder am FPLC-System chromatographiert. Nicht gespaltenes Protein und GST sollten an der Säule verbleiben, während sich Bet v 4 im Probendurchbruch finden sollte.

Isolierung von Bet v 4 durch Größenausschluss–Chromatographie (SEC)

Fraktionen, die Bet v 4 enthielten wurden gegen Wasser oder 0,2 mM CaCl₂ dialysiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in maximal 15 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen und auf eine HiLoad 26/60 Superdex 75 HR pg–Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 oder 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 2 mM CaCl₂ am HPLC oder FPLC–System mit einer Flussrate von 1 – 1,5 ml/min. Fraktionen, die Bet v 4 enthielten, wurden vereinigt, gegen 5 mM Ammoniumacetat, pH 7,0, 0,2 mM CaCl₂ dialysiert und lyophilisiert.

Reinigung von Bet v 4 ohne Affinitäts–tag

Zur Reinigung von Bet v 4 ohne Fusionspartner wurden verschiedene Strategien verfolgt:

- Reinigung über Anionenaustauscher, Elution mit Salzgradient
- Reinigung über Chromatofokussierung (Anionenaustauscher, Elution über pH–Gradient)
- Reinigung durch Kochen des Rohextrakts mit nachfolgender Reinigung über Größenausschluss–Chromatographie

3.4.4 Reinigung von Bet v 4 durch Anionenaustauscher–Chromatographie

Puffer

| | |
|----------------|--|
| Lysispuffer | 20 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl ₂ , Protease–Inhibitor–Cocktail ohne EDTA, pH 8,0, 7,0 oder 6,0 |
| Bindungspuffer | 20 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 8,0, 7,0 oder 6,0 |
| Elutionspuffer | 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 8,0, 7,0 oder 6,0 |

Herstellung des Proteinrohextraktes

Zellpellets von *E. coli* BL21(DE3)/pMW175–betv4 wurden in 4 ml je Gramm Nasszellgewicht Lysispuffer resuspendiert und drei Mal bei –80 °C eingefroren und im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 1 % (w/v) Streptomycinsulfat (Sigma, St. Louis, MO, USA) und 0,1 % Polyethylenimin (Serva, Heidelberg) präzipitiert. Die viskose Lösung wurde 45 min bei 40.000 rpm (160.000 g), 4 °C zentrifugiert. Der pH des Überstandes wurde auf 8,0 (bzw. 7,0 oder 6,0) eingestellt.

Anionenaustauscher–Chromatographie

Die Anionenaustauscher–Chromatographie erfolgte an einer MonoQ HR 10/10–Säule oder an Q–Sepharose mit Hilfe eines FPLC–Systems. Die Säule wurde mit mindestens fünf Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert (Flussraten 0,5 – 1 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 – 10 Bettvolumen Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen NaCl–Gradienten von 0 – 300 mM NaCl über 5 – 10 Säulenvolumen. Es wurde mit weiteren 2 – 4 Säulenvolumen Elutionspuffer nachgespült. Fraktionen, die Bet v 4 enthielten, wurden gegen Wasser, 0,2 mM CaCl₂ oder 5 mM Ammoniumacetat, pH 7,0, 0,2 mM CaCl₂ dialysiert und lyophilisiert.

3.4.5 Reinigung von Bet v 4 mittels Chromatofokussierung

Bei der Chromatofokussierung handelt es sich um eine Anionenaustauscher–Chromatographie, bei der die Elution über einen pH–Gradienten erfolgt (Sluyterman & Elgersma 1978). Der pH–Gradient wird durch Ampholyt–ähnliche Substanzen (im Polybuffer enthalten) aufgebaut.

Puffer

PBE 94

| | |
|---------------------------|--|
| Lysispuffer | 25 mM Imidazol, 2 mM CaCl ₂ , Protease–Inhibitor–Cocktail ohne EDTA, pH 7,4 |
| Prä–Äquilibrierungspuffer | 1 M Imidazol, pH 8,0 |
| Startpuffer | 25 mM Imidazol, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,4 |
| Elutionspuffer | 12,5 % (v/v) Polybuffer ¹ , pH 4,0 |

¹ Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

MonoP

| | |
|---------------------------|---|
| Lysispuffer | 25 mM BisTris, 2 mM CaCl ₂ , Protease–Inhibitor–Cocktail ohne EDTA, pH 7,1 |
| Prä–Äquilibrierungspuffer | 1 M Imidazol, pH 8,0 |
| Startpuffer | 25 mM Bis–Tris/HCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,1 |
| Elutionspuffer | 12,5 % (v/v) Polybuffer ¹ , pH 5,0 |

¹ Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Herstellung des Rohextraktes

Der Proteinrohextrakt wurde wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben gewonnen.

Chromatofokussierung

Die Chromatofokussierungs-Säulen wurden zunächst mit Prä-Äquilibriumspuffer gespült. Die hohe Pufferkapazität sollte den pH-Wert in der Säule in den leicht basischen Bereich bringen. Anschließend wurde die Säule mit 3 – 5 Bettvolumen Startpuffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag (Flussrate 0,25 – 0,5 ml/min) wurde die Säule mit 5 – 10 Säulenvolumen Elutionspuffer beschickt. Anschließend wurde die Säule mit 1 – 2 Säulenvolumen 1 M NaCl gespült, um verbliebene Proteine von der Säule zu waschen.

Entfernen von Polybuffer

Polybuffer enthält Ampholyt ähnliche Moleküle, deren Entfernung durch Anionenaustauscher-Chromatographie erfolgte.

Fractionen aus der Chromatofokussierung, die Bet v 4 enthielten, wurden vereinigt, mit 100 mM NaOH auf pH 8,0 gebracht und auf eine MonoQ HR 10/10-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben durch einen NaCl-Gradienten.

Größenausschluss-Chromatographie

Die abschließende Reinigung von Bet v 4 erfolgte durch Größenausschluss-Chromatographie (SEC). Bet v 4 enthaltende Fractionen wurden auf eine mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM CaCl₂ äquilibrierte HiLoad 26/60 Superdex 75 HR pg-Säule aufgetragen und mit 1,5 Säulenvolumen desselben Puffers eluiert. Fractionen, die Bet v 4 enthielten wurden gegen Wasser oder 0,2 mM CaCl₂ dialysiert und lyophilisiert.

3.4.6 Reinigung von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von *E. coli*-Proteinen

Herstellung des Rohextraktes

Die Herstellung des Proteinrohextraktes erfolgte wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben. Lediglich auf die Nukleinsäure-Präzipitation mit Streptomycinsulfat und Polyethylenimin wurde verzichtet.

Kochen des Proteinrohextraktes

Der Rohextrakt wurde unter Rühren langsam auf 90 – 95 °C erhitzt und 10 min weitergerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden präzipitierte Proteine durch Zentrifugation (13.000 rpm entsprechend 25.000 g im KA 18.50-Rotor, 30 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde durch Größenausschluss-Chromatographie von niedermolekularen Verunreinigungen getrennt.

Größenausschluss-Chromatographie

Der klare Überstand wurde gegen Wasser oder 0,2 mM CaCl₂ dialysiert, lyophilisiert und in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen. Die Proteinlösung wurde wie in Kapitel 3.4.5.5 beschrieben einer Größenausschluss-Chromatographie zugeführt. Fraktionen, die Bet v 4 enthielten, wurden gegen Wasser oder 0,2 mM CaCl₂ dialysiert und lyophilisiert.

3.4.7 Reinigung der Apo-Form

Die Apo-Form von Bet v 4 wurde entweder durch Dialyse der Calcium-Form von Bet v 4 gegen 2 mM EDTA, pH 8,0, gewonnen (Reinigung über Affinitäts-Chromatographie mit enzymatischer Spaltung) oder durch Verwendung von Puffern mit 0,1 – 2 mM EDTA statt CaCl₂ (Reinigung von Bet v 4 ohne Fusionsanteil).

3.4.8 Herstellung eines wässrigen Extrakts von Birkenpollen

1 g Birkenpollen (Allergon, Angelholm, Schweden) wurden eine Stunde in 5 ml Extraktionspuffer (20 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl₂, Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA, pH 8,0) bei Raumtemperatur gerührt. Die hydratisierten Pollen wurden vom Überstand durch eine 30-minütige Zentrifugation (13.000 rpm entsprechend 16.000 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt.

3.5 Proteincharakterisierung

3.5.1 SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese nach Laemmli

Lösungen und Puffer

| | |
|-------------------|---|
| Probenpuffer | 4 x Roti–Load (Roth, Karlsruhe) |
| Laufpuffer | 25 mM Tris/HCl, 192,5 mM Glycin, 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), pH 8,3 |
| Färbelösung | 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung I | 25 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung II | 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure |

Molekulargewichts–Standards für Proteine

| Bio–Rad <i>low range</i> | | Fluka Bromcyanspaltungsfragmente von Pferdeherz–Myoglobin |
|--------------------------|------------------------|--|
| Protein | Molekulargewicht (kDa) | Molekulargewicht (kDa) |
| Phosphorylase B | 97,4 | 17 |
| Rinderserumalbumin | 66,2 | 14.5 |
| Ovalbumin | 45,0 | 10.7 |
| Carbonanhydrase | 31,0 | 8.2 |
| Trypsininhibitor | 21,5 | 6.3 |
| Lysozym | 14,4 | 2.5 |

Zur Überprüfung der Proteinexpression und der Reinheit von Protein–Präparationen wurde die denaturierende Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und 19 % (w/v) Polyacrylamid–Gelen nach Laemmli (1970) oder Schägger und von Jagow (1987) (Kapitel 3.5.2) angewandt.

Die Elektrophorese wurde als vertikale Plattenelektrophorese im diskontinuierlichen System durchgeführt. Die Trenngele waren 10,2 cm breit, 6 cm hoch und 0,75 mm dick. Das Sammelgel hatte eine Höhe von etwa 2 cm.

Das Trenngel bestand aus 15 – 19 % (w/v) Acrylamid, 0,51 % (w/v) N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 (Chemikalien von Roth, Karlsruhe). Das Sammelgel bestand aus 10 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 140 mM Tris, pH 6,8. Durch Zugabe von 67 µl N,N,N',N'–Tetramethyldiamin

(TEMED) und 1 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) je 100 ml Gel-Lösung wurde die Polymerisation gestartet.

Alle Proben wurden mit 1x bis 4x Probenpuffer versetzt und 5 – 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 24 mA durchgeführt. Die Laufzeit der Gele lag zwischen 60 und 90 min.

Nach dem Lauf wurden die Gele für 30 min in Proteinfärbelösung gegeben. Zum Entfärben wurden die Gele 30 min in Entfärbelösung I und anschließend über Nacht in Entfärbelösung II bei 25 rpm geschüttelt.

3.5.2 Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow

SDS-Gele nach Schägger und von Jagow (1987) zeichnen sich durch einen erhöhten Anteil an Quervernetzer aus und eignen sich daher besonders zur Analyse kleiner Proteine.

| | |
|-------------------|---|
| Probenpuffer | 4 x Roti-Load (Roth, Karlsruhe) |
| Kathodenpuffer | 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25 |
| Anodenpuffer | 200 mM Tris/HCl pH 8,9 |
| Färbelösung | 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung I | 25 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung II | 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure |

Das Trenngel bestand aus 16,5 % (w/v) Acrylamid, 2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (Acrylamid und Methylenbisacrylamid von AppliChem), 0,1 % (w/v) SDS und 1 M Tris/HCl, pH 8,45. Das Sammelgel bestand aus 4 % (w/v) Acrylamid, 0,24 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 0,75 M Tris, pH 8,45. Der Start der Polymerisation erfolgte wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben. Teilweise enthielten die Gele zusätzlich 6 M Harnstoff (Gerbu, Gaiberg).

Alle Proben wurden mit 1x bis 4x Probenpuffer versetzt und 5 – 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 28 mA, bis die Proben in das Trenngel eingedrungen waren. Dann wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht. Die Laufzeit der Gele lag zwischen 3 und 4 Stunden.

Die Färbung der Gele erfolgte analog der Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (Kapitel 3.5.1).

3.5.3 Silberfärbung zum Nachweis geringer Proteinmengen

Zum Nachweis geringer Proteinmengen wurde die schnelle Silberfärbung ohne Glutardialdehyd-Fixierungsschritt (Blum *et al.* 1987) durchgeführt.

Lösungen

| | |
|--------------------------|---|
| Formaldehyd-Fixierlösung | 40 % (v/v) Methanol, 0,05 % (v/v) Formaldehyd |
| Natriumthiosulfat-Lösung | 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat |
| Silbernitrat-Lösung | 0,1 % Silbernitrat |
| Entwicklerlösung | 3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,05 % (v/v) Formaldehyd |
| Stopp-Lösung | 3 M Citronensäure |

Das Gel wurde 10 min in Formaldehyd-Fixierlösung geschüttelt (150 rpm), zweimal je 5 min mit Wasser gewaschen und 1 min in Natriumthiosulfat-Lösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für je 20 s wurde das Gel in Silbernitratlösung eingelegt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde durch Zugabe von Entwicklerlösung der Entwicklungsprozess gestartet. Erreichten die Banden die gewünschte Intensität, wurde die Entwicklung durch Zugabe des gleichen Volumens Stopp-Lösung beendet.

3.5.4 Blaue Native Gelelektrophorese

Die Blaue Native Gelelektrophorese dient der Untersuchung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen (Schamel & Schamel, 2001). Die Gele bestehen aus einem Gradienten an Acrylamid, der eine zunehmend geringere „Maschengröße“ beinhaltet. Proteine und Proteinkomplexe wandern in Abhängigkeit von Proteingröße und -Gestalt verschieden weit in das Gel ein. Durch die Anlagerung des sauren Farbstoffs CoomassieBlue G250 entstehen negativ geladene Komplexe, die im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern.

| | |
|----------------|--|
| Probenpuffer | 750 mM 6-Aminohexansäure ¹ , 50 mM NaCl, 20 mM BisTri/HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 0,01 % Triton X-100, 0,5 % (w/v) CoomassieBlue G250 ¹ , pH 7,0 |
| Kathodenpuffer | 50 mM Tricin, 15 mM BisTri/HCl, pH 7,0 |
| Anodenpuffer | 50 mM BisTri/HCl, pH 7,0 |

| | |
|-------------------|---|
| Färbelösung | 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung I | 25 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbelösung II | 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure |

¹ (Fluka, Taufkirchen)

Das Gele enthalten einen kontinuierlichen Gradient von Acrylamid/Bisacrylamid:

| | | |
|---------------------|-----------------------|--------------|
| Acrylamid | 5 bzw. 10 % (w/v) bis | 19,7 % (w/v) |
| Bisacrylamid | 0,6 % (w/v) bis | 2,4 % (w/v) |
| Glycerin | 0 % (v/v) bis | 23,3 % (w/v) |
| 6–Aminohexansäure | 333 mM | |
| BisTris/HCl, pH 7,0 | 167 mM | |

Zum Gießen der Gele wurden zunächst 1,75 ml der 5 bzw. 10 %-igen Gellösung in einer Glaspipette aufgenommen und mit 1,75 ml der 19,7 %-igen Gellösung unterschichtet. Beide Lösungen enthielten zum Start der Polymerisation Ammoniumperoxodisulfat und TEMED (Kapitel 3.5.1). Durch das Einsaugen von 3 – 5 Luftblasen wurde der Gradient gebildet und in die Gelform entlassen. Das Sammelgel bestand aus der 5 %-igen Gellösung.

Die Proteinproben wurden mit 10 – 20 µl Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung, die von anfangs 50 V auf 200 V erhöht wurde. Die Elektrophorese erfolgte so lange, bis keine Bewegung der Banden mehr beobachtet wurde (4 – 6 Stunden). Die Gele wurden in Coomassie Brilliant Blue R250-Lösung nachgefärbt und wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben entfärbt.

3.5.5 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Absorptionsmessung wurde ein Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) benutzt. Streulichtmessungen bei 600 nm (Kapitel 3.3.1) erfolgten in Halbmikroküvetten aus Kunststoff (Sarstedt, Nürnberg). Für Messungen im ultravioletten (UV) Spektralbereich wurden Schwarzwandküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Mühlheim) verwendet.

3.5.6 Proteinbestimmung mit BCA

Bet v 4 enthält keine Tyrosin- oder Tryptophanseitenketten, weswegen eine Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorption im UV-Bereich nicht möglich ist. Deswegen wurde auf eine kolorimetrische Proteinbestimmung im VIS-Bereich mittels einer Farbkomplex-Reaktion zurückgegriffen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration während der Präparation wurde deswegen die Bichinolin-Methode angewandt (Smith *et al.* 1985). Die Methode beruht auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion, wobei Cu^{2+} im alkalischen Milieu zu Cu^+ reduziert wird, während gegenläufig Peptidbindungen des Proteins über einen vierzähligen Komplex mit Cu^{2+} oxidiert werden (Wiechelman *et al.* 1988). Die Detektion der Cu^+ -Konzentration erfolgt über einen Komplex aus Cu^+ und 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) der Stöchiometrie $[\text{Cu}^+\cdot\text{BCA}_2]$, dessen Konzentration spektrophotometrisch bei 570 nm bestimmt wurde.

Es wurde der *BCA-Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 100 Teile des Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Natrium-Tartrat und BCA enthaltenden Reagens A mit 2 Teilen Reagens B (4 %-ige CuSO_4 -Lösung) gemischt. Die Proteinproben wurden so vorverdünnt, daß die Proteinkonzentration zwischen 20 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ lag. Die Proteinbestimmungen erfolgten in Mikrotiterplatten. 10 – 25 μl der Proteinproben wurden mit 200 μl der Arbeitslösung gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 570 nm gegen eine Referenz aus Wasser und Arbeitslösung an einem Microplate Reader Model 550 (Bio-Rad, München) gemessen.

Für die Erstellung von Eichgeraden wurden Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen mit Konzentrationen von 25 – 2000 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

3.5.7 Circular dichroismus–Spektropolarimetrie

UV–Circular dichroismus–Spektren wurden mit einem J–810 S Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan) aufgenommen. Es wurden verschiedene Küvetten (Hellma, Müllheim) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verwendet (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Quarzküvetten zur Messung des Circular dichroismus von Bet v 4

| Schichtdicke | Küvettentyp | Proteinkonzentration | Probenvolumen |
|--------------|-------------|----------------------|---------------|
| 0,01 mm | Plättchen | 1 – 2 mM | 2,7 µl |
| 0,1 mm | Plättchen | 100 – 200 µM | 27 µl |
| 1 mm | Standard | 10 – 20 µM | 200 µl |
| 1 mm | zylindrisch | 10 – 20 µM | 150 µl |
| 2 mm | Standard | 10 µM | 400 µl |
| 5 mm | Standard | 5 µM | 800 µl |
| 10 mm | Standard | 2 – 5 µM | 3 ml |

Die Schlitzweite betrug 1 nm, die Zeitkonstante 1 s, die Auflösung der Datenpunkte 0,2 nm und die Aufnahmegeschwindigkeit 20 – 50 nm/min. Der Wellenlängenbereich betrug 260 – 185 nm. Bei größeren Schichtdicken wurde nur bis 190, 195 oder 200 nm gemessen. Datenpunkte, bei denen das Hochspannungssignal des Detektors > 600 V war, wurden verworfen. Es wurden 3 bis 10 Spektren akkumuliert und gemittelt. Pufferspektren wurden unter denselben Bedingungen aufgenommen und subtrahiert. Die Sensitivität betrug ±100 mdeg, die gemessenen Elliptizitäten lagen im Bereich von ±30 mdeg.

Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest erfolgte nach Gleichung (3.1) (Schmid 1989).

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{10^5 \cdot \Theta}{c \cdot d \cdot N} \quad \text{Gleichung (3.1)}$$

- $[\Theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
 Θ : gemessene Elliptizität (mdeg)
 c : Proteinkonzentration (μM)
 d : Schichtdicke der Küvette (cm)
 N : Zahl der Aminosäuren im Protein

Die Abschätzung der Sekundärstruktur erfolgte mit dem Programm *Secondary Structure Estimation*, das zum Programmpaket der CD-Spektropolarimeter-Software *Spectra Manager* gehört. Der circulare Dichroismus im fernen UV kann zur Abschätzung der Sekundärstruktur verwendet werden. Zunächst stellte man fest, daß bei Modell-Polypeptiden wie poly-L-Lysin die CD-Spektren für verschiedene Konformationen unterschiedlich aussehen. Dies führt zur Darstellung des Circular dichroismus als Linearkombination von Basisspektren:

$$[\Theta^\lambda] = f_\alpha \cdot [\Theta_\alpha^\lambda] + f_\beta \cdot [\Theta_\beta^\lambda] + f_{rc} \cdot [\Theta_{rc}^\lambda] \quad \text{Gleichung (3.2)}$$

$[\Theta^\lambda]$: gemessene Elliptizität bei der Wellenlänge λ

f_α : α -helikaler Anteil

$[\Theta_\alpha^\lambda]$: Elliptizität eines rein α -helikalen Proteins bei der Wellenlänge λ

f_β : β -Faltblattanteil

$[\Theta_\beta^\lambda]$: Elliptizität eines reinen β -Faltblatt-Proteins bei der Wellenlänge λ

f_{rc} : Anteil nichtregulärer Strukturen

$[\Theta_{rc}^\lambda]$: Elliptizität eines unstrukturierten Proteins bei der Wellenlänge λ

Die Werte der Elliptizität für die einzelnen Sekundärstrukturelemente lassen sich mit obigem Ansatz anhand von CD-Messungen von Proteinen mit aufgeklärter Röntgenstruktur und somit bekanntem Anteil der jeweiligen Elemente ermitteln. Eine Verfeinerung dieser Beschreibung ist durch Zerlegung in eine größere Anzahl von Basisspektren sowie eine Einbeziehung von β -turns in die Betrachtungen möglich. Die hier durchgeführten Sekundärstrukturabschätzungen basieren auf Referenzspektren von Yang *et al.* (1986).

3.5.8 Messung von Temperaturkurven

Die Messung von CD-Temperaturkurven erfolgte an einem JASCO J-810 Spektropolarimeter mit Peltier-Element und einer CDF-426S Temperaturkontrolleinheit, die von der JWJTC-484 Temperaturkontrollsoftware gesteuert wurde.

Es wurde eine 1 mm oder 1 cm-Quarzküvette (Hellma, Mühlheim) mit einem Probenvolumen von 350 μ l bzw. 3 ml verwendet. Die Temperatur in der Küvette wurde mit einem eingebrachten Temperatursensor bestimmt. Vermessen wurden 2 – 20 μ M Proben von Bet v 4 in 2 mM CaCl₂,

1 mM EGTA bzw. EDTA in Wasser oder 5 mM Natriumacetat, pH 6,5.

Die Proben wurden von 5 – 100 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min aufgeheizt und mit 1 °C/min wieder auf 5 °C abgekühlt. Während des Temperaturübergangs wurde die Elliptizität bei 222 nm verfolgt. Die gemessene Elliptizität wurde nach Gleichung (3.1) in die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest umgerechnet.

3.5.9 ESI–Massenspektrometrie

Bei der *electrospray ionization* (ESI) Massenspektrometrie werden Moleküle in einem Spray feinsten Tröpfchen in einem starken elektrischen Feld bei Atmosphärendruck ionisiert (Dole *et al.* 1968, Iribarne & Thomson 1976). Die Analyse der ionisierten Ionen kann z.B. über einen *time of flight* (TOF) Analysator erfolgen.

Die ESI–Massenspektren wurden von Xaver Schrott (Lehrstuhl für Bioorganische Chemie, Universität Bayreuth) und Irena Matecko (Institut für Chemie, Johannes Kepler Universität, Linz, Österreich) aufgenommen.

3.6 NMR–Spektroskopie

3.6.1 Spektrometer

Alle mehrdimensionalen NMR–Experimente wurden an einem Bruker DRX600–Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem inversen Vierfachresonanz–Probenkopf mit Dreiaachsen–Gradienten durchgeführt. Die Aufnahme von ¹H 1D–Spektren erfolgte teilweise an einem AMX400–Spektrometer (Bruker, Karlsruhe).

3.6.2 Allgemeine Meßbedingungen

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in allen Zeitdimensionen unter Verwendung der *States–TPPI*–Methode (Marion *et al.* 1989a,b). In NOESY– und TOCSY–Experimenten erfolgte die Unterdrückung der Wasser–Resonanz mittels *excitation sculpting* (Hwang und Shaka, 1995), bei den heteronuklearen Experimenten mit einer 3–9–19–WATERGATE–Sequenz (Piotto *et al.* 1992, Sklenár *et al.* 1993). Die Eichung der ppm–Skala erfolgte für ¹H durch den externen Standard 2,2–Dimethyl–2–silapentan–5–sulfonat (DSS), für ¹⁵N indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktfrequenz ($\omega_N/\omega_H = 0,1013291444$, Live

et al. 1984). Die Experimente wurden bei 298 bzw. 300 K durchgeführt. Die Temperatur wurde durch eine BVT3000 Temperatur–Kontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe) reguliert.

3.6.3 NMR–Proben

Die NMR–Messungen erfolgten in Ultra Precision NMR *Sample Tubes* 5 mm (Norell, Inc., Landisville, NJ, USA). Das Probenvolumen betrug 500 µl. Alle Proben enthielten 0,02 % (w/v) NaN₃ zur Vermeidung von mikrobiellem Befall. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch (Kapitel 3.5.5) oder anhand der Einwaage des Proteins.

Tabelle 3.5: NMR–Proben, die in dieser Arbeit vermessen wurden.

| Probe | Protein | Konzentration | Puffer / Salze | Lösungsmittel |
|-------|--|---------------|---|---|
| A | Bet v 4 / Ca ²⁺ | 1,2 mM | 25 mM CaCl ₂ , pH 6 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| B | Bet v 4 / Apo | 1,0 mM | H ₂ O, pH 6 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| C | Bet v 4 / Ca ²⁺ | 1,0 mM | 25 mM CaCl ₂ , 10 mM NaOAc, pH 6,0 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| D | Bet v 4 / Apo | 0,8 mM | 10 mM NaOAc, pH 6,0 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| E | Bet v 4 / Ca ²⁺ | 1,1 mM | 25 mM CaCl ₂ , 10 mM NaOAc, pH 6,0 | D ₂ O |
| F | [U–98 % ¹⁵ N] Bet v 4 / Ca ²⁺ | 1,5 mM | 25 mM CaCl ₂ , pH 6 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| G | [U–98 % ¹⁵ N] Bet v 4 / Apo | 1,0 mM | 10 mM NaOAc, pH 6,0 | H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) |
| H | [U–98 % ¹⁵ N] Bet v 4 / Ca ²⁺ | 1,2 mM | 25 mM CaCl ₂ , 10 mM NaOAc, pH 6,0 | D ₂ O |

3.6.4 Aufnahme der Spektren

Die NMR–Experimente, die für die Strukturbestimmung relevant waren oder deren Spektren in dieser Arbeit abgebildet sind, finden sich zusammen mit den wichtigsten Aufnahmeparametern in Tabelle 3.5 (folgende Seite).

Dabei bedeuten: SW Frequenzbreite (*sweepwidth* in Hz)
 TD Zahl der reellen Datenpunkte.

Tabelle 3-6: NMR-Experimente an Bet v 4

| Experiment | Probe | Scans | Frequenzachse | | | | | | | | | | Mischzeit (ms) | Referenz | |
|--|------------|-------|-----------------|------|-------|-----------------|------|------|----------------|------|------|--|----------------|----------|---|
| | | | F1 | | | | F2 | | | | F3 | | | | |
| | | | Kern | SW | TD | Kern | SW | TD | Kern | SW | TD | | | | |
| ID- ¹ H | A, B, C, D | 64 | ¹ H | 9615 | 16384 | | | | | | | | | | McDonald & Phillips 1970 |
| 2D-TOCSY | A, B | 96 | ¹ H | 8389 | 512 | ¹ H | 8389 | 4096 | | | | | | | Braunschweiler & Ernst 1983 |
| 2D-NOESY | A, B | 96 | ¹ H | 8389 | 512 | ¹ H | 8389 | 4096 | | | | | | | Jeener 1979 |
| 2D-TOCSY | E | 64 | ¹ H | 7788 | 720 | ¹ H | 7788 | 4096 | | | | | | | Braunschweiler & Ernst 1983 |
| 2D-NOESY | E | 64 | ¹ H | 7788 | 800 | ¹ H | 7788 | 4096 | | | | | | | Jeener 1979 |
| ¹ H, ¹⁵ N-HSQC | F, G, H | 16 | ¹⁵ N | 1216 | 384 | ¹ H | 8389 | 2048 | | | | | | | Mori <i>et al.</i> 1995 |
| ¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-NOESY-HSQC | F | 16 | ¹ H | 6902 | 256 | ¹⁵ N | 1216 | 64 | ¹ H | 8389 | 1024 | | | | Talluri & Wagner 1996 Marion <i>et al.</i> 1989 |
| ¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-TOCSY-HSQC | F | 16 | ¹ H | 6902 | 256 | ¹⁵ N | 1216 | 64 | ¹ H | 8389 | 1024 | | | | Zhang <i>et al.</i> 1994 Marion <i>et al.</i> 1989b |
| HNHA | F | 16 | ¹ H | 4999 | 180 | ¹⁵ N | 1216 | 64 | ¹ H | 8389 | 1024 | | | | Zhang <i>et al.</i> 1997 |
| HMQC-NOESY-HSQC | F | 16 | ¹⁵ N | 1216 | 64 | ¹⁵ N | 1216 | 96 | ¹ H | 8389 | 1024 | | | | Ikura <i>et al.</i> 1990 Frenkiel <i>et al.</i> 1990 |

3.6.5 Datenprozessierung

Homonukleare 2D-Spektren wurden in der t_1 -Richtung nach einem einfachen *zerofilling* (Cavanagh *et al.* 1996) in beiden Domänen mit einer $\pi/2$ bis $\pi/3$ verschobenen \sin^2 -Funktion multipliziert und Fourier-transformiert. Anschließend wurde – soweit notwendig – eine Basislinienkorrektur mit einem *Model-free*-Algorithmus (Friedrich, 1995) durchgeführt. Hierzu wurde das Programm *base_fast* (Schweimer 2000) verwendet.

Zur Prozessierung der 3D-Spektren erfolgte zunächst ein *zerofilling* auf die doppelte Länge der FID's (*free induction decay*). Anschließend wurden in allen drei Zeitdomänen mit einer $\pi/2$ bis $\pi/3$ verschobenen \sin^2 -Fensterfunktion multipliziert. In der ^{15}N -Dimension wurde der FID durch *linear prediction* auf die doppelte Länge extrapoliert. Nach Fourier-Transformationen in allen drei Domänen wurde schließlich die Hochfeldhälfte in F3 des Kubus verworfen und es resultierte ein Datenkubus mit $256 \times 128 \times 512$ realen Punkten.

3.6.6 Software, Rechner

Die NMR-Spektren wurden mit den Programmen NDee (SpinUp Inc., Dortmund), NMRView 5.0.4 und 5.1.3 (Johnson & Blevins 1994) sowie mit zusätzlicher Software, die am Lehrstuhl entwickelt wurde, und automatischer Peakroutinen (Schweimer 2000) auf ULTRA Sparc 5- (Sun Microsystems, Palo Alto, CA, USA), R5000- und Octane- (Silicon Graphics, Mountainview, CA, USA) sowie DEC-Workstations (Compaq, Houston, Texas, USA) bearbeitet.

3.6.7 Auswertung dreidimensionaler NMR-Spektren

Zur Zuordnung der Resonanzsignale von Bet v 4 und Gewinnung von Abstandsinformationen war die Aufnahme von 3D-Spektren notwendig: $^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -NOESY-HSQC, $^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TOCSY-HSQC, HNHA und HMQC-NOESY-HSQC (oder auch NNH-NOESY). Die Peaks der 2D- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Analoge von NOESY-HSQC und TOCSY-HSQC sind hierbei entlang der ^{15}N -Dimension aufgespalten. Daraus resultiert ein Kubus, der durch eine ω_1 - (^1H), ω_2 - (^{15}N) und eine ω_3 - (^1H)-

Achse begrenzt wird. Ausgehend von jeder Amidprotonenresonanz finden sich (meist hochfeldverschoben) entlang der ω_1 - (^1H) Achse die weiteren Protonen eines Spinsystems. Sie bilden zusammen mit dem Amidproton die sogenannten Leitern. Um die Leitern aus dem Kubus zu extrahieren, wurden mit Hilfe des NMRView-Programmpakets Streifen (*stripes*) aus ω_1 - ω_3 -Ebenen, die Spinsysteme enthielten, herausgeschnitten und nebeneinander gelegt (Abbildung 3.6-1):

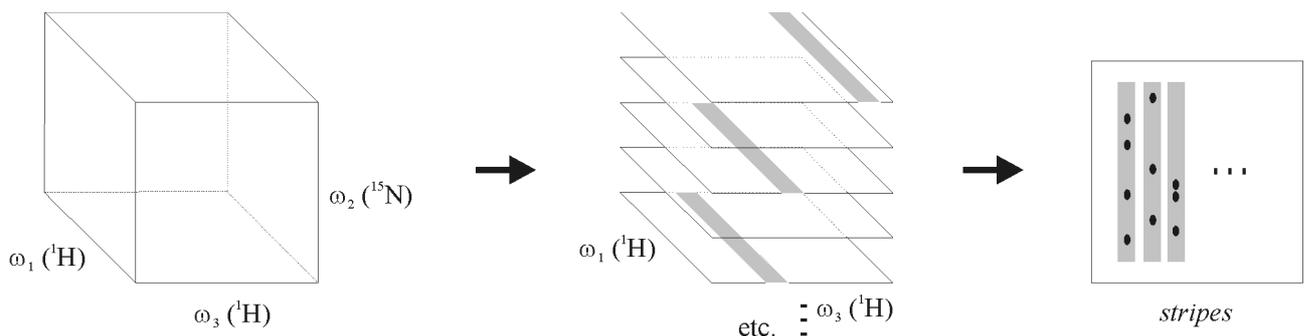


Abbildung 3.6-1: Zur Auswertung dreidimensionaler NMR-Spektren wurden die Ebenen entlang der ^{15}N -Achse nach Spinsystemen (den sogenannten Leitern) durchsucht. Bei Vorhandensein von Spinsystemen wurden 2D-Schnitte (grau hinterlegte Trapeze) mit einer gewissen Toleranz in der ω_3 -Richtung ausgeschnitten und die Streifen (*stripes*) nebeneinandergelegt.

3.6.8 Sequenzielle Zuordnung

Die sequenzspezifische Zuordnung erfolgte mit Hilfe des *chain-tracing* durch das Auffinden sequenzieller NOEs (*nuclear Overhauser enhancement*) (Wüthrich 1986). Spinsysteme wurden mit Hilfe des 3D-TOCSY-Spektrums Aminosäuren zugeordnet. Die Identifikation der α -Protonen erfolgte auch mit Hilfe des HNHA-Spektrums. Bei der sequenziellen Zuordnung half neben dem 3D-NOESY-HSQC-Spektrum das NNH-NOESY-Spektrum, bei dem durch die Kreuzresonanzen die Amid-Protonen des vorhergehenden und des nachfolgenden Aminosäurerestes identifiziert werden können.

3.6.9 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart

Die Lage der $C_{\alpha}H$ -Resonanzen in einem Protein kann mit dem Vorliegen von Sekundärstrukturelementen korreliert werden (Wishart *et al.*, 1991 und 1992). Dazu wurde die chemische Verschiebungen der C_{α} -Protonen des Aminosäurerestes X im Protein mit der chemischen Verschiebung derselben Aminosäure in einem GGXAGG-Peptid verglichen. Folgte dem Rest sequenziell ein Prolin, so wurden die Verschiebungswerte von $C_{\alpha}H$ von X in GGXPPG verwendet (Wishart *et al.*, 1995). War die Abweichung von den im Peptid gemessenen Werten größer als 0,1 ppm so wurde ein Index von (+1) zugeordnet, war sie hingegen kleiner als -0,1 ppm so wurde der Wert (-1) zugewiesen. Das Auftreten einer α -Helix kann dann angenommen werden, wenn mehr als dreimal (-1) aufeinanderfolgt, mindestens aber viermal in fünf Aminosäuren (-1) vorkommt. Für β -Faltblattstrukturen muss der Index (+1) dreimal hintereinander auftreten, mindestens jedoch dreimal in 5 Aminosäuren.

3.6.10 Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 durch NMR Diffusionsmessungen

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 erfolgte mittels *Pulse Field Gradient* (PFG) NMR Technik (Jones *et al.* 1997, Wilkins *et al.* 1999). Hierbei kam die *pulse gradient stimulated echo longitudinal encode – decode* (PG-SLED) Sequenz zum Einsatz (Gibbs & Johnson 1991). Die Intensität der NMR-Resonanzsignale ist hier u.a. abhängig von der angelegten Gradientenstärke und dem Diffusionskoeffizienten D des Moleküls (Slichter 1996).

$$I(G) = A \cdot e^{-d \cdot G^2} \quad \text{Gleichung (3.4)}$$

I Signalintensität

G relative Gradientenstärke

A Konstante

d Zerfallskonstante ($d \propto$ Diffusionskoeffizient D)

Bei Variation der relativen Gradientenstärke kann nach Bestimmung der Signalintensität durch Integration die Zerfallskonstante d bestimmt werden, die dem Diffusionskoeffizienten D proportional ist. Die Abnahme der Intensität kann einer Gauss-Kurve [Gleichung (3.4)] angepasst werden. D kann nicht ohne Weiteres aus d bestimmt werden, weil hierzu die genaue Kenntnis von

Temperatur und Viskosität der Probelösung notwendig ist.

Der Diffusionskoeffizient und damit auch die Zerfallskonstante d ist nach der Stokes–Einstein Gleichung indirekt proportional zum hydrodynamischen Radius R_h eines Moleküls.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot R_h \cdot \eta} \quad (\text{Stokes–Einstein Gleichung})$$

| | |
|--------|--------------------------------------|
| D | Diffusionskoeffizient |
| k | Boltzmann–Konstante |
| T | absolute Temperatur |
| R_h | hydrodynamischer Radius des Moleküls |
| η | Viskosität der Lösungsmittel |

d.h. $R_h \propto \frac{1}{d}$ Gleichung (3.5)

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius ohne Kenntnis des Diffusionskoeffizienten ist möglich, wenn die Diffusion des Proteins mit der Diffusion einer Referenzsubstanz mit bekanntem hydrodynamischen Radius verglichen wird.

$$R_h^{Prot} = \frac{d^{Ref}}{d^{Prot}} \cdot R_h^{Ref} \quad \text{Gleichung (3.6)}$$

| | |
|--------------|--|
| R_h^{Prot} | hydrodynamischer Radius des Proteins |
| R_h^{Ref} | hydrodynamischer Radius der Referenzsubstanz |
| d^{Prot} | Zerfallskonstante des Proteins |
| d^{Ref} | Zerfallskonstante der Referenzsubstanz |

Hier wurde die Diffusion von Bet v 4 mit der Diffusion von 1,4–Dioxan verglichen.

Hierzu wurden ^1H –1D–Spektren einer 1 mM Probe von Bet v 4 in D_2O , 20 mM NaOAc, pH 6,0, 25 mM CaCl_2 , 1 % (v/v) 1,4–Dioxan gemessen. Die relative Gradientenstärke wurde in 18 Schritten von 5 – 100 % variiert. Die Aufnahme aller Spektren wurde jeweils fünfmal wiederholt, um die Daten statistisch abzusichern.

Die Abnahme der Signalintensität wurde für Bet v 4 durch Integration der Signale im Bereich der Methylprotonen (0,15 – 1,20 ppm) bestimmt. Zur Bestimmung der Signalintensität für 1,4-Dioxan wurde der Bereich von 3,0 – 4,1 ppm herangezogen, dem allerdings das Proteinsignal überlagert ist. Daher wurde wie in Wilkins *et al.* (1999) beschrieben zunächst eine Gauss-Kurve (3.4) an die Abnahme der Methylgruppenintensität angepasst und so d^{Prot} bestimmt. Anschließend wurde eine Summe zweier Gauss-Kurven an die Abnahme der Dioxan/Protein-Intensität (3.4) angepasst, wobei die aus der Abnahme der Methylgruppenintensität bestimmte Zerfallskonstante d^{Prot} für den Proteinanteil vorgegeben wurde. Daraus erhält man die Zerfallskonstante des Dioxananteils d^{Ref} . Der hydrodynamische Radius von Bet v 4 wurde nach Gleichung (3.6) bestimmt, wobei für den hydrodynamische Radius von 1,4-Dioxan 2,12 Å angenommen wurden (Wilkins *et al.* 1999).

3.7 Gewinnung der Distanzbeschränkungen für die Strukturberechnung

3.7.1 Aus NOEs abgeleitete Distanzbeschränkungen

Die Stärke der dipolaren Kopplung steigt mit zunehmender räumlicher Nähe zwischen Protonen indirekt proportional zur dritten Potenz des Abstandes. Damit nimmt die Intensität der NOE-Kreuzresonanzen zu ($\propto 1/r^6$). Je nach Stärke wurden die NOEs in verschiedene Klassen unterteilt. Die Untergrenze des Abstandes wurde auf 0 Å festgelegt, weil dies zu einer besseren Konvergenz der berechneten Strukturen führt (Varani *et al.* 1996).

Tabelle 3.6: Zusammenhang zwischen NOE-Intensität und Abstandsintervall.

| NOE-Intensität | Proton-Proton-Abstandsintervall |
|----------------|---------------------------------|
| stark | 0 – 2,7 Å |
| mittel | 0 – 3,5 Å |
| schwach | 0 – 5,0 Å |

In die Strukturberechnung von Bet v 4 gingen überwiegend Abstandsbeschränkungen ein, die aus dem ^{15}N , ^1H , ^1H -NOESY-HSQC-Spektrum stammten. Zur Klassifizierung der NOEs im NOESY-HSQC wurde die Intensität jeder Kreuzresonanz auf die Intensität der zugehörigen Amidprotonenresonanz im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum normiert. Als Anhaltspunkte für die Klassifizierung der NOE-Stärke dienten mehrere ausgewählte sequenzielle NOEs: $\text{H}_{\alpha i}, \text{HN}_{i+1}$ in β -Faltblattsträngen mit einem typischen Abstand von 2,2 Å, $\text{HN}, \text{HN}(i, i+1)$ in α -Helices mit einem

typischen Abstand von 2,8 Å und $H_{\alpha},HN(i, i+1)$ in α -Helices mit einem typischen Abstand von 3,5 Å (Wüthrich 1986). Eine manuelle Korrektur der Klassifizierung wurde z.B. bei Signal-Überlappungen durchgeführt.

Die Resonanzen des NOESY-HSQC-Spektrums wurden mit der *peak pick*-Funktion von NMRView identifiziert. Die erhaltene Liste wurden mit Hilfe des Programms *list_compare* (Schweimer 2000) gegen das $^1H, ^{15}N$ -HSQC gefiltert, um die Zahl der Rauschsignale zu minimieren. Die Liste mit den NOE-Resonanzen wurde mit dem Programm *AssignNOE* (Schweimer 2000) analysiert. Die chemischen Verschiebungen der NOE-Kreuzsignale werden hierbei mit den Resonanzen der Spinsysteme, die bei der sequenziellen Zuordnung (Kapitel 3.6.8) gefunden wurden, verglichen. Als Resultat liefert das Programm *AssignNOE* eine Vorschlagsliste aller möglichen Paare von Protonen, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung in Frage kommen. Aus der Vorschlagslisten wurden durch die grafische Auswertung der Spektren unter teilweiser Einbeziehung vorläufiger Strukturen (soweit bereits vorhanden) die tatsächlichen Abstandsbeschränkungen extrahiert, die dann in die Strukturberechnung einfließen.

Weitere NOEs wurden mit Hilfe des 2D-NOESY-Spektrums einer D_2O -Probe von Bet v 4 erhalten. Die Amidprotonen tauschen gegen Deuterium aus und sind im Spektrum nicht mehr zu sehen. Vor allem H_{α} - H_{α} -Distanzbeschränkungen konnten so gewonnen werden.

3.7.2 Einschränkung der dihedralen Winkel

Die skalare Kopplungskonstante $^3J_{HN-H\alpha}$ über drei Bindungen hängt vom Torsionswinkel Φ des Proteinrückgrats nach der Karplus-Beziehung [Gleichung (3.7); Karplus 1959, Pardi *et al.* 1984] ab (Abbildung 4.7-1).

$$^3J_{HN-H\alpha} = 6,4 \text{ Hz} \cdot \cos^2\Theta - 1,4 \text{ Hz} \cdot \cos\Theta + 1,9 \text{ Hz} \quad \text{Gleichung (3.7)}$$

$$\text{mit } \Theta = | \Phi - 60^\circ |$$

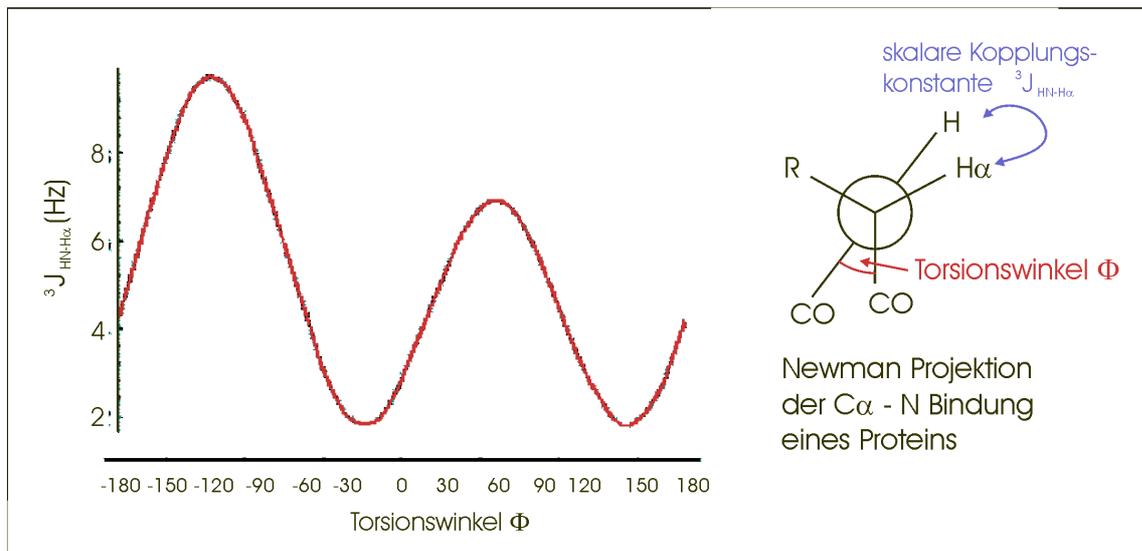


Abbildung 3.7-1: Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ vom Diederwinkel Φ des Proteinrückgrats nach der Karplus-Beziehung.

Die Kopplungskonstanten wurden aus dem HNHA-Spektrum erhalten (Vuister & Bax 1993, Kuboniwa *et al.* 1994). Die Werte für die Kopplungskonstanten wurden nach Gleichung (3.8) aus dem Verhältnis der Intensität des Kreuzpeaks und des Diagonalpeaks berechnet. Die Werte wurden pauschal um den Faktor 1,05 korrigiert, um den Einfluss der Relaxation zu berücksichtigen (Cavanagh 1996).

$$J = 1,05 \cdot \left(\frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \delta} \right) \cdot \arctan \sqrt{\frac{-I_c}{I_d}} \quad \text{Gleichung (3.8)}$$

J : Kopplungskonstante

I_c : Intensität des Kreuzpeaks

I_d : Intensität des Diagonalpeaks

δ : Für den Kohärenztransfer $\text{H}\alpha$ -HN zur Verfügung stehendes Intervall (hier 12,3 ms)

Hieraus resultierten folgende Winkelbeschränkungen :

$${}^3J_{\text{HN-H}\alpha} \leq 6,0 \text{ Hz} \Rightarrow -80^\circ \leq \Phi \leq -40^\circ \text{ (typisch für } \alpha\text{-helikale Bereiche)}$$

$${}^3J_{\text{HN-H}\alpha} \geq 8,0 \text{ Hz} \Rightarrow -160^\circ \leq \Phi \leq -80^\circ \text{ (typisch für } \beta\text{-Faltblattstränge)}$$

3.7.3 Wasserstoffbrücken als Distanzbeschränkungen

Zur Identifikation von Amidprotonen, die an eine Wasserstoffbrücke involviert sind, wurden ^{15}N , ^1H HSQC-Spektren von Bet v 4 in D_2O aufgenommen. Hierzu wurde ein Lyophilisat von ^{15}N markiertem Bet v 4 mit Puffersalz und Calcium (Tabelle 3.5) in 99,8 % D_2O (Eurisotop, Gif-sur-Yvette, Frankreich) gelöst und HSQC-Spektren nach 1, 3 und 18 h aufgenommen.

Amidprotonen tauschen in wässrigem Medium rasch aus, es sei denn, sie bilden mit einem Elektronendonator eine Wasserstoffbrücke oder sind im Proteininneren verborgen. Vergleicht man das HSQC-Spektrum von Bet v 4 in Wasser mit dem einer D_2O -Probe, werden nur noch jene Signale zu sehen sein, die langsam austauschen, d.h. jene Amidprotonen, die Wasserstoffbrücken-Donoren sind. Die Identifikation der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren erfolgte aus vorläufigen Bet v 4-Strukturen.

Bei Vorliegen einer Wasserstoffbrücke wurden jeweils zwei Abstandsbeschränkungen eingeführt (Kraulis *et al.* 1989).

$$0 \leq \text{Abstand zwischen Amidproton und Akzeptor} \leq 2,3 \text{ \AA}$$

$$0 \leq \text{Abstand zwischen Amidstickstoff und Akzeptor} \leq 3,3 \text{ \AA}$$

Die Untergrenze des Abstandes wurde wie bereits bei der Klassifizierung der NOEs (Kapitel 3.7.1) auf 0 Å festgelegt, um eine bessere Konvergenz der berechneten Strukturen zu erlangen (Varani *et al.* 1996).

3.8 Strukturberechnung mit Hilfe der Moleküldynamik

Alle Strukturberechnungen erfolgten auf einem mit 4 300 MHz UltraSPARC II-Prozessoren bestückten Sun Ultra Enterprise 450 Server (Sun Microsystems, Palo Alto, CA, USA).

Für die Berechnung der dreidimensionalen Strukturen wurde die NIH Version 1.1.0 (Kuszewski *et al.* 2000) des Programmpakets X-PLOR 3.851 (Brünger 1992) verwendet. Die meisten Berechnungen wurden mit im Programmpaket enthaltenen Protokollen durchgeführt. Protokolle, die nicht der Bibliothek des X-PLOR-Pakets entstammten, sind im Anhang abgedruckt.

Zunächst wurde mit den Protokollen `generate_structure.inp`, `generate_ca2+.inp` und `make_cluster.inp` eine Ausgangsstruktur generiert. Da sich in unmittelbarer Nähe der Ca^{2+} -Ionen keine Protonen befinden, können mit den üblichen Methoden keine Distanzbeschränkungen für den Calcium-*cluster* bestimmt werden. Deswegen wurde der *cluster* modelliert, um die lokale

Geometrie der Calcium-Ionen festzulegen. Hierzu diente das Protokoll `make_cluster.inp`. Als Vorbild für die Modellierung der Koordinaten dienten dabei die aminoternale Domäne zweier Calmodulin-Kristallstrukturen [Rao *et al.* 1993 (PDB-Code 1CLM; Ban *et al.* 1994 (PDB-Code 1OSA)]. Die 6. Koordinationsstelle, die in manchen Röntgenstrukturen von EF-Hand-Proteinen von einem Wassermolekül eingenommen wird, ist mit NMR-Methoden nur schwer zu verifizieren (Otting 1997). Ausgehend von der Ausgangsstruktur wurde unter Verwendung der Distanz- und Winkelbeschränkungen sowie der Beschränkungen der Wasserstoffbrücken mit einem *ab initio simulated annealing* Protokoll (Nilges *et al.* 1988a, b, c; `sa_betv4_8.inp`) ein Satz an 60 Strukturen berechnet. Jede Runde der Strukturberechnung startete mit einer Randomisierung aller Φ/Ψ -Winkel der gestreckten Aminosäurekette. Die Berechnungsstrategie entsprach dabei der von Neudecker *et al.* (2001a) und beinhaltete neben der Behandlung prochiraler Gruppen nach dem *floating chirality* Verfahren (Kharrat *et al.* 1995), einen Potentialterm für eine konformationelle Datenbasis der dihedralen Winkel des Proteinrückgrats und der Seitenketten (Kuszewski *et al.* 1996, 1997, Kuszewski & Clore 2000) mit einem *cut-off* von 10 Standardabweichungen (Neudecker *et al.* 2001c). Für das Absuchen des Konformationsraums wurde 160 ps mit einem Zeitschritt von 2 fs bei 2000 K simuliert, gefolgt von 120 ps langsamen Abkühlens auf 1000 K und 60 ps Abkühlens auf 100 K, letztere mit einem Zeitschritt für die Integration von 1 fs. Anschließend folgten 1200 Schritte einer Energieminimierung, wobei während der letzten 1000 Schritte kein Potentialterm für die konformationelle Datenbasis enthalten war.

Analyse der Sekundärstruktur und der Torsionswinkel

Zur Analyse der Sekundärstruktur und der Torsionswinkel von Bet v 4 diente das Programmpaket PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.* 1993, Laskowski *et al.* 1996). Die resultierenden Φ/Ψ -Winkelpaare wurden als Ramachandran-Plot dargestellt (Ramachandran *et al.* 1963).

Grafische Darstellung der Strukturen

Zur Darstellung der Strukturen wurde das SYBYL-Programmpaket (Version 6.5, Tripos, St. Louis, USA), RasMol 2.7.2 (Sayle & Milner-White 1995; Bernstein 2000), MOLSCRIPT (Kraulis 1991) und Raster3D (Merritt & Murphy 1994) verwendet.

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Reinigung von Bet v 4

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Strategie etabliert werden, mit der Bet v 4 in Mengen exprimiert und gereinigt werden kann, die zur Strukturaufklärung mit der Methode der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) notwendig sind. Hierzu gehört auch die Markierung des Proteins mit NMR-aktiven Isotopen.

Am Anfang der Arbeit standen die Plasmide pMW175-betv4 von Prof. Dr. Fátima Ferreira (Universität Salzburg) und pGEX-6P-2-betv4 von Dr. Silke Hoffman (Universität Bayreuth) zur Verfügung.

Das Plasmid pMW175-betv4 erlaubt die Expression von Bet v 4 als Nichtfusionsprotein. In früheren Versuchen, die vor Anfertigung dieser Arbeit durchgeführt wurden, war die Reinigung von Bet v 4 ohne Affinitätsfusion nicht gelungen.

Die Expression von Bet v 4 mit aminoterminaler Glutathion-S-Transferase- (GST) Fusion ermöglicht das Plasmid pGEX-6P-2-betv4 (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4).

4.1.1 Expression und Reinigung von Bet v 4 als GST-Fusionsprotein

Das Plasmid pGEX-6P-2-betv4 wurde von Dr. Silke Hoffmann konstruiert. Es erlaubt die Überproduktion von Bet v 4 mit einer aminoterminalen Glutathion-S-Transferase (GST) Fusion. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgt durch Affinitäts-Chromatographie an Glutathion, das an einer Sepharose-Matrix immobilisiert ist (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4). Das GST-Fusionsprotein bindet an die Matrix, während zelluläre *E. coli*-Proteine die Säule passieren. Die Elution erfolgt mit freiem Glutathion, das mit dem gebundenen Glutathion um die GST kompetiert. Nach enzymatischer Spaltung mit der Protease Enterokinase soll reines Bet v 4 durch einen weiteren Affinitäts-Chromatographie-Schritt erhalten werden.

Expressions des Fusionsproteins

Das Plasmid pGEX-6P-2-betv4 wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Positive Transformaten wurden auf Überproduktion des GST-Fusionsproteins untersucht (Kapitel 3.3.2). Hierzu wurden Wachstumskurven aufgezeichnet und Zellysate vor und nach der Induktion der Expression durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abbildung 4.1-1).

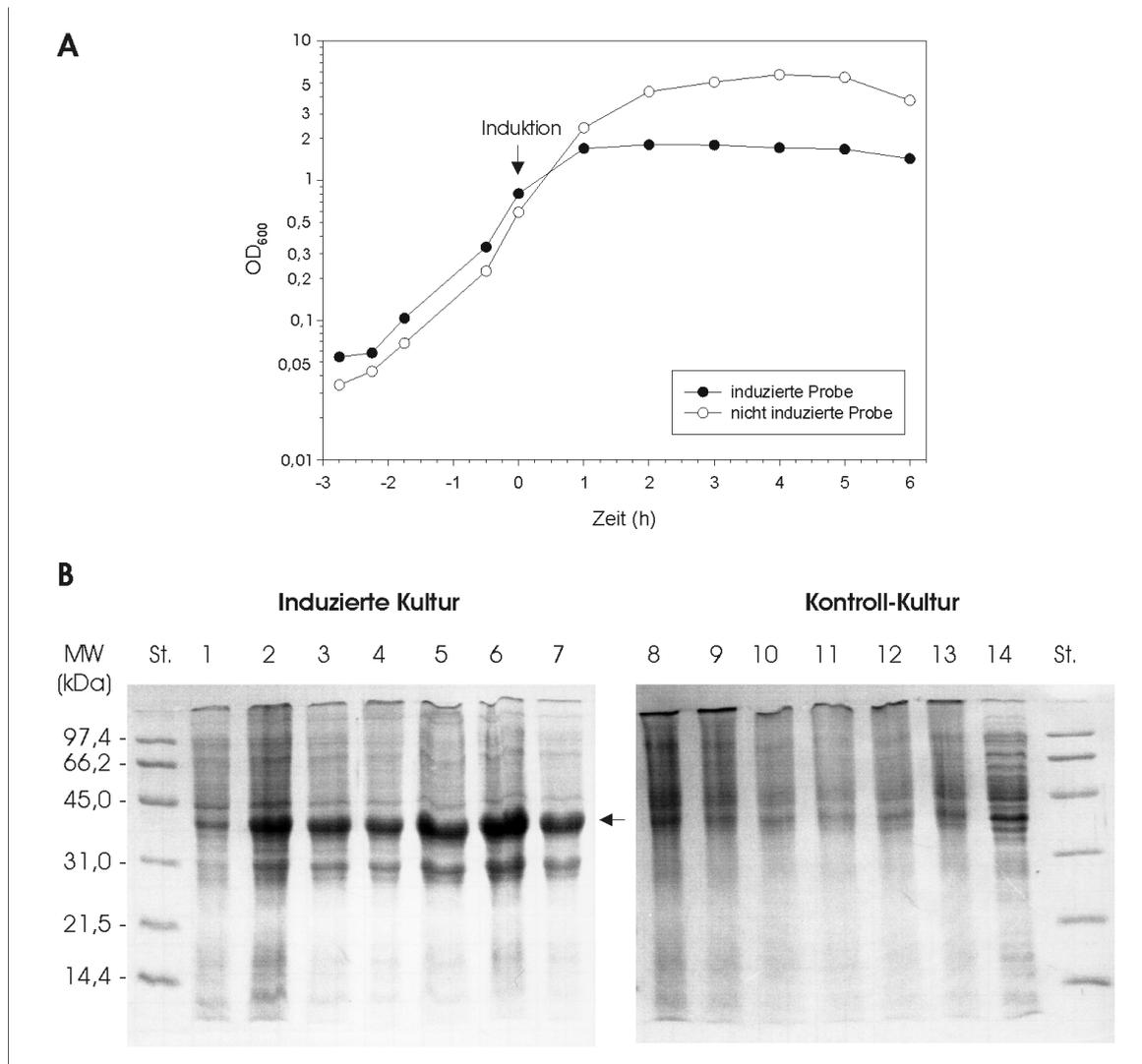


Abbildung 4.1-1 A: Wachstumskurve von *E. coli* BL21/pGEX-6P-2-betv4 einer Testfermentation in 100 ml LB-Selektivmedium. Die Induktion mit 2 mM IPTG erfolgte bei einer Probe zu dem mit einem Pfeil markierten Zeitpunkt bei einer OD_{600} von etwa 0,8. Das Zellwachstum der induzierten Kultur nahm nach der Zugabe von IPTG rasch ab und stagnierte. Zur Kontrolle wurde das Wachstum einer Bakterienkultur ohne Induktion der Expression verfolgt. Die Zelldichte war wesentlich höher als bei der induzierten Kultur.

B: Die Analyse der Expressionsversuche mit *E. coli* BL21/pGEX-6P-2-betv4 erfolgte durch SDS-PAGE mit einem 15 % Gel. In der linken Bildhälfte sind Zellysate der induzierten Probe aufgetragen. Auf Bahn 1 ist das Zellaliquot, das unmittelbar vor der Induktion entnommen wurde, aufgetragen. Die Bahnen 2 – 7 zeigen die Zellysate 1 bis 6 h nach der Induktion in 1 h-Schritten. Nach Induktion mit 2 mM IPTG taucht eine Bande mit einer Laufhöhe von 40 kDa auf, die dem GST-Fusionsprotein entspricht (Pfeil). Unterhalb findet sich eine Bande von 31 kDa, bei der es sich um GST handelt. Von der Kontroll-Kultur wurde zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der induzierten Kultur Proben entnommen (Bahnen 8 – 14). Hier sind keine Banden von Fusionsprotein oder GST zu sehen. St.: BioRad Molekulargewichtsmarker.

Die Wachstumskurve flachte unmittelbar nach der Induktion der Expression des Zielgens rasch ab und erreichte bereits nach einer Stunde ein Plateau bei einer OD_{600} von etwa 2, das heißt die Zelldichte nahm nicht weiter zu. Im Gegensatz dazu wuchs die nicht induzierte Kultur bis zu einer OD_{600} von 5. Die Zelldichte nahm dann aber ab, vermutlich aufgrund verbrauchter Nährstoffe im Medium. Die Analyse des Induktionstests erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese von Zellaliquots, die vor der Induktion sowie im 1 h-Abstand nach der Induktion entnommen wurden. Nach der Induktion der Überexpression des GST-Bet v 4 Fusionsproteins erscheint eine Proteinbande bei 40 kDa, was gut mit dem berechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins übereinstimmt (GST: 31 kDa, Bet v 4: 9 kDa). Diese Bande ist im nicht induzierten Kontrollansatz nicht zu sehen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der 40 kDa-Bande um das Zielprotein handelt. Es macht etwa 80 % des Gesamtproteins aus. Die starke Überexpression ließ eine Fermentation im größeren Maßstab sinnvoll erscheinen. Die Kultivierung wurde jedoch 4 h nach der Induktion beendet, da die Zelldichte einen Plateauwert erreicht hatte und nach 6 h die Bande des Fusionsproteins schwächer wurde.

Reinigung des GST-Fusionsproteins an Sepharose 4B

Der Zellaufschluss erfolgte unter nativen Bedingungen. Es wurde eine enzymatische Lyse der Bakterien durch Lysozym angewandt (Cull & McHenry 1990, Kapitel 3.4.3.2). Der Großteil des Fusionsproteins lag gelöst vor und konnte unmittelbar einer Affinitäts-Chromatographie zugeführt werden (Kapitel 3.4.3.3).

Die Reinigung des Fusionsproteins war mittels eines einzigen Affinitäts-Chromatographie-Schrittes möglich. Die Reinigung erfolgte an 10 ml Sepharose 4B durch *gravity flow*. In Abbildung 4.1–2 ist eine Präparation des GST-Fusionsproteins dokumentiert.

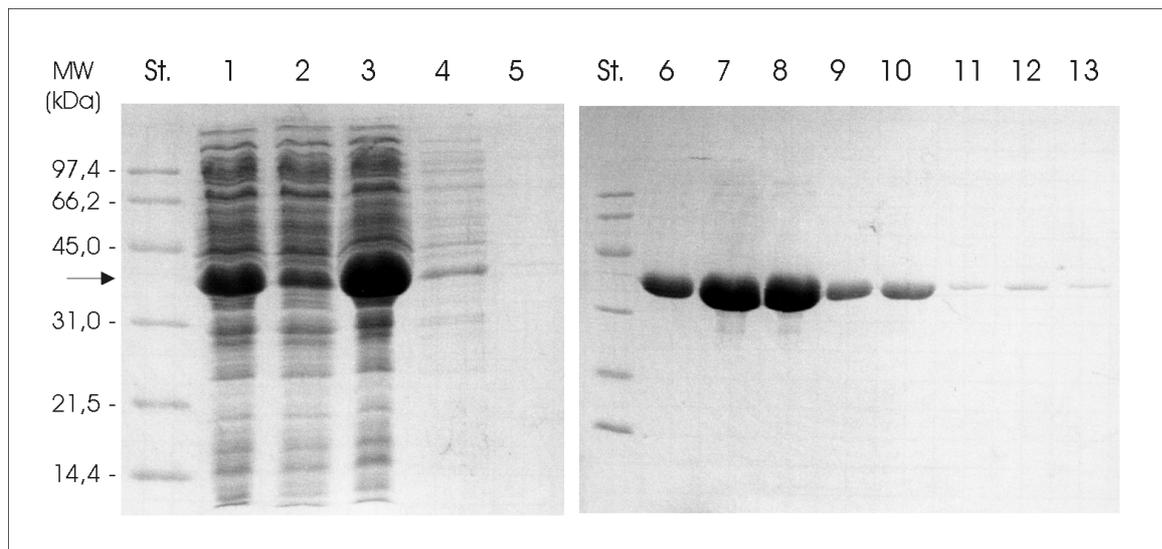


Abbildung 4.1–2: 15 % SDS–PAGE einer Präparation des Bet v 4–GST Fusionsproteins. Bahn 1 zeigt den Protein–Rohextrakt der nach dem nativen Zellaufschluss mit Lysozym erhalten und direkt auf die Säule aufgetragen wurde. Ein Großteil des Proteins wurde von der Matrix gebunden (Bahn 3), ein kleiner Anteil passierte die Säule (Bahn 2). Die Säule wurde in zwei Schritten mit je zwei Bettvolumen Bindungspuffer gewaschen. Auf den Bahnen 5 und 6 sind Waschfraktionen aufgetragen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte in mehreren Schritten mit 10 mM Glutathion. Die Bahnen 6, 8, 10 und 12 zeigen die Eluate, die Bahnen 7, 9, 11 und 13 das nach den Elutionsschritten auf der Säule verbliebene Fusionsprotein.

Nach Aufgabe des Proteinrohextraktes wurde der Großteil des Fusionsproteins an die Säule gebunden. Ein wenig Protein fand sich im Probendurchbruch. Vermutlich war die Bindungskapazität der Säule nicht ausreichend. Durch Waschen wurden zelluläre Proteine von der Säule entfernt. Die Elution des GST–Fusionsproteins erfolgte in mehreren Schritten, bis kein Protein mehr an die Säule gebunden war. Insgesamt konnten 25 – 30 mg Fusionsprotein je Liter Bakterienkultur präpariert werden.

Enzymatische Spaltung des GST–Bet v 4 Fusionsproteins

Fractionen, die das Fusionsprotein enthielten wurden gegen Enterokinase–Spaltpuffer dialysiert, da die Spaltung im Elutionspuffer, in dem das Protein nach der Affinitäts–Chromatographie vorliegt, nicht so effektiv war (Daten nicht gezeigt). Die Spaltung mit Enterokinase erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht, denn eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C brauchte keine Verbesserung der Ausbeute. Es wurde $\frac{1}{100}$ der vom Hersteller angegebenen Menge des Enzyms eingesetzt (Kapitel 3.4.3.4).

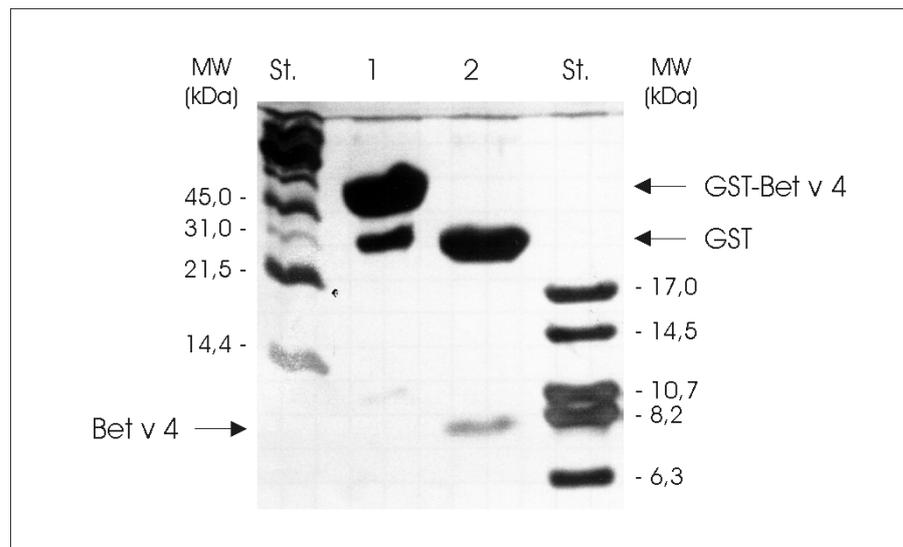


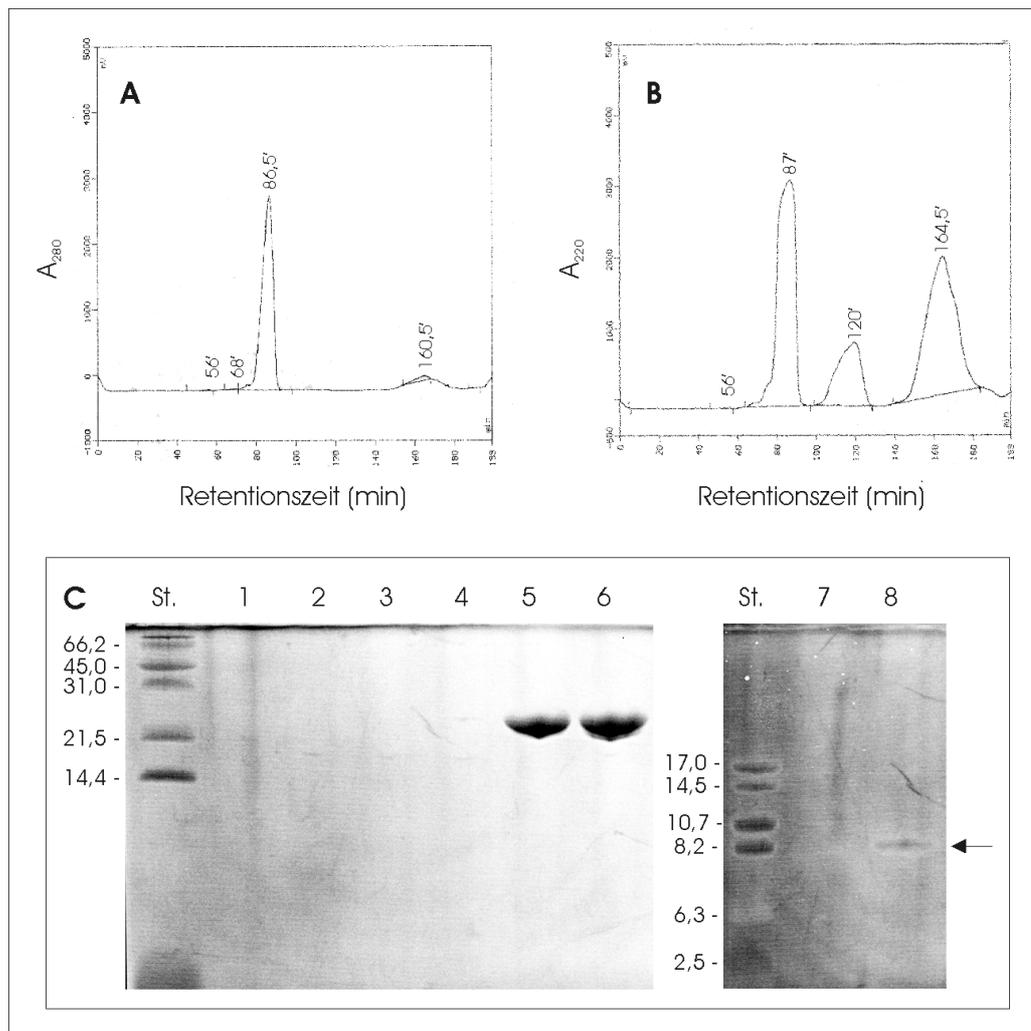
Abbildung 4.1–3: Silber gefärbtes SDS–Gel nach Schägger und von Jagow zur Analyse des Enterokinase–Verdau des GST–Bet v 4 Fusionsproteins. Bahn 1 zeigt ein Eluat aus der Affinitäts–Chromatographie. Es enthält Fusionsprotein und einen geringen Anteil an GST, das bei der Überproduktion als Nebenprodukt gebildet wird. Nach der Spaltung taucht im SDS–Gel eine neue Bande bei 8 – 9 kDa auf (Bahn 2), bei der es sich um Bet v 4 handelt. St.: BioRad bzw. Fluka Molekulargewichts–Standard.

Abschließende Reinigung von Bet v 4 durch präparative Größenausschluss–Chromatographie (SEC)

Durch die zweite Affinitäts–Chromatographie konnte kein reines Bet v 4 erhalten werden, weil sich neben Bet v 4 auch Enterokinase im Probendurchbruch befand. Die Größenunterschiede von GST, Enterokinase und Bet v 4 sind jedoch ausreichend, um eine Trennung durch präparative Größenausschluss–Chromatographie zu erreichen. Die Abbildungen 4.1–4 A und B zeigen die Elutionsprofile eines Säulenlaufs. In Abbildung 4.1–4 C ist die Analyse der Fraktionen mittels SDS–PAGE dokumentiert.

Abbildung 4.1–4 (folgende Seite): Elutionsprofile einer präparativen Größenausschluss–Chromatographie der Bet v 4–Präparation nach dem Enterokinase–Verdau. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 (A) und 220 nm (B). Der Peak bei 86,5 min enthält GST, was durch SDS–PAGE nachgewiesen wurde (C), und vermutlich Enterokinase, die dieselbe molekulare Masse (31 kDa) hat. Bet v 4 verließ die Säule nach 120 min. Bet v 4 absorbiert kein Licht der Wellenlänge 280 nm. Der Peak bei 164 min stammt vom Puffersalz, das ebenfalls nur Licht der Wellenlänge 220 nm absorbiert.

C: Analyse der Fraktionen der präparativen SEC mit SDS–Harnstoff–Gelen. Auf die Bahnen 1 und 2 bzw. 3 und 4 sind Fraktionen aufgetragen, die den Peaks bei 56 und 68 min entsprechen. Die Proteinmengen waren zu gering, um sie durch SDS–PAGE nachzuweisen. Die Bahnen 5 und 6 zeigen Fraktionen aus dem Peak bei 86,5 min. Es handelt sich vermutlich um GST. Das apparente Molekulargewicht ist mit 23 kDa deutlich kleiner als in den anderen Läufen, bei denen kein Harnstoff in den Gelen enthalten war. Die Fraktionen 7 und 8 enthalten reines Bet v 4, das mit einem Pfeil markiert ist. Die Proben wurden Fraktionen entnommen, die vom Peak bei 120 min stammen.



Bet v 4 konnte durch die präparative Größenausschluss-Chromatographie in reiner Form erhalten werden. Bet v 4 hatte bei der SEC eine Retentionszeit von 120 min, was einem Retentionsvolumen von 180 ml entspricht. Das Bettvolumen der Säule beträgt 319 ml. Die Detektion konnte bei 220 nm erfolgen. In diesem Wellenlängenbereich absorbiert das Proteinrückgrat von Bet v 4. Bet v 4 enthält keine Tryptophan- und Tyrosinseitenketten und keine Cystin-Brücken und absorbiert deswegen kein Licht der Wellenlänge 280 nm (Kapitel 4.2.1). Dementsprechend findet sich bei 120 min kein Peak im 280 nm-Chromatogramm. Fraktionen des 120 min-Peaks wurden einer Analyse durch Harnstoff-SDS-PAGE unterzogen. Nur eine Proteinbande mit einer Laufhöhe von etwa 8 kDa wurde detektiert. Es handelt sich um Bet v 4.

GST hat ein größeres Molekulargewicht als Bet v 4 und verlässt die Säule deswegen früher. GST hat die Säule bereits nach 86,5 min passiert, was einem Retentionsvolumen von 130 ml entspricht. Im Harnstoff-Gel lieferte GST eine Proteinbande mit einer Laufhöhe von 23 kDa im Vergleich zu 31 kDa bei SDS-Gelen ohne Harnstoff.

Durch die Expression und Reinigung als GST–Fusionsprotein im *gravity flow*–Verfahren konnten maximal 2 mg Bet v 4 je Liter Bakterienkultur präpariert werden. Dies erschien für die kostenintensive Isotopenmarkierung mit ^{15}N zu wenig und ließ es sinnvoll erscheinen, eine Expression und Reinigung von Bet v 4 mit einem anderen Fusionspartner zu versuchen.

Der Einsatz von Säulen mit besserer Bindungskapazität und eines modereren FPLC–Systems ermöglichte zu einem späteren Zeitpunkt eine Verbesserung der Proteinausbeuten. Eine Präparation von Bet v 4 als GST–Fusionsprotein aus einer Bakterienkultur, die in unmarkiertem Minimalmedium kultiviert worden war, erbrachte 3,5 mg/ml Bakterienkultur.

4.1.2 Präparation von Bet v 4 als His–tag–Fusionsprotein

Die Präparation von Fusionsproteinen mit aminoterminalen Histidin–Anhang hatte sich als erfolgreiche Strategie für die Reinigung von Allergenen etabliert (Boehm 1998, Nerkamp 1999). Deswegen wurde überprüft, ob sich dieses System auch für die Präparation von Bet v 4 eignet.

Dazu wurde das Bet v 4–Gen in den Vektor pET16b kloniert (Kapitel 3.2.3), der eine Expression von Bet v 4 als His–tag–Fusionsprotein mit der T7–RNA–Polymerase erlaubt (Studier und Moffat 1986, Studier *et al.* 1990). Gleichzeitig wurde eine Schnittstelle für die Protease Enterokinase eingeführt, welche die enzymatische Abspaltung des aminoterminalen Fusionsanteils erlaubt. Das erhaltene Plasmid pET16b–betv4 wurde in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert (Kapitel 3.2.15), der eine Koexpression von Bet v 4 und T7–RNA–Polymerase ermöglicht (Kapitel 3.2.1). Die Überproduktion des Fusionsproteins war allerdings nur schwach (Abbildung 4.1–5).

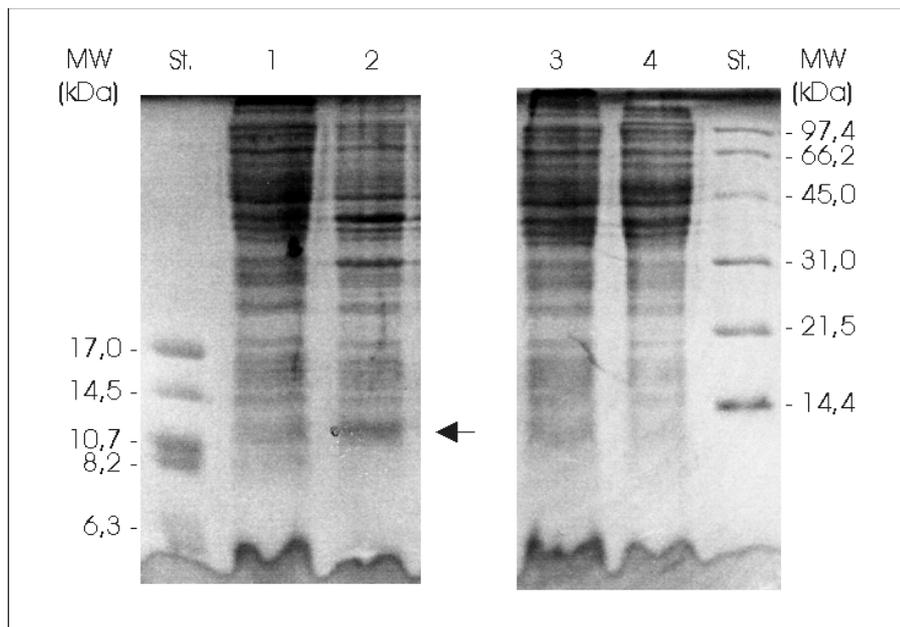


Abbildung 4.1–5: Harnstoff–SDS–Polyacrylamidgel nach Schagger und von Jagow von Zelllysaten der Testfermentation von *E. coli* BL21(DE3)/pET16b–betv4. Rechts und links sind Fluka bzw. BioRad Molekulargewichtsstandards (St.) aufgetragen. Die linke Bildhälfte zeigt die Analyse der induzierten Probe. Auf Bahn 1 ist das Zellaliquot, das unmittelbar vor der Induktion entnommen wurde, aufgetragen. Bahn 2 zeigt das Zelllysate 4 h nach der Induktion. Bei etwa 11 kDa findet sich eine Bande, die deutlich intensiver ist als vor der Induktion (Pfeil). In der rechten Bildhälfte ist die nicht induzierte Kontrollfermentation analysiert worden. Aufgetragen wurden Aliquots, die zu den Zeitpunkten vor (Bahn 3) und nach (Bahn 4) der Zugabe von IPTG der induzierten Bakterienkultur entsprachen.

Trotz der geringen Expression des Bet v 4–Fusionsproteins wurde nach einem nativen Zellaufschluss (Kapitel 3.4.2.2) eine Reinigung über immobilisierte Nickelionen–Affinitäts–Chromatographie (IMAC) durchgeführt (Kapitel 3.4.2.3).

Das Fusionsprotein konnte nicht in reiner Form präpariert werden, weil die Bindung des Fusionsproteins an die Affinitätssäule nicht ausreichend war, um eine Trennung von allen zellulären Proteinen zu erreichen. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die zellulären Proteine bei einer zweiten IMAC wiederum von der Säule gebunden werden, während sich das gespaltene Protein im Probendurchbruch befindet.

Die Spaltung des Histidin–Fusionsanteils erfolgte enzymatisch mit der Protease Enterokinase. Das Fusionsprotein wurde einem Pufferwechsel unterzogen, um ideale Bedingungen für die Enterokinase–Reaktion zu schaffen. Die Spaltung erfolgte für 48 h bei Raumtemperatur (Kapitel 3.4.2.4). Dennoch konnte keine vollständige Spaltung des Fusionsproteins erzielt werden, obwohl die vom Hersteller vorgegebenen Bedingungen eingehalten wurden.

Zur abschließenden Reinigung von Bet v 4 wurde ein weiterer IMAC–Schritt und eine präparative Größenausschluss–Chromatographie durchgeführt.

Die schwache Expression des Fusionsproteins in *E. coli*, die schwache Bindung an die Nickelionen-Säule, die unvollständige enzymatische Spaltung und zwei Chromatographieschritte zur abschließenden Reinigung hatten zur Folge, dass aus einem Liter Bakterienkultur lediglich 0,4 mg reines Bet v 4 präpariert werden konnten. Für NMR-spektroskopische Untersuchungen werden mindestens 5 mg Protein benötigt. Außerdem ist eine Markierung mit NMR-geeigneten Isotopen unumgänglich. Diese erfordert die Verwendung von Minimalmedium mit Glukose bei der Bakterienanzucht, was eine geringere Proteinausbeute erwarten lässt. Deswegen wurde versucht, Bet v 4 durch andere Reinigungsstrategien zu präparieren.

Reinigung von Bet v 4 ohne Fusionspartner

Die Reinigung von Bet v 4 ohne Fusionspartner birgt bei der kostenintensiven Markierung mit NMR-aktiven Isotopen einige Vorteile in sich. Bei der Reinigung von Bet v 4 mit Affinitäts-*tag* wird der Fusionspartner ebenfalls markiert. Gerade bei einem so großen Fusionspartner wie GST ist das von Nachteil. Um die gleiche Ausbeute des Zielproteins wie bei der Reinigung ohne Affinitätsanhang zu erhalten, muss bei 100 %-iger Spaltung das Fusionsprotein in vierfacher Menge produziert werden. Ferner entfallen bei der Präparation von Bet v 4 ohne Fusionsanteil mögliche Ausbeuteminderungen bei der enzymatischen Spaltung des Fusionsproteins. Die Etablierung der Reinigung eines Proteins ohne Affinitäts-*tag* ist meist aufwändiger und schwerer. Unter den zahlreichen bakteriellen Proteinen des Expressionsstammes werden sich fast immer solche finden, die in einer oder mehreren Eigenschaften dem Zielprotein ähnlich sind, z.B. der molekularen Masse oder dem isoelektrischen Punkt.

Es wurden drei verschiedene Präparationen von Bet v 4 versucht:

- Reinigung über eine Anionenaustauscher-Säule
- Reinigung durch Chromatofokussierung
- Hitzepräzipitation zellulärer Proteine.

In allen Fällen wurde Bet v 4 in *E. coli* BL21(DE3)/pMW175-betv4 überproduziert. Der Zellaufschluss erfolgte nach Resuspension der Zellen in Tris- oder Imidazol-Puffer durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C und Wiederauftauen. Das Protein lag gelöst im wässrigen Überstand vor, der durch Zentrifugation von unlöslichen Zelltrümmern getrennt wurde (Kapitel 3.4.4.2).

4.1.3 Reinigung von Bet v 4 durch Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Bindung von Proteinen an einen Anionenaustauscher beruht auf der Wechselwirkung negativ geladener Proteine an positiv geladene funktionelle Gruppen, die über *spacer* an der Säulenmatrix fixiert sind. Bet v 4 ist ein saures Protein mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von 4,77. Bei neutralem und leicht basischem pH-Wert ist das Protein somit negativ geladen (vgl. Kapitel 4.1.4) und wird vom Anionenaustauscher gebunden. Die Elution des Proteins erfolgt über einen Salz-Konzentrationsgradienten, z.B. von NaCl. Die Anionen konkurrieren mit dem Protein um die positiv geladenen Bindungsstellen und bewirken eine Elution der Proteine. Je nach Stärke der Bindung eines Proteins an die Säule erfolgt die Elution bei niedrigerer oder höherer Konzentration des Salzes.

Abbildung 4.1–6 zeigt einen Versuch der Reinigung von Bet v 4 mittels Anionenaustauscher.

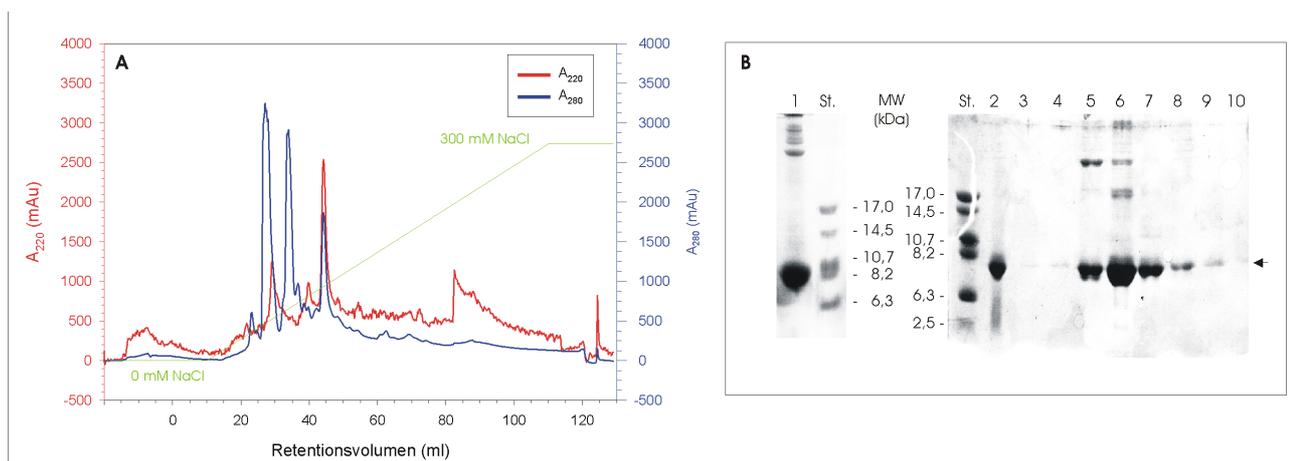


Abbildung 4.1–6: Präparative Anionenaustauscher-Chromatographie von Bet v 4.

A: Elutionsprofil. Ein Protein-Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pMW175-betv4 wurde an einer MonoQ HR 10/10-Säule mit einem Bettvolumen von 10 ml bei pH 8,0 chromatographiert. Nach dem Waschen der Säule mit einem Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, erfolgte die Elution über einen linearen Gradienten von 0 – 300 mM NaCl über 10 Säulenvolumen. Die Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 220 und 280 nm. Aus dem Elutionsprofil konnte nicht entschieden werden, welche Fraktionen Bet v 4 enthielten. Deswegen wurden eine Analyse mittels SDS-PAGE durchgeführt.

B: Schägger-Gel mit Harnstoff zur Analyse der Präparation von Bet v 4 mittels Anionenaustauscher-Chromatographie. Bahn 1 zeigt den Rohextrakt, Bahn 2 den Probendurchbruch, der andeutet, dass die Kapazität der Säule nicht ausreichend war. Auf den Bahnen 3 – 10 sind die Fraktionen mit Retentionsvolumina von 25 – 50 sowie 80 – 90 ml in 5 ml-Schritten aufgetragen. Die Proteinbanden von Bet v 4 sind mit einem Pfeil markiert. St.: Fluka Molekulargewichtsmarker.

Durch Anionenaustauscher-Chromatographie konnte Bet v 4 nicht in ausreichenden Mengen in reiner Form erhalten werden. Bet v 4 wurde bei NaCl-Konzentrationen zwischen 60 und 120 mM NaCl eluiert. Eine Trennung von zellulären Proteinen ist jedoch kaum erfolgt, nur hochmolekulare Bestandteile konnten zum Teil abgetrennt werden. Die Chromatographie bei anderen pH-Werten führte ebenfalls zu keinem nennenswerten Reinigungseffekt (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Reinigung von Bet v 4 durch Chromatofokussierung

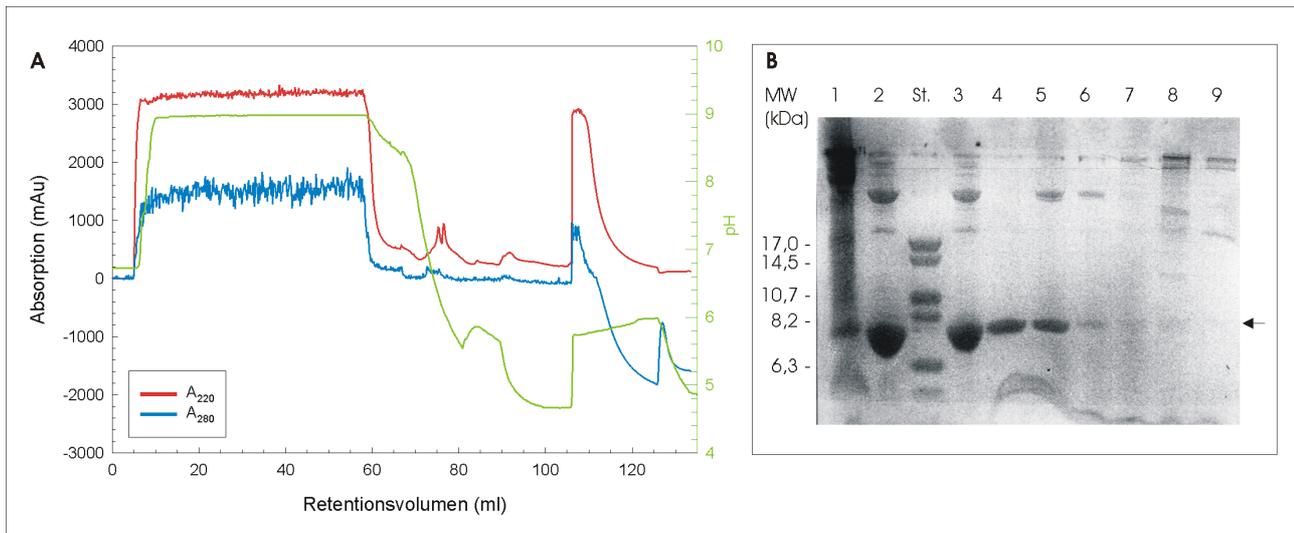
Bei der Chromatofokussierung handelt es sich ebenfalls um eine Anionenaustauscher-Chromatographie (Sluyterman & Wijdenes 1981). Die Elution erfolgt hier jedoch nicht durch einen Salzgradienten, sondern durch einen pH-Gradienten (Vesterberg 1971, Sluyterman & Elgersma 1978). Der Gradient wurde hier intern gebildet: Die Säule wird bei einem hohen pH-Wert äquilibriert. Die Elution des Proteins erfolgt durch einen Puffer mit niedrigem pH-Wert. Ähnlich wie bei der isoelektrischen Fokussierung werden hier Ampholyte verwendet. Die Elution eines Proteins hängt bei der Chromatofokussierung von seinem isoelektrischen Punkt (pI) ab. Bei pH-Werten, die größer sind als der pI, ist ein Protein negativ geladen. Mit sinkendem pH-Wert nimmt die Zahl der negativen Ladungen ab, am isoelektrischen Punkt ist die Zahl der positiven und negativen Ladungen gleich, das Protein hat eine Nettoladung von Null. Mit abnehmender negativer Ladung eines Proteins sinkt die Affinität des Proteins zu den positiv geladenen Gruppen des Anionenaustauschers, bis es schließlich die Säule verlässt.

Zur Chromatofokussierung wurden zwei unterschiedliche Säulen eingesetzt, PBE 94 und MonoP. Die MonoP-Säule zeichnet sich hierbei durch eine bessere Auflösung aus. Der pH-Bereich ist mit 7,1 – 5,0 geringer als bei PBE 94 (7,4 – 4,0), was sich jedoch als ausreichend herausstellte. Exemplarisch ist die Reinigung von ¹⁵N-markiertem Bet v 4 an MonoP gezeigt (Abbildungen 4.1–7 und 4.1–9).

Abbildung 4.1–7 (folgende Seite): Reinigung von Bet v 4 mittels Chromatofokussierung an MonoP.

A: Elutionsprofil der Chromatographie. Ein Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pMW175–betv4 (50 ml) wurde auf eine MonoP HR 5/20-Säule mit einem Bettvolumen von 5 ml aufgetragen (Flussrate 0,5 ml/min) und mit 3 Säulenvolumen (75 ml) BisTris, pH 7,1 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 Säulenvolumen 12,5 % Polybuffer, pH 5,0. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen 1 M NaCl von an der Säule verbliebenem Protein befreit.

B: Harnstoff-SDS-PAGE-Analyse des Säulenlaufs aus (A). Bahn 2 zeigt den Rohextrakt, der auf die Chromatofokussierungs-Säule aufgetragen wurde. Die Bande von Bet v 4 ist mit einem Pfeil markiert. Auf Bahn 1 sind die unlöslichen Bestandteile nach der Zellyse gezeigt. Der Probendurchbruch ist auf Bahn 3 aufgetragen. Die Bindungskapazität der Säule war nicht ausreichend. Neben zellulären Proteinen wurde auch ein großer Teil von Bet v 4 nicht gebunden. Die Bahnen 4 – 9 zeigen Fraktionen der Elution mit Retentionsvolumina von 70, 75, 80, 90, 105 und 110 ml. Bet v 4 eluiert bei pH-Werten zwischen 6,5 und 6.



Bet v 4 verlässt die Säule bei pH-Werten zwischen 6,5 und 6,0. In diesem pH-Bereich hat Bet v 4 aufgrund von deprotonierten Seitenketten eine Ladung von -7 . Durch die zwei Calcium-Ionen beträgt die berechnete Nettoladung eines Bet v 4-Moleküls bei pH 6–6,5 etwa -3 (Abbildung 4.1–8).

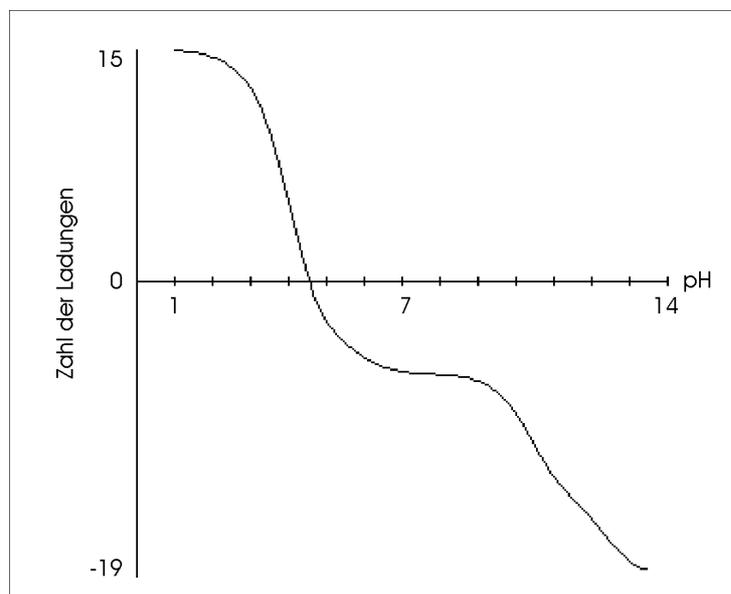


Abbildung 4.1–8: Berechnete Titrationskurve von Bet v 4. Der isoelektrische Punkt, an dem die Nettoladung des Proteins 0 beträgt, liegt bei 4,77. Nicht berücksichtigt sind hierbei die beiden Ca^{2+} -Ionen. Bet v 4 wird in einem pH-Bereich von 6,0 – 6,5 von der Säule eluiert. Die Nettoladung des Apoproteins liegt hier bei -7 , die von Bet v 4/ $(\text{Ca}^{2+})_2$ bei -3 . Die Grafik wurde auf dem Server des Atelier BioInformatique de Marseille (A.B.I.M.) erstellt (www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html).

Es kann jedoch nicht ausreichend reines Protein erhalten werden. Bei pH 6,0 wird ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von 31 kDa eluiert. Der Größenunterschied schien ausreichend, um Bet v 4 durch Größenausschluss-Chromatographie von der Verunreinigung zu trennen.

Zunächst wurde jedoch Polybuffer entfernt, der bei der NMR-Spektroskopie stören würde. Zum einen werden in ^1H -Spektren Proteinsignale durch das Spektrum von Polybuffer überdeckt. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ampholyt-Moleküle mit Bet v 4 interagieren und einen Einfluss auf die Struktur des Proteins ausüben. Polybuffer enthält Ampholyt-ähnliche Moleküle mit einer breiten Variationsbreite von Molekulargewichten. Polybuffer kann somit nicht über Dialyse oder Größenausschluss-Chromatographie abgetrennt werden.

Deswegen wurde Bet v 4 an eine MonoQ-Säule gebunden. Polybuffer bindet nicht an den Anionenaustauscher. Andere Möglichkeiten sind die reversible Proteinpräzipitation mit Ammoniumsulfat oder die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie, bei denen die Proteinverluste aber größer waren als bei der Anionenaustauscher-Chromatographie (Daten nicht gezeigt).

Durch die Chromatographie an MonoQ konnte Bet v 4 nicht von dem 31 kDa-Protein getrennt werden, weswegen abschließend die Größenausschluss-Chromatographie zum Einsatz kam (Abbildung 4.1–9).

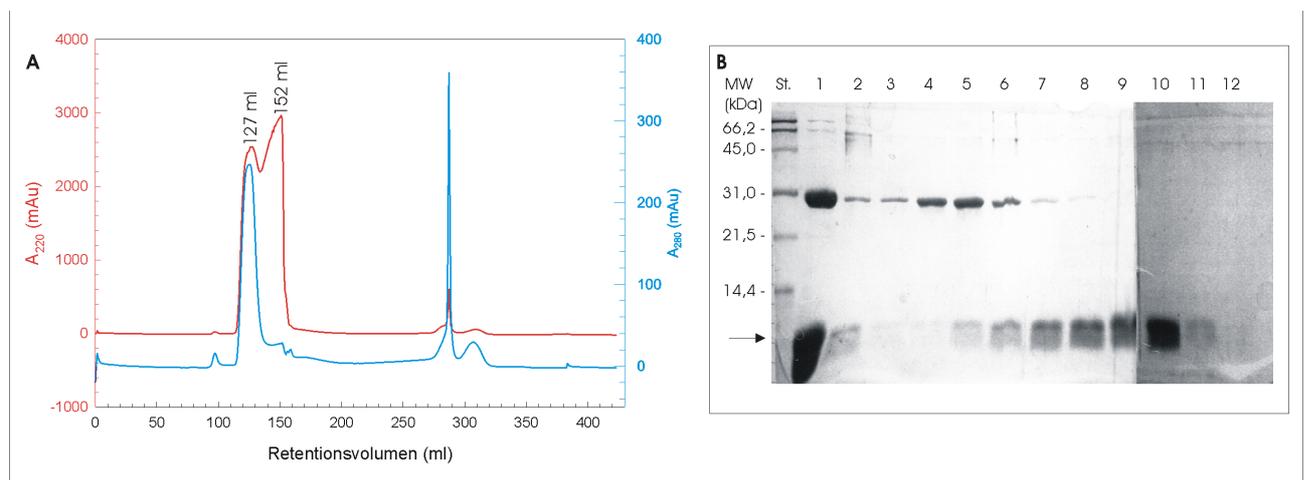


Abbildung 4.1–9: Abschließende Reinigung von chromatofokussiertem Bet v 4 durch Größenausschluss-Chromatographie (Superdex HighLoad 26/60 pg 75, Flussrate 1,5 ml/min). Die SEC diente der Trennung von Bet v 4 von einem 31 kDa-Protein. (A) zeigt das Elutionsprofil des Säulenlaufs, (B) die dazugehörigen SDS-Gele. Bahn 1 (B) zeigt das Proteingemisch vor der SEC, die Bahnen 2–12 zeigen Fraktionen der Elution. Die Verunreinigung verlässt die Säule mit einem Retentionsvolumen von 127 ml (A), was durch SDS-PAGE Analyse nachgewiesen werden konnte (B, Bahnen 2–7). Bet v 4 eluiert bei 152 ml (Bahnen 8–11). Bet v 4 zeigt kaum eine Absorption bei 280 nm. Die Peaks von Bet v 4 und Verunreinigung überlappen jedoch (Bahnen 5–7). St.: Molekulargewichtsmarker.

Durch die Größenausschluss-Chromatographie konnte Bet v 4 in reiner Form erhalten werden. Die beiden Proteine eluieren unmittelbar nacheinander. Das Auflösungsvermögen der Säule war nicht ausreichend, um eine vollständige Trennung zu erreichen. Die Verluste waren jedoch nicht sehr groß. Durch Chromatofokussierung konnten bis zu 8 mg Bet v 4 je Liter Bakterienkultur präpariert werden, abhängig vom Nährmedium und der verwendeten Chromatofokussierungs-Säule. Mit dem ^{15}N -markierten Bet v 4, dessen Reinigung hier gezeigt wurde, wurden die meisten der für die Strukturbestimmung relevanten NMR-Spektren aufgenommen.

4.1.5 Reinigung von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von *E. coli*-Proteinen

Die Aufnahme von Temperaturkurven von Bet v 4 aus der Chromatofokussierungs-Präparation hatte gezeigt, dass es sich um ein thermostabiles Protein handelt (Kapitel 4.2.3). Nachdem diese Eigenschaft bekannt war, sollte Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von zellulären *E. coli*-Proteinen von diesen getrennt werden.

Hierzu wurden Lysate von *E. coli* BL21(DE3)/pMW175-betv4 10 min auf 90 – 95 °C erhitzt (Kapitel 3.4.6.1). Die *E. coli*-Proteine präzipitierten bei dieser Temperatur, während Bet v 4 gelöst blieb. Bet v 4 wurde vom Präzipitat durch Zentrifugation getrennt und durch eine Größenausschluss-Chromatographie (Kapitel 3.4.6.3) von verbliebenen Nährstoffen und Salzen gereinigt (Abbildung 4.1–10).

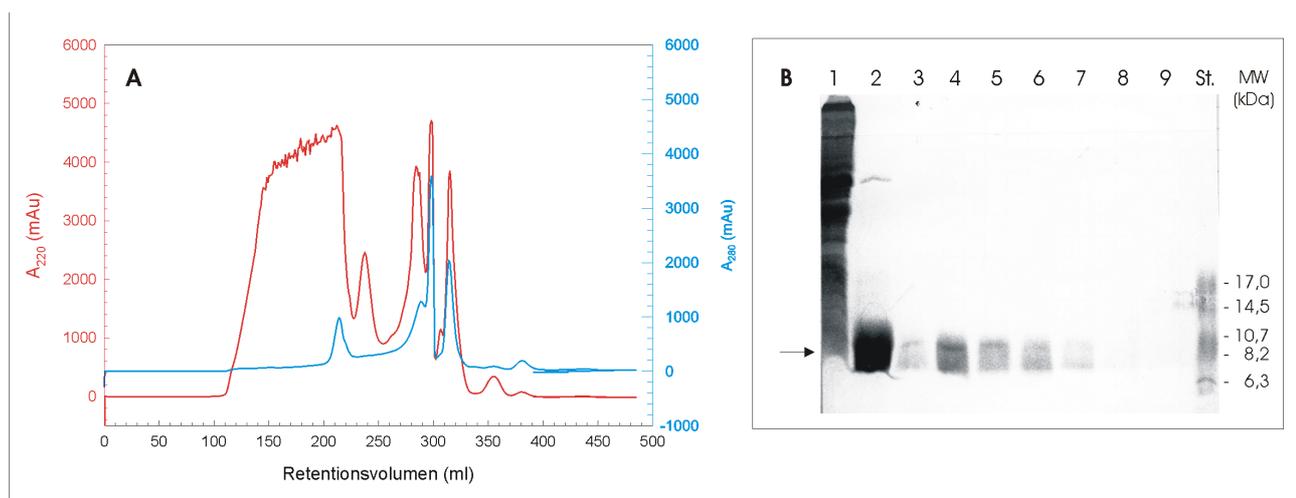


Abbildung 4.1–10: Reinigung von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von *E. coli*-Proteinen. A: Elutionsprofil der SEC; B: 19 % SDS-PAGE-Analyse der Präparation.

Ein Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pMW175-betv4 wurde zum Kochen erhitzt. Präzipitierte Proteine (Bahn 1) wurden durch Zentrifugation vom in Lösung verbliebenen Bet v 4 (Bahn 2) getrennt. Das gelöste Bet v 4 wurde auf eine Superdex HighLoad 26/60 pg 75 aufgetragen und bei einer Flussrate von 1,5 ml/min eluiert. Auf den Bahnen 3 – 9 sind Fraktionen mit Retentionsvolumina von 125, 150, 175 ... 325 ml aufgetragen. Bet v 4 eluiert als breiter Peak von 120–230 ml. Die anderen Peaks stammen von Nährstoffen des Nährmediums oder kleinen Peptiden, die im SDS-Gel nicht sichtbar sind.

Die Präparation von Bet v 4 mittels Kochen eines *E.coli*-Lysats und anschließender SEC ermöglichte Ausbeuten von 20 – 50 mg je Liter Bakterienkultur.

4.1.6 Extraktion von Birkenpollen

Natürliches Bet v 4 (nBet v 4) sollte gewonnen werden, um es mit dem rekombinanten Protein (rBet v 4) zu vergleichen. Hierzu wurden Birkenpollen in wässrigem Puffer extrahiert (Kapitel 3.4.8). Hydratationsversuche zeigen, dass Pollenallergene im Sekunden- bis Minutenbereich aus Pollen herausgelöst werden (Grote *et al.* 1999).

Abbildung 4.1–11 zeigt das Proteinmuster eines Birkenpollenextraktes.

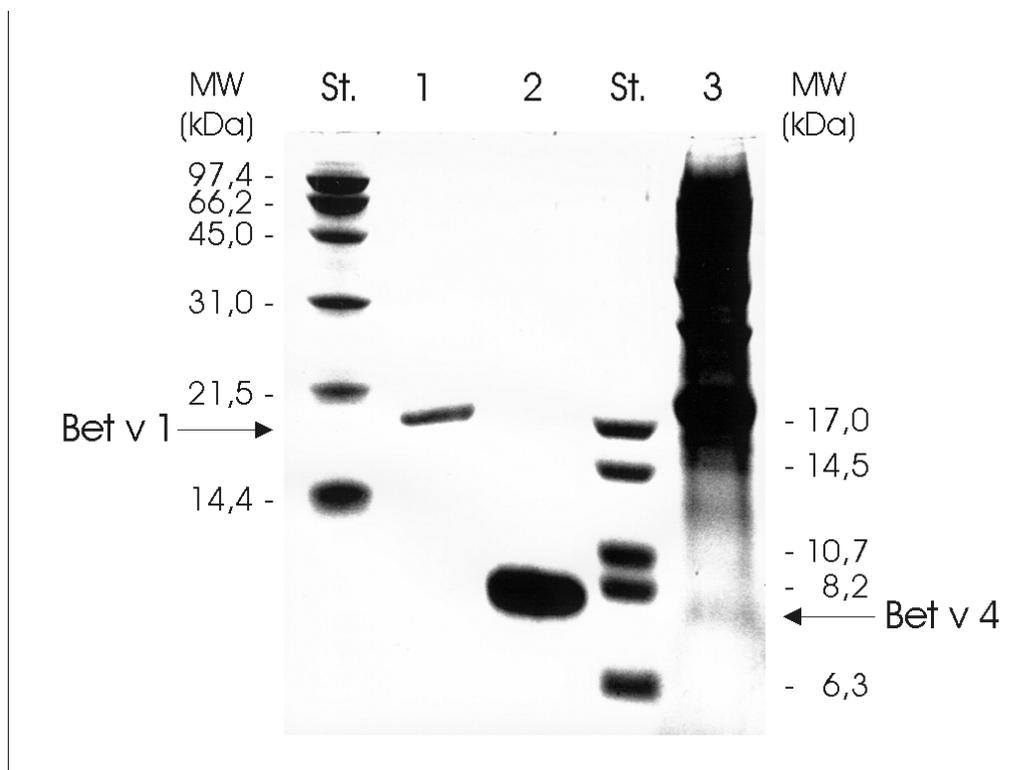


Abbildung 4.1–11: Harnstoff-SDS-Gel nach Schägger und von Jagow. Auf den Bahnen 1 und 2 sind rekombinant hergestelltes Bet v 1 und Bet v 4 aufgetragen. Bahn 3 zeigt das Proteinmuster eines Extraktes aus Birkenpollen. St.: Molekulargewichts-Standard.

Der Birkenpollenextrakt enthält eine intensive Proteinbande bei einer Laufhöhe von 17,5 kDa. Diese Bande stammt vom Hauptallergen der Birke, Bet v 1. Weiter Banden finden sich bei 28 kDa, 32 kDa, 45 kDa und 62 kDa. Bet v 4 ergibt eine vergleichsweise schwache Proteinbande.

Es wurde versucht, nBet v 4 aus Birkenpollen zu reinigen. Der Anteil an nBet v 4 im Birkenpollenextrakt war allerdings zu gering, um das Protein durch etablierte chromatographische Methoden zu isolieren.

Der Extrakt konnte bei der Blauen Nativen Gelelektrophorese eingesetzt werden, um rBet v 4 mit nBet v 4 zu vergleichen (Kapitel 4.3.2).

4.2 Spektroskopische Charakterisierung von Bet v 4

4.2.1 UV-Spektroskopie an Bet v 4

Bet v 4 enthält keine Tryptophan- oder Tyrosinseitenketten oder Disulfid verbrückte Cysteine. Demnach wird nur eine geringe Lichtabsorption bei 250 – 280 nm erwartet. Abbildung 4.2–1 bestätigt diese Vermutung.

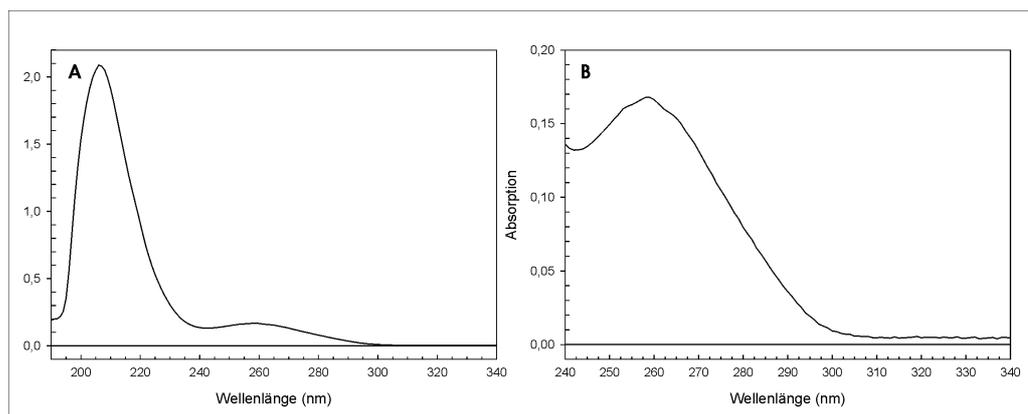


Abbildung 4.2–1: UV-Spektrum einer 100 μ M Bet v 4-Lösung in 5 mM Natriumacetat, pH 6,0. Das Spektrum wurde in einer 1 cm-Quarzküvette aufgenommen und um das Pufferspektrum korrigiert. A zeigt das Spektrum über den gesamten UV-Bereich. In B ist der Bereich, in dem aromatische Seitenketten absorbieren, vergrößert dargestellt.

Im Aromatenbereich (240 – 300 nm) findet sich ein Absorptionsmaximum bei 258 nm, das von den 7 Phenylalaninseitenketten in Bet v 4 hervorgerufen wird (Abbildung 4.2–2; van Holde *et al.* 1998).

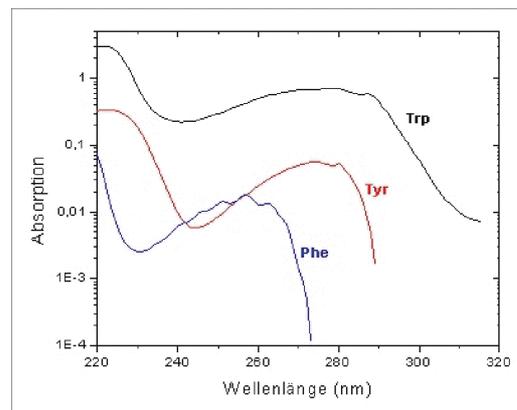


Abbildung 4.2–2: Fern-UV-Spektren der aromatischen Aminosäuren. Tryptophan absorbiert Licht im Bereich von 280 nm. Tyrosin zeigt in diesem Bereich ebenfalls eine Absorption, die aber um den Faktor 10 geringer ist. Phenylalanin absorbiert Licht im fernen UV nur schwach. Das Absorptionsmaximum liegt bei etwa 260 nm.

Die geringe Absorption von ultraviolettem Licht durch aromatische Aminosäuren machte die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration mit einem Bichinolin-Assay notwendig (Kapitel 3.5.6).

4.2.2 Circular dichroismus-Spektroskopie an Bet v 4

Um vergleichende Aussagen über die Sekundärstruktur der Calcium gebundenen und der Apoform von Bet v 4 treffen zu können, wurden CD-Spektren im fernen UV-Bereich aufgenommen (Kapitel 3.5.7).

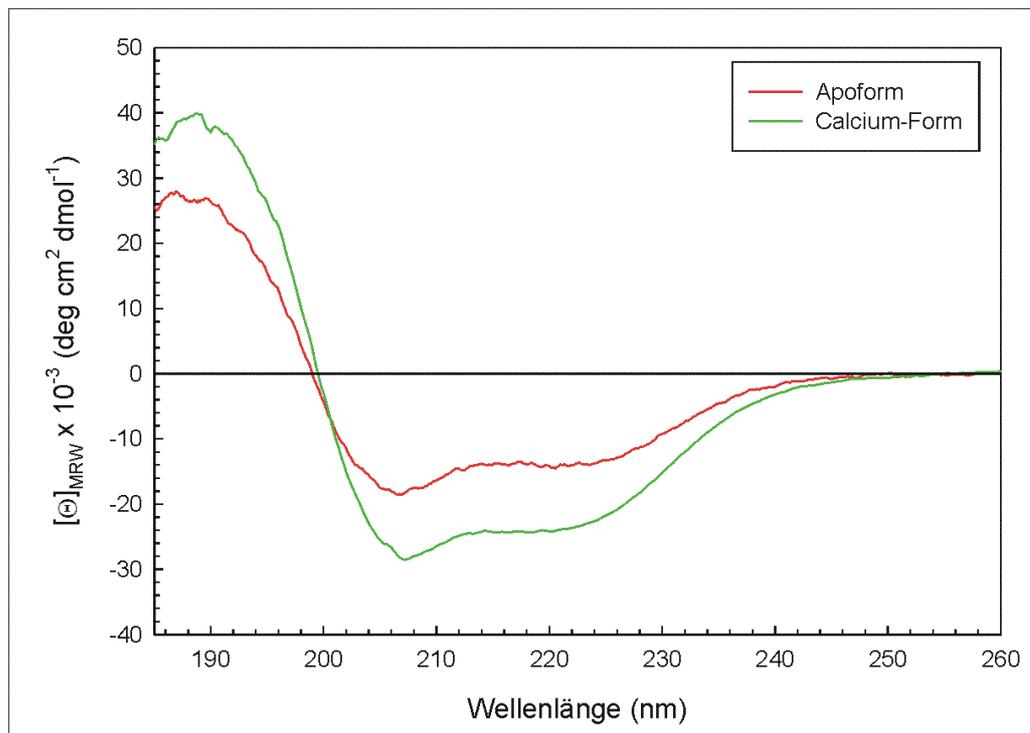


Abbildung 4.2–3: Fern–UV–CD–Spektren der Calcium gebundenen (grün \rightarrow) und der Apoform (rot \rightarrow) von Bet v 4. Die Proben lagen je 1,2 bzw. 1,0 mM in 25 mM CaCl₂ bzw. Wasser (pH 6) vor. Die Spektren wurden bei 22 °C mit einer Schlitzweite von 1 nm und einer Zeitkonstante von 1 s aufgenommen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,01 mm. Je 8 Spektren wurden akkumuliert. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min. Pufferspektren wurden subtrahiert. Der Entzug von Calcium führt zu einer deutlichen Veränderung des CD–Spektrums von Bet v 4.

Das CD–Spektrum der Calcium–Form von Bet v 4 entspricht dem eines typisch α –helikalen Proteins: Es weist Elliptizitätsminima bei 208 und 222 nm auf und hat unterhalb von 195 nm ein stark positives Signal (Woody 1994). Der α –helikale Anteil beträgt nach einer Sekundärstruktur–abschätzung rund 58 %, der Anteil an β –Faltblattsträngen 2,3 %.

Das CD–Spektrum der Apoform sieht im Vergleich sehr ähnlich aus. Die Kurvenform ist nahezu identisch, lediglich die Signalintensität ist vermindert. Zunächst lässt das eine Konzentrationsdifferenz vermuten, zumal sich die Bestimmung der Proteinkonzentration nur mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays möglich war (Kapitel 4.2.1, 3.5.6). Gibt man jedoch zu Apo–Bet v 4 Ca²⁺–Ionen, nimmt die Signalintensität zu, und das CD–Spektrum ist mit dem der Calciumform nahezu identisch (Abbildung 4.2–4). Damit war gezeigt, dass die unterschiedlichen Elliptizitätswerte nicht auf einem Konzentrations– sondern auf einem Stabilitätseffekt beruhen. Die Zugabe von Calcium alleine war jedoch nichtausreichend, Bet v 4 wieder in die Konformation der Calciumform zu überführen. Erst das Erhitzen auf 60 °C (siehe hierzu Kapitel 4.2.3) unter Beisein von Calcium–Ionen ermöglichte den Übergang in die vollständig Calcium gebundene Form. Demnach könnte Apo–Bet v 4 bereits eine intrinsische Tendenz zur Ausbildung einer α –helikalen

Struktur haben, die jedoch erst durch die Zugabe von Calcium stabilisiert wird.

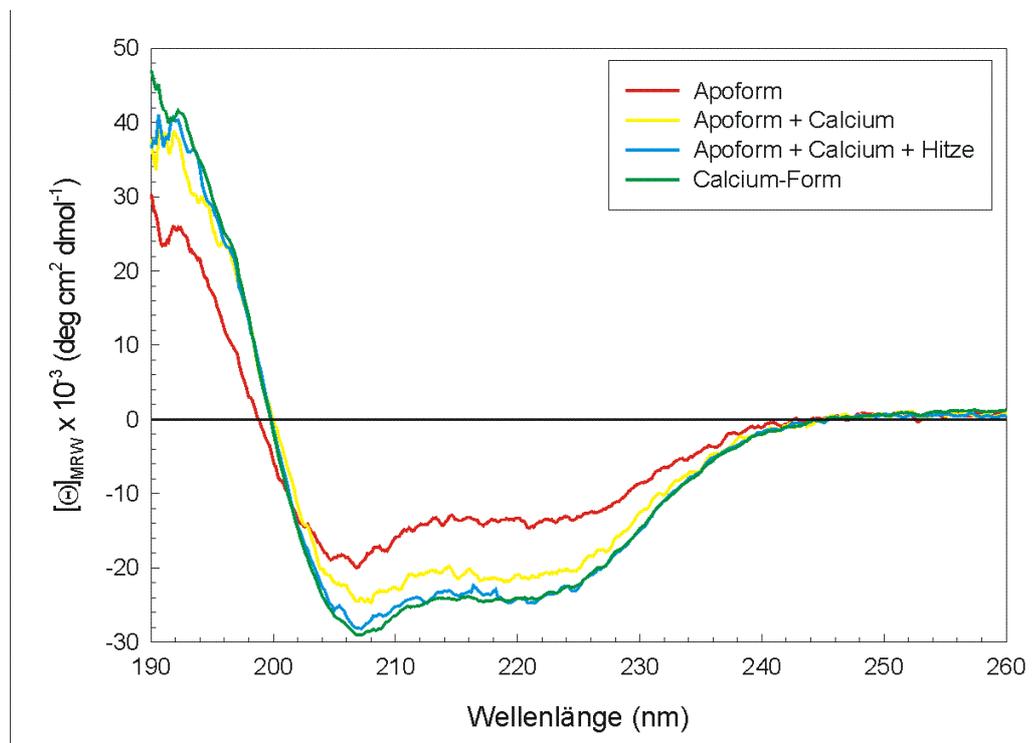


Abbildung 4.2–4: Überprüfung der Reversibilität des Entzugs von Calcium bei Bet v 4.

Zu einer 20 μM Lösung von Apo-Bet v 4 (rot \rightarrow) in 5 mM Natriumacetat, pH 6,0, wurde Calcium zu einer Endkonzentration von 5 mM gegeben. Die Probe wurde 24 h inkubiert und erneut ein CD-Spektrum aufgenommen (gelb \rightarrow). Die Probe wurde anschließend auf 60 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt (blau \rightarrow). Zum Vergleich ist ein Spektrum der Calciumform von Bet v 4 gezeigt (grün \rightarrow). Die Spektren wurden in einer 1 mm-Küvette bei 20 $^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Die Schlitzweite betrug 1 nm, die Zeitkonstante 1 s, die Scangeschwindigkeit lag bei 50 nm/min, 8 Spektren wurden akkumuliert.

4.2.3 Thermische Stabilität von Bet v 4

Zur Untersuchung der thermodynamischen Stabilität von Bet v 4 wurde eine CD-Schmelzkurve aufgenommen (Kapitel 3.5.8). Das CD-Signal wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm zwischen 5 und 100 $^{\circ}\text{C}$ verfolgt. Abbildung 4.2–5 zeigt die Schmelz- und Abkühlkurven von Calcium gebundenem Bet v 4 und der Apoform.

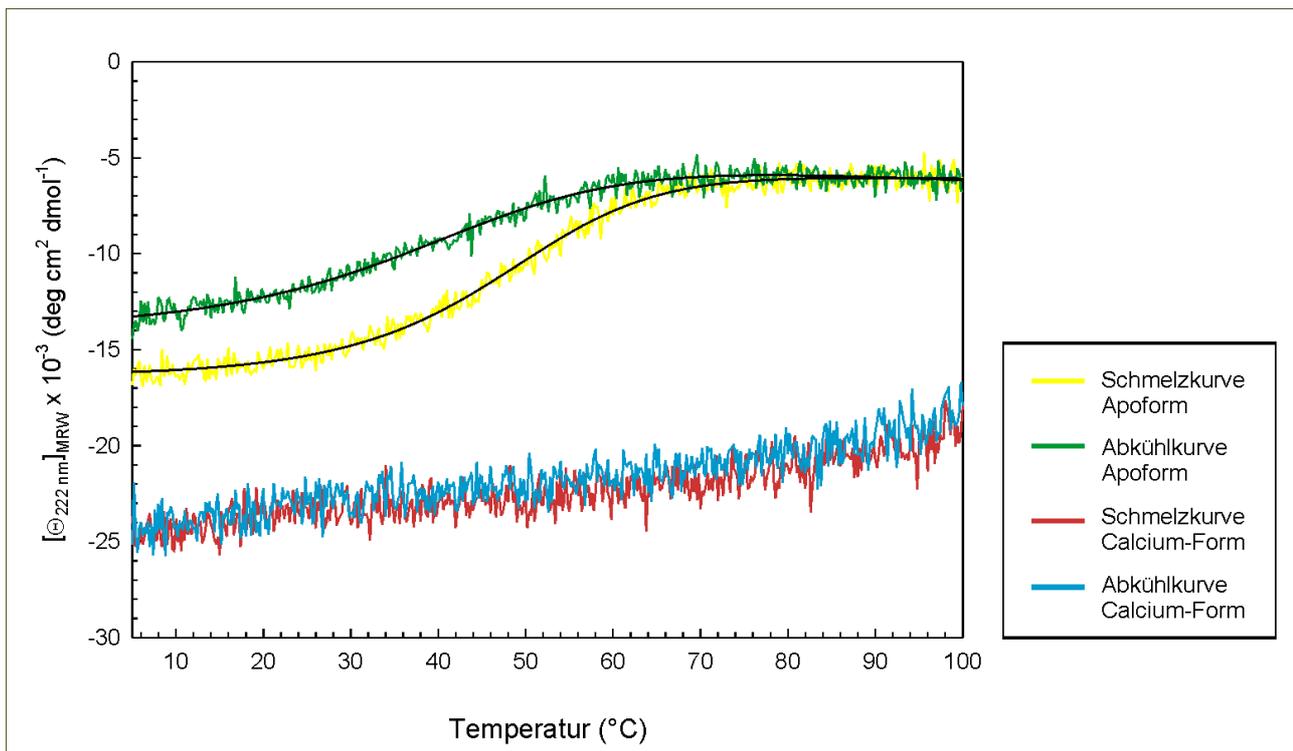


Abbildung 4.2–5: Die Schmelzkurven von je 20 μM Bet v 4 in der Calcium gebundenen und der Calcium freien Form wurden in 5 mM Natriumacetat, pH 6,0 mit 1 mM CaCl_2 bzw. 0,5 mM EGTA anhand der Elliptizität bei 222 nm von 5 bis 100 $^\circ\text{C}$ gemessen. Die Heiz- und Abkühlraten betragen jeweils 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Die Messung erfolgte in einer 1 mm-Küvette. Die gemessene Elliptizität wurde nach Gleichung (3.1) (Schmid, 1989) in die molare Elliptizität umgerechnet.

Die Messdaten der Apoform wurden einer Temperaturfit-Gleichung (Mayr *et al.*, 1993) angeglichen (durchgezogene Linie). Die Mittelpunktstemperatur T_m des thermischen Übergangs der Apoform wurde zu 47,1 $^\circ\text{C}$ bestimmt. Beim Abkühlen liegt die Mittelpunktstemperatur bei 38,8 $^\circ\text{C}$.

Bet v 4 in der Calcium-Form ist ein thermostabiles Protein. Bis zu einer Temperatur von 90 $^\circ\text{C}$ wird kein thermischer Übergang in eine entfaltete Form beobachtet. Die Elliptizität bei 222 nm nimmt beim Erhitzen nahezu linear ab. Beim Abkühlen sinkt die Elliptizität wieder auf den gleichen Wert wie vor dem Aufheizen. Vermutlich schmelzen Sekundärstrukturelemente an ihren Enden bei höherer Temperatur leicht auf, ohne dass die Sekundärstruktur im Ganzen kollabiert. Beim Abkühlen wird wieder der ursprüngliche Zustand erreicht. Diese Beobachtung erlaubte die Präparation von Bet v 4 durch Hitzepräzipitation von *E. coli*-Proteinen (Kapitel 3.4.6).

Ein ganz anderes Verhalten zeigt die Apoform von Bet v 4. Es wird ein kooperativer Übergang der Entfaltung beobachtet, wie er bei Eindomänenproteinen häufig vorkommt. Apo-Bet v 4 hatte eine Mittelpunktstemperatur T_m des thermischen Übergangs von 47,1 $^\circ\text{C}$. Der Übergang ist nicht vollständig reversibel, wie man anhand der Abkühlkurve sehen kann. Die Mittelpunktstemperatur der Rückfaltung liegt bei 38,8 $^\circ\text{C}$. Die Elliptizität erreicht nicht mehr den Ausgangswert vor der Entfaltung, was auf eine unvollständige Rückfaltung oder eine teilweise Präzipitation des Proteins

hindeuten könnte.

Das thermische Verhalten beider Bet v 4-Formen wurde genauer untersucht, indem in 10 °C-Schritten Fern-UV-CD-Spektren gemessen wurden (Abbildung 4.2-6).

Bei der Calcium-Form von Bet v 4 beobachtet man mit zunehmender Temperatur eine kontinuierliche abnehmende der Elliptizität bei 222 nm, die in deutlich schwächerem Maße auch bei 208 nm auftritt. Eine mögliche Interpretation ist die Zunahme unstrukturierter Bereiche z.B. an den Helixpolen. Das CD-Spektrum eines vollständig entfalteten Proteins weist bei 222 nm positive Elliptizitäten auf, während sie bei 208 nm im Bereich von Null sind. Bei der Überlagerung eines α -helikalen Spektrums mit einem *random coil*-Spektrum würde man demnach eine stärkere Intensitätsabnahme bei 222 nm als bei 208 nm erwarten. Zwischen 10 und 90 °C sind jeweils nur kleine Unterschiede in der Abnahme der Elliptizität zu sehen. Einen deutlichen Sprung in der Abnahme der Elliptizität findet man zwischen 90 und 100 °C. Das deutet darauf hin, dass die Calcium-Form von Bet v 4 jenseits von 100 °C schmilzt. Nach dem Abkühlen sind die CD-Spektren identisch mit denen beim Erhitzen der Proteinlösung. Exemplarisch ist das für die Bet v 4-Spektren bei 20 °C gezeigt (Abbildung 4.2-6 C). Es ist anzunehmen, dass die Helices von Bet v 4 beim Erhitzen an den Enden flexibler werden, ohne dass die Sekundärstruktur im ganzen aufgebrochen wird. Möglich ist auch ein erhöhter Ca^{2+} -Austausch mit dem Lösungsmittel bei höherer Temperatur.

Anders sieht es bei Apo-Bet v 4 aus. Zwischen 10 und 30 °C ist ebenfalls nur eine geringe Abnahme der Signalintensität zu beobachten (Abbildung 4.2-6 B). Bei 40, 50 und 60 °C verändert sich die Kurvenform der Spektren hin zu einem Spektrum, das dem eines teilweise entfalteten Proteins entspricht: nur eine geringe negative Elliptizität zwischen 240 und 200 nm und ein nur gering positives oder gar negatives Signal unterhalb von 200 nm. In diesem Temperaturbereich entfaltet Apo-Bet v 4, was in der Schmelzkurve (Abbildung 4.2-5) bereits beobachtet wurde. Zwischen 60 und 100 °C ändern sich die CD-Spektren nicht mehr. Apo-Bet v 4 hat seinen maximalen Entfaltungszustand durch thermische Denaturierung erreicht.

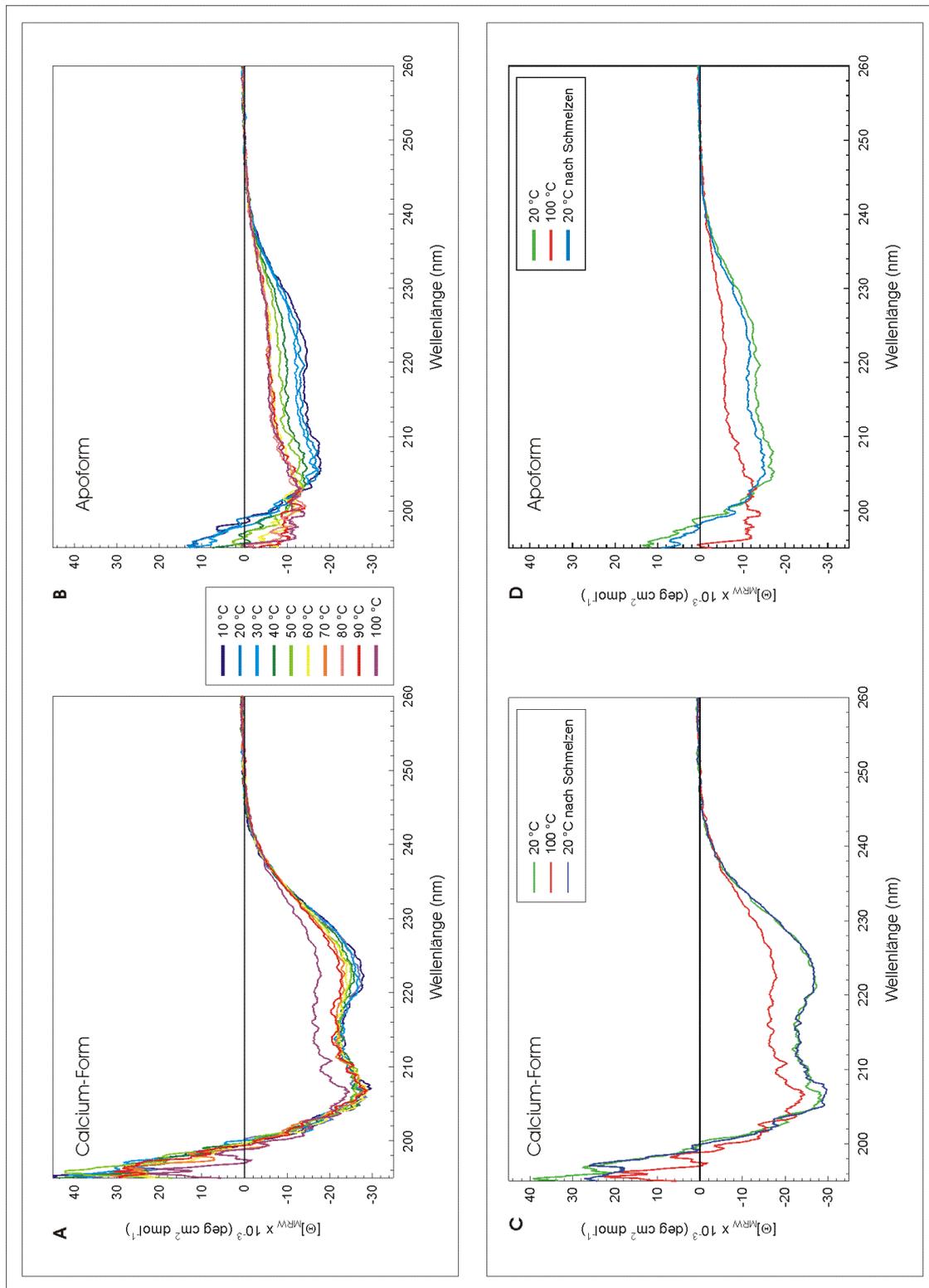


Abbildung 4.2–6: Fern-UV-CD-Spektren von Apo- und Calcium-Bet v 4 in Abhängigkeit von der Temperatur.

A, B: CD-Spektren der Calcium-(A) und Apoform (B) von Bet v 4 von 10 bis 100 °C in 10 °C-Schritten. Die Proteinkonzentrationen betragen 20 μM in 5 mM Natriumacetat, pH 6,0 mit 1 mM CaCl_2 bzw. 0,5 mM EGTA. Die Proben wurden in einer 1 mm-Küvette vermessen. Die Heizrate betrug 1 °C/min. Es wurden jeweils 3 Spektren, die mit 50 nm/min aufgenommen wurden, akkumuliert. Die gemessenen Elliptizitäten wurden nach Gleichung (3.1) in die mittleren molaren Elliptizitäten umgerechnet.

C, D: CD-Spektren von Calcium- und Apo-Bet v 4 bei 20 °C, 100 °C und 20 °C nach dem Erhitzen auf 100 °C. Die Messbedingungen waren dieselben wie in A und B. Die Kühlrate betrug 1 °C/min.

Die thermische Entfaltung der Apoform von Bet v 4 ist nicht vollständig reversibel. Die Schmelz- und die Rückfaltungskurve sind nicht identisch (Abbildung 4.2–5). Ebenso sind die CD-Spektren bei 20 °C vor und nach der Entfaltung nicht übereinander zu legen (Abbildung 4.2–6 D). Der Unterschied liegt jedoch allein in der Signalintensität, die Kurvenform ist hingegen identisch. Das spricht für eine irreversible Präzipitation eines Teils des gelösten Proteins.

4.2.4 ESI-Massenspektrometrie

Mit der ESI (Elektrospray Ionisation) Massenspektrometrie kann zum einen die molekulare Masse von Bet v 4 bestimmt werden. Zum anderen kann die Reinheit der Probe überprüft werden. Abbildung 4.2–7 zeigt das Massenspektrum von Bet v 4.

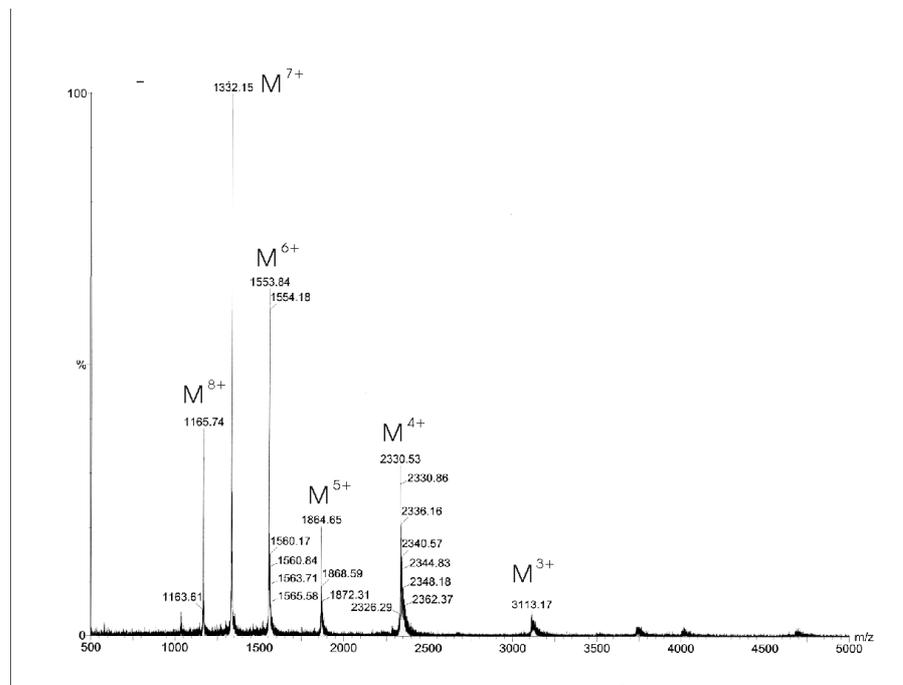


Abbildung 4.2–7: ESI-Massenspektrum von Bet v 4. Eine mit Essigsäure angesäuerte Probe von Calcium-Bet v 4 wurde im positiven Modus vermessen. Die Signale bei 3113,17, 2330,53, 1864,65, 1553,84, 1332,15 und 1165,74 entsprechen den drei-, vier-, fünf-, sechs-, sieben- und achtfach geladenen Molekülonen.

Bei der ESI–Massenspektrometrie wurden sechs Peaks detektiert, die von den drei– bis achtfach geladenen Molekülonen stammen:

Tabelle 4–1: Auswertung der Molekülpeaks aus der ESI–Massenspektrometrie.

| Ladung (z) | Masse (m) | m/z |
|------------|-----------|--------|
| 3+ | 3113,17 | 9339,5 |
| 4+ | 2330,53 | 9322,1 |
| 5+ | 1864,65 | 9323,3 |
| 6+ | 1553,84 | 9323,0 |
| 7+ | 1332,15 | 9325,1 |
| 8+ | 1165,74 | 9325,9 |

Daraus ergibt sich ein Mittelwert der molekularen Masse von $9326,5 \pm 6,5$. Die experimentell bestimmte Masse von Bet v 4 stimmt mit einer Abweichung von 10,2 Da (= 0,1 %) gut mit dem berechneten Wert von 9316,3 Da (Kapitel 1.4.2) überein.

Die Calciumionen gehen bei der Ionisierung verloren und konnten nicht detektiert werden, weswegen bei Apo– und Calciumform die gleichen Massen bestimmt wurden.

Ein Bet v 4–Dimer wurde nur bei einer Messung an Apo–Bet v 4 bei pH 4 beobachtet; das Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar (Irena Matecko, persönliche Mitteilung).

4.3 Experimente zum Oligomerisierungsgrad von Bet v 4

Verdino *et al.* (2001) haben die Struktur eines Bet v 4 homologen Allergens aus Wiesenlischgras (*Phleum pratense*), Phl p 7, mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Phl p 7 ist laut Verdino *et al.* (2001) ein Dimer. Die asymmetrische Einheit enthält ein Monomer. Die EF–Hand–Paarung in Phl p 7 findet über die Dimer–Kontaktfläche statt. In der Aminosäuresequenz von Phl p 7 findet sich ein einzelnes Cystein, das möglicherweise eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einem weiteren Phl p 7–Molekül bilden könnte. Eine Bildung eines stabilen Dimers ist jedoch auch über nichtkovalente Wechselwirkungen möglich. Bislang ist jedoch keine Information über die Dimer–Kontaktfläche in der Proteindatenbank (PDB) zugänglich. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass Bet v 4 dimer vorliegt, auch wenn sich in der Aminosäuresequenz kein Cysteinrest findet. Daher wurden experimentelle Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von Bet v 4 durchgeführt.

Hierzu wurden neben der ESI–Massenspektrometrie folgende Methoden angewendet:

- analytische Gelfiltration
- blaue native Gelelektrophorese
- Bestimmung des hydrodynamischen Radius durch NMR Diffusions–Messungen.

4.3.1 Analytische Größenausschluss–Chromatographie

Neben der Überprüfung der Reinheit des präparierten Bet v 4 kann die analytische Größenausschluss–Chromatographie (SEC) zur Abschätzung des Molekulargewichts eingesetzt werden.

Zur Aufstellung der Eichgeraden wurden die Verteilungskoeffizienten, die den Anteil durch ein Protein besetzbarer Poren angibt, nach folgender Gleichung aus den Retentionsvolumina berechnet:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Gleichung (4–1)}$$

| | |
|----------|-----------------------------|
| K_{AV} | Verteilungskoeffizient |
| V_e | Elutionsvolumen |
| V_0 | Ausschlussvolumen der Säule |
| V_t | Bettvolumen der Säule |

In Abbildung 4.3–1 sind Elutionsprofile von Chromatographien der Eichproteine und Bet v 4 sowie die daraus resultierende Eichgerade zur Kalibrierung der SEC–Säule dargestellt.

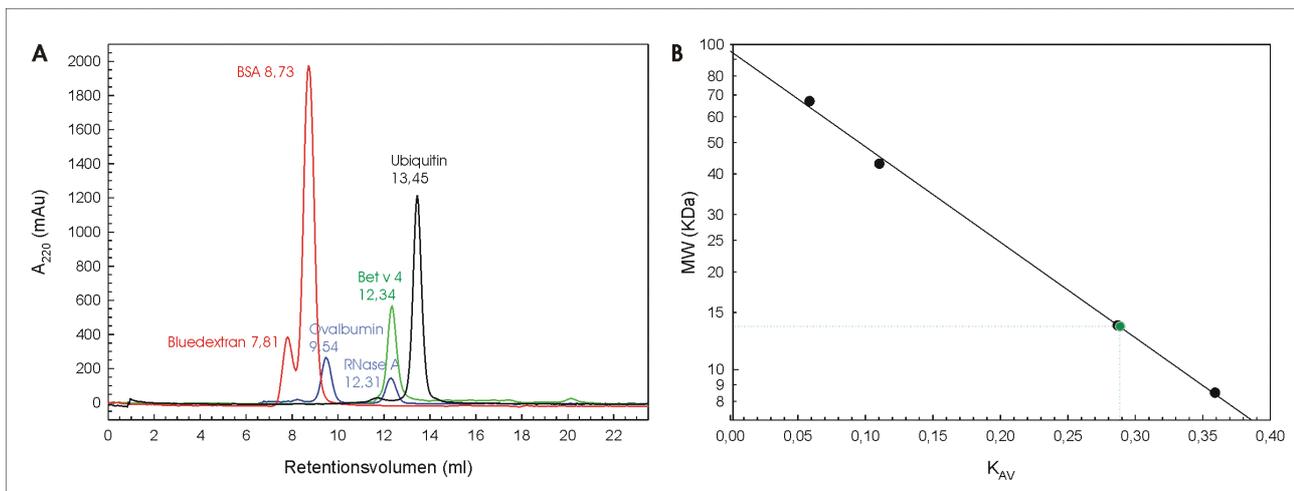


Abbildung 4.3–1: Die analytische Größenausschluss–Chromatographie erfolgte mit einer Superdex 75 HR 10/30–Säule (Amersham Pharmacia Biotech). Als Elutionspuffer diente 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0, dem zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen von Proteinen mit der Gelmatrix 300 mM NaCl zugefügt war.

A: Als Eichsubstanzen dienten Rinderserumalbumin (BSA, 67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), RNase A (13,7 kDa) und Ubiquitin (8,5 kDa). Das Totvolumen der Säule wurde mit Blueextran bestimmt. Neben den Elutionsprofilen der Eichproteine ist ein Säulenlauf mit der Calciumform von Bet v 4 dokumentiert (grüne Linie —). Bet v 4 hatte ein Retentionsvolumen von 12,34 ml.

B: Zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse sind die Verteilungskoeffizienten der Eichproteine gegen ihre molekulare Masse in halblogarithmischer Skalierung aufgetragen. Bet v 4 ist als grün gefüllter Punkt kenntlich gemacht. Aus der Analyse der analytischen Größenausschluss–Chromatographie ergibt sich für Bet v 4 ein apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa.

Für die Eichkurve wurde durch lineare Regression folgende Geradengleichung ermittelt:

$$\log_{10}(\text{MW}) = 1,980 - 2,937 \cdot K_{AV} \quad \text{Gleichung (4.2)}$$

| | |
|----------|------------------------|
| MW | Molekulargewicht |
| K_{AV} | Verteilungskoeffizient |

Daraus ergibt sich für Bet v 4 mit einem Retentionsvolumen von 12,34 ml, bzw. einem Verteilungskoeffizienten von 0,289 ein apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa. Das entspricht dem 1,5–fachen der berechneten molekularen Masse.

Die Bestimmung des Molekulargewichts mit Hilfe der analytischen Größenausschluss–Chromatographie setzt allerdings ähnliche äußere Gestalten der Eichproteine und des zu untersuchenden Proteins voraus. Das beruht darauf, dass das Elutionsvolumen proportional zum Stokes’schen Radius ist und nicht proportional zum Molekulargewicht (Scopes 1994). Deswegen wurden weitere Experimente durchgeführt, um Rückschlüsse auf den Oligomerisierungsgrad von Bet v 4 ziehen zu können.

4.3.2 Blaue native Gelelektrophorese

Mit Hilfe der blauen nativen Gelelektrophorese kann das Molekulargewicht von Proteinkomplexen und damit deren Zusammensetzung abgeschätzt werden oder Proteine auf ihren Oligomerisierungsgrad hin untersucht werden (Schamel & Schamel 2001). Die Trennung aufgrund der Molekülgröße erfolgt hierbei über einen Gradienten der Gelkonzentration (Kapitel 3.5.4).

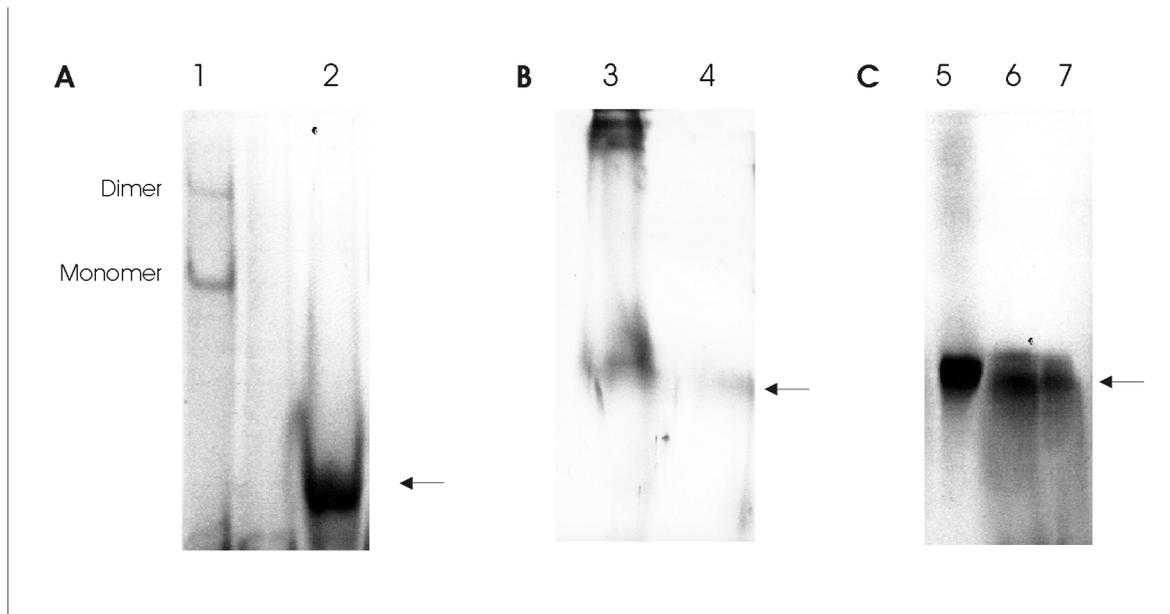


Abbildung 4.3-2: Blaue native Gelelektrophorese an Bet v 4. Die Gele bestanden aus einem Acrylamidgradienten von 5 – 19,7 % (A, C) bzw. 10 – 19,7 % (B). Die Proben wurden mit einem CoomassieBlue G250-haltigen Probenpuffer versetzt und bei konstanter Spannung einer Elektrophorese unterzogen. Die sauren Farbstoffmoleküle lagern sich an das Protein an und verleihen ihm eine negative Oberflächenladung, so dass im elektrischen Feld eine Wanderung zur Anode erfolgt. Die Elektrophorese erfolgte, bis keine Bewegung der Banden mehr beobachtet wurde.

A: Bahn 2 zeigt rekombinantes Bet v 4 aus einer unmarkierten NMR-Probe. Auf Bahn 1 ist zum Vergleich das Sellerieallergen Api g 1.0201, ein 17 kDa-Protein, verfügt über ein Cystein und liegt als Monomer oder Dimer vor.

B: Ein wässriger Extrakt von Birkenpollen ist auf Bahn 3 aufgetragen. Rekombinantes Bet v 4 (Bahn 4) hat dieselbe Laufhöhe wie natives Bet v 4.

C: Die Apoform von Bet v 4 (Bahn 6) liegt wie die Calcium-Form (Bahn 7) als Monomer vor. Als Standardprotein wurde Ubiquitin mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa eingesetzt (Bahn 5).

Die Ergebnisse der blauen nativen Gelelektrophorese (Abbildung 4.3-2) sprechen dafür, dass Bet v 4 in Birkenpollen ein Monomer ist, und rekombinant präpariertes Bet v 4 sowohl in der Calcium als auch in der Apoform ebenfalls monomer vorliegt.

Die Proteinbande des Birkenpollenallergens liegt näher zur Anode als diejenige des Sellerieallergens Api g 1.0201, das eine molekulare Masse von 17 kDa hat, und zum Teil als Dimer mit 34 kDa vorliegt (Abbildung 4.3-2A).

Um natürliches Bet v 4 bei der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, mussten große Mengen an Birkenpollenextrakt eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass ein 5 – 19,7 % Gel hierbei überladen

wurde. Deswegen wurden 10 – 19,7 % Gele eingesetzt (Abbildung 4.3–2 B). Hier verblieben die größeren Pollenproteine an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel, während Bet v 4 in die Gelmatrix eindringen konnte.

Die blaue native Gelelektrophorese gab einen weiteren Hinweis auf die ellipsoide Gestalt von Bet v 4, die das Laufverhalten in der analytischen Gelfiltration beeinflusst hat (Kapitel 4.3.1). Die Proteinbande des Birkenpollenallergens impliziert ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht als das von Ubiquitin mit einer molekularen Masse von 8,5 kDa (Abbildung 4.3–2 C). Möglicherweise vermag Bet v 4 durch seine ellipsoide Gestalt weiter in das engere Maschenwerk des Gels vorzudringen als das globuläre Ubiquitin.

Um auszuschließen, dass konzentrierte Lösungen von Bet v 4, die zur Messung von NMR–Spektren notwendig sind, zu einer Oligomerisierung oder Aggregation des Proteins führen, wurde ein Teil einer NMR–Probe aufgetragen (Abbildung 4.3–2A). Hierbei tritt aber eine Verdünnung der Probe ein, die ein potenzielles Monomer–Dimer–Gleichgewicht auf Seite des Monomers verschieben könnte. Aus CD–Spektren ergaben sich keinerlei Hinweise auf eine konzentrationsabhängige strukturelle Änderung (Daten nicht gezeigt). Zur Verifizierung dieses Befundes wurde der Oligomerisierungsgrad mittels NMR–spektroskopier Methoden untersucht (Kapitel 4.3.3).

4.3.3 Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 über NMR–Diffusionsmessungen

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Bet v 4 wurde das Diffusionsverhalten von Bet v 4 mit dem einer Referenzsubstanz, 1,4–Dioxan, verglichen (Kapitel 3.6.10). Beobachtet wurde die Abnahme des Integrals der NMR–Signale bei steigender Gradientenstärke (Abbildung 4.3–3).

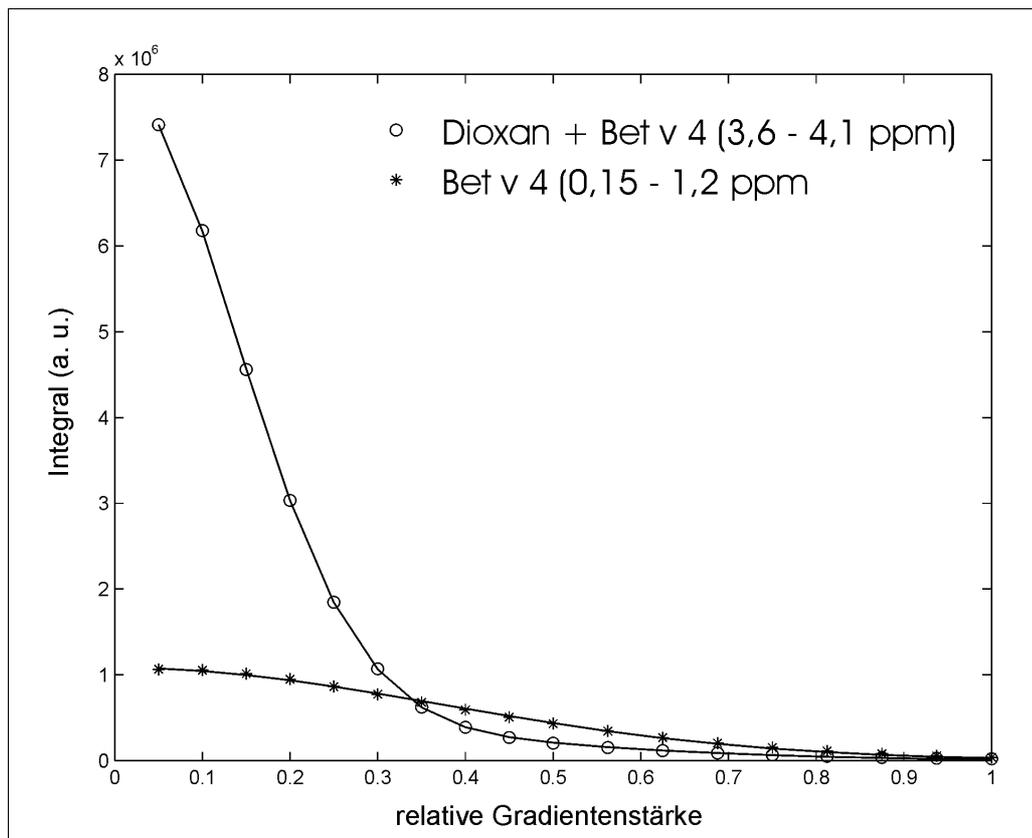


Abbildung 4.3-3: Auswertung der Diffusionsmessungen von Bet v 4 und 1,4-Dioxan. Es wurden 18 ^1H -1D-Spektren einer 1 mM Bet v 4-Probe in D_2O , 20 mM NaOAc pH 6,0, 25 mM CaCl_2 , 1 % (v/v) 1,4-Dioxan bei einer Variation der relativen Gradientenstärke von 5 – 100 % gemessen. Die Experimente wurden jeweils fünfmal wiederholt. Hier ist das erste der 5 Experimente gezeigt. Die Integration der Resonanzsignale erfolgte für Bet v 4 für den Spektrenbereich von 0,15 – 1,2 ppm und für Dioxan von 3,0 – 4,1 ppm, wobei das Dioxansignal um das Proteinsignal korrigiert wurde (Kapitel 3.6.10). Die Datenpunkte wurden schließlich Gauss-Kurven angeglichen.

Die Datenpunkte wurden Gauss-Kurven angeglichen und daraus die Zerfallskonstanten d^{Prot} und d^{Ref} bestimmt [Gleichung (3.4), Kapitel 3.6.10].

Für das Verhältnis $\frac{d^{\text{Ref}}}{d^{\text{Prot}}}$ wurden aus den fünf Datensätzen folgende Werte bestimmt:

7,176

7,173

7,174

7,222

7,248

Daraus ergibt sich ein Mittelwert von 7,198 mit einer Standardabweichung von 0,034.

Nach Gleichung (3.6) ergibt sich somit unter der Annahme eines hydrodynamischen Radius von 2,12 Å für Dioxan (Wilkins 1999) für den hydrodynamischen Radius von Bet 4:

$$R_h^{\text{Bet v 4}} = 7,198 \cdot 2,12 \text{ \AA} = \underline{\underline{15,3 \pm 0,3 \text{ \AA}}}$$

4.4 NMR–Spektroskopie an Bet v 4

Die Struktur von Bet v 4 sollte mittels NMR–Spektroskopie bestimmt werden. Zunächst wurden ^1H – 1D –Spektren aufgenommen, um beurteilen zu können, ob das rekombinant präparierte Protein strukturiert vorlag.

Um eine hochaufgelöste Struktur zu erhalten und für die Durchführung von Dynamik–Messungen (Eisenmann 2001) war eine Markierung mit dem Isotop ^{15}N notwendig, was durch die Expression in Isotopen markiertem Medium möglich war.

4.4.1 ^1H – 1D –Spektren von Bet v 4

Erste Spektren wurden von unmarkiertem Bet v 4 in 25 mM CaCl_2 aufgenommen. Der pH–Wert der NMR–Lösung lag dabei zwischen 6,0 und 6,5. Dieser pH–Bereich ist einerseits niedrig genug, um einen schnellen Austausch der Amidprotonen zu vermeiden, die ansonsten in der NMR–Spektroskopie nicht mehr zu sehen sind. Andererseits ist der pH–Wert nicht zu niedrig, um Carboxylat–Gruppen von Aspartat– und Glutamat–Seitenketten zu protonieren. Bei pH 6,0 – 6,5 ist Bet v 4 etwa 3–fach negativ geladen (Kapitel 4.2.1) und somit in wässrigem Medium löslich. Außerdem entspricht der pH–Bereich in etwa dem physiologischen Milieu. Der pH–Wert eines wässrigen Birkenpollenextrakts liegt bei 5,5 – 6. Bei der Verwendung von Puffersalzen wurde keine Veränderung der Resonanzen in 1D –Spektren beobachtet. Bei der NMR–Spektroskopie an unmarkierten Proben wurde deswegen auf Puffer verzichtet, weil die für die NMR besonders geeigneten Phosphatpuffer mit Calcium einen unlöslichen Niederschlag von Calciumphosphat bilden und womöglich Bet v 4 die Calcium–Ionen entziehen. Andere Puffer wie Tris und Acetat würden in homonuklearen Spektren starke Signale ergeben, die Resonanzen von Bet v 4 überdecken.

Die Qualität der Spektren bei 298 K war so gut, dass auf eine Optimierung der Temperaturbedingungen verzichtet wurde.

Das 1D – ^1H –Spektrum der Calciumform von Bet v 4 (Abbildung 4.4–1) zeigt eine gute Dispersion der Signale über den gesamten spektralen Bereich.

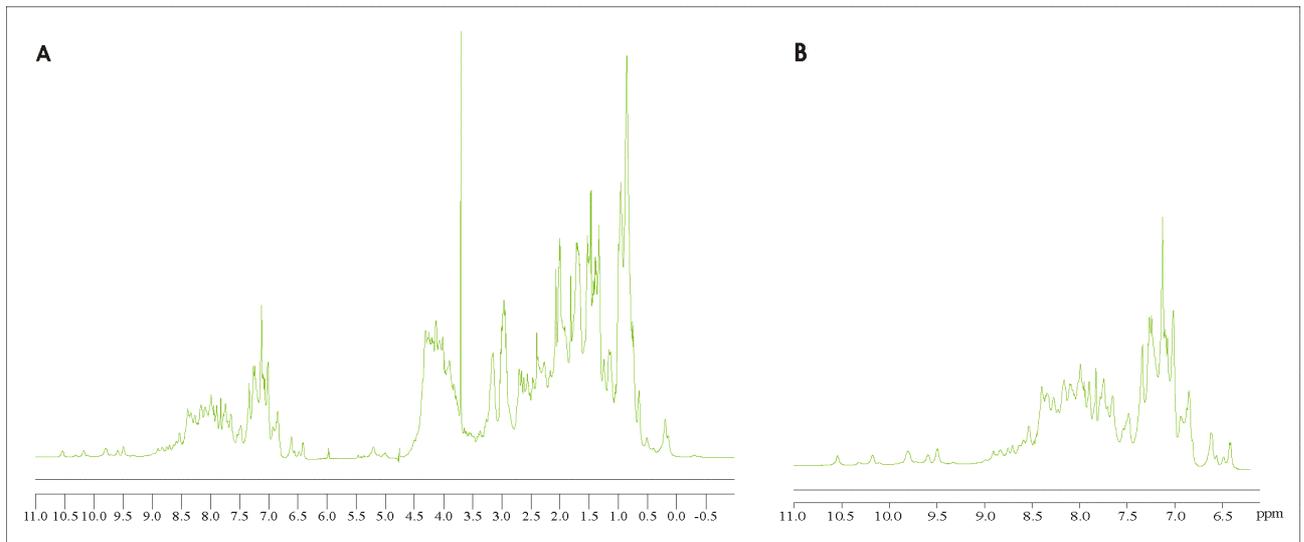


Abbildung 4.4-1: 1D- ^1H -NMR-Spektrum von 1,2 mM Bet v 4 in 25 mM CaCl_2 , pH 6 mit 10 % (v/v) D_2O . A zeigt das gesamte Spektrum. In B ist der Bereich der Amid- und Aromaten-Protonen-Resonanzen vergrößert dargestellt.

Die Resonanzsignale erstrecken sich über einen Bereich von etwa $-0,5$ bis $10,6$ ppm. Bet v 4 hatte eine Dispersion von $4,3$ ppm im Bereich der Amidprotonen ($6,3 - 10,6$ ppm). Die Amidproton-Resonanzen > 10 ppm sind typisch für Glycinreste aus den EF-Händen (Chou *et al.* 2001, Ames *et al.* 2000, Aitio *et al.* 1999). Die C_α -Protonen erscheinen zwischen $3,2$ und $5,2$ ppm. tieffeldverschobene C_α -Protonen lassen das Vorliegen von β -Faltblattsträngen vermuten. Der Großteil der H_α -Resonanzen findet sich jedoch hochfeld von $4,5$ ppm. Das ist typisch für ein α -helikales Protein. Auf den Zusammenhang zwischen *shifts* von C_α -Protonenresonanzen und das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen wird in Kapitel 4.4.5 genauer eingegangen. Der Bereich der Methylprotonen umfasst $-0,5$ bis $1,5$ ppm. Die gute Dispersion der Signale der Methylprotonen rührt von den unterschiedlichen chemischen Umgebungen her und ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer definierten Tertiärstruktur des Proteins.

Vergleicht man die 1D-Spektren der Calcium- und der Apoform von Bet v 4 (Abbildung 4.4-2), fällt das Verschwinden der tieffeldverschobenen Amidproton-Resonanzen beim Calcium freien Protein auf. Die Signaldispersion wird schlechter, v.a. im Bereich der Amid-, Methyl und Aromaten-Protonen.

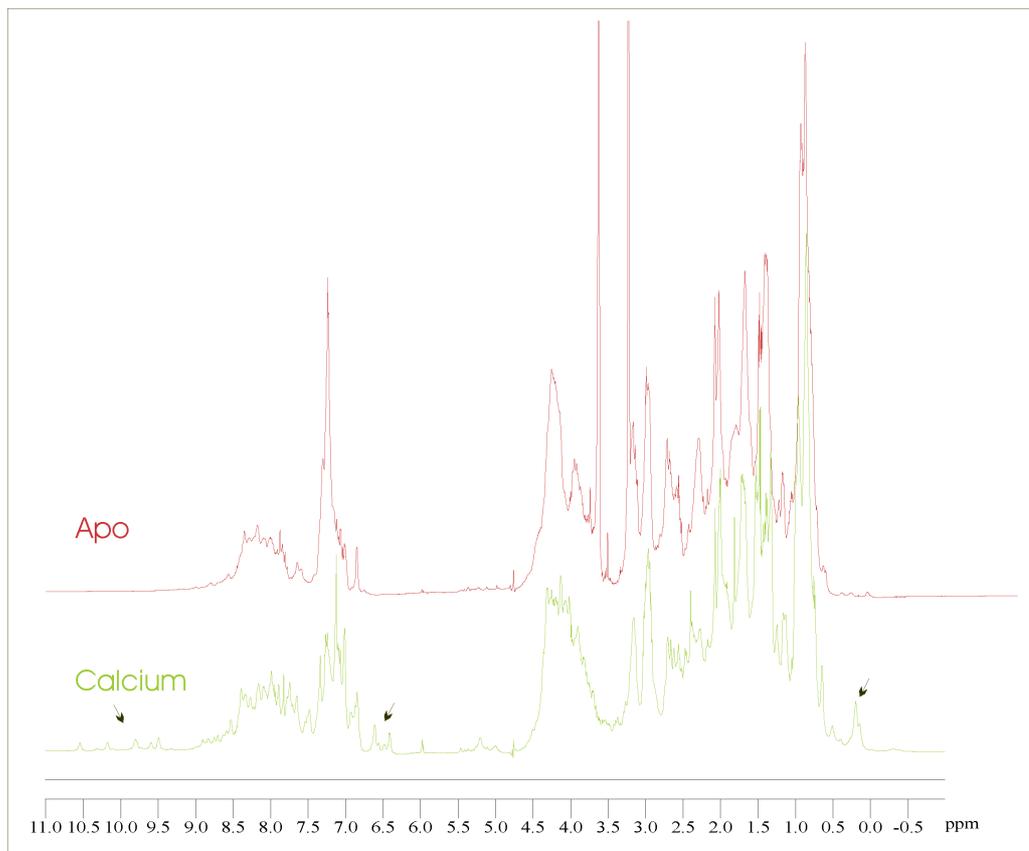


Abbildung 4.4–2: Vergleich der 1D–Spektren von Calcium gebundenem Bet v 4 (1,2 mM in 25 mM CaCl₂, pH 6 mit 10 % (v/v) D₂O) und der Apoform von Bet v 4 (1 mM in H₂O/D₂O im Verhältnis 9:1, pH 6).

4.4.2 Homonukleare 2D–NMR–Spektroskopie

Abbildung 4.4–3 zeigt die sogenannte *fingerprint*–Region aus dem NOESY–Spektrum von Bet v 4, die NOEs zwischen den Amid– und C_α–Protonen zeigt. Im TOCSY–Spektrum (nicht gezeigt) können Spinsysteme identifiziert werden, die mit Hilfe des NOESY–Spektrums sequenziell zugeordnet werden können. Jedoch ließ die Überlagerung der Resonanzsignale eine Zuordnung aus homonuklearen Spektren sehr schwer erscheinen, weswegen das Protein mit ¹⁵N isotopenmarkiert wurde, um heteronukleare 3D–Spektren aufnehmen zu können (Kapitel 4.4.4).

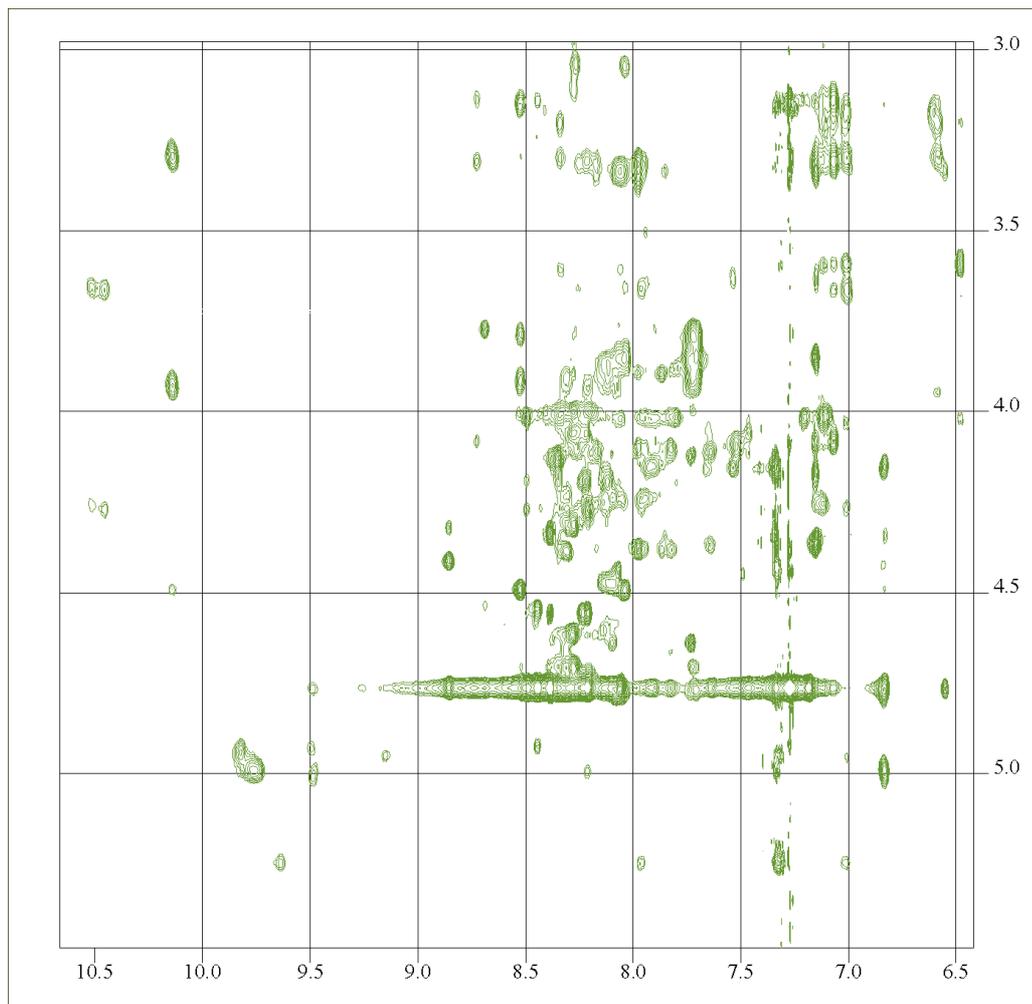


Abbildung 4.4–3: *Fingerprint*–Region des homonuklearen NOESY–Spektrums (Mischzeit 120 ms) von Calcium–Bet v 4 in 25 mM CaCl₂, pH 6, 10 % (v/v) D₂O. Bei 4,76 ppm liegt das Wassersignal.

Dennoch konnte aus den homonuklearen Spektren Strukturinformationen gewonnen werden. Nach der sequenziellen Zuordnung mit Hilfe dreidimensionaler NMR–Spektren wurden aus dem D₂O–NOESY–Spektrum vor allem Faltblatt–typische C_αH–C_αH–NOEs identifiziert (Abbildung 4.4–4).

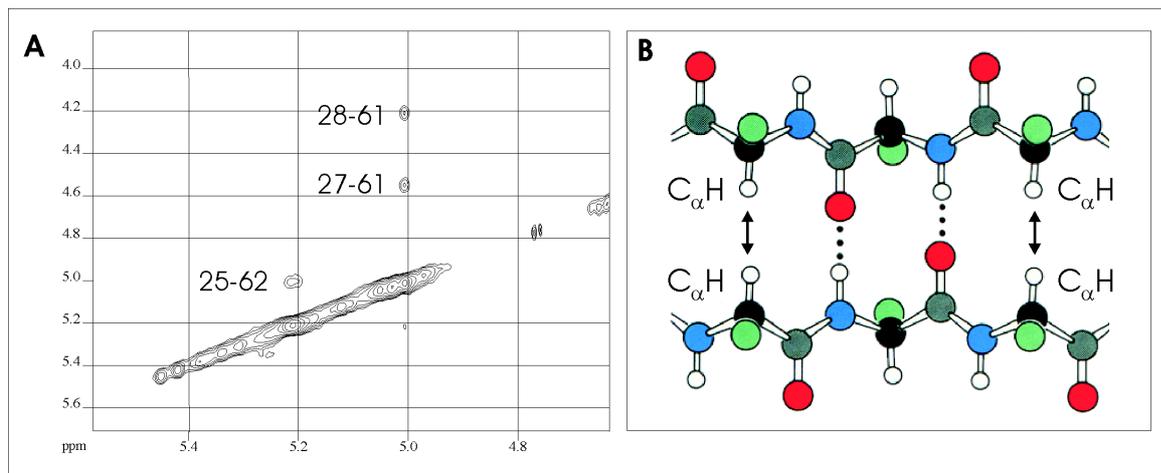


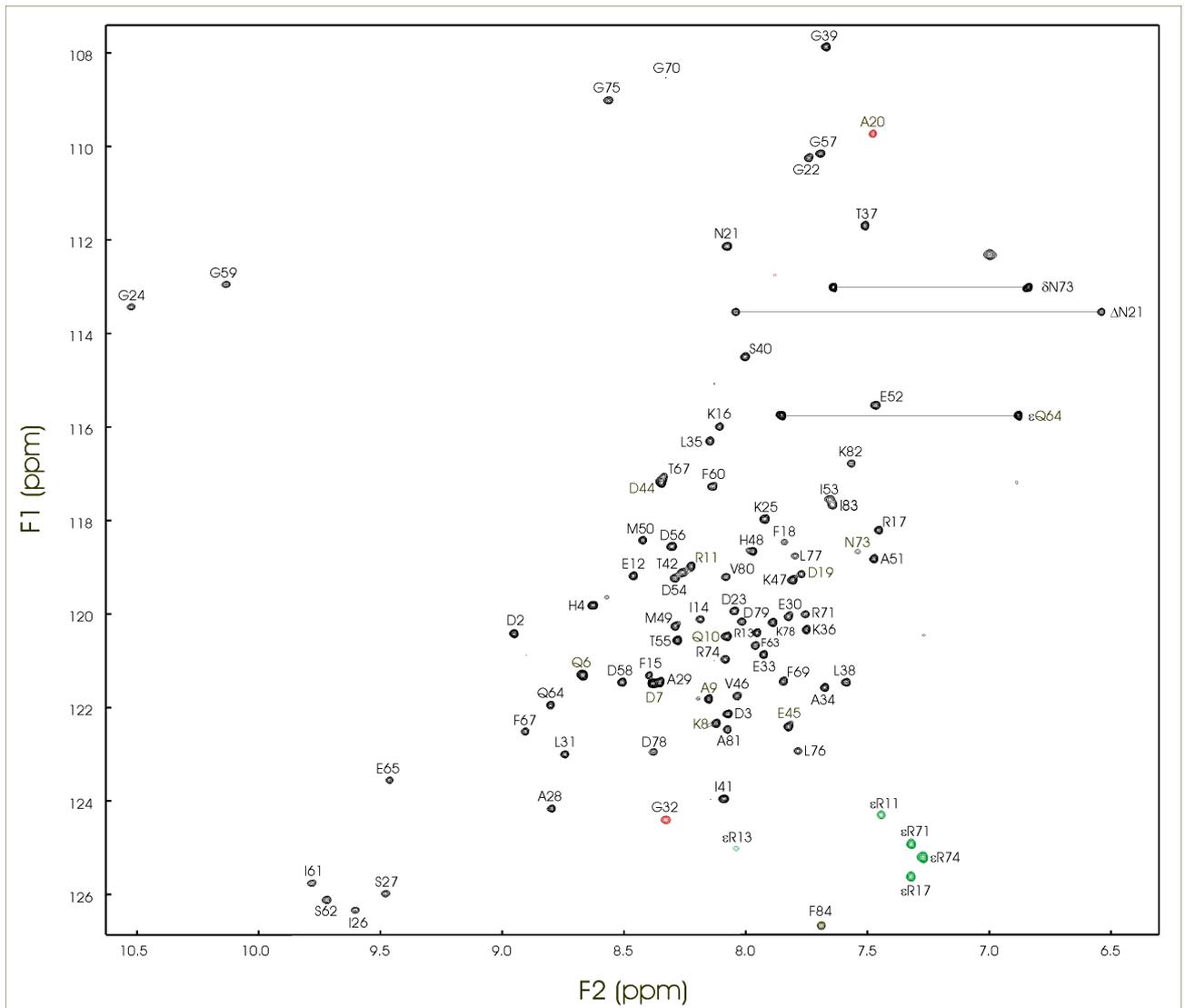
Abbildung 4.4-4 A: Bereich der α -Protonen aus einem homonuklearen NOESY-Spektrum. Vermessen wurde 1,1 mM Bet v 4-Lösung in D_2O , 25 mM $CaCl_2$, 10 mM NaOAc, pH 6,0. Die Mischzeit betrug 120 ms. B: Räumliche Anordnung des Proteinrückgrats in einem antiparallelen β -Faltblatt. Aus dem NOESY-Spektrum (A) konnten Faltblatt-typische $C_\alpha H-C_\alpha H$ -NOEs identifiziert werden.

4.4.3 NMR-Spektroskopie an Isotopen markiertem Bet v 4

$^{15}N, ^1H$ -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem Bet v 4

Im $^{15}N, ^1H$ -HSQC-Spektrum (*heteronuclear single quantum correlated spectroscopy*, Abbildung 4.4-5) sind Signale von Protonen zu sehen, die an einen ^{15}N -Kern gebunden sind. Neben den Amidprotonen des Rückgrats gehören dazu auch die Amidprotonen in den Seitenketten von Asparagin und Glutamin und die Stickstoff-gebundenen Protonen der Guanidinium-Gruppe in Argininresten. Die ϵ -Aminogruppe von Lysin ist hingegen wegen des Austauschs mit dem Lösungsmittel häufig nicht zu sehen.

Abbildung 4.4-5 (folgende Seite): $^{15}N, ^1H$ -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem Bet v 4 (1,2 mM in 25 mM $CaCl_2$, 10 % (v/v) D_2O). Das Spektrum wurde an einem DRX600-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit 16 Scans bei 25 °C aufgenommen. Die Resonanzen stammen von Protonen, die an ^{15}N -Kerne gebunden sind: Amidprotonen des Proteinrückgrats, der Seitenketten von Asparagin und Glutamin und stickstoffgebundene Protonen der Seitenkette von Arginin. Farbige markierte Signale sind entlang der ^{15}N -Dimension (F1) gefaltet (rot: einfach gefaltet, grün: zweifach gefaltet). Die Resonanzsignale sind mit dem Einbuchstabencode und der Sequenzposition der Aminosäure beschriftet, wie sich nach der sequenziellen Zuordnung (Kapitel 4.4.4) ergeben hat.



¹⁵N,¹H–HSQC–Spektrum von Apo–Bet v 4

Mit Hilfe der Circular dichroismus–Spektroskopie wurde bereits nachgewiesen, dass der Entzug von Calcium Einfluss auf die Struktur von Bet v 4 nimmt (Kapitel 4.2.2). Die Auswirkungen auf die Tertiärstruktur wurden bei der Abbildung eines 1D–¹H–NMR–Spektrums bereits erläutert (Abbildung 4.4–2). Die Dispersion der Amidproton–Resonanzen entlang der ¹⁵N–Dimension im HSQC–Spektrum verdeutlicht den Einfluss, den Calcium–Ionen auf die Struktur von Bet v 4 haben (Abbildung 4.4–7).

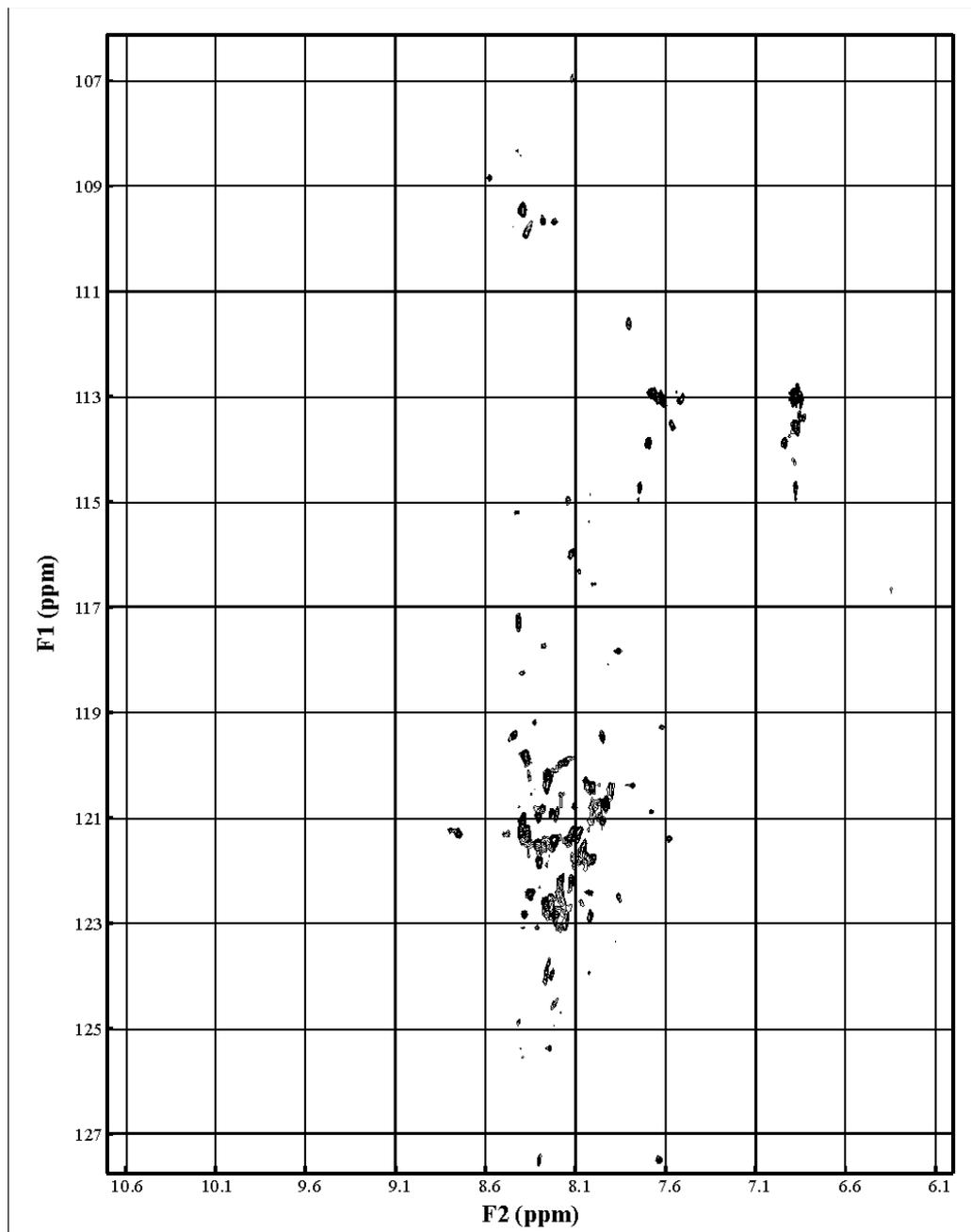


Abbildung 4.4–7: ^1H , ^{15}N HSQC–Spektrum von 1,0 mM Apo–Bet v 4 in 10 mM NaOAc, pH 6,0.

Das Spektrum von Apo–Bet v 4 lässt auf ein Protein mit einer schwach ausgeprägten Tertiärstruktur schließen, weil die Dispersion der Resonanzen im Vergleich zur Calcium–Form sehr schlecht ist. Viele Signale befinden sich im Bereich der *random coil* Verschiebungen, wie sie bei unstrukturierten Proteinen, aber auch bei α –helikalen Proteinen ohne ausgeprägte Tertiärstruktur erwartet wird. Die Heterogenität von Signalintensität und Linienbreiten lassen eine Dynamik des Apo–Bet v 4 erwarten.

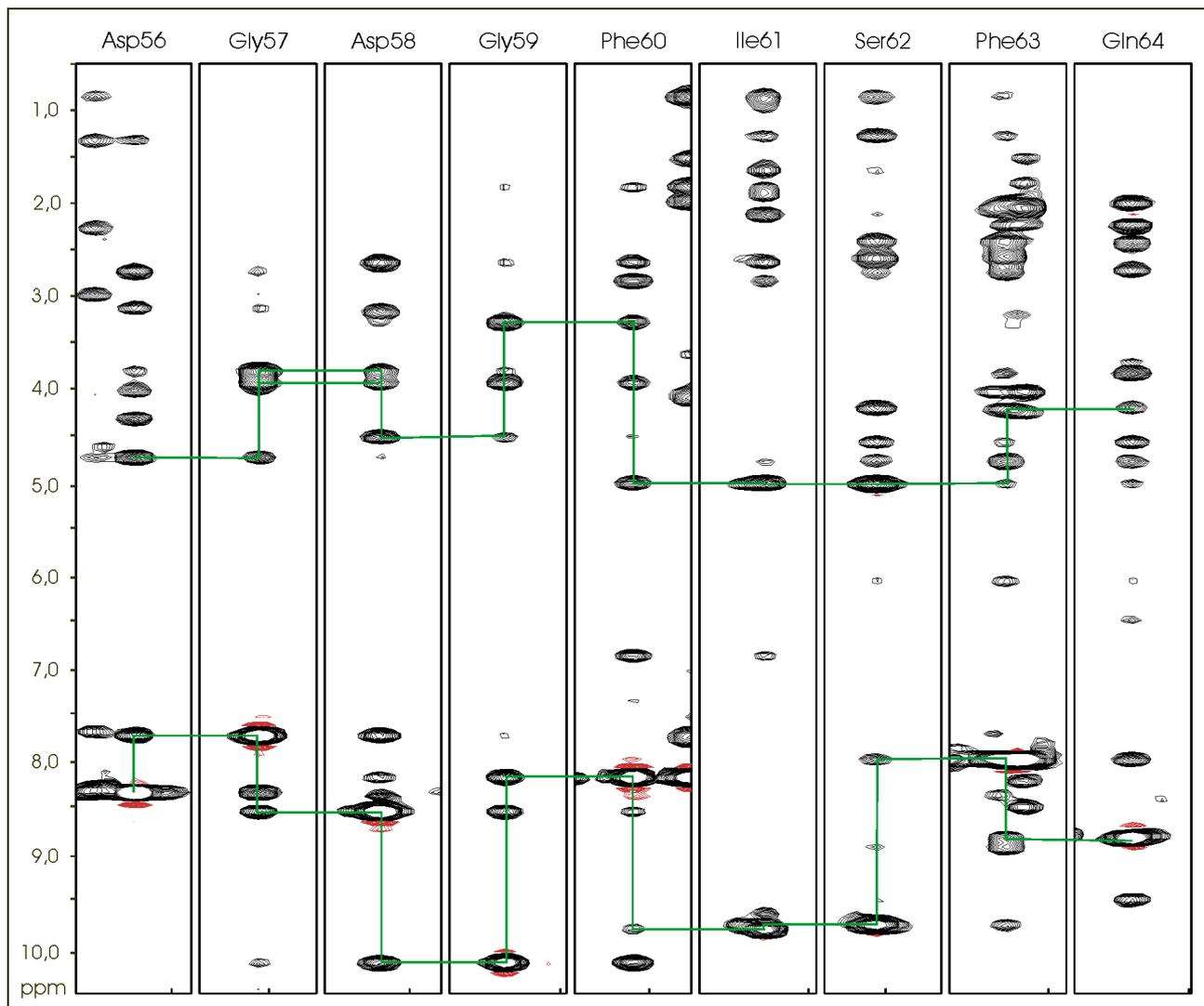
4.4.4 Zuordnung der Resonanzen von Bet v 4

Für die Zuordnung der Resonanzen von Bet v 4 wurden dreidimensionale NMR-Spektren aufgenommen:

- 3D- ^1H , ^{15}N -TOCSY-HSQC
- 3D- ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC
- HNHA
- 3D- ^1H , $^{15}\text{N}/^1\text{H}$, ^{15}N -HMQC-NOESY-HSQC (NNH-NOESY).

Die Spinsysteme der Aminosäuren wurden im TOCSY-Spektrum identifiziert. Das HNHA-Spektrum wurde zur Zuordnung der α -Protonen mit herangezogen. Die Spinsysteme wurden mit Hilfe des NOESY-Spektrums und des NNH-NOESY sequenziell angeordnet. Das sogenannte *chaintracing* (Wüthrich 1986) ist in Abbildung 4.4–8 exemplarisch für die Aminosäurereste 56 – 64 dargestellt.

Abbildung 4.4–8 (folgende Seite): 2D-Schnitte (*stripes*) aus dem ^1H , ^1H , ^{15}N -HSQC-NOESY-Spektrum von Bet v 4. Neben den typischen NOEs deuten auch die chemischen Verschiebungen der C_α -Protonen, die im Vergleich zu *random coil*-Verschiebungen zu tiefem Feld verschoben sind, auf das Vorliegen eines β -Faltblattstrangs hin. Bei α -Helices finden sich mittelstarke bis starke NOEs zwischen sequenziell benachbarten Amidprotonen (Wüthrich 1986). Gezeigt ist das *chain-tracing* zur sequenzspezifischen Zuordnung für die Aminosäuren 56 bis 64. Das NOE-Muster der Reste 60 – 62 deutet auf einen β -Faltblattstrang hin, dem im *chain-tracing* eine α -Helix folgt, was in der endgültigen Struktur bestätigt wurde. Der gezeigte Aminosäureabschnitt ist Teil der carboxyterminalen Calciumbindungsregion. Im Bereich von β -Strängen findet man starke sequenzielle NOEs zwischen C_α - und Amidprotonen.



Mit Ausnahme des aminoterminalen Alanins konnten so alle 81 verbleibenden Amidprotonen des Proteinrückgrats zugeordnet werden. In Tabelle 4-3 sind die chemischen Verschiebungen zusammengestellt.

Tabelle 4–3: Die chemischen Verschiebungen der Protonen und Stickstoffatome von Bet v 4.

| AS | H ¹⁵ N | HN | C _α H | C _β H | C _γ H | andere | SK- ¹⁵ N |
|--------|-------------------|-------|------------------|------------------|------------------|---|---------------------|
| Ala 1 | n.b. | n.b. | n.b. | | | | |
| Asp 2 | 120,45 | 8,95 | 4,32 | 2,43/2,07 | | | |
| Asp 3 | 122,15 | 8,09 | 4,58 | 2,90/2,75 | | | |
| His 4 | 119,83 | 8,61 | 4,98 | 3,31/3,17 | | HD2: 7,22 HE1: 8,37 | |
| Pro 5 | | | 4,58 | n.b. | n.b. | HD*: 3,75 | |
| Gln 6 | 121,31 | 8,68 | 4,64 | n.b. | n.b. | | |
| Asp 7 | 121,46 | 8,37 | 4,58 | 2,59 | | | |
| Lys 8 | 122,36 | 8,13 | 4,00 | 1,94 | 1,49 | HD*: 1,72 | |
| Ala 9 | 121,85 | 8,16 | 4,26 | 1,52 | | | |
| Glu 10 | 120,48 | 8,09 | 4,22 | 2,23/2,17 | 2,38 | | |
| Arg 11 | 118,99 | 8,23 | 4,16 | 2,25/1,96 | 1,63 | HD: 3,07/3,17 HE1: 7,44 | 85,30 |
| Glu 12 | 119,22 | 8,47 | 4,04 | 2,06/2,22 | 2,38 | | |
| Arg 13 | 120,36 | 7,96 | 4,03 | 2,06 | 1,78/1,53 | HD*: 3,31/3,25 HE: 8,04 | 86,02 |
| Ile 14 | 120,09 | 8,19 | 3,56 | 1,93 | 1,15/0,94 | HD1: 0,78 | |
| Phe 15 | 121,33 | 8,37 | 3,19 | 2,89 | | HD: 7,03/7,00 HE: 7,38 HZ:6,63 | |
| Lys 16 | 116,00 | 8,11 | 4,01 | 1,90/1,81 | 1,59 | n.b. | |
| Arg 17 | 118,23 | 7,47 | 4,02 | 1,85 | 1,51 | HD: 3,16/3,08 HE1: 7,32 | 86,14 |
| Phe 18 | 118,44 | 7,82 | 4,22 | 2,87/2,60 | | HD: 7,22 HE: 6,44 | |
| Asp 19 | 119,15 | 7,78 | 4,47 | 2,63 | | | |
| Ala 20 | 105,37 | 7,47 | 4,10 | 1,54 | | | |
| Asn 21 | 112,14 | 8,07 | 4,79 | 3,36/2,95 | | HD2: 8,04/6,54 | 113,54 |
| Gly 22 | 110,24 | 7,74 | 3,88 | | | | |
| Asp 23 | 119,94 | 8,06 | 4,51 | 3,03/2,42 | | | |
| Gly 24 | 113,45 | 10,53 | 4,26/3,64 | | | | |

| AS | H ¹⁵ N | HN | C _α H | C _β H | C _γ H | andere | SK- ¹⁵ N |
|--------|-------------------|------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Lys 25 | 117,99 | 7,93 | 5,21 | 1,57 | 1,12 | HD: 0,96/0,75 HE: 2,28/1,96 | |
| Ile 26 | 126,38 | 9,60 | 4,99 | 1,89 | 1,24/0,97 | HD1: 0,21 | |
| Ser 27 | 125,99 | 9,49 | 4,18 | 4,77 | 5,88 | | |
| Ala 28 | 124,20 | 8,81 | 4,19 | 1,38 | | | |
| Ala 29 | 121,44 | 8,35 | 4,14 | 1,41 | | | |
| Glu 30 | 120,04 | 7,82 | 4,01 | 2,43 | 2,57 | | |
| Leu 31 | 123,00 | 8,73 | 3,87 | 1,98 | 1,40 | HD: 0,81 | |
| Gly 32 | 129,60 | 8,36 | 4,01/3,62 | | | | |
| Glu 33 | 120,84 | 7,96 | 4,02 | 2,07 | 2,43 | | |
| Ala 34 | 121,57 | 7,68 | 4,04 | 0,85 | | | |
| Leu 35 | 116,31 | 8,13 | 4,10 | 1,96/1,84 | 1,57 | HD: 0,88 | |
| Lys 36 | 120,32 | 7,76 | 4,31 | 1,98 | 1,53 | HD: 1,78 | |
| Thr 37 | 111,69 | 7,52 | 4,12 | 4,30 | 1,31 | | |
| Leu 38 | 121,48 | 7,66 | 4,33 | 1,86/1,73 | 1,53 | HD: 0,87/0,95 | |
| Gly 39 | 107,87 | 7,66 | 4,15/ 3,88 | | | | |
| Ser 40 | 114,54 | 8,02 | 4,44 | 3,86 | | | |
| Ile 41 | 123,93 | 8,09 | 4,59 | 1,80 | 1,51/1,26 | HD: 0,83 | |
| Thr 42 | 119,08 | 8,24 | 4,78 | 4,60 | 1,31 | | |
| Pro 43 | | | n.b | n.b. | n.b. | n.b | |
| Asp 44 | 117,18 | 8,34 | 4,37 | 2,55 | | | |
| Glu 45 | 122,38 | 7,82 | 4,14 | 2,01 | 2,38 | | |
| Val 46 | 121,74 | 8,04 | 3,37 | 2,25 | 1,04/0,89 | | |
| Lys 47 | 119,28 | 7,81 | 3,92 | 1,90 | 1,38 | HD: 1,55/1,65 HE: 2,86 | |
| His 48 | 118,65 | 7,98 | 4,42 | 3,34 | | | |
| Met 49 | 120,24 | 8,29 | 4,04 | 2,18/1,87 | 2,65/2,39 | HE: 1,99 | |
| Met 50 | 118,42 | 8,44 | 4,02 | 2,19/1,96 | 2,65/2,51 | HE: 1,86 | |
| Ala 51 | 118,85 | 7,49 | 4,14 | 1,46 | | | |
| Glu 52 | 115,53 | 7,47 | 4,10 | 2,10 | 2,33 | | |
| Ile 53 | 117,53 | 7,66 | 3,80 | 1,32 | 0,84/-0,36 | HD: 0,20 | |
| Asp 54 | 119,25 | 8,29 | 4,73 | 2,97/2,23 | | | |

| AS | H ¹⁵ N | HN | C _α H | C _β H | C _γ H | andere | SK- ¹⁵ N |
|--------|-------------------|-------|------------------|------------------|------------------|--|---------------------|
| Thr 55 | 120,56 | 8,30 | 4,01 | 4,29 | 1,31 | | |
| Asp 56 | 118,60 | 8,31 | 4,69 | 2,74/3,11 | | | |
| Gly 57 | 110,16 | 7,70 | 3,91/3,79 | | | | |
| Asp 58 | 121,46 | 8,52 | 4,51 | 3,14/2,63 | | | |
| Gly 59 | 112,97 | 10,15 | 3,27/3,91 | | | | |
| Phe 60 | 117,27 | 8,15 | 4,99 | 2,83/2,63 | | HD: 6,85/6,86 HE: 7,35 | |
| Ile 61 | 125,78 | 9,78 | 5,00 | 2,10 | 0,92/1,27 | 0,88 | |
| Ser 62 | 126,14 | 9,72 | 4,99 | 4,54/4,19 | | | |
| Phe 63 | 120,67 | 7,97 | 4,21 | 2,75/2,57 | | HD: 6,43/6,45 | |
| Gln 64 | 121,91 | 8,79 | 3,82 | 2,23/1,98 | 2,43 | HE: 7,86/6,89 | 115,75 |
| Glu 65 | 123,58 | 9,46 | 3,69 | 2,68 | n.b. | | |
| Phe 66 | 122,50 | 8,89 | 4,04 | 3,29/3,19 | | HD: 7,02 HE: 6,62/6,64 HZ: 7,38 | |
| Thr 67 | 117,02 | 8,33 | 3,53 | 4,13 | 0,99 | | |
| Asp 68 | 122,98 | 8,37 | 4,35 | 2,71 | | | |
| Phe 69 | 121,46 | 7,85 | 4,34 | 3,35/2,88 | | HD: 7,14 HE: 7,01 | |
| Gly 70 | 108,51 | 8,33 | 3,39 | | | | |
| Arg 71 | 120,00 | 7,74 | 3,99 | 1,75 | 1,52 | HD: 3,14 HE: 7,32 | 85,93 |
| Ala 72 | 120,49 | 7,28 | 4,30 | 1,35 | | | |
| Asn 73 | 118,63 | 7,56 | 4,71 | 2,39/2,00 | | HD: 6,85/7,64 | 112,98 |
| Arg 74 | 120,95 | 8,09 | 4,05 | 1,76 | 1,61 | HD: 3,15 HE: 7,29 | 125,21 |
| Gly 75 | 109,01 | 8,55 | 3,95/ 3,86 | | | | |
| Leu 76 | 122,92 | 7,80 | 4,30 | 1,70 | 1,64 | HD: 0,94 | |
| Leu 77 | 118,81 | 7,80 | 4,16 | 1,67 | n.b. | HD: 0,80 | |
| Lys 78 | 120,17 | 7,89 | 4,09 | 1,87 | 1,48 | HD: 1,67 HE: 2,99 | |
| Asp 79 | 120,15 | 8,03 | 4,58 | 2,87/2,76 | | | |
| Val 80 | 119,13 | 8,08 | 3,96 | 2,32 | 1,10 | | |

| AS | H ¹⁵ N | HN | C _α H | C _β H | C _γ H | andere | SK- ¹⁵ N |
|--------|-------------------|------|------------------|------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| Ala 81 | 122,49 | 8,08 | 4,31 | 1,48 | | | |
| Lys 82 | 116,77 | 7,58 | 4,28 | 1,90/1,74 | 1,48 | HD: 1,60 HE: 3,01 | |
| Ile 83 | 117,66 | 7,65 | 4,21 | 1,80 | 1,12/0,74 | HD1: 0,67 | |
| Phe 84 | 126,65 | 7,70 | 4,53 | 3,19/2,90 | | HD: 7,24 | |

Die chemischen Verschiebungen aller Resonanzen sind relativ zu DSS als externem Standard angegeben (Kapitel 3.6.2). AS bezeichnet den jeweiligen Aminosäurerest, SK steht für Seitenkette.

4.4.5 Analyse der Sekundärstruktur anhand experimenteller Daten

Auswertung der C_αH-Verschiebungen

Die chemischen Verschiebungen der C_α-Protonen können nach Wishart *et al.* (1991, 1992) mit der Sekundärstruktur eines Proteins korreliert werden (Kapitel 3.6.9). Die Differenzen aus den C_αH-Verschiebung von Bet v 4 und den *random coil*-Verschiebungen (Wishart *et al.*, 1995) sind in Abbildung 4.4–9 aufgetragen.

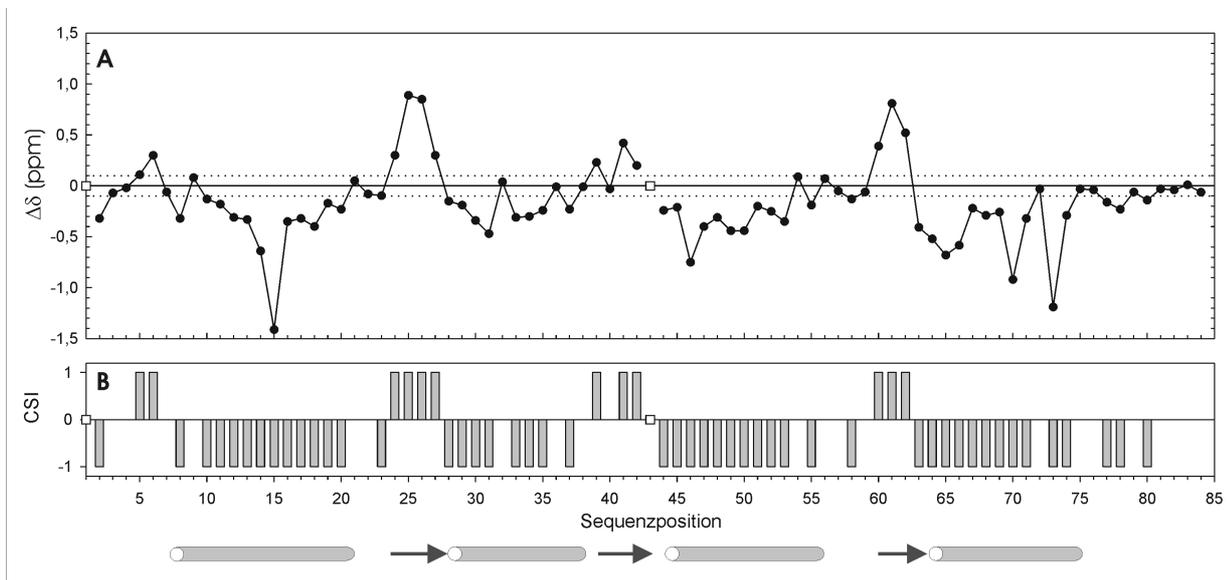


Abbildung 4.4–9 A: Grafische Darstellung der Differenzen der C_αH-Verschiebungen von Bet v 4 und der Verschiebungswerte in einem GGXAGG-Peptid bzw. GGXPGG-Peptid, wenn der Aminosäure X ein Prolin folgt (Wishart *et al.* 1995). Nicht zugordnete C_α-Protonen sind durch weiße Quadrate markiert.

B: *Chemical shift index* (CSI) Diagramm. Zur Zuordnung von α-helikalen und β-Faltblatt-Bereichen wurde allen Differenzwerten, die größer als 0,1 sind, der CSI „+1“ zugeordnet, und allen Differenzen, die kleiner als -0,1 sind, der Wert „-1“ zugewiesen.

C: Vorhersage der Sekundärstruktur von Bet v 4 aus dem CSI-Diagramm. Das Auftreten einer α-Helix (Zylinder) kann angenommen werden, wenn mindestens viermal eine „-1“ aufeinanderfolgt, mindestens aber viermal in fünf Aminosäuren. Für β-Faltblattstränge (Pfeile) muss der CSI „+1“ dreimal hintereinander erscheinen, mindestens jedoch dreimal in fünf Aminosäuren.

Für Bet v 4 werden aus der Analyse der *chemical shift indeces* vier α -Helices (α 1: 8 – 20, α 2: 28 – 37, α 3: 44 – 55, α 4: 63 – 74) und drei β -Faltblattstränge (β 1: 24 – 27, β 2: 39 – 42, β 3: 60 – 62) vorhergesagt.

Auswertung der $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten

Der Zusammenhang zwischen skalarer Kopplungskonstante $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ über drei Bindungen und dem Torsionswinkel Φ des Proteinerückgrats wurde bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben. Die Größe der Kopplungskonstanten wurde durch den Intensitätsvergleich der Amidprotonen- und α -Protonen aus dem HNHA-Spektrum erhalten (Kapitel 3.7.2, Vuister & Bax 1993, Kuboniwa *et al.* 1994). Insgesamt konnten 64 Kopplungskonstanten bestimmt werden. Für die restlichen Aminosäuren waren entweder keine H_{α} -Resonanzen detektiert worden, oder die Signale überlappten zu stark. Die vicinalen Kopplungskonstanten von Bet v 4 sind in Tabelle 4–3 zusammengefasst.

Tabelle 4–3: $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (in Hz) für Bet v 4

| Aminosäure | $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ | Aminosäure | $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ | Aminosäure | $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ |
|------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|
| 2 | 5.64 O | 28 | 3.11 O | 54 | 5.51 O |
| 3 | 5.81 O | 29 | 6.63 | 55 | 4.67 O |
| 4 | 7.87 | 30 | 5.16 O | 56 | 8.37 \Rightarrow |
| 6 | 6.93 | 31 | 4.00 O | 58 | 7.88 |
| 8 | 3.67 O | 33 | 4.42 O | 60 | 9.33 \Rightarrow |
| 9 | 4.01 O | 34 | 5.15 O | 61 | 8.30 \Rightarrow |
| 10 | 4.89 O | 35 | 4.65 O | 62 | 7.26 |
| 11 | 4.37 O | 36 | 3.82 O | 64 | 4.39 O |
| 12 | 4.25 O | 37 | 5.66 O | 65 | 3.24 O |
| 13 | 3.97 O | 38 | 7.01 | 66 | 4.16 O |
| 14 | 5.20 O | 40 | 7.07 | 67 | 4.21 O |
| 15 | 4.77 O | 41 | 8.12 \Rightarrow | 68 | 4.14 O |
| 16 | 4.15 O | 45 | 6.09 | 72 | 7.87 |
| 17 | 5.56 O | 46 | 4.73 O | 73 | 8.96 \Rightarrow |
| 18 | 6.73 | 47 | 3.68 O | 74 | 4.48 O |
| 20 | 2.37 O | 48 | 4.94 O | 76 | 5.22 O |
| 21 | 8.52 \Rightarrow | 50 | 3.50 O | 77 | 7.17 |
| 23 | 8.72 \Rightarrow | 51 | 3.87 O | 78 | 4.90 O |
| 25 | 8.25 \Rightarrow | 52 | 6.47 | 82 | 6.40 |
| 27 | 7.20 | 53 | 5.88 O | 84 | 8.82 \Rightarrow |

Zu Tabelle 4-3 (vorige Seite). Die $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten wurden aus dem HNHA-Spektrum durch Intensitätsvergleich der Amid- und α -Protonenresonanzen erhalten. Die berechneten Werte wurden um den Faktor 1,05 korrigiert. Die Kopplungskonstanten sind mit dem Torsionswinkel Φ des Proteinerückgrats korreliert. $^3J_{\text{HN-H}\alpha} < 6$ Hz (markiert mit O) sind typisch für Aminosäurereste, die in α -Helices eingebunden sind, während in β -Faltblatt-Bereichen typischerweise Kopplungskonstanten > 8 Hz (\Rightarrow) gefunden werden. Kopplungskonstanten zwischen 6 und 8 Hz kommen oft durch zeitliche Mittelung der verschiedenen Konformationen zustande (Cavanagh *et al.* 1996)

Anhand der Kopplungskonstanten werden fünf α -Helices ($\alpha 1$: 8 – 17; $\alpha 2$: 30 – 37; $\alpha 3$: 46 – 55; $\alpha 4$: 64 – 68; $\alpha 5$: 74 – 76) und zwei β -Faltblattstränge ($\beta 1$: 23 – 26; $\beta 2$: 60 – 61) vorhergesagt. Kopplungskonstanten $\leq 6,0$ Hz oder $\geq 8,0$ Hz gingen als Einschränkung der dihedralen Winkel in die Strukturrechnungen ein (Kapitel 3.7.2 und 10.2.3).

Die NOEs

Tabelle 4-4 enthält eine Übersicht über die Anzahl und Klassifizierung der zugeordneten NOEs in Bet v 4.

Tabelle 4-4: Anzahl und Klassifizierung der zugeordneten NOEs.

| Art der NOEs | |
|--|-----|
| gesamt | 737 |
| intraresidual $ i-j = 0$ | 333 |
| sequenziell $ i-j = 1$ | 247 |
| mittelreichweitig $ i-j = 2, 3, 4, 5$ | 127 |
| langreichweitig $ i-j > 5$ | 30 |

NOE-Kontaktkarte

In der NOE-Kontaktkarte (Abbildung 4.4-10) sind alle NOE-Resonanzen zwischen den Aminosäureresten aufgetragen. Auf der Diagonalen finden sich die intraresidualen NOEs. Das Muster der NOE-Kreuzresonanzen liefert ebenfalls Hinweise auf das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen. Hierbei spielen vor allem *long range* und *medium range*-NOE-Kreuzresonanzen eine wichtige Rolle. Typisch für Helices sind *medium range*-Kontakte zwischen den Aminosäuren i und $(i+3)$. Außerdem gibt es Kontakte zum sequenziellen Nachbarn und zu den Aminosäure $i+2$ und $i+4$. Entsprechend findet man für α -helikale Bereiche Parallelen zur Diagonalen im Abstand von vier ($i, i+4$ -Kontakte), drei ($i, i+3$ -Kontakte), zwei ($i, i+2$ -Kontakte)

und eins (sequenzielle Kontakte). Anhand der NOE-Kontakte deuten sich folgende α -helikale Bereiche an: 11–19, 30–39, 47–54 und 66–84. β -Faltblätter hingegen zeichnen sich durch langreichweitige NOEs aus, die von gegenüberliegenden β -Strängen stammen. Ein antiparalleles Faltblatt deutet sich zwischen den Resten 25–27 bzw. 60–62 an.

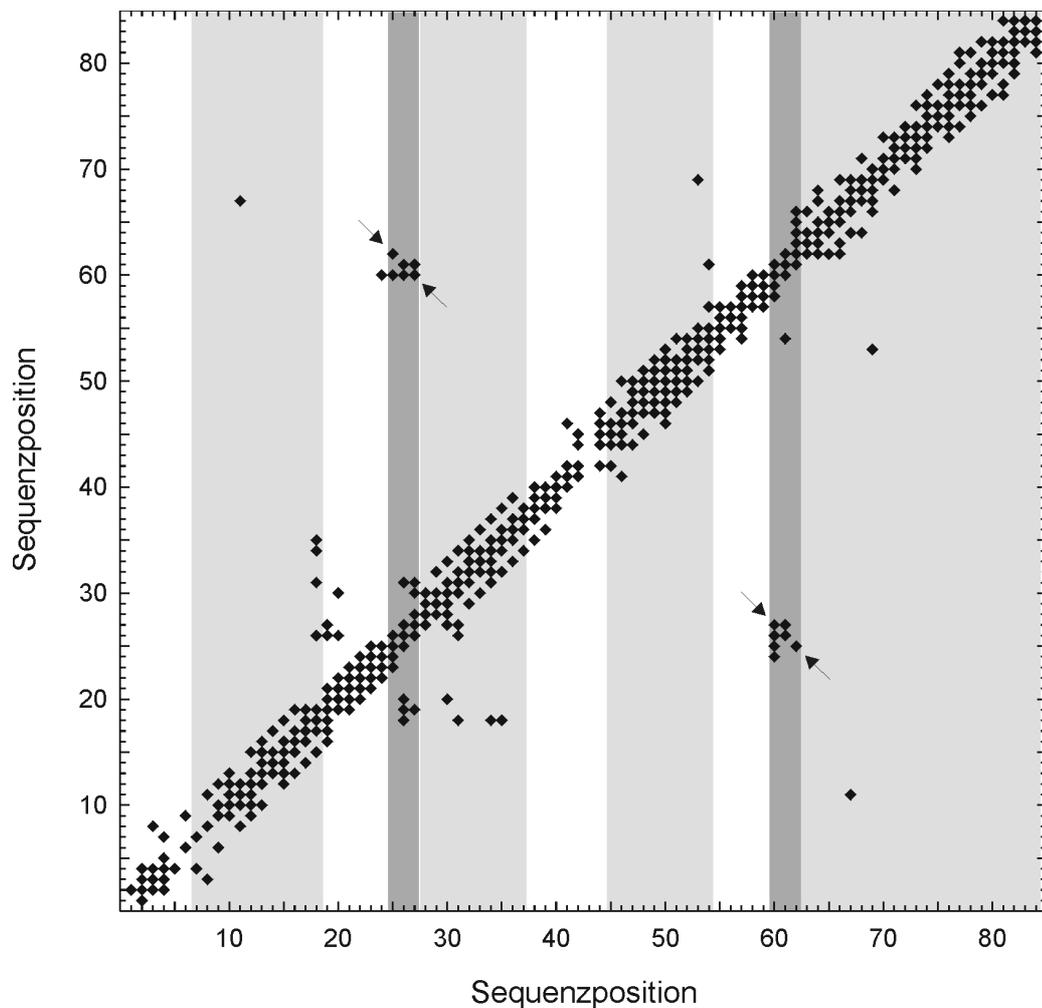


Abbildung 4.4–11: NOE-Kontaktkarte. Hier sind alle experimentell bestimmten Kontakte zwischen je zwei Aminosäureresten aufgetragen. Jedem Karo im Diagramm entspricht mindestens einer gefundenen NOE-Kreuzresonanz. Typisch für α -Helices sind sequenzielle ($i, i+1$) und mittelreichweitige Kontakte ($i, i+2$; $i, i+3$; $i, i+4$), die sich als Parallelen von Karos zur Diagonalen zeigen. Langreichweitige NOESs zwischen β -Faltblättern äußern sich in der Kontaktkarte als Orthogonale zur Diagonalen. Entlang der Abszisse sind α -helikale Bereiche, die in der Struktur (Kapitel 4.5) identifiziert wurden, hellgrau hinterlegt, β -Faltblattbereiche dunkelgrau.

Die Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Bet v 4 sind in Abbildung 4.4–11 zusammengefasst.

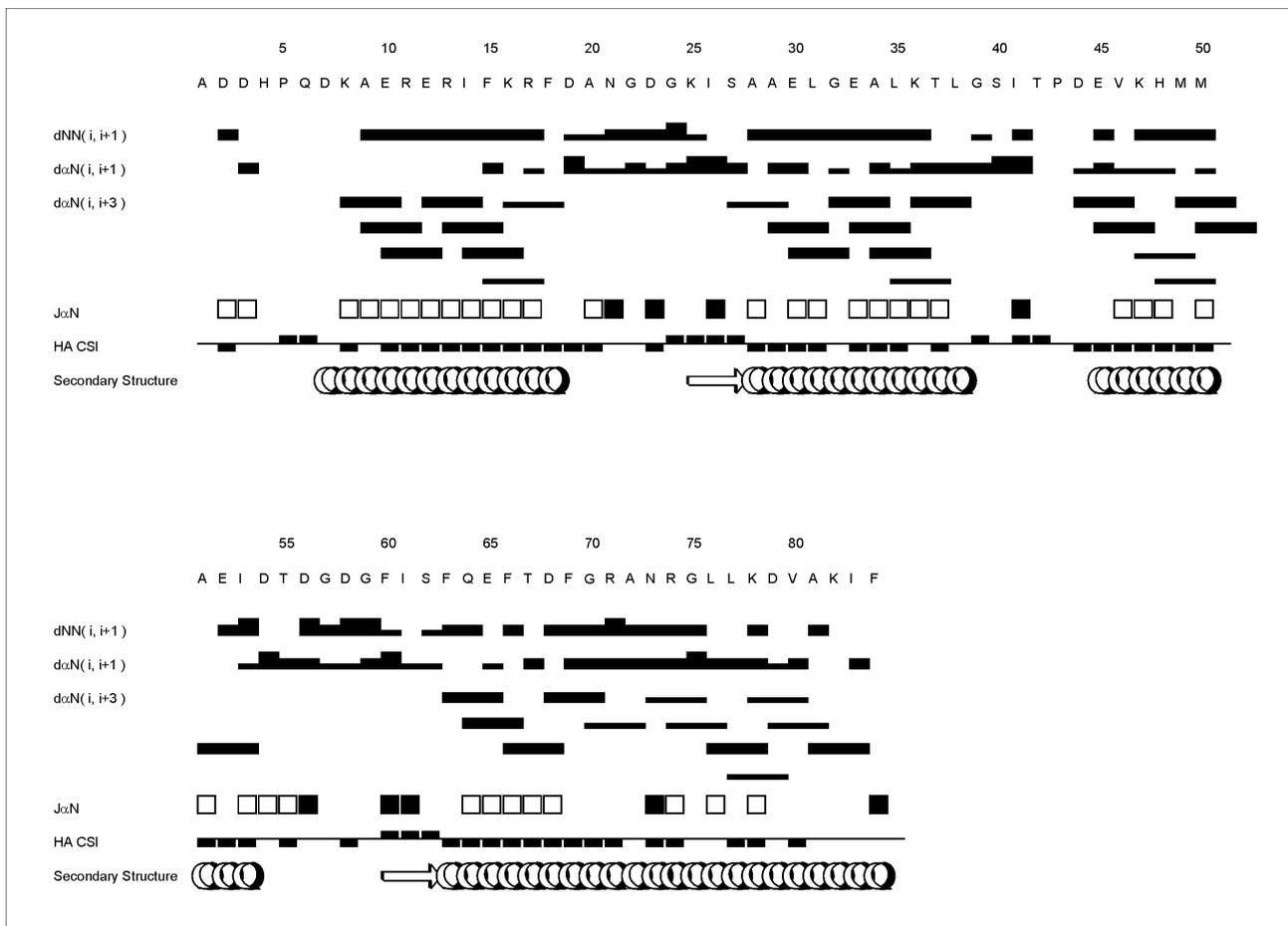


Abbildung 4.4–11: Zusammenschau der NMR-spektroskopisch bestimmten Daten zur Sekundärstruktur von Bet v 4. Die Reichweite und Intensität der interresidualen NOEs ist in Form eines Balkendiagramms aufgetragen, wobei die Balkenstärke der Einteilung der NOEs in schwach, mittel und stark entspricht. Die Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HNH}\alpha} < 6$ Hz sind als weiße Quadrate dargestellt, solche > 8 Hz mit einem schwarzen Quadrat. Beim *chemical shift index* (CSI) sind Werte von „+1“ mit einem Balken nach oben gekennzeichnet, solche mit dem Wert „-1“ mit einem nach unten gerichteten Balken. Ganz unten ist die tatsächliche Sekundärstruktur dargestellt, die sich aus der berechneten Struktur (Kapitel 4.5) ergibt.

4.4.6 Wasserstoffbrücken

Zum Nachweis von Amidprotonen, die in Wasserstoffbrücken eingebunden sind, wurde eine ^{15}N -markierte Bet v 4 Probe in D_2O gelöst (Kapitel 3.7.3). Freie Amidprotonen werden gegen Deuteronen ausgetauscht und sind im HSQC-Spektrum nicht mehr sichtbar, während Amidprotonen, die an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, Resonanzsignale ergeben. Das HSQC-Spektrum von Bet v 4, das 18 h in D_2O gelöst war, ist in Abbildung 4.4–12 gezeigt.

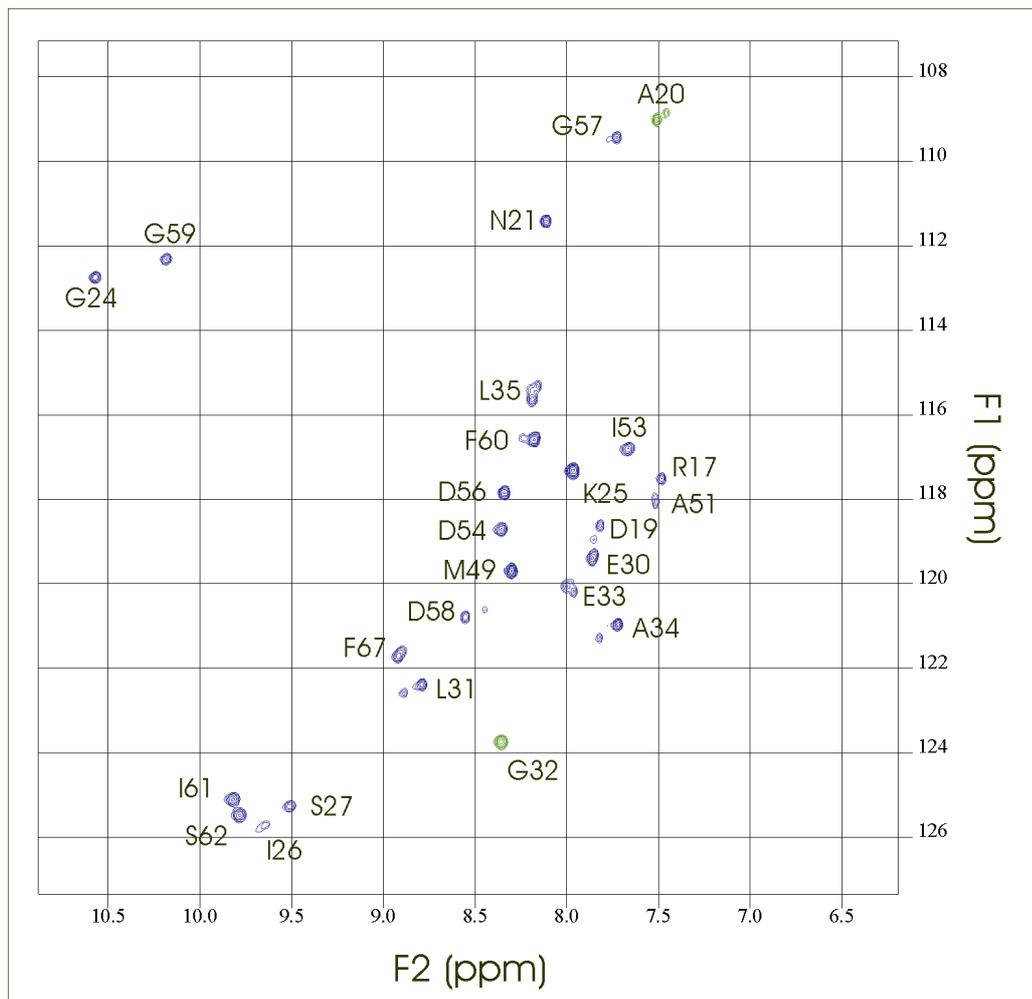


Abbildung 4.4–12: ^1H , ^{15}N –HSQC–Spektrum von $800\ \mu\text{M}$ Bet v 4, 18 h nach dem Lösen in D_2O . Die verbliebenen Resonanzen stammen von Amidprotonen, die in Wasserstoffbrücken eingebunden sind.

Nach der Identifikation der Zugehörigkeit der Resonanzsignale konnten durch Vergleich mit vorläufigen Bet v 4–Strukturen insgesamt 16 Akzeptor/Donor–Paare, die Wasserstoffbrücken bilden, identifiziert werden. Sie gingen als Distanzbeschränkungen in die Strukturrechnung ein (Kapitel 3.7.3 und 10.2.2).

4.5 Die Struktur von Bet v 4 und ihre Güte

Die Struktur des Proteins wurde wie in Kapitel 3.8 beschrieben berechnet. Es wurden 60 Strukturen berechnet, von denen die 22 energieärmsten mit Energien $E_{\text{tot}} < 140$ kcal/mol für weitere Analysen ausgewählt wurden. In Tabelle 4–4 sind die Werte für die Energien sowie die mittleren quadratischen Abweichungen von den Idealwerten aus der letzten Runde der Strukturberechnung zusammengefasst.

Keine der Strukturen weist eine Verletzung der Abstandsbeschränkung um mehr als 0,4 Å auf, und es tritt keine systematische Verletzung einer Abstandsbeschränkung um mehr als 0,17 Å auf.

Tabell 4–4: Übersicht über die Ergebnisse der Moleküldynamik–Simulationen

| Statistik der Moleküldynamik–Simulation | |
|--|---------------------|
| Durchschnittliche Energien (kcal/mol) | |
| E_{tot} | 133 ± 5 |
| E_{bonds} | $5,2 \pm 0,4$ |
| E_{angles} | $90,2 \pm 2,2$ |
| $E_{\text{impropers}}$ | $14,7 \pm 0,3$ |
| E_{vdW} | $8,8 \pm 1,9$ |
| E_{NOE} | $14,4 \pm 3,0$ |
| $E_{\text{dihangles}}$ | $0,012 \pm 0,001$ |
| Standardabweichung von idealen Abständen (Å) | |
| Abstandsbeschränkungen | $0,020 \pm 0,002$ |
| Bindungslängen | $0,002 \pm 0,0002$ |
| Standardabweichung von idealen Winkeln (°) | |
| Bindungswinkel | $0,500 \pm 0,006$ |
| Diederwinkel | $0,0186 \pm 0,0001$ |
| Diederwinkelbeschränkungen | $0,415 \pm 0,003$ |
| Atomare Standardabweichung der 22 Strukturen von der mittleren Struktur (Å) | |
| Proteinrückgrat | $0,68 \pm 0,20$ |
| alle schweren Atome | $1,15 \pm 0,23$ |

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte über die 22 energieärmsten Strukturen mit der jeweiligen Standardabweichung.

Für die Berechnung der Standardabweichung von der mittleren Struktur wurden lediglich die Reste 7 – 71 herangezogen. Die endständige carboxyterminalen α -Helices und der unstrukturierte Aminoterminus wurden außer Acht gelassen, weil sie sehr flexibel sind, wie die Überlagerung der 22 akzeptierten Strukturen von Bet v 4 zeigt (Abbildung 4.5–1).

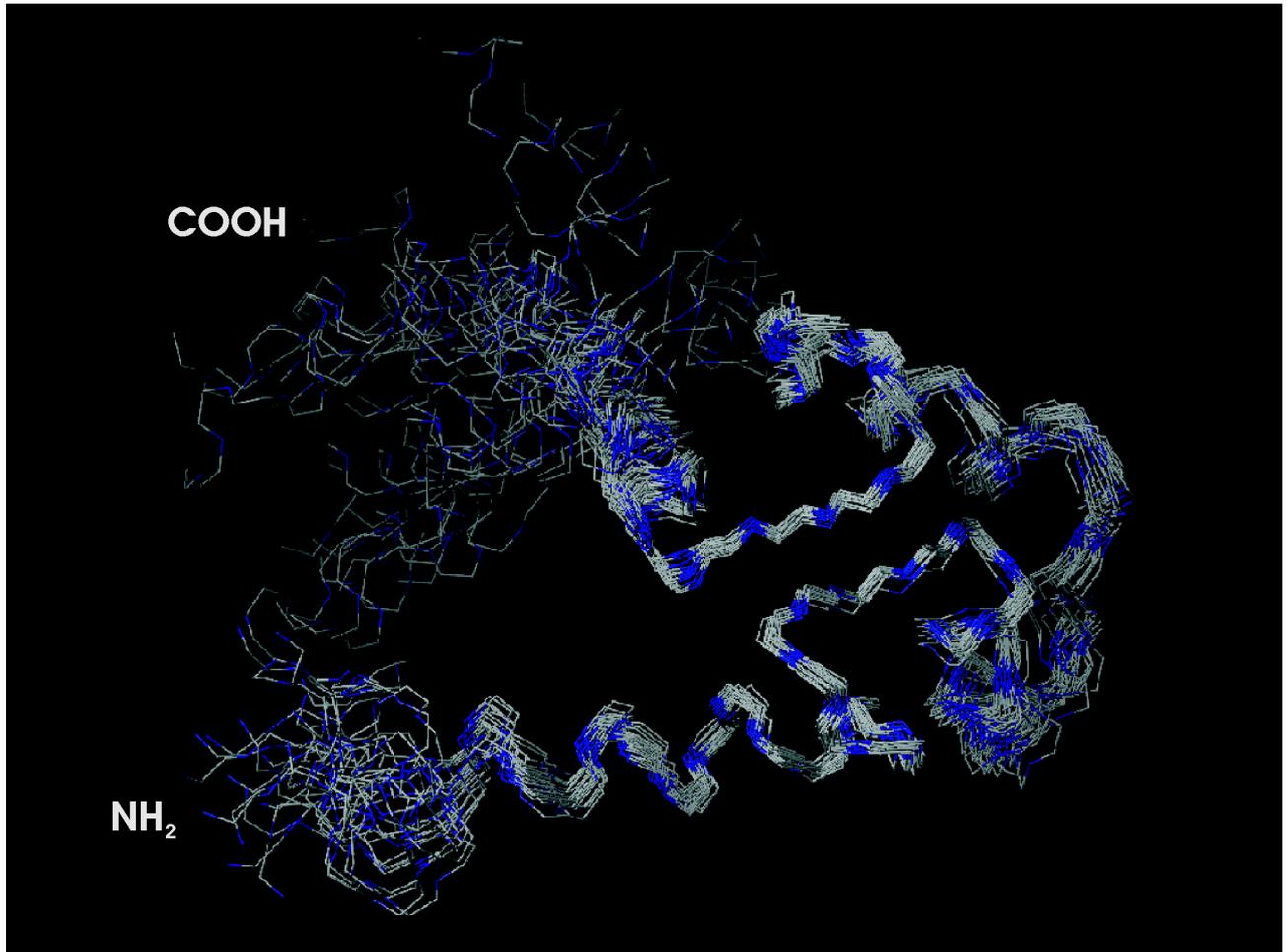
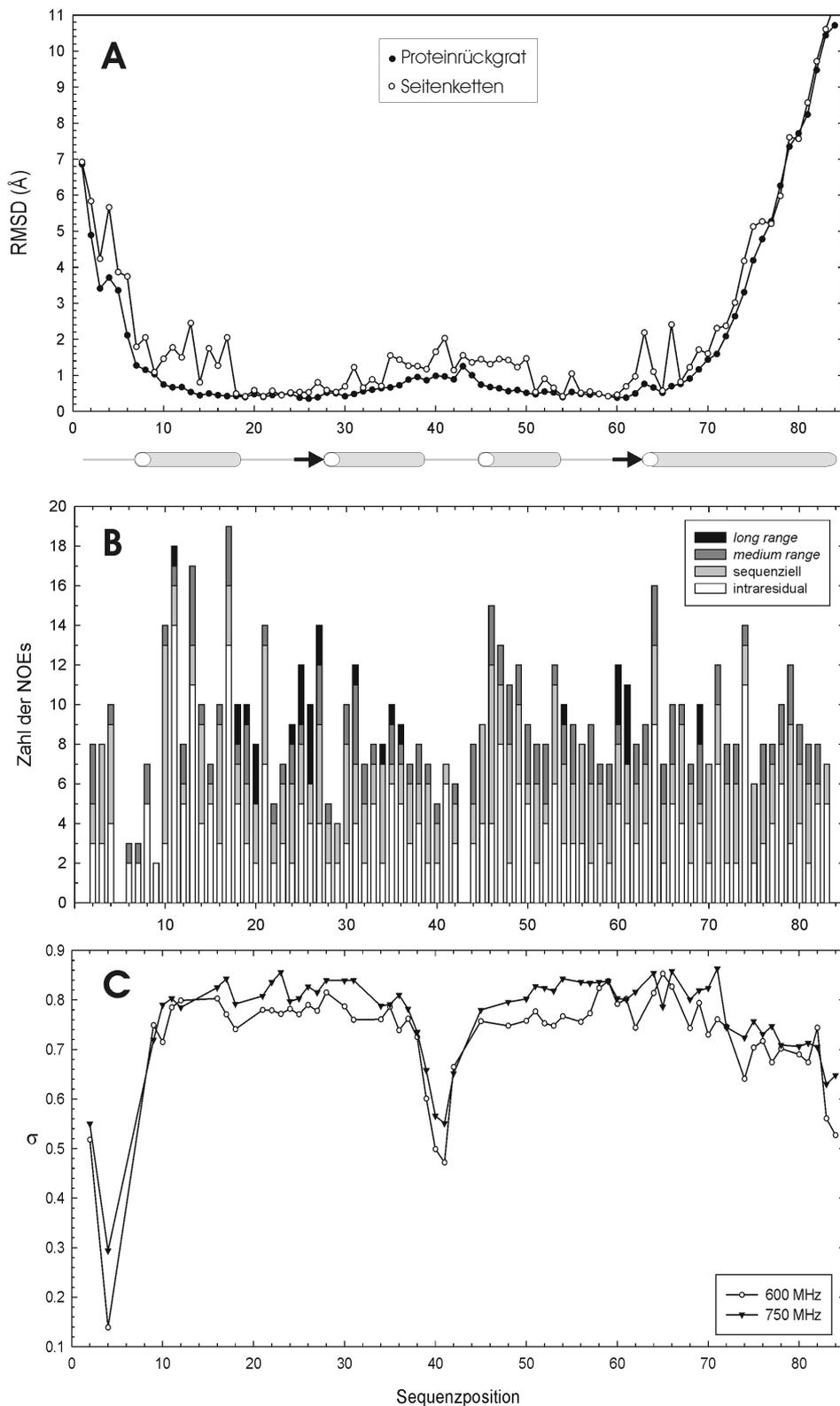


Abbildung 4.5–1: Die Struktur von Bet v 4. Gezeigt ist die Überlagerung des Proteinrückgrats (N, C_α, C) der 22 energieärmsten Strukturen. Der NH₂- und COOH-Terminus sind beschriftet. C-Atome sind grau markiert, Stickstoffatome blau.

Abbildung 4.5–2: Atomare Standardabweichung von der mittleren Struktur (A) und Zahl der Abstandsbeschränkungen (B) für die einzelnen Aminosäurereste. Die Lage der α -Helices und β -Faltblattstränge innerhalb der Aminosäuresequenz ist durch Zylinder bzw. Pfeile skizziert. Bei der Berechnung der mittleren Struktur gingen wegen der Flexibilität der Termini nur die Reste 7 – 71 ein. In C ist der stationäre heteronukleare NOE σ (Kay *et al.* 1989) gezeigt (aus Eisenmann 2001). Die Werte für 750 MHz sind als schwarze Dreiecke und die bei einer Feldstärke von 600 MHz gemessenen Datenpunkte als Kreise dargestellt. Für ein starres Proteine liegt der stationäre heteronukleare NOE bei 0,83 (600 MHz) bzw. 0,85 (750 MHz).



Die Struktur ist im Bereich der Termini und des *linkers*, der beiden EF-Hände miteinander verbindet, schlecht definiert. Das spiegelt sich in den hohen Standardabweichungen von der mittleren berechneten Struktur wider (Abbildung 4.5–2 A). Eine Ursache hierfür ist das Fehlen von *long range*-NOEs (Abbildung 4.5–2 B) und Wasserstoffbrücken (Kapitel 4.4.6 und 10.2.2) in

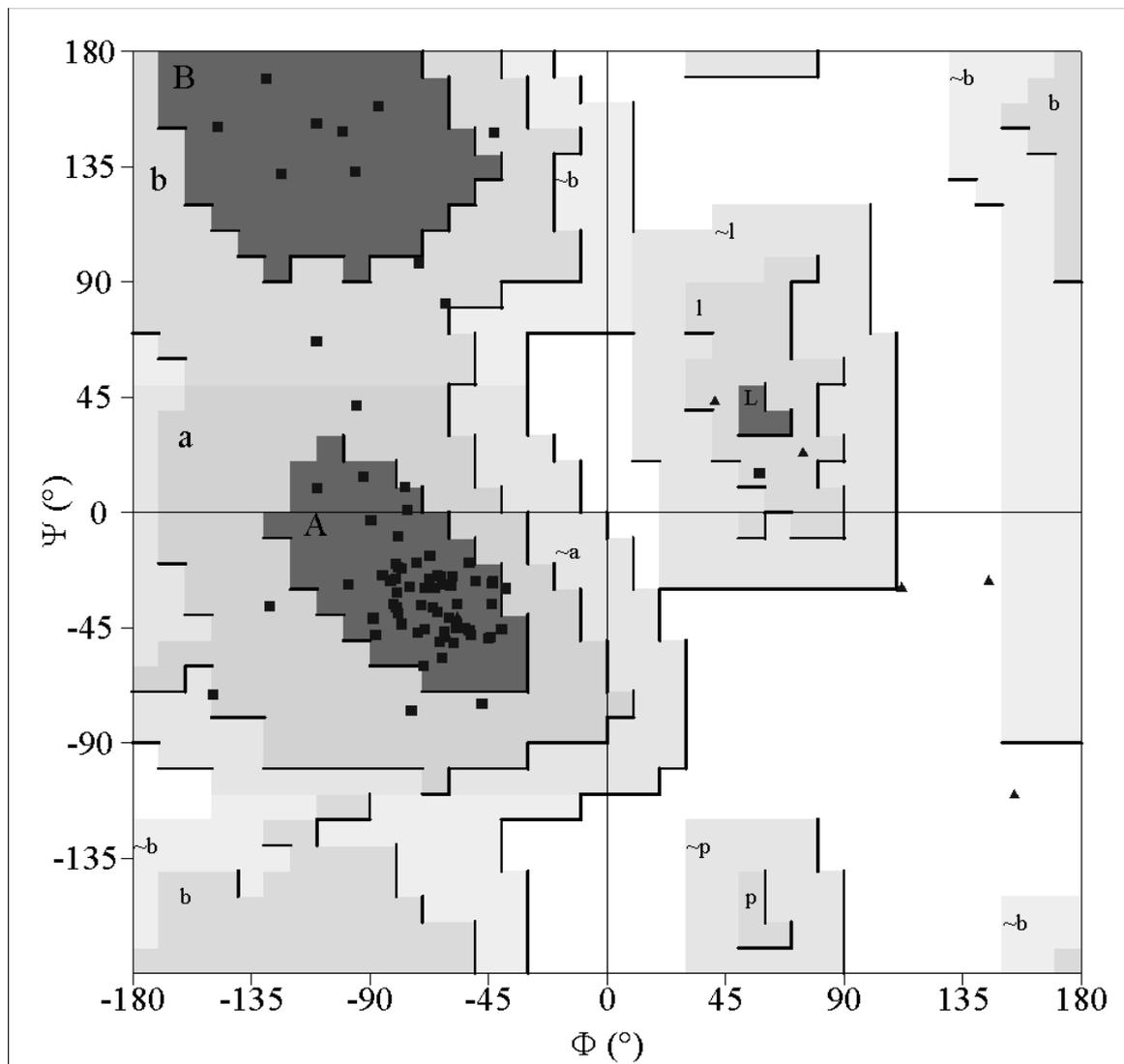
diesen Bereichen. Eisenmann (2001) hatte jedoch in Dynamikmessungen durch Bestimmung des stationären heteronuklearen NOEs gezeigt, dass sowohl die Termini als auch der *linker*-Bereich flexibel sind (Abbildung 4.5–2 C), womit sich das Fehlen von *long range*-NOEs erklären lässt.

Die Bereiche der Calcium-Bindung und das β -Faltblatt sind dagegen gut definiert, ebenso die direkt angrenzenden Helix-Bereiche, wobei die Seitenketten in den Calcium *clustern* im Vergleich zu den angrenzenden Bereichen besonders starr sind, wie man anhand der RMSD-Werte über alle schweren Atome erkennen kann. In diesen Bereichen finden sich auch die meisten *long range*-NOEs.

Analyse der Torsionswinkel

Die Torsionswinkel Φ und Ψ von Bet v 4 sind in Abbildung 4.5–3 als Ramachandran-Plot aufgetragen. Von den 73 Aminosäureresten der energieärmsten Struktur ohne die terminalen Reste und Glycine oder Proline befinden sich 62 (84,9 %) in den sterisch besonders günstigen Regionen, 11 Winkelpaare (15,1 %) finden sich in den sterisch günstigen Bereichen. Dabei handelt es sich ausschließlich um experimentell unterbestimmte Reste aus *loop*- und *linker*-Regionen oder vom NH_2 -terminalen unstrukturierten Bereich. Keine Reste sind in zusätzlich oder nicht erlaubten Regionen zu finden. Betrachtet man alle 22 akzeptierten Strukturen, befinden sich 86 % der Reste in sterisch besonders günstigen Regionen, 13,3 % in sterisch erlaubten und 0,7 % in den großzügig erlaubten Bereichen.

Abbildung 4.5–3: Ramachandran-Plot der Bet v 4 Struktur mit der niedrigsten Energie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Φ/Ψ -Winkelpaare der anderen Strukturen verzichtet. Glycinreste sind als Dreiecke symbolisiert, alle anderen Reste als Quadrate. Die dunkelgrauen Bereiche geben die erlaubten (A, B, L), die mittelgrauen zusätzlich erlaubte (a, b, l, p) und die hellgrauen großzügig erlaubte Bereiche (~a, ~b, ~l, ~p) an. Die Region A ist typisch für α -helikale Bereiche, die Region B für β -Faltblattstränge.



Betrachtung der Struktur

Abbildung 4.5–4 zeigt die mittlere Struktur von Bet v 4 mit schematischer Darstellung seiner Sekundärstrukturelemente. Die Zuordnung in α -Helix, β -Faltblattstrang und andere Bereiche erfolgte nach der Lage der Φ - und Ψ -Winkel der akzeptierten Strukturen im Ramachandran-Plot.

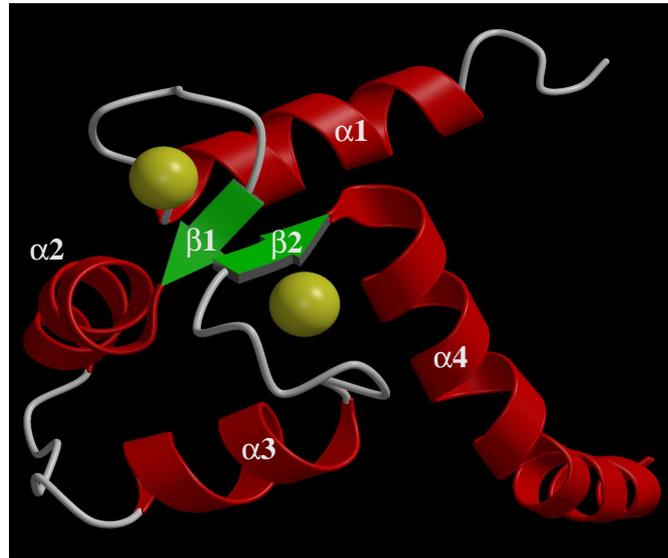


Abbildung 4.5–4: Schematische Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente von Bet v 4 (mittlere berechnete Struktur). Die beiden Calciumbindungsstellen (Reste 19 – 30 und 54 – 65) werden von jeweils zwei α -Helices flankiert (α 1: Reste 7 – 18, α 2: Reste 28 – 38, α 3: Reste 45 – 53, α 4: Reste 63 – 84). Die carboxyterminale α -Helix ist im Bereich der Aminosäuren 72 und 73 experimentell unterbestimmt.

Die beiden EF-Hand-Motive von Bet v 4 werden über ein kurzes β -Faltblatt (β 1: 25 – 27, β 2: 60 – 62) in räumliche Nähe gebracht. Sie sind durch einen *linker* (39 – 44) miteinander verbunden. Die starren Calciumbindungsschleifen werden von jeweils zwei senkrecht zueinander stehenden α -Helices flankiert. Der NH_2 -Terminus ist unstrukturiert und sehr flexibel (vgl. Abbildung 4.5–1), wie der stationäre heteronukleare NOE zeigt (Eisenmann 2001, Abbildung 4.5–2 C). Der Aminoterminus geht in eine helikale Konformation über (α 1: 7 – 18). Daran schließt sich die erste Calciumbindungsstelle an (Reste 19 – 30). Die Bindung von Ca^{2+} erfolgt über die O_{δ_1} -Atome der Seitengruppen von Aspartat 19 und 23, den Carboxamid-Sauerstoff von Asparagin 21, den Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Lysin 25 und die beiden Carboxylat-Sauerstoffatome der Seitenkette von Glutamat 30 (Abbildung 4.5–5). Die Koordination des Ca^{2+} -Ions ist in der carboxyterminalen Calciumbindungsschleife analog. Sie erfolgt über Seitenketten-Carboxylat- oder Carboxylat-Sauerstoffatome von Aspartat 54, 56 und 58, den Carbonylsauerstoff von Phenylalanin 60 und die beiden Carboxylat-Sauerstoffatome von Glutamat 65. Die Faltblattstränge sind Teil der Calciumbindungsregionen. β 1 geht direkt in die zweite α -Helix (α 2: 28 – 38) über. Die zweite EF-Hand wird von den Helices α 3 und α 4 (45 – 53 bzw. 63 – 84), die das β -Faltblatt β 2 (60 – 62) und die weiteren Aminosäurereste der Calciumbindungsschleife (54 – 65) umschließen. Die carboxyterminale α -Helix an im Bereich der Aminosäuren Ala 72 und Asn 73

flexibel. Dies machte sich durch helixuntypische Kopplungskonstanten von rund 7 bis 9 Hz im Bereich der Reste 70 – 73 bemerkbar (Tabelle 4–3). Die Φ - und Ψ -Winkel sind jedoch für die meisten der akzeptierten Strukturen im sterisch günstigsten Bereich für α -Helices, zeigten also eine α -helikale Tendenz. Die Flexibilität der carboxyterminalen Helix beginnt in diesem Bereich (vgl. Abbildung 4.5–1 und 4.5–2). Betrachtet man Bet v 4 in Abbildung 4.5–4, scheint man in eine Tasche zu schauen, die von den α -Helices begrenzt wird und deren Boden das Faltblatt und die Calcium-Bindungsregionen bilden. Innerhalb der Tasche sind überwiegend hydrophobe Bereiche oberflächenexponiert.

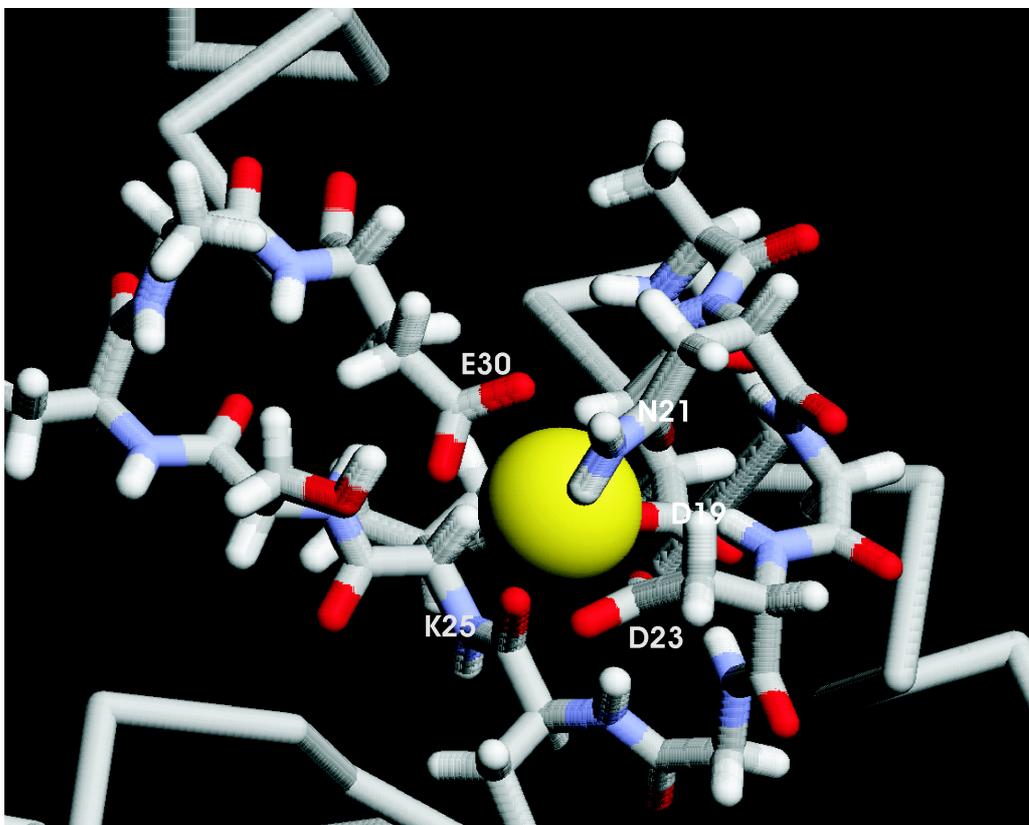


Abbildung 4.5–5: Die Koordination des Ca^{2+} -Ions der aminoterminalen Calcimbindungsstelle erfolgt über die O_{δ_1} -Carboxylat-Sauerstoffatome von Asp19 und Asp 23, O_{δ_1} von Asn 21, den Carbonylsauerstoff von Lysin 25 sowie die beiden Carboxylat-Sauerstoffatome von Glutamat 30. Das Calcium-Ion ist als gelbe Kugel dargestellt, Sauerstoffatome sind rot markiert, Stickstoffatome blau und Kohlenstoffatome grau.

5. Diskussion

5.1 Die Präparation von Bet v 4

Die Strukturbestimmung von Proteinen bedingt einen großen Probenbedarf. Zur Röntgenstrukturanalyse muss die Menge an Protein ausreichend sein, um genügend große Einkristalle zu erhalten. Im Gegensatz dazu liegt die Probe bei der Kernmagnetischen Resonanz (NMR) Spektroskopie in Lösung vor. Allerdings ist die NMR-Spektroskopie eine relativ insensitive Methode, denn im Gegensatz zu den meisten anderen spektroskopischen Methoden wird bei der NMR-Spektroskopie eine Besetzungsdifferenz detektiert. Nach dem Boltzmann-Gesetz beträgt der Besetzungsunterschied zwischen angeregtem und Grundzustand der Kernspins bei Raumtemperatur für Protonen selbst bei hoher Feldstärke nur etwa 10^{-4} . Der Probenbedarf für die NMR-Spektroskopie liegt in Abhängigkeit von der Proteingröße bei mehreren Milligramm Protein. Oftmals können solch große Mengen nicht aus natürlichen Quellen isoliert werden. Deswegen ist die Präparation von rekombinantem Protein notwendig. Hierzu wird das Zielprotein in eukaryotischen (z.B. *Sacharomyces cerevisiae*) oder bakteriellen (*Escherichia coli*) Wirten exprimiert und durch geeignete chromatographische Methoden gereinigt. Ein weiterer Vorteil der Expression in *E. coli* ist in der Möglichkeit zur Markierung mit dem Isotop ^{15}N gegeben, denn mit zunehmender Größe eines Moleküls wird die Zuordnung der Resonanzsignale aus homonuklearen Spektren erschwert. Die Zahl der Spinsysteme nimmt zu, was zwangsläufig eine Überlappung von Signalen zur Folge hat. Erschwerend kommt es zu einer Verbreiterung der Linien bedingt durch eine größere Korrelationszeit der Molekülrotation, die zu stärkerer Relaxation führt. Um eine bessere Dispersion der Resonanzen zu erreichen, können multidimensionale Spektren aufgenommen werden, bei denen die Signale entlang einer weiteren Achse (bei 3D-Experimenten) aufgespalten werden. Zudem können NMR-Experimente durchgeführt werden, die die Zuordnung des Proteins erleichtern, in dieser Arbeit z.B. das HNHA-Spektrum, mit dessen Hilfe die α -Protonen identifiziert werden konnten.

Zur Strukturbestimmung von Bet v 4 mittels NMR-Spektroskopie war deswegen die Etablierung einer Reinigungsstrategie zur Präparation von rekombinantem Bet v 4 nach der Expression in *E. coli* notwendig, die einerseits ausreichende Mengen Protein liefert und andererseits die Möglichkeit zur Markierung mit ^{15}N bot.

Hierzu wurden zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze gewählt:

- a) die Reinigung von Bet v 4 mit einem Fusionspartner, der eine Reinigung über Affinitäts-Chromatographie erlaubt;
- b) die Reinigung von Bet v 4 ohne Fusionsanteil.

5.1.1 Die Reinigung von Bet v 4 mittels Affinitäts-Chromatographie erbrachte nur geringe Proteinausbeuten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit standen zwei Plasmide zur Expression von Bet v 4 zur Verfügung. Das Plasmid pMW175-betv4 erlaubt die Expression von Bet v 4 ohne Affinitäts-tag. In Versuchen, die vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden, war es nicht gelungen, reines Bet v 4 in ausreichender Menge zu isolieren. Deswegen wurde das Plasmid pGEX-6P-2-betv4 konstruiert, mit dem ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und Bet v 4 überproduziert werden konnte. GST birgt neben der Möglichkeit zur Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie den Vorteil, dass meist selbst schlecht lösliche Proteine nach der Expression im Cytoplasma gelöst vorliegen und somit nativ gereinigt werden können. Das GST-Bet v 4-Fusionsprotein wurde in hohem Maße überproduziert und konnte durch Affinitäts-Chromatographie in einem Schritt gereinigt werden (Kapitel 4.1.1). Dennoch konnten trotz nahezu vollständiger enzymatischer Spaltung des Fusionsproteins mit Enterokinase nur geringe Mengen (1 – 3,5 mg) von Bet v 4 präpariert werden. Gerade in Hinblick auf die Isotopenmarkierung schien dieses System deswegen nicht optimal.

Deswegen wurde das Bet v 4-Gen in den pET16b-Vektor eingefügt. Die Klonierungsstrategie war hierbei so gewählt, dass aminoterminal ein (His)₆-tag angefügt war, so dass das Fusionsprotein über Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) gereinigt werden konnte (Kapitel 3.2.3). Der Histidinanhang sollte durch eine enzymatische Spaltung mit Enterokinase abgespalten werden. Diese Protease schien sehr geeignet zu sein, weil sie zum einen GST-Bet v 4 fast vollständig spalten konnte, sich also als sehr effektiv erwiesen hatte; zum anderen liegt die Schnittstelle carboxyterminal von der Erkennungssequenz (Asp)₄Lys, so dass an Bet v 4 nach der Entfernung des Fusionspartners keine zusätzlichen aminoterminalen Reste verbleiben. Die Verwendung des Histidin-tags hatte sich bei der Reinigung von anderen Allergenen (Bet v 1 und Pru av 1) als außerordentlich effektiv erwiesen (Boehm 1998, Nerkamp 1999). Allerdings lagen die Bet v 1 und Pru av 1-Fusionsproteine unter den gewählten Kultivierungsbedingungen in Einschlusskörpern vor, weswegen die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgte, was wiederum eine Rückfaltung der Allergene notwendig machte. Bet v 4 hingegen lag nach der Expression gelöst vor

(Kapitel 4.1.). Dies schien von Vorteil zu sein, weil die Rückfaltung eines Proteins schwer zu optimieren ist und Verluste durch Aggregation zu befürchten sind. Allerdings war die Überexpression des His-tag-Bet v 4 nur schwach (Abbildung 4.1–5). Da das Fusionsprotein bei der Affinitäts-Chromatographie jedoch angereichert wird, wurde dennoch eine Reinigung versucht. Die Bindung von Bet v 4 mit (His)₆-Anhang an eine Nickelionen-Affinitäts-Säule war nicht stark genug, um eine vollständige Separierung von zellulären Proteinen zu erreichen. Bei einer zweiten IMAC, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wird, sollten diese Proteine wiederum an die Säule binden, während Bet v 4 nach dem Entfernen des Histidinanhangs die Säule ohne Bindung passieren sollte. Es stellte sich jedoch heraus, dass die enzymatische Spaltung mit Enterokinase nicht so effektiv verlief wie bei der Spaltung des GST-Fusionsproteins. Dies bedingte ebenso eine Ausbeuteminderung wie die zwei weiteren Chromatographieschritte (IMAC und SEC), die für die Isolierung von reinem Bet v 4 notwendig waren. Somit konnten lediglich 0,4 mg Bet v 4 je Liter Bakterienkultur erhalten werden, was für die NMR-Spektroskopie deutlich zu wenig war.

Da ein Klon vorlag, der die Expression von Bet v 4 ohne Fusionsanteil erlaubt, wurde versucht, das Allergen ohne Hilfe der Affinitäts-Chromatographie zu reinigen. Die Präparation auf diesem Wege war in früheren Versuchen nicht gelungen. Mit Hilfe eines erweitereten Repertoires an Chromatographiesäulen durch den Einsatz eines modernen FPLC-Systems schien dies grundsätzlich möglich.

5.1.2 Es konnten effektive Strategien zur Reinigung von Bet v 4 ohne Affinitätsfusion etabliert werden

Die Reinigung *eines* Proteins aus einer Vielzahl anderer Proteine ist kein einfaches Unterfangen. Es werden sich fast immer solche Proteine finden, die sich in mindestens einer Eigenschaft dem gewünschten Protein ähnlich sind. Deswegen sind in der Regel mehrere Chromatographieschritte notwendig, um eine vollständige Reinigung zu erzielen. Die Zahl der Reinigungsstufen sollte jedoch möglichst gering gehalten werden, da erfahrungsgemäß bei jedem Schritt Ausbeuteverluste auftreten.

Zunächst wurde Bet v 4 über eine Chromatofokussierung gereinigt (Kapitel 4.1.4). Bei dieser Methode handelt es sich um einen Anionenaustauscher-Chromatographie, bei der die Elution über einen pH-Gradienten erfolgt (Sluyterman & Elgersma 1978; Kapitel 3.4.5). Mit Hilfe eines modernen FPLC-Systems ist die Reinigung im Rahmen dieser Arbeit gelungen und erlaubte die Präparation von ¹⁵N markiertem Bet v 4, das bei der NMR-Spektroskopie der meisten für die

Strukturbestimmung relevanten Experimente verwendet wurde (Tabelle 3–6). Bei weiteren Präparationen von Bet v 4 und anderen Allergenen stellte sich jedoch heraus, dass die Entfernung der Ampholyt-ähnlichen Moleküle im Elutionspuffer (Polybuffer) nicht immer vollständig möglich war. Bei homonuklearen NMR-Spektren überlagern die Signale des Polybuffers die Proteinresonanzen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ampholyt-ähnlichen Moleküle strukturellen Einfluss auf Proteine nehmen.

Aus diesem Grund wurde versucht, Bet v 4 durch Anionenaustauscher-Chromatographie und einer Elution mittels eines Salzgradienten zu reinigen (Kapitel 4.1.3). Bet v 4 konnte mit dieser Methode nicht gereinigt werden. Dennoch wird die Anionenaustauscher-Chromatographie in Verbindung mit einer Größenausschluss-Chromatographie in unserem Labor erfolgreich bei der nativen Präparation anderer Allergene eingesetzt, z.B. den Erdnussallergenen Ara h 2 und Ara h 6, dem Birkenpollenallergen Bet v 1 und dem Hauptallergenallergen aus Süßkirsche, Pru av 1.

Eine besonders effektive Reinigungsmethode war durch die Tatsache gegeben, dass Bet v 4 ein thermostabiles Protein ist (Kapitel 4.2.3). Thermostabilität wird bei EF-Hand-Proteinen häufig beobachtet (Blum *et al.* 1977, Kawasaki & Kretsinger 1994). Dadurch konnte Bet v 4 durch Erhitzen eines Rohextraktes aus lysierten Bakterienzellen in nahezu reiner Form erhalten werden (Kapitel 4.1.5). Diese Methode wurde bei den Bet v 4-homologen Allergenen der Erle, Aln g 4 (Hayek *et al.* 1998) und Wiesenlischgras, Phl p 7 (Niederberger *et al.* 1999) ebenfalls angewandt. Nach abschließender Reinigung durch Größenausschluss-Chromatographie konnten so 20 – 50 mg Apo- oder Calcium-Bet v 4 gereinigt werden.

In Tabelle 5–1 sind die durchgeführten Methoden zur Reinigung von Bet v 4 zusammengefasst.

Tabelle 5–1: Vergleich der Proteinausbeuten bei den verschiedenen Reinigungsmethoden für Bet v 4.

| Strategie | Methode | Ausbeute (je 1 Bakterienkultur) |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Affinitäts- chromatographie | GST-Fusion | 1 – 3,5 mg |
| | His-tag | 0,4 mg |
| Reinigung ohne Affinitätsfusion | Chromatofokussierung | 3 – 8 mg |
| | Anionenaustauscher- Chromatographie | keine Reinigung |
| | „Koch-Präparation“ | 20 – 50 mg |

Eine effektive Reinigung von Bet v 4 war durch die Reinigung ohne Fusionspartner gelungen, wobei sich Chromatofokussierung und die Hitzepräzipitation von *E. coli*-Proteinen als geeignete Methoden herausstellten.

5.2 Charakterisierung von Bet v 4

5.2.1 Der Oligomerisierungsgrad von Bet v 4

EF-Hand-Proteine können nichtkovalente Dimere bilden (Lafitte *et al.* 1999). Die in dieser Arbeit gelöste Bet v 4-Struktur ist die eines Monomers (Kapitel 4.5). Da eine Monomer/Dimer-Unterscheidung in der NMR nicht immer unproblematisch ist, wurde eine Reihe anderer Methoden zur Klärung des Oligomerisierungszustandes mit herangezogen.

1. Engel *et al.* (1997) berichten von *crosslinking*-Experimenten, in denen sie weder für die Calciumform noch für das Apoprotein Dimere oder höherste Oligomere nachweisen konnten. Es wurden dennoch weitere Experimente durchgeführt, um den Oligomerisierungsgrad von Bet v 4 zu bestimmen.
2. Mittels ESI-Massenspektrometrie konnten nichtkovalente Dimere von Calmodulin nachgewiesen werden (Lafitte *et al.* 1999). Von Bet v 4 wurde in Calcium gebundener Form jedoch nur das Monomer nachgewiesen (Kapitel 4.2.4). Lediglich von Apo-Bet v 4 wurde bei pH 4 während einer Messung ein Dimer beobachtet.
3. Mit Hilfe der Blauen Nativen Gelelektrophorese (Kapitel 4.3.2) war rekombinantes mit natürlichem Bet v 4 verglichen worden. Beide Proteine laufen im nativen Gel auf derselben Höhe, die abermals nur durch das Vorliegen eines monomeren Status erklärt werden kann.
4. In den bisherigen Experimenten lag Bet v 4 in niedrigerer Konzentration vor, als sie bei NMR-Experimenten notwendig sind. Aber auch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie war der Oligomerisierungsgrad von Bet v 4 untersucht worden. Eisenmann (2001) hatte die Rotationskorrelationszeit von Bet v 4 zu 6,4 ns bestimmt, während die von Parvalbumin (12 kDa) 7,6 ns beträgt.
5. Mit Hilfe der NMR-Diffusionsmessung (Kapitel 4.3.3) war der hydrodynamische Radius des Birkenpollenallergens zu rund 15 Å bestimmt worden. Nach Wilkins *et al.* (1999) lässt sich der hydrodynamische Radius eines nativen Proteins nach folgender Gleichung abschätzen:

$$R_h = 4,75 \cdot N^{0,29} \text{ \AA} \quad \text{Gleichung (5.1)}$$

R_h : hydrodynamischer Radius

N : Zahl der Aminosäurereste

Bet v 4 (84 Aminosäurereste) hätte demnach einen hydrodynamischen Radius von 17,3 Å. Der experimentell bestimmte, kleinere Wert spricht für das Vorliegen eines Monomers. Bei einem Dimer wäre ein R_h von etwa 21 Å zu erwarten. Zum Vergleich sind in Tabelle 4–2 die hydrodynamischen Radii anderer Proteine aufgeführt.

Tabelle 5–2: Experimentell bestimmte hydrodynamische Radii von gefalteten Proteinen (aus Wilkins *et al.* 1999).

| Protein | R_h (Å) | Zahl der Aminosäurereste |
|--|-----------|--------------------------|
| Pankreatischer Trypsin Inhibitor aus Rind (BPTI) | 15.8 | 58 |
| SH3–Domäne von PI3 Kinase | 18.6 | 90 |
| Cytochrom c aus Pferdeherz | 17.8 | 104 |
| Lysozym aus Hühnereiweiß | 20.5 | 129 |
| Pferde–Myoglobin | 21.2 | 153 |

Die SH3–Domäne von PI3 Kinase umfasst 90 Aminosäurereste und hat mit 18,6 Å einen deutlich größeren hydrodynamischen Radius. Pferde–Myoglobin ist mit 153 Aminosäureresten etwa so groß wie ein potenzielles Bet v 4–Dimer und hat einen R_h von über 21 Å, was der Hypothese einer Dimerisierung von Bet v 4 widerspricht.

6. Eine ebenfalls hoch konzentrierten Probe von Bet v 4 wurde einer analytischen Ultrazentrifugation unterzogen. In einem ersten Messergebnis wurde ein Molekulargewicht von 7620 kDa genannt (Dr. Hauke Lilie, Institut für Biotechnologie, Universität Halle, persönliche Mitteilung). Das Ergebnis muss jedoch noch statistisch abgesichert werden.

Somit ist zweifelsfrei nachgewiesen worden, dass Bet v 4 in Lösung ein Monomer ist.

5.2.2 Bet v 4 ist ein stark α -helikales Protein mit ausgeprägter Thermostabilität

Das Fern-UV-Spektrum von Calcium-Bet v 4 (Abbildung 4.2-3) ist typisch für ein α -helikales Protein mit einem ausgeprägten Minimum bei 208 nm, einer Schulter bei 222 nm und einem Maximum bei 188 nm (Venyaminov & Yang 1996). Spektren mit ähnlich hohem Helixgehalt zeigen die Polcalcine Aln g 4 (Hayek *et al.* 1998) und Phl p 7 (Niederberger *et al.* 1999) und wurden auch schon für Bet v 4 veröffentlicht (Engel *et al.* 1997).

Der hohe Anteil α -helikaler Sekundärstruktur ist typisch für EF-Handproteine, bei denen die Calcium-Bindungsstellen von α -Helices flankiert werden. EF-Hände werden in einer Vielzahl eukaryotischer Calcium bindender Proteine gefunden (Heizmann & Hunziker 1991). Die Calciumbindungsschleife, der Calcium-Ionen über funktionelle Gruppen von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin sowie einem Carbonyl-Sauerstoff des Proteinrückgrats koordiniert (vgl. Kapitel 1.4.2), wird von zwei α -Helices flankiert (Kretsinger & Nockolds 1973, Kawasasaki & Kretsinger 1994). Oftmals wird eine außerordentlich hohe thermische Stabilität bei EF-Hand-Proteinen beobachtet (Blum *et al.* 1977, Bugajska-Schretter *et al.* 1998), und sie scheint eine typische Eigenschaft der Polcalcin-Familie zu sein (Hayek *et al.* 1998, Niederberger *et al.* 1999), so auch von Bet v 4 (Kapitel 4.2.3). Im Verlauf der Erwärmung einer Bet v 4-Lösung ist zwar eine kontinuierliche Abnahme der Elliptizität bei 222 nm zu beobachten, jedoch wird kein kooperativer Übergang beobachtet, der auf eine Entfaltung des Proteins hindeutet (Abbildung 4.2-5, 4.2-6). Die stetige Abnahme des CD-Signals kann dahingehend interpretiert werden, dass mit steigender Temperatur die Helix-Enden zunehmend flexibler werden, ohne dass es zu einem Kollabieren der Sekundärstrukturelemente oder gar der Tertiärstruktur im Ganzen kommt. Betrachtet man jedoch das CD-Spektrum bei 100 °C (Abbildung 4.2-6 A, B), beobachtet man eine deutlich veränderte Kurvenform. In der Temperaturkurve wird dies durch eine Zunahme der Steigung zu hohen Temperaturen hin deutlich. Der Mittelpunkt der thermischen Entfaltung von Calcium-Bet v 4 liegt also jenseits von 100 °C. Beim Abkühlen sank die Elliptizität bei 222 nm wieder auf den Wert vor dem Erhitzen, und das Fern-UV-CD-Spektrum war identisch mit dem vor Aufnahme der Temperaturkurve (Abbildung 4.2-6 B).

5.3 Die Struktur des Birkenpollenallergens Bet v 4

5.3.1 Bet v 4 hat eine leicht ellipsoide Gestalt

Bet v 4 zeigte sowohl bei der analytischen Größenausschluss-Chromatographie (Kapitel 4.3.1) als auch bei der nativen Gelelektrophorese (Kapitel 4.3.2) ein ungewöhnliches Laufverhalten. Beide Methoden sollten Hinweise auf den Oligomeresierungsgrad des Proteins geben.

Durch die analytische Größenausschluss-Chromatographie wurde ein Molekulargewicht bestimmt, das dem 1,5-fachen der berechneten molekularen Masse des Monomers entsprach (Abbildung 4.3–1). Allerdings setzt diese Methode voraus, dass die Eichproteine und das *target*-Protein in ihrer Gestalt einander ähnlich sind, da das Laufverhalten bei der Chromatographie nicht vom Molekulargewicht, sondern vom Stokes'schen Radius abhängt (Scopes 1994). Da die verwendeten Eichproteine nahezu globulär sind, konnte vermutet werden, dass Bet v 4 keine solche äußere Gestalt besitzt.

Ähnliches war bei der blauen nativen Gelelektrophorese (Kapitel 4.3.2) beobachtet worden. Die Lage einer Proteinbande im Gel ist davon abhängig, wie weit das Molekül in das kontinuierlich dichter werdende Maschenwerk der Polyacrylamid-Matrix eindringen kann (Schamel & Schamel 2001). Bet v 4 (9,3 kDa) wurde neben Ubiquitin (8,5 kDa) auf ein Gradientengel aufgetragen und lief weiter in Richtung der Anode (Abbildung 4.3–2). Eine mögliche Ursache könnte wiederum eine ellipsoide oder fibrilläre Gestalt von Bet v 4 sein.

Einen weiteren Hinweis lieferten auch die NMR-Diffusionsmessungen (Kapitel 4.3.3). Der hydrodynamischen Radius eines gefalteten Proteins lässt sich nach Gleichung (4.3) aufgrund der Zahl seiner Aminosäurereste abschätzen. Der für Bet v 4 vorhergesagte Wert beträgt 17,3 Å, experimentell wurden jedoch 15,3 Å bestimmt. Das kann dahingehend interpretiert werden, dass bei der Diffusion der kleinere Radius des Ellipsoids dominiert.

Die Annahme einer mehr ellipsoiden als globulären Gestalt von Bet v 4 wurde durch die NMR-Struktur bestätigt.

5.3.2 Die Struktur von Bet v 4 in Lösung – Vergleich mit den Relaxationsdaten

Bei der Betrachtung der Struktur von Bet v 4 (Abbildung 4.5–1) in Lösung fällt auf, dass der Aminoterminus und die carboxyterminale Helix experimentell unterbestimmt sind, ebenso der *linker*, der die beide EF-Hände verbindet (Abbildung 4.5–2). Im Gegensatz dazu findet sich in den Calciumbindungsschleifen und den sie unmittelbar flankierenden Bereiche eine gut definierte lokale

Struktur, die durch die in diesen Regionen gefundenen *long range*-NOEs stabilisiert wird. Betrachtet man die Verteilung der NOEs (Abbildung 4.4–11 und 4.5–2), fällt das Fehlen solcher NOEs in den terminalen Bereichen auf, was letztendlich Ursache der schlecht definierten Lage der Termini ist. Experimente zur Flexibilität von Bet v 4 wurden bereits von Eisenmann (2001) anhand von NMR-Relaxationsmessungen durchgeführt. Die hohe Beweglichkeit der terminalen Bereiche wurde hier bestätigt, so dass davon auszugehen ist, dass die tatsächlich vorhandene Beweglichkeit Grund für das Fehlen von NOEs ist. Im einzelnen sind die Interpretationen der Relaxationsmessungen folgende:

- Der Aminoterminus ist vermutlich hoch flexibel.
- Die NH₂-terminale Helix (9 – 18) führt als gemeinsame Struktureinheit Bewegungen aus.
- Beide Calciumbindungsschleifen sind relativ starr.
- Der Linkerbereich zwischen beiden EF-Händen (38 – 42) führt vermutlich schnelle Bewegungen mit großer Amplitude aus.
- Die beiden Helices, die durch den *linker* verbunden sind, zeichnen sich durch hohe Ordnungsparameter aus und sind somit ebenfalls recht starre Bereiche.
- Die carboxyterminale Helix (Bereich der Reste 66 – 71) ist etwas beweglich. Die Flexibilität ist bei den Resten 72 – 84 deutlich erhöht.

Die Daten aus den Relaxationsmessungen stehen in hervorragender Übereinstimmung mit der Strukturschar von Bet v 4 (Abbildung 4.5–1) und den Abweichungen der Einzelstrukturen von der mittleren Struktur (Abbildung 4.5–2).

5.3.3 Die Polcalcine Bet v 4 und Phl p 7 unterscheiden sich in ihrer dreidimensionalen Struktur beträchtlich

Die allergenen Polcalcine gleichen sich in Vielzahl von Eigenschaften (Engel *et al.* 1997; Twardosz *et al.* 1997; Niederberger *et al.* 1999; Hayek *et al.* 1998):

- Sie sind Calcium bindende Proteine aus Pollen und bestehen aus zwei EF-Hand-Domänen.
- Die Aminosäure-Identität liegt bei über 70 %, die Sequenzhomologie ist sogar noch höher (Abbildung 1.4–3);
- das macht sich in einer ausgeprägten IgE-Kreuzreaktivität bemerkbar.
- Alle bislang strukturell charakterisierten Polcalcine weisen ähnliche CD-Spektren auf und sind in ihrer Calcium gebundenen Form ähnlich thermostabil.

Dennoch unterscheiden sie sich die Polcalcine aus Birke und Wiesenlischgras in ihrer dreidimensionalen Struktur. Verdino *et al.* (2001) konnten die Struktur von Phl p 7 durch Röntgenstrukturanalyse lösen (Abbildung 5.3–1).

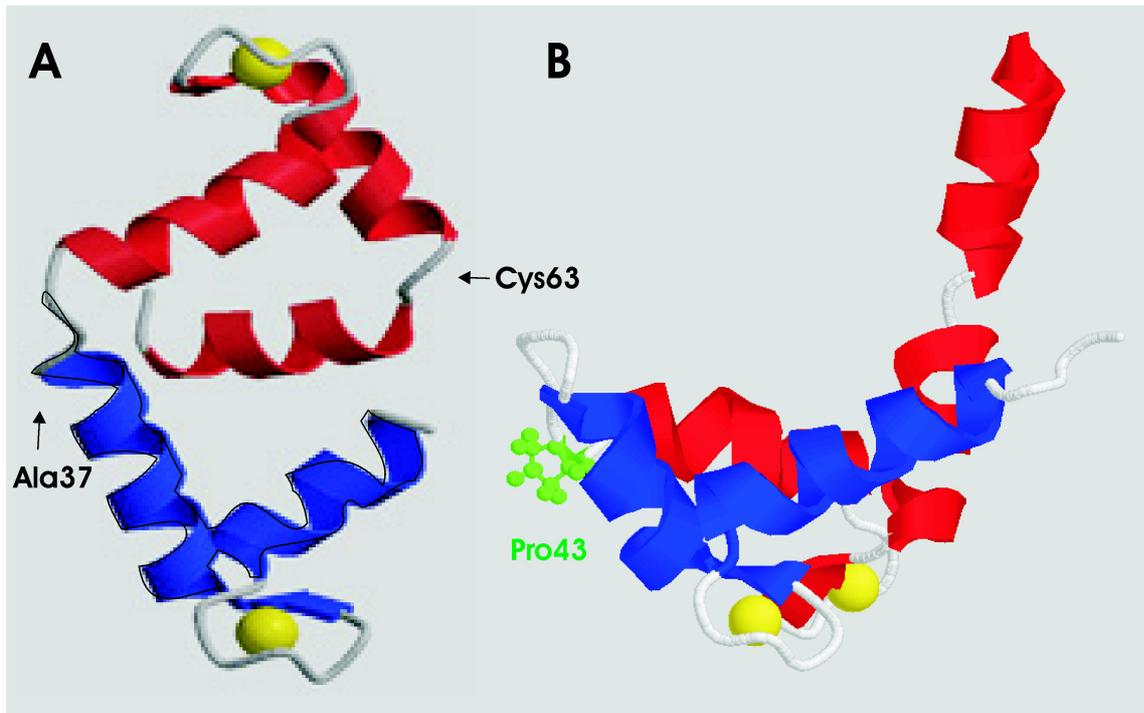


Abbildung 5.3–1: Schematische Darstellung der Strukturen von Phl p 7 und Bet v 4. Die aminoterminalen Hälften sind blau markiert, die carboxyterminalen Hälften rot. Calcium-Ionen sind gelb hervorgehoben.

A: Röntgenstruktur von Phl p 7. Gezeigt ist die asymmetrische Einheit, die eine Untereinheit des Homodimers enthält. Der Cysteinrest findet sich im Bereich des Knicks der carboxyterminalen Helix, Alanin 37 am Ende der zweiten aminoterminalen Helix. Die Koordinaten sind in der *Protein Data Bank* (PDB-Code 1K9U) hinterlegt, aber noch nicht öffentlich zugänglich.

B: Durchschnittsstruktur von Bet v 4 mit derselben räumlichen Anordnung der aminoterminalen Domäne. Prolin 43 ist markiert.

Phl p 7 ist nach Verdino *et al.* (2001) ein Homodimer. In Abbildung 4.3–2 ist nur die Struktur eines Monomers abgebildet. Phl p 7 verfügt über einen Cystein-Rest, über den eine kovalente Verknüpfung zweier Monomere erfolgen kann. Es ist jedoch noch nicht veröffentlicht, unter welchen Bedingungen die Kristallisation erfolgte, und somit auch nicht, ob die beiden Untereinheiten über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Ein genauer Vergleich beider Polcalcin-Strukturen ist erst nach Publikation aller Phl p 7-Daten möglich.

Maßgeblich für die Dimerbildung von Phl p 7 ist jedoch womöglich nicht Cystein 64 sondern Alanin 37. Vergleicht man die Sequenzen von Phl p 7 und Bet v 4 (Abbildung 1.4–3), findet man beim Birkenpollenallergen an dieser Stelle ein Prolin (Rest 43), bei Phl p 7 hingegen einen Alaninrest. Bei Calbindin D_{9k} befindet sich an dieser Stelle (Position 43) ebenfalls einen Prolinrest (Abbildung 5.3–2).

```

Bet v 4      -ADDHPQDKAERERIFKRFDAN-GD-GKISAAELGEALK-TLGSIT--DDEVKHMMAEI
Phl p 7      MADDM-----ERIFKRFDTN-GD-GKISLSELTDALR-TLGSTS--ADEVQRMAEI
Calbindin    M--SAKKSPEELKGI FEKYAAKEGDPQNL SKEELKLLLQTEFP SLLKG DSTLDELFEEL
              .                : **::: : : ** .::: * ** * : : * . : .::: * :
                                |----Ca2+----|

Bet v 4      DTDGDGFISFQEF TDFGRANRGLLKDVAKIF 84
Phl p 7      DTDGDGFIDFNEFISFCNANPGLMKDVAKVF 78
Calbindin    DKNGDGEV SFEEFQ-----VLVKKISQ-- 76
              *.:*** :.:***          *:*.:::
              |---Ca2+---|

```

Abbildung 5.3–2: Sequenzalignment von Bet v 4 (Engel *et al.* 1997), Phl p 7 (Niederberger *et al.* 1999) und Calbindin D_{9k} aus *Bos taurus* (Kumar *et al.* 1996). Der für den *EF-hand swap* von Calbindin prägende Rest Pro 43 ist hervorgehoben.

Calbindin D_{9k} (8,5 kDa) ist ein Calciumtransportprotein. Das Wildtypprotein ist ein Monomer, bei dem wie bei Bet v 4 die beiden EF-Hand-Motive durch ein kurzes β -Faltblatt gepaart sind (Szebenyi & Moffat 1986; Svensson *et al.* 1992). Wird Prolin 43 von Calbindin D_{9k} zu Methionin mutiert, wird nach mehreren Tagen die Bildung eines Dimers beobachtet (Håkansson *et al.* 2001). Die Struktur Calbindin D_{9k} (Q22N + P43M) wurde mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst. Calbindin D_{9k} (Q22N + P43M) liegt dimer vor, wobei die EF-Hand 1 von Molekül A mit der EF-Hand 2 von Untereinheit B packt und umgekehrt. Dieses Phänomen nennt man *EF-hand-swap* (Håkansson *et al.* 2001). Der Austausch von Prolin, das dem *linker* eine gewisse Rigidität verleiht, erleichtert das Öffnen der Packung der EF-Hände eines Monomers, das eine Zwischenstufe bei der Dimerisierung darstellt. Durch die Dimerisierung wird in der Linker-Region, die die beiden EF-Hände verbindet, ein stabilisierender hydrophober *cluster* gebildet. Bei einer Substitution von Prolin durch Glycin wurde vermutlich deswegen keine Dimerisierung beobachtet. Die Alaninseitenkette von Phl p 7 mag womöglich ebenfalls in einen stabilisierenden Cluster eingebunden sein. Der *EF-hand-swap* von Calbindin D_{9k} verläuft wahrscheinlich über die Apoform und ist nur über eine hohe Energiebarriere umkehrbar. Deswegen stellt sich die Frage, ob die Dimerisierung von Phl p 7 nicht ein Kristallisationsartefakt darstellt, zumal die Kristallisation intermolekulare Kontakte begünstigt. Außerdem gibt es NMR-Strukturen von Calbindin D_{9k}, die monomer sind, sowohl mit als auch ohne Prolin 43 (Kordel *et al.* 1993; Akke *et al.* 1992).

Die carboxyterminale Helix von Bet v 4 zeigt eine erhöhte Flexibilität. Die Biegung ist beim *Phleum*-Allergen ausgeprägter und führt dazu, dass zwei Helices senkrecht aufeinander stehen. Über die Flexibilität des Carboxyterminus des Wiesenlischgrasallergens ist nichts bekannt. Vielleicht ist die Flexibilität in diesem Bereich ein gemeinsames Strukturmerkmal der Polcalcine und direkt mit ihrer biologischen Bedeutung korreliert (siehe auch Kapitel 5.5).

Sollte es sich bei den strukturellen Unterschieden nicht um ein Kristallisationsartefakt handeln, stellt sich die Frage, wie die ausgeprägte IgE-Kreuzreaktivität, wie sie für beide Allergene beobachtet wird (Engel *et al.* 1997, Niederberger *et al.* 1999), erklärt werden kann. Die Calciumbindungsschleife ist strukturell stark konserviert, auch bei Sequenzidentitäten < 25 % (Heizmann & Hunziker 1991). Phl p 7 und Bet v 4 sowie alle anderen Polcalcine weisen sehr hohe Sequenzidentitäten in diesen Bereichen auf (Abbildung 1.4–3). Diese Bereiche stellen demnach potentielle IgE-Epitope dar, was auch durch den teilweisen Verlust der IgE-Reaktivität durch den Entzug von Calcium bestätigt wird (Engel *et al.* 1997, Twardosz *et al.* 1997, Niederberger *et al.* 1999). Weitere gemeinsame lokale Strukturelemente wie α -Helices, die sich nur in ihrer räumlichen Anordnung, nicht jedoch in ihrer lokalen Struktur unterscheiden, können bei gleicher Zugänglichkeit ebenfalls kreuzreaktive Epitope darstellen.

5.4 Der Entzug von Calcium hat eine starke konformationelle Änderung von Bet v 4 zur Folge

Das CD-Spektrum von Apo-Bet v 4 im Vergleich zur Calcium-Form (Abbildung 4.2–3) zeigt, dass der Entzug von Calcium zu einer Verringerung der Elliptizität führt, wie sie auch bei anderen Polcalcinen beobachtet wurde (Niederberger *et al.* 1999, Hayek *et al.* 1998). Der Effekt war hier jedoch nicht so drastisch. Grund hierfür könnte eine unvollständige Komplexierung der Protein gebundenen Calciumionen durch EGTA bei den Experimenten der anderen Arbeitsgruppen sein. Bestätigt wird diese Annahme dadurch, dass Mutanten von Aln g 4 und Bet v 4, bei denen die Calcium komplexierenden Aspartatreste durch Alanin ersetzt wurden und somit kein Calcium mehr binden konnten, eine ebenso verminderte helixtypische Elliptizität aufwiesen wie die in dieser Arbeit präparierte Apoform von Bet v 4 (Hayek *et al.* 1998, Engel *et al.* 1997). Die Bindung von Calciumionen durch Polcalcine scheint so stark zu sein, oder aber die Zugänglichkeit ist so schlecht, dass Chelatoren wie EDTA oder EGTA sie den Proteinen nur teilweise entziehen können. Lediglich die Zugabe von EDTA während der Reinigung von Bet v 4 über eine Kochpräparation, die mit vermutlich mit einer erhöhten Flexibilität der Struktur einhergeht, vermochte einen

vollständigen Verlust von Calcium zu bewirken.

Das wird durch die Aufnahme von Schmelzkurven bestätigt (Kapitel 4.2.3). Wurde die vermeintlich Calcium freie Form von Bet v 4 durch Dialyse gegen EDTA-haltigen Puffer erzeugt, wurde wie bei der Calciumform kein Schmelzen von des Proteins beobachtet, lediglich eine stetig abnehmende Helicität. Erst die Apoform, die durch Präparation mittels Kochen in EDTA-haltigem Puffer gereinigt wurde, zeigte einen kooperativen Übergang der Entfaltung (Abbildung 4.2–5). Die Mittelpunktstemperatur des thermischen Übergangs wurde zu 47 °C bestimmt.

Bislang wurde lediglich die Sekundärstruktur von Apo-Bet v 4 betrachtet. Eine Untersuchung der Tertiärstruktur mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie blieb wegen des Fehlens von Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten (Kapitel 4.2.1) erfolglos. NMR-Spektren machten jedoch deutlich, dass in der Apoform weit drastischere strukturelle Änderungen zu erwarten sind als sie allein durch Betrachtung der Sekundärstruktur zu vermuten waren (Abbildung 4.4–2, 4.4–7). Der Entzug von Calcium führt zu einer deutlichen Änderung der Tertiärstruktur. NMR-Spektren zeigten, dass Apo-Bet v 4 im Vergleich zur Calcium gebundenen Form breitere Linien aufwies und die Signaldispersion wesentlich schlechter war (Kapitel 4.4.1 und 4.4.3), ein Phänomen, das in noch deutlicherem Ausmaß bei unstrukturierten oder aggregierten Proteinen häufig beobachtet wird. Das Vorliegen von regulären Sekundärstrukturelementen ohne Tertiärstruktur ist typisch für *Molten Globules* (Ku wajima 1996). Ein *Molten Globule State* wurde auch bei der Apoform von Calerythrin (Aitio *et al* 2001), Parvalbumin (Williams *et al.* 1986, Sudhakar *et al.* 1995) und der regulatorischen Domäne des Calcium Vektor Proteins (Théret *et al.* 2000) beobachtet. NMR-Spektren von *Molten Globule*-Proteinen ähneln denen von unstrukturierten Proteinen, unterscheiden sich aber durch eine ausgeprägtere Signaldispersion (Baum *et al.* 1989, Matthews *et al.* 2000). Die Verminderung der Dispersion beim ¹H-Spektrum im Bereich der Aliphaten (Abbildung 4.4–2) könnte als Bewegung der Sekundärstrukturelemente relativ zueinander interpretiert werden (Aitio *et al* 2001). Im Gegensatz dazu konnte von Apo-Calmodulin eine NMR-Struktur bestimmt werden (Kubinowa *et al.* 1995; Chou *et al.* 2000; Chou *et al.* 2001), die sich in der gegenseitigen Orientierung der Helices zueinander von der Calcium-Form unterscheidet.

Die strukturelle Änderung spiegelt sich auch in der verminderten IgE-Reaktivität von Apo-Bet v 4 im Vergleich zur Calciumform wider. Zwar wurde beobachtet, dass manche Patientensera auch mit Apo-Bet v 4 reagieren (vgl. Kapitel 1.4.2), dennoch lässt sich allgemein feststellen, dass die Apoform von Polcalcinen und Parvalbumin deutlich weniger immunreaktiv ist als die ihrer Calcium gebundenen Analoga (Hayek *et al.* 1998, Seiberler *et al.* 1994, Smith *et al.* 1997, Suphioglu *et al.* 1997, Bugajska-Schretter *et al.* 1998). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass

Antikörper bevorzugt an die aminoternale Calciumbindungsstelle binden (Hayek *et al.* 1998, Twardosz *et al.* 1997). Eine teilweise verbliebene Immunreaktivität von Apo-Bet v 4 lässt vermuten, dass α -Helices der Polcalcine IgE-Epitope darstellen.

5.5 Überlegungen zur physiologischen Funktion von Bet v 4

Calcium bindende Proteine können eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen, entweder durch direkte Bindung von Calcium oder durch eine Calcium abhängige Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Heizmann & Hunziker 1991, Ikura 1996, Strynadka & James 1991). Hierbei unterscheidet man Calcium-Speicherproteine wie Calbindin D_{9k} (Svenson *et al.* 1992) und Calcium-Sensorproteine wie Calmodulin (Haiech *et al.* 1981, Kawasaki & Kretsinger 1994, Ikura 1996). Häufig wird eine *open-closed*-Konformationsänderung bei der Calcium gebundenen im Vergleich zur Calcium freien Form bei Calcium-Sensorproteinen beobachtet (Zhang *et al.* 1995, Berggård *et al.* 2000, Yap *et al.* 1999, Herzberg *et al.* 1986, Ababou & Desjarlais 2001).

Alle bislang bekannten Calcium bindenden Pollenallergene werden in Pollen, jedoch nicht in anderen pflanzlichen Geweben exprimiert. Ihre physiologische Funktion ist bislang unklar (vgl. Kapitel 1.4.2). Es ist aber seit langem bekannt, dass der Calcium-Spiegel bei der Reifung der Pollen und dem Wachstum des Pollenschlauchs eine wichtige Rolle spielt (Brewbacker & Kwack 1963, Steer & Steer 1989, Rathore *et al.* 1991, Miller *et al.* 1992, Malho *et al.* 1994, Pierson *et al.* 1996, Messerli & Robinson 1997). Die genaue Rolle, die z.B. Polcalcine hierbei spielen, ist nicht geklärt. Sie könnten entweder als Calciumspeicher eine schnellen Konzentrationsänderung des cytoplasmatischen Calciumspiegels herbeiführen oder als Calcium abhängige Regulatoren mit Liganden wechselwirken. Engel *et al.* (1997) hatten Experimente mit Bet v 4 in Lilien-Pollenschläuchen durchgeführt, die zeigten, dass die Calcium-Form von Bet v 4 die cytoplasmatische Strömung stoppen und eine Depolarisation des Membranpotentials bewirken konnte, wozu Calcium-defektive Mutanten nicht in der Lage waren (Kapitel 1.4.2). Sie postulierten eine Funktion als Wachstumsinhibitor, der durch die Hydratation der Pollen das pflanzliche Gewebe schnell verlässt.

Die Bedeutung der Calciumionen für die Konformation von Bet v 4 wurde bereits eingehend beleuchtet. Vergleicht man Calcium gebundenes Bet v 4 mit anderen EF-Hand-Proteinen (Abbildung 5.5-1), fällt die große Ähnlichkeit mit der offenen Konformation der aminoterminalen Domäne von Calmodulin in seiner Calcium gebundenen Form (Chou *et al.* 2001a) auf. Eine deutlich andere Konformation, die geschlossene oder *closed* Konformation, nimmt die Apofom

von Calmodulin (Chou *et al.* 2001b) und das Calciumtransportprotein Calbindin (Akke *et al.* 1992) ein. Dieses Protein vollführt nur eine leichte Calcium-abhängige Konformationsänderung (Skelton *et al.* 1994, Chazin 1995, Ikura 1996).

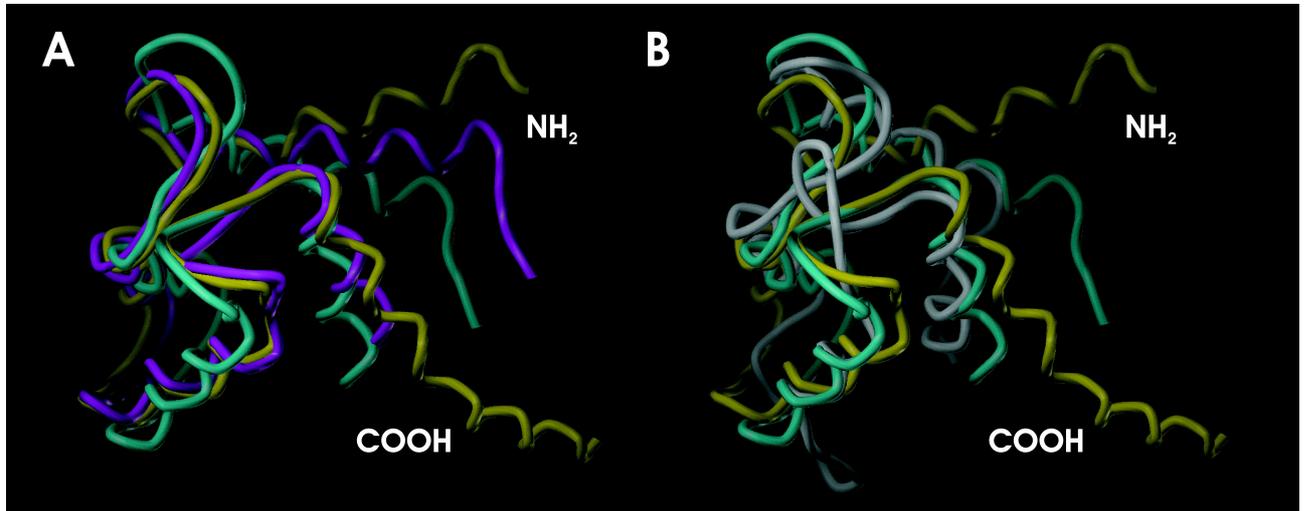


Abbildung 5.5-1: Vergleich von Bet v 4 mit anderen EF-Hand-Proteinen.

A: Überlagerung der Strukturen von Bet v 4 (gelb), der aminoterminalen Domäne von menschlichem Calmodulin in der Calcium gebundenen (magenta, PDB-Code 1J7O) bzw. Apo-Form (cyan, PDB-Code 1F7O).

B: Überlagerung der Strukturen von Bet v 4 (gelb), der Apoform der aminoterminalen Domäne von menschlichem Calmodulin (cyan) und von Calbindin D_{9k} aus Schwein (weiß, PDB-Code 1CB1)

Legt man die Strukturen von Bet v 4 und menschlichem Calcium-Calmodulin aufeinander, findet man entlang des Proteinrückgrats eine Abweichung der Strukturen von 1,70 Å, wobei die Proteine nur in denen Bereichen einander angefügt wurden, in denen im Sequenzalignment keine Lücken vorhanden sind. Dahingegen beträgt die Standardabweichung bei der Übereinanderlagerung von Bet v 4 mit der Apoform von menschlichem 3,38 Å. Ähnliches beobachtet man beim Vergleich von Bet v 4 mit Calcium gebundenem Calbindin D_{9k} (RMSD = 2,70 Å). Hier liegt die Standardabweichung ebenfalls höher als bei Holo-Calmodulin.

Die strukturelle größere Ähnlichkeit zum Calciumsensorprotein Calmodulin im Vergleich zum Calcium-Transportprotein Calbindin D_{9k} deutet auf eine regulatorische Funktion von Bet v 4 hin.

Betrachtet man die Oberfläche von Bet v 4, fällt die Hydrophobizität der Tasche auf, während andere Bereiche überwiegend polar sind (Abbildung 5.5-2). Möglicherweise kann Bet v 4 einen Liganden in der Tasche binden oder sie bildet eine Kontaktfläche zur Wechselwirkung mit einem anderen Protein. Die Bindung von Liganden an die Calciumform von Calmodulin erfolgt ebenfalls über hydrophobe Kontakte (Elshorst *et al.* 1999). Die hydrophoben Bereiche sind in der Apoform von Calmodulin nicht zugänglich, weil die beiden Domänen eine geschlossene Konformation

einnehmen. Erst durch Calciumbindung geht Calmodulin in die offene Konformation über, wobei hydrophobe Bereiche zugänglich werden (Krebs *et al.* 1984, Zhang *et al.* 1995, Kubinowa *et al.* 1995). Polcalcine findet man keine zwei Domänen, die sich wie bei Calmodulin relativ zueinander bewegen können. Vielleicht kommt den flexiblen Bereichen von Bet v 4 am Carboxy- und Aminoterminus bei der Bindung eines Liganden vielleicht eine besondere Bedeutung zu. Die Flexibilität könnte nach Ligandenbindung eingeschränkt werden, wobei die auch bei anderen Polcalcinen gefundene amphipatische COOH-terminale Helix (Abbildung 5.5-3) eine wichtige Rolle spielen könnte.

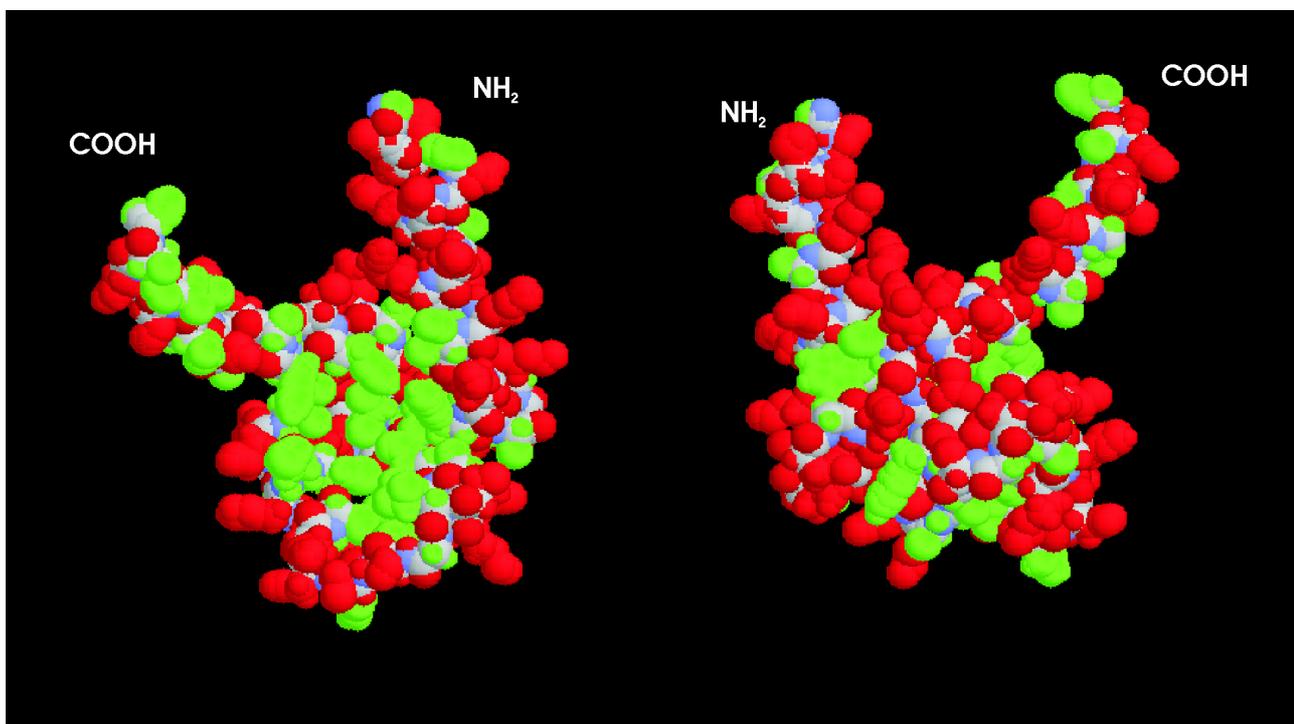


Abbildung 5.5-2: Raumerfüllende Darstellung von Bet v 4. Grüne Bereiche entsprechen hydrophoben Aminosäureseitenketten, während polare Reste rot dargestellt sind. Die Rückgrat-Kohlenstoffatome sind grau gehalten, Sauerstoff rot und Stickstoffatome blau.

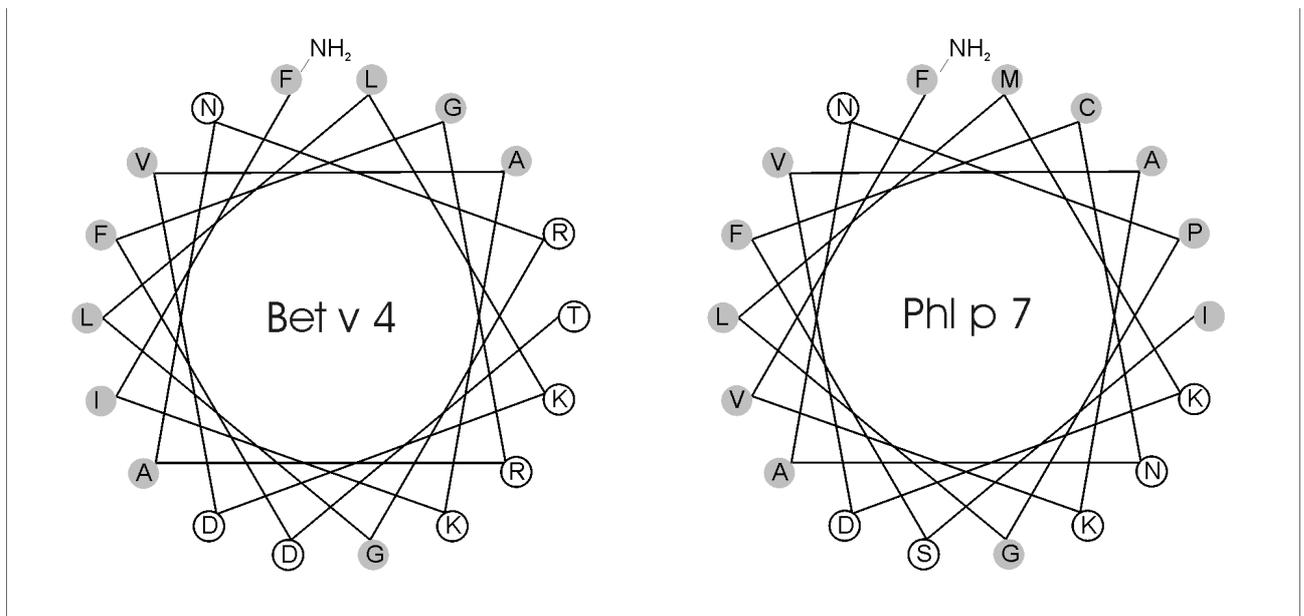


Abbildung 5.5–3: Helixrad-Darstellungen, der carboxyterminalen Helices von Bet v 4 und Phl p 7. Unpolare Aminosäurereste sind grau hinterlegt.

5.6 Ausblick

Da die α -Helices in Bet v 4 nur relativ wenig tertiäre Kontakte aufweisen, was sich in der geringen Zahl von *long range*-NOEs widerspiegelt (Tabelle 4–4, Abbildung 4.4–11, 4.5–2), erscheint für eine weitere Verfeinerung der Struktur vor allem die Messung dipolarer Kopplungskonstanten (Tjandra & Bax 1997) interessant, da diese im Gegensatz zu der lokalen Strukturinformation aus NOEs und J-Kopplungskonstanten globale Strukturinformationen liefern. Wegen der negativen Nettoladung von Bet v 4 (Abbildung 4.1–8) kommen als Medium der dazu notwendigen teilweisen Ausrichtung des Proteins z.B. ebenfalls negativ geladene filamentöse Phagen in Frage (Hansen *et al.* 1998), die bereits bei Calmodulin zum Einsatz kamen (Chou *et al.* 2000, 2001b). Damit sollte sich insbesondere die relative Lage der Helices zueinander noch präziser bestimmen lassen, was einen noch detaillierteren Vergleich mit anderen Calcium bindenden Proteinen erlaubt. Vor allem soll damit überprüft werden, ob die carboxyterminale Helix trotz ihrer erhöhten Flexibilität eine definierte Orientierung relativ zum Rest des Proteins einnimmt.

Ein detaillierter struktureller Vergleich des Birkenpollenallergens mit dem Wiesenlischgras-Allergens Phl p 7 kann erfolgen, wenn die Koordinaten frei gegeben sind, und die genauen experimentellen Bedingungen, unter denen die Struktur entstanden ist, bekannt sind. Die Untersuchung von Prolin 43-Mutanten und das Einführen eines Cysteinrestes in die

carboxyterminale α -Helix von Bet v 4 könnten Aufschluss darüber geben, ob diese Reste die Ursache der Dimerisierung von Phl p 7 sein könnten.

Durch die Kenntnis der Struktur von Bet v 4 und anderen Polcalcinen wird gezielt nach strukturellen Gemeinsamkeiten gesucht werden, die für die ausgeprägte Kreuzreaktivität verantwortlich sein könnten. Diese Bereiche können durch Mutagenese gezielt verändert werden, um damit hypoallergene Varianten der Polcalcine zu konstruieren, die bei der spezifischen Immuntherapie eingesetzt werden können, und zu einer Desensibilisierung ohne Nebenreaktionen führen können. Zudem wird man durch die Kenntnis der Struktur vieler Allergene vielleicht herausfinden, was ein Protein zum Allergen macht.

6. Zusammenfassung

Bet v 4 ist ein minores Allergen aus Birkenpollen (*Betula verrucosa*). Es gehört zur Familie der Polcalcine, kleinen Calcium bindenden Allergenen mit je 2 EF-Hand Strukturmotiven, die in einer Vielzahl höherer Pflanzen gefunden werden.

Es wurden effektive Strategien zur Präparation von rekombinantem Bet v 4 entwickelt, die auch eine Markierung mit dem Isotop ^{15}N erlaubten. Zwei hervorstechende Eigenschaften von Bet v 4 wurden bei der Reinigung ausgenutzt:

- Bet v 4 ist ein saures Protein, was eine Reinigung mittels Chromatofokussierung erlaubte.
- Aufgrund seiner Thermostabilität konnte Bet v 4 durch Kochen eines Proteinrohextraktes von hitzelabilen bakteriellen Proteinen abgetrennt werden.

Somit stand genügend Bet v 4 zur Verfügung, um eine strukturelle Charakterisierung durchzuführen und letztendlich seine Struktur mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen.

Anhand von ESI-MS, nativer PAGE und NMR-Diffusionsmessungen konnte gezeigt werden, dass Bet v 4 monomer vorliegt.

Die strukturelle Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie wies auf einen hohen Anteil α -helicaler Strukturelemente in der Calcium-Form hin, der anhand der chemischen Verschiebungen von α -Protonen, helixtypischer NOEs und vicinaler Kopplungskonstanten bestätigt wurde. Der Entzug von Calcium hat eine Verringerung des CD-Signals, jedoch keinen kompletten Verlust der Sekundärstruktur zur Folge. NMR-Spektren ließen vermuten, dass Apo-Bet v 4 keine geordnete dreidimensionale Struktur mehr besitzt. Der strukturelle Einfluss von Calcium weist mehr auf eine regulatorische Funktion von Bet v 4 als Calcium-Sensorprotein denn auf eine Funktion als Calcium-Speicherprotein.

Durch die Auswertung von homonuklearer 2D- und heteronuklearen 3D-Spektren konnte die Struktur von Calcium gebundenem Bet v 4 gelöst werden. Die beiden EF-Hand-Motive sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden und werden durch ein kurzes Faltblatt zusammengehalten. Während die beiden Calciumbindungsschleifen und die sie unmittelbar flankierenden Regionen eine starre Struktur aufweisen, sind die terminalen Bereiche experimentell unterbestimmt, was jedoch mit den Daten aus NMR-Relaxationsmessungen übereinstimmt, die in diesen Bereichen eine erhöhte Flexibilität nachwiesen. Der Aminoterminus ist relativ unstrukturiert.

Die Kenntnis der Struktur einer Vielzahl von Allergenen wird womöglich eine Antwort auf die Frage liefern, was ein Protein zum Allergen macht.

7. Summary

Bet v 4 is a minor allergen from birch (*Betula verrucosa*) pollen. It belongs to the polcalcin family. Polcalcins are small calcium binding allergens from a wide variety of plants, which possess two calcium binding domains of EF-hand type each. In the present work effective strategies for the preparation of recombinant Bet v 4 were established, which allowed ^{15}N -isotope labelling. Two striking properties of the birch pollen allergen were helpful for the purification of the protein:

- Bet v 4 is an acidic protein allowing a purification by chromatofocusing.
- Because of its thermostability Bet v 4 could be separated from *E. coli* proteins by boiling of crude bacterial lysates.

A structural characterization could be carried out and finally the three-dimensional structure of Bet v 4 was determined using NMR-spectroscopy.

Bet v 4 is a monomer as shown by ESI-MS, native PAGE and NMR diffusion experiments.

A high content of α -helical structure in calcium bound Bet v 4 was detected by CD spectroscopy and was in accordance with the NMR spectroscopic data: Chemical shifts of α -protons, typical (i, i+3)-NOEs and vicinal coupling constants indicate Bet v 4 to predominantly possess α -helical secondary structure. Depletion of calcium ions leads to a decrease of the CD-signal, but not to a complete loss of secondary structure. Apo-Bet v 4 seems to lack a distinct tertiary fold as indicated by its NMR-spectra. The remarkable conformational changes upon depletion of calcium suggests Bet v 4 to be a calcium sensor protein involved in a regulatory pathway rather than a calcium buffer protein.

The analysis of homonuclear two-dimensional and heteronuclear three-dimensional NMR spectra allowed the determination of the tertiary structure of calcium-bound Bet v 4. The two EF-hand motifs are connected by a flexible linker and are brought together by a short β -sheet. The calcium binding sites and their flanking regions exhibit rigidity, while the terminal regions are underdetermined experimentally, which is consistent with NMR relaxation data showing an increased flexibility of these regions. In accordance with the relaxation data the aminoterminal amino acid residues are rather unstructured.

The knowledge of the structure many of allergens might allow the answer to the question: What makes a protein an allergen?

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| $[\Theta]_{MRW}$ | mittlere residuale Elliptizität |
| ω | Frequenz |
| 1D | eindimensional |
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| A_{jkl} | Absorption bei jkl nm |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Amp^R | Resistenz gegen Ampicillin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure |
| Bet v 1 | <i>Betula verrucosa</i> Allergen 1 |
| Bet v 4 | <i>Betula verrucosa</i> Allergen 4 |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| $C_{\alpha}H$ | C_{α} -Proton |
| CD | Circulardichroismus |
| cDNA | <i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure |
| CSI | <i>chemical shift index</i> |
| Da | Dalton |
| deg | Grad |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| DSS | 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat |
| ϵ_{jkl} | Extinktionskoeffizient bei jkl nm |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat |
| ESI | Elektrospray Ionisation |
| FID | <i>free induction decay</i> |
| FPLC | <i>fast protein liquid chromatography</i> |

| | |
|-------------------|--|
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HSQC | <i>heteronuclear single quantum correlated spectroscopy</i> |
| IFN _γ | Interferon γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IMAC | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| M | mol/l |
| M9 | M9-Minimalmedium |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| mdeg | ¹ / ₁₀₀₀ Grad |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | molekulare Masse |
| MWCO | <i>molecular weight cutoff</i> |
| nBet v 4 | natürliches Bet v 4 |
| NMR | kernmagnetische Resonanz |
| NOE | <i>Nuclear Overhauser enhancement</i> |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i> |
| NS | Zahl der akkumulierten Spektren (<i>number of scans</i>) |
| OAc | Acetat |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| Phl p 7 | Allergen 7 aus Wiesenlischgras (<i>Phleum pratense</i>) |
| PFG | <i>pulse field gradient</i> |
| PG-SLED | <i>pulse gradient stimulated echo longitudinal encode – decode</i> |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| Pru av 1 | Hauptallergen der Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>) |
| rBet v 4 | rekombinantes Bet v 4 |

| | |
|-----------------------|---|
| RBS | Ribosomenbindungsstelle |
| RMSD | mittlere quadratische Abweichung (<i>root mean square deviation</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEC | Größenausschluss–Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>) |
| SW | Spektrales Fenster (<i>sweepwidth</i>) |
| TAE | Tris–Acetat, EDTA |
| TD | Zahl der komplexen Datenpunkte |
| TEMED | N,N,N',N'–Tetramethyldiamin |
| T _H –Zelle | T–Helfer–Zelle |
| TOCSY | <i>total correlated spectroscopy</i> |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| TPPI | <i>time proportional phase incrementation</i> |
| Tris | Trimethoxyaminomethan |
| ÜNK | Übernachtkultur |
| UV | ultraviolett |
| v/v | Volumen je Volumen |
| VIS | sichtbares Licht |
| w/v | Gewicht je Volumen |

9. Literaturverzeichnis

Ababou, A. und Desjarlais, J.R. (2001)

Solvation energetics and conformational change in EF-hand proteins.
Protein Sci. **10(2)**: 301–312

Aitio, H., Annala, A., Heikkinen, S., Thulin, E., Drakenberg, T., Kilpeläinen, I. (1999)

NMR assignments, secondary structure, and global fold of calerythrin, an EF-hand calcium-binding protein from *Saccharopolyspora erythraea*.
Protein Sci. **8(12)**: 2580–2588

Aitio, H., Laakso, T., Pihlajamaa, T., Torkkeli, M., Kilpeläinen, I., Drakenberg, T., Serimaa, R. und Annala, A. (2001)

Characterization of apo and partially saturated states of calerythrin, an EF-hand protein from *S. erythraea*: A molten globule when deprived of Ca^{2+} .
Protein Sci. **10(1)**: 74–82

Akdis, C.A. und Blaser, K. (2000)

Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens.
Int. Arch. Allergy Immunol. **121(4)**: 261–269

Akke, M., Drakenberg, T. und Chazin, W. J. (1992)

Three-dimensional solution structure of Ca^{2+} -loaded porcine calbindin D_{9k} determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Biochemistry **31**: 1011 (1992)

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997),

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res. **25**: 3389–3402

Ames, J.B., Hendricks, K.B., Strahl, T., Huttner, I.G., Hamasaki, N., Thorner, J. (2000)

Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochemistry **39(40)**: 12149–12161

Atkinson, T.P. und Kaliner, M.A. (1992)

Anaphylaxis.
Med. Clin. North Am. **76(4)**: 841–855

Ball, T., Vrtala, S., Sperr, W.R., Valent, P., Susani, M., Kraft, D. und Valenta, R. (1994)

Isolation of an immunodominant IgE hapten from an epitope expression cDNA library. Dissection of the allergic effector reaction.
J. Biol. Chem. **269(45)**: 28323–28328

Ban, C., Ramakrishnan, B., Ling, K.Y., Kung, C., Sundaralingam, M. (1994)

Structure of the recombinant *Paramecium tetraurelia* calmodulin at 1.68 Å resolution.
Acta Cryst. **D50**: 50–63

- Baum, J., Dobson, C.M., Evans, P.A. und Hanley, C.** (1986)
Characterization of a partly folded protein by NMR methods: Studies on the molten globule state of guinea-pig α -lactalbumin.
Biochemistry **28**: 7–13
- Bax, A. und Sabramanian, S.** (1986)
Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR-spectroscopy.
J. Magn. Res. **67**: 565–569
- Bax, A.** (1989)
Homocuclear Hartmann-Hahn experiments.
Methods Enzymol. **176**:151–168
- von Behring, E. und Kitasato, S.** (1991)
The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890.
Mol. Immunol. **28(12)**: 1317, 1319–1320
- Bennich, H.H., Ishizaka, K., Johansson, S.G., Rowe, D.S., Stanworth, D.R., Terry, W.D.** (1968)
Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin.
Immunochemistry **5(4)**: 327–328
- Berggård, T., Silow, M., Thulin, E. und Linse, S.** (2000)
 Ca^{2+} - and H^{+} -dependent conformational changes of Calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$
Biochemistry **39**: 6864–6873
- Bernstein, H.J.** (2000)
Recent changes to RasMol, recombining the variants.
Trends Biochem. Sci. **25(9)**: 453–455
- Bircher, A.J., Van Melle, G., Haller, E., Curty, B. und Frei, C.** (1994)
IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy.
Clin. exp. Allergy **24**: 367–374
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. **7**: 1513–1523
- de Blay, F., Pauli, G. und Bessot, J.C.** (1991)
Cross-reactions between respiratory and food allergens.
Allergy Proc. **12(5)**: 313–317
- Blum, H.E., Lehky, P., Kohler, L., Stein, E.A. und Fischer, E.H.** (1977)
Comparative properties of vertebrate parvalbumins.
J. Biol. Chem. **252**: 2834–2828
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** (1987)
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis **8**: 93–99
- Bodenhausen, G. und Ruben, D.J.** (1980)
Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy.
Chem. Phys. Lett. **69**: 185–189

Boehm, M. (1998)

Arbeiten zur Strukturaufklärung immunologisch relevanter Proteine: Bet v 1 und HIV-1 Tat.
Dissertation, Universität Bayreuth

Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G.W., Chapman, M.D., Creticos, P.J., Dayer, J.M., Durham, S.R., Demoly, P., Goldstein, R.J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P.H., Løwenstein, H., Müller, U., Norman, P.S., Reisman, R.E., Valenta, R., Valovirta, E. und Yssel, H. (1998)

Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology.
Ann. Allergy Asthma Immunol. **81(5 Pt 1)**: 401–405

Braunschweiler, L. und Ernst, R.R. (1983)

Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy.
J. Magn. Res. **53**: 521–528

Brewbaker, J.L. und Kwack, B.H. (1963)

The essential role of calcium ions in pollen germination and pollen tube growth.
Am. J. Botany **50(9)**: 859–865

Brostoff, J. & Hall, T. (1996)

Hypersensitivity type I.
In: Immunology. 4th ed. (Eds. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.), Mosby, London

Brünger, A.T. (1992)

XPLOR Version 3.1: A system for x-ray crystallography and NMR.
Howard Hughes Medical Institute & Yale University, New Haven, CT, USA

von Bubnoff, D., Geiger, E. und Bieber, T. (2001)

Antigen-presenting cells in allergy.
J. Allergy Clin. Immunol. **108(3)**: 329–339

Bugajska-Schretter, A., Elfman, L., Kapiotis, S., Rumpold, H., Valenta, R. und Spitzauer, S. (1998)

Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen contains IgE epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion.
J. Allergy Immunol. **101**: 67–74

Bugajska-Schretter, A., Grote, M., Vangelista, L., Valent, P., Sperr, W.R., Rumpold, H., Pastore, A, Reichelt, R., Valenta, R., Spitzauer S. (2000)

Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of carp parvalbumin.
Gut. **46(5)**: 661–669

Cadot, P., Diaz, J.F., Proost, P., Van Damme, J., Engelborghs, Y., Stevens, E.A. und Ceuppens, J.L. (2000)

Purification and characterization of an 18-kd allergen of birch (*Betula verrucosa*) pollen: identification as a cyclophilin.
J. Allergy Clin. Immunol. **105(2 Pt 1)**: 286–291.

Casolaro, V., Georas, S.N., Song, Z., Ono, S.J. (1996)

Biology and genetics of atopic disease.
Curr. Opin. Immunol. **8(6)**: 796–803

Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G. und Skelton, N.J. (1996)

Protein NMR Spectroscopy.
Academic Press, San Diego

Chan, M.S., Medley, G.F., Jamison, D. and Bundy, D.A.P. (1994)

The evaluation of potential global morbidity due to intestinal nematode infections.
Parasitology **109**: 373–387

Chazin, W.J. (1995)

Releasing the calcium trigger.
Nat. Struct. Biol. **2(9)**: 707–710

Chou, J.J., Delaglio, F. und Bax, A . (2000)

Measurement of ^{15}N – ^{13}C dipolar couplings in medium sized proteins.
J. Biomol. NMR, **18**: 101–105

Chou, J.J., Li, S., Klee, C.B, Bax, A. (2001a)

Solution structure of Ca^{2+} –calmodulin reveals flexible hand–like properties of its domains.
Nat. Struct. Biol. **8(11)**: 990–997

Chou, J., Li, S., Bax, A. (2001b)

Study of Conformational Rearrangement and Refinement of Structural Homology Models by the Use of Heteronuclear Dipolar Couplings.
J. Biomol. NMR **18**: 217–227

Cull, M. und McHenry, C.S. (1990)

Preparation of extracts from prokaryotes.
Methods Enzymol. **182**: 147–153

Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D. Und Alice, M.B. (1968)

Molecular beams of macroions.
J. Chem. Phys. **49**: 2240–2249

Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988)

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Res. **16(13)**: 6127–6145

Eisenmann, A. (2001)

Strukturelle Charakterisierung von Bet v 4.
Diplomarbeit, Universität Bayreuth

Else, K.J. und Finkelman F.D. (1998):

Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms.
Int. J. Parasitology **28**: 1145–1158

Elshorst, B., Hennig, M., Forsterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T. und Carafoli, E. (1999)

NMR solution structure of a complex of calmodulin with a binding peptide of the Ca^{2+} pump.
Biochemistry. 1999 **38(38)**: 12320–12332

- Engel, E., Richter, K., Obermeyer, G., Briza, P., Kungl, A.J., Simon, B., Auer, M., Ebner C., Rheinberger, H.J., Breitenbach, M. und Ferreira, F.** (1997)
Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains.
J. Biol. Chem. **272(45)**: 28630–28637
- Eriksson, N.E., Formgren H. und Svenonius E.** (1982)
Food hypersensitivity in patients with pollen allergy.
Allergy **37**: 437–443
- Fedorov, A.A., Ball, T., Mahoney, N.M., Valenta, R. und Almo, S.C.** (1997)
The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin.
Structure **5(1)**: 33–45
- Finkelman, F.D. und Urban J.F. Jr.** (2001)
The other side of the coin: the protective role of the T_H2 cytokines.
J. Allergy Clin. Immunol. **107(5)**: 772–780
- Finn R.** (1992)
John Bostock, hay fever, and the mechanism of allergy.
Lancet **340(8833)**: 1453–1455
- Fluckiger, S., Fijten, H., Whitley, P., Blaser, K., Cramer, R.** (2002)
Cyclophilins, a new family of cross-reactive allergens.
Eur. J. Immunol. **32(1)**: 10–7
- Focke, M., Hemmer, W., Hayek, B., Götz, M., Jarisch, R.** (1998)
Identification of allergens in oilseed rape (*Brassica napus*) pollen.
Int. Arch. Allergy. Immunol. **117(2)**: 105–112
- Frenkiel, T., Bauer, T.C., Carr, M.D., Birdsall, B. und Feeney, J.** (1990)
HMQC-NOESY-HMQC, a Three-Dimensional NMR Experiment Which Allows Detection of Nuclear Overhauser Effects between Protons with Overlapping Signals.
J. Magn. Reson. **90**: 420–425
- Friedrich, M.S.** (1995)
A model-free algorithm for the removal of baseline artifacts.
J. Biomol. NMR **5**: 147–153
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., Joost van Neerven, R.J., Schou, C., Løwenstein, H. und Spangfort, M.D.** (1996)
X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy.
Nat. Struct. Biol. **3(12)**: 1040–1045
- Garman, S.C., Kinet, J.P., Jardetzky, T.S.** (1999)
The crystal structure of the human high-affinity IgE receptor FcεRIα.
Annu. Rev. Immunol. **17**: 973–976
- Gaspari, A.A.** (1996)
Mechanisms of resolution of allergic contact dermatitis.
Am. J. Contact Dermat. **7(4)**: 212–219

Gell, P.G.H. und Coombs, R.R.A. (1963)

The classification of allergic reactions underlying diseases.

In: Coombs, R.R.A, Gell, P.G.H (Eds.), *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, Oxford

Gibbs, S.J., Johnson, C.S. (1991)

A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents.

J. Magn. Reson. **93**: 395–402

Godkin, A.J., Smith, K.J., Willis, A., Tejada–Simon, M.V., Zhang, J., Elliott, T. und Hill A.V. (2001)

Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide–MHC interactions.

J. Immunol. **166(11)**: 6720–6727

Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K., Ernst, R.R. (1988)

Clean–TOCSY for ¹H spin system identification in macromolecules.

J. Am. Chem. Soc. **110**: 7870–7872

Grodberg, J. und Dunn, J.J. (1988)

OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification.

J. Bacteriol. **170**, 1245–1253

Grote, M., Hayek, B., Reichelt, R., Kraft, D., Valenta, R. (1999)

Immunogold electron microscopic localization of the cross–reactive two–EF–hand calcium–binding birch pollen allergen Bet v 4 in dry and rehydrated birch pollen.

Int. Arch. Allergy Immunol. **120(4)**: 287–294

Haiech, J., Klee, C.B. und Demaille, J.G. (1981)

Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin stimulated enzymes.

Biochemistry **20**: 3890–3897

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of *E. coli*.

In: Glover, D. M. (Hrsg.). *DNA cloning. A practical approach. Vol. 1.*

IRL press, Oxford. S. 109–135.

Hansen, M.R., Mueller, L. und Pardi, A. (1998)

Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions.

Nat. Struct. Biol. **5(12)**: 1065–1074

Hayek, B., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W.R., Valent, P., Vrtala, S., Niederberger, V., Twardosz, A., Kraft, D., Valenta, R. (1998)

Molecular and immunologic characterization of a highly cross–reactive two EF–hand calcium–binding alder pollen allergen, Aln g 4: structural basis for calcium–modulated IgE recognition.

J. Immunol. **161(12)**: 7031–7039

Heizmann, C.W. und Hunziker, W. (1991)

Intracellular calcium–binding proteins: More sights than insights.

Trends Biochem. Sci. **16**: 98–103

Herzberg, O., Moulton, J. und James, M.N. (1986)

A model for the Ca²⁺–induced conformational transition of troponin C: a trigger for muscle contraction.

J. Biol. Chem. **261**: 2638–2644

Hirsch T. (1999)

Indoor allergen exposure in west and East Germany: a cause for different prevalences of asthma and atopy?
Rev. Environ. Health **14(3)**: 159–168

van Holde, K.E, Johnson, C. und Shing Ho, P. (1998)

Principles of physical biochemistry.
Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey

Holzwarth, G. und Doty, P. (1965)

The ultraviolet circular dichroism of polypeptides.
J. Am. Chem. Soc. **87**: 218–228

Hopp, T.P. und Woods, K.R. (1983)

A computer program for predicting protein antigenic determinants.
Mol. Immunol. **20(4)**: 483–489

Horak, F. (2000)

Clinical advantages of dual activity in allergic rhinitis.
Allergy **55 Suppl 64**: 34–39

Hutchinson, E.G. und Thornton, J.M. (1996)

PROMOTIF – A program to identify and analyze structural motifs in proteins.
Protein Sci. **5**: 212–220

Hwang, T.L. und Shaka, A.J. (1995)

Water Suppression That Works: Excitation sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients.
J. Magn. Res. **112A**, 275–279

Ikura, M., Bax, A., Clore, G.M. und 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. (1996)

Calcium binding and conformational response in EF-hand-proteins.
Trends Biochem. Sci. **21**: 14–17

Iribarne, J.V. & Thomson, B.A. (1976)

On the evaporation of small ions from charged droplets.
J. Chem. Phys. **64**: 2287–2294

Ishizaka, K., Ishizaka, T. (1967)

Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity.
J. Immunol. **99(6)**: 1187–1198

Jacobsen, L., Nüchel Petersen, B., Wihl, J.Å., Løwenstein, H. und Ipsen, H. (1997)

Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts IV: efficiency and safety during a 4-year follow-up study.
Allergy **50**: 914–920

Jameson, B.A. und Wolf, H. (1988)

The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants.
Comput. Appl. Biosci. **4(1)**: 181–186

- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A.T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O., Kraft, D.** (1989)
IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*.
Allergy **44(6)**: 385–395
- J. Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. und Ernst, R.R.** (1979)
Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy.
J. Chem. Phys. **71**: 4546–4553
- Jessee, J.** (1986)
New subcloning efficiency of competent cells: > 10⁶ transformants/μg.
Focus **8**, 9–10
- Jeung, E.B., Krisinger, J., Dann, J.L. und Leung, P.C.** (1992)
Cloning of the porcine Calbindin D_{9k} complementary deoxyribonucleic acid by anchored polymerase chain reaction technique.
Biol. Reprod. **47(4)**: 503–508
- Johansson, S.G., Bennich, H., Wide, L.** (1968)
A new class of immunoglobulin in human serum.
Immunology **14(2)**: 265–272
- Johnson, B.A. und Blevins, R.A.** (1994)
NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data.
J. Biomol. NMR **4**: 603–614
- Jones, J.A., Wilkins, D.K., Smith, L.J. und Dobson, C.M.** (1997)
Characterization of protein unfolding by NMR diffusion measurements.
J. Biomol. NMR **10**: 199–203
- Karamloo, F., Wangorsch, A., Kasahara, H., Davin, L.B., Hausteiner, D., Lewis, N.G. und Vieths, S.** (2001)
Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables.
Eur. J. Biochem. **268(20)**: 5310–5320
- Karplus, M.** (1959)
Contact electron–spin coupling of nuclear magnetic moments.
J. Chem. Phys. **30**: 11–15
- Kawasasaki, H. und Kretsinger, R.H.** (1994)
Calcium-binding proteins. 1: EF-hand proteins.
Protein Profile **1**: 343–527
- Kay, L.E., Torchia, D.A., Bax, A.** (1989)
Backbone dynamics as studied by 15N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease.
Biochemistry **28(23)**: 8972–8979
- Kelso, J.M.** (2000)
Pollen–food allergy syndrome.
Clin. Exp. Allergy. **30(7)**: 905–907

Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T. J., Nilges, M. und Pastore, A. (1995)

Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III.

EMBO J. **14**: 3572–3584

Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.L. und Bursill, L.A. (1997)

Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution.

Clin. Exp. Allergy **27**(3): 246–251

Kordel, J., Skelton, N. J., Akke, M. und Chazin, W. J. (1993)

High-resolution structure of calcium-loaded calbindin D_{9k}.

J. Mol. Biol. **231**: 711–734

Kraulis, P.J., Clore, G.M., Nilges, M., Jones, T.A., Pettersson, G., Knowles, J. und Gronenborn, A.M. (1989)

Determination of the Three-Dimensional Solution Structure of the C-Terminal Domain of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A Study Using Nuclear Magnetic Resonance and Hybrid Distance Geometry – Dynamical Simulated Annealing.

Biochemistry **28**: 7241–7257

Kraulis, P.J. (1991)

MOLSCRIPT: A Program to Produce both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures

J. Appl. Cryst. **24**: 946–950

Krebs J, Buerkler J, Guerini D, Brunner J, Carafoli E. (1984)

3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine, a hydrophobic, photoreactive probe, labels calmodulin and calmodulin fragments in a Ca²⁺-dependent way.

Biochemistry **23**(3): 400–403

Kretsinger, R.H. und Nockolds, C.E. (1973)

Carp muscle calcium binding protein. II. Structure determination and general description.

J. Biol. Chem. **248**: 3313–3326

Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. und Bax, A. (1994)

Measurement of HN-H α J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water-flip-back methods.

J. Biomol. NMR **4**: 871–878

Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., Bax, A. (1995)

Solution structure of calcium-free calmodulin.

Nat Struct Biol **2**: 768–776

Kumar, R., Wieben, E. und Beecher, S.J. (1996)

The molecular cloning of the complementary deoxyribonucleic acid for bovine vitamin D-dependent calcium-binding protein: structure of the full-length protein and evidence for homologies with other calcium-binding proteins of the troponin-C superfamily of proteins.

Mol. Endocrinol. **3**(2): 427–432

Kumar, V.D., Lee, L., Edwards, B.F. (1990)

Refined crystal structure of calcium-liganded carp parvalbumin 4.25 at 1.5-Å resolution.

Biochemistry **29**: 1404–1412

Kuszewski, J., Gronenborn, A.M. und 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

Kuszewski, J., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1997)

Improvements and extensions in the conformational database potential for the refinement of NMR and X-ray structures of proteins and nucleic acids.
J. Magn. Reson. **125**: 171–177

Kuszewski, J. und Clore, G.M. (2000)

Source of and solutions to problems in the refinement of protein NMR structures against torsion angle potentials of mean force.
J. Magn. Reson. **146**: 249–254

Kuwajima, K. (1996)

The molten globule state of α -lactalbumin.
FASEB J. **10**: 102–109

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680–685

Lafitte, D., Heck, A.R.J., Hill, T.J., Jumel, K., Harding, S.E. und Derrick, P.J. (1999)

Evidence of noncovalent dimerization of calmodulin.
Eur. J. Biochem. **261**: 337–344

Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993)

PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.
J. Appl. Cryst. **26**: 283–291

Laskowski, R.A., Rullmann, J.A.C., McArthur, M.W., Kapstein, R. und Thornton, J.M. (1996)

AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.
J. Biomol. NMR **8**: 477–486

Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E., Rodriguez, R. (1998)

Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca^{2+} -binding proteins (polcalcins) in allergy.
Eur. J. Biochem. **258(2)**: 454–459

Lewit-Bentley, A und Réty, S. (2000)

EF-hand calcium binding proteins.
Curr. Opin. Struct. Biol. **10**: 637–643

Live, D.H., Davis, D.G., William, C.A. und Cowburn, D. (1984)

Long range hydrogen bond mediated effects in peptides: ^{15}N NMR study of gramicidin S in water and organic solvents.
J. Am. Chem. Soc. **106**: 1939–1941

Lundback, B. (1998)

Epidemiology of rhinitis and asthma.
Clin. Exp. Allergy **28** (Suppl 2): 3–10

Malho, R., Read, N.D., Pais, M.S. und Trewavas, A.J. (1994)

Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth.

Plant J. **5**: 331–341

Marion, D., Ikura, M., Tschudin, L. und Bax, A. (1989a)

Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins.

J. Magn. Res. **85**: 393–399

Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1989b)

Overcoming the overlap problem in the assignment of ^1H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ^1H – ^{15}N Hartmann–Hahn–multiple quantum coherence and nuclear Overhauser–multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1β .

Biochemistry **28(15)**: 6150–6156

Marshall, G.D. Jr. (2000)

Therapeutic options in allergic disease: antihistamines as systematic antiallergic agents.

J. Allergy Clin. Immunol. **106(5)**: 303–309

Matthews, J.M., Norton, R.S., Hammacher, A. und Simpson, R.J. (2000)

The single mutation Phe173→Ala induces a molten globule–like state in murine interleukin–6.

Biochemistry **39**: 1942–1950

May, C.D. (1985)

The ancestry of allergy: being an account of the original experimental induction of hypersensitivity recognizing the contribution of Paul Portier.

J. Allergy Clin. Immunol. **75(4)**: 485–495

Mayr, L.M., Landt, O., Hahn, U. und Schmid, F.X. (1993)

Stability and folding kinetics of Ribonuclease T1 are strongly altered by the replacement of cis–proline 39 with alanine.

J. Mol. Biol. **231**: 897–912

McDonald, C.C. und Phillips, W.D. (1970)

In: Fasman, G.D. und Timasheff, S.N. (Hrsg.): Fine structure of Proteins and Nucleic acids, Dekker, New York

McKenzie, A.N. (2000)

Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin–4 and interleukin–13.

Pharmacol. Ther. **88(2)**: 143–151

McNeil, H.P. & Austen, K.F. (1995)

in Samter's Immunologic Diseases, eds. Frank, M.M., Austen, K.F., Claman H.M. & Unanue, E.R. (Williams & Wilkins, Baltimore), 5th Ed., pp. 185–198

Merritt, E.A. und Murphy, M.E.P. (1994)

Raster3D Version 2.0 – A Program for Photorealistic Molecular Graphics.

Acta Cryst. **D50**: 869–873

Messerli, M. und Robinson, K.R. (1997)

Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*.

J. Cell Sci. **110**: 1269–1278

- Meyer, O. und Schlegel, H.G.** (1983)
Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria.
Annu. Rev. Microbiol. **37**: 227–310
- Midoro-Horiuti, T., Brooks, E.G. und Goldblum, R.M.** (2001)
Pathogenesis-related proteins of plants as allergens.
Ann. Allergy Asthma Immunol. **87(4)**: 261–271
- Miller, D.D., Callahan, D.A., Gross, D.J., Hepler, P.K.** (1992)
Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of *Lilium*.
J. Cell Sci. **101**: 7–12
- Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D. und Gajhede, M.** (2000)
Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a F_{ab} fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1.
J. Immunol. **165(1)**: 331–338.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., O'Neil Johnson, M. und van Zijl, P.C.M.** (1995)
Improved Sensitivity of HSQC-Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation.
J. Magn. Res. **108B**: 94–98
- Mueller, G.A., Smith, A.M., Chapman, M.D., Rule, G.S. und Benjamin, D.C.** (2001)
Hydrogen exchange nuclear magnetic resonance spectroscopy mapping of antibody epitopes on the house dust mite allergen Der p 2.
J. Biol. Chem. **276(12)**: 9359–9365.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1992)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986.
Biotechnology **24**: 17–27.
- Nerkamp, Jörg** (1998)
Expression, Reinigung und spektroskopische Charakterisierung von Pru a 1, dem Haptallergen der Kirsche.
Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. und Rösch, P.** (2001a)
Allergic cross-reactivity made visible – Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1.
J. Biol. Chem. **276**: 22756–22763
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Lehmann, K., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. und Rösch, P.** (2001b)
Solution structure determination and ligand interaction studies of the major cherry allergen Pru av 1 by NMR spectroscopy.
Posterbeitrag ICMSB 2001
- Neudecker, P., Sticht, H. und Rösch, P.** (2001)
Improving the efficiency of the Gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures.
J. Biomol. NMR **21**: 373–375
- Nicolai, T., Bellach, B., Mutius, E.V., Thefeld, W., Hoffmeister, H.** (1997)
Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany.
Clin. Exp. Allergy **27(8)**: 886–892

- Niederberger, V., Hayek, B., Vrtala, S., Laffer, S., Twardosz, A., Vangelista, L., Sperr, W.R., Valent, P., Rumpold, H., Kraft, D., Ehrenberger, K., Valenta, R., Spitzauer, S.** (1999)
Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7.
FASEB J. **13(8)**: 843–856
- Nilges, M., Clore, G.M. und Gronenborn, A.M.** (1988a)
Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations.
FEBS Lett. **229**: 317–324
- Nilges, M., Clore, G.M. und Gronenborn, A.M.** (1988b)
Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms.
FEBS Lett. **239**, 129–136
- Nilges, M., Gronenborn, A.M., Brünger, A.T. und Clore, G.M.** (1988c)
Determination of three-dimensional structures of proteins by simulated annealing with interproton distance restraints. Application to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley serine proteinase inhibitor 2.
Protein Eng. **2**: 27–38
- Okada, T., Zhang, Z., Russell, S.D., Toriyama, K.** (1999)
Localization of the Ca²⁺-binding protein, Bra r 1, in anthers and pollen tubes.
Plant Cell Physiol. **40(12)**: 1243–1252
- Ortolani, C., Spano, M., Pastorello, E., Bigi, A., Ansaloni, R.** (1988)
The oral allergy syndrome.
Ann. Allergy **61(6 Pt 2)**: 47–52
- Otting, G.** (1997)
NMR studies of water bound to biological molecules.
J. Progr. Nucl. Magn. Res. **31**: 259–285
- Palmer III, A.G., Cavanagh, J., Wright, P.E. und M. Rance, M.** (1991)
Sensitivity improvement in proton detected heteronuclear correlation experiments.
J. Magn. Reson. **93**: 151–170
- Pardi, A., Billeter, M. und Wüthrich, K.** (1984)
Calibration of the angular dependence of the amide proton – C_α proton coupling constants, ³J<sub>HNH_α, in a globular protein.
J. Mol. Biol. **180**: 741–751</sub>
- Pettersson I.** (1992)
Methods of epitope mapping.
Mol. Biol. Rep. **16(3)**: 149–53
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., van Akcn, J., Hackett, G. und Hepler, P.K.** (1996)
Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth.
Dev. Biol. **174**: 160–173
- Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V.** (1992)
Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions.
J. Biomol. NMR **2(6)**: 661–665

- Pope, B.P. und Kent, H.M.** (1996)
High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*.
Nucl. Acids Res. **24**: 536–537
- Porath, J.** (1992)
Immobilized metal ion affinity chromatography.
Protein Expression Purif. **3**: 263–281
- Powell, M.J.D.** (1977)
Restart procedures for the conjugate gradient method.
Mathemat. Progr. **12**: 241–254
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. und Sasisekharan V.** (1963)
Stereochemistry of polypeptide chain configurations.
J. Mol. Biol., **7**: 95–99
- Rao, S.T., Wu, S., Satyshur, K.A., Ling, K.Y., Kung, C., Sundaralingam, M.** (1993)
Structure of *Paramecium tetraurelia* calmodulin at 1.8 Å resolution.
Protein Sci **2**: 436–447
- Rathore, K.S, Cork R.J., Robinson, K.R.** (1991)
A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes.
Dev. Biol. **148**: 612–619
- van Regenmortel, M.H.** (1989)
Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity.
Immunol Today **10(8)**: 266–272
- Riediker, M., Monn, C., Koller, T., Stahel, W.A. und Wüthrich, B.** (2001)
Air pollutants enhance rhinoconjunctivitis symptoms in pollen–allergic individuals.
Ann. Allergy Asthma Immunol. **87(4)**: 311–318.
- Rock, K.L., Rothstein, L., Benacerraf, B.** (1992)
Analysis of the association of peptides of optimal length to class I molecules on the surface of cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **89(19)**: 8918–8922
- Rolland, J.M., Douglass, J. Und O’Hehir, R.E.** (2000)
Allergen immunotherapy: current an new therapeutic strategies.
Expert Opin. Investig. Drugs **9(3)**: 515–527
- Rozwadowski, K., Zhao, R., Jackman, L., Huebert, T., Burkhart, W.E., Hemmingsen, S.M., Greenwood, J., Rothstein, S.J.** (1999)
Characterization and immunolocalization of a cytosolic calcium–binding protein from *Brassica napus* and *Arabidopsis* pollen.
Plant Physiol. **120(3)**: 787–798
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985)
Enzymatic amplification of β–globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230(4732)**: 1350–1354
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, M.** (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Sayle, R.A., Milner-White, E.J. (1995)

RASMOL: biomolecular graphics for all.
Trends Biochem. Sci. **20(9)**: 374

Schägger, H., von Jagow, G. (1987)

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Anal Biochem. **166(2)**: 368-379

Schamel, W.A.W & Schamel, K.R. (2001)

Die Blaue Native Gelelektrophorese zur Untersuchung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen.
MAI Journal **2(1)**: 33-39

Scheurer, S., Son, D.Y., Boehm, M., Karamloo, F., Franke, S., Hoffmann, A., Haustein, D. und Vieths, S. (1999)

Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen
Immunol. **36(3)**: 155-167

Schmid, F. X. (1989)

Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes.
in Creighton, T. E. (ed.), Protein structure: A practical approach, IRL Press, Oxford

Schöning, B., Ziegler, W., Vieths, S. und Balthes, W. (1996)

Apple allergy: the cDNA sequence of the major allergen to apple, determined by performing PCR with a primer based on the N-terminal amino acid sequence, is highly homologous to the sequence of the major birch pollen allergen.
J. Sci. Food Agric. **71**: 475-482

Schramm, G., Bufer, A., Petersen, A., Haas, H., Merget, R., Schlaak, M., Becker, W.M. (2001)

Discontinuous IgE-binding epitopes contain multiple continuous epitope regions: results of an epitope mapping on recombinant Hol 1 5, a major allergen from velvet grass pollen.
Clin. Exp. Allergy **31(2)**: 331-341

Schweimer, K., Sticht, H., Nerkamp, J., Boehm, M., Vieths, S., Breitenbach, S. und Rösch, P. (1999)

NMR spectroscopy reveals common structural features of the birch pollen allergen Bet v 1 and the cherry allergen Pru a 1
J. Appl. Magn. Res. **17**, 449-464

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

Scopes, R.K. (1994)

Protein purification: principles and practice.
3rd Edition. Springer, New York

Seiberler, S., Scheiner, O., Kraft, D., Lonsdale, D. und Valenta, R. (1994)

Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca²⁺ binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca²⁺.
EMBO J. **13(15)**: 3481-3486

deShazo, R.D., Kemp, S.F. (1997)

Allergic reactions to drugs and biologic agents.

JAMA. **278**(22): 1895–1906

Silverstein, A.M. (2000)

Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906.

Nat. Immunol. **1**(6): 453–455

Sindo T. (1973)

Allergy: concept and history.

J. Asthma Res. **10**(3): 141–155

Skelton, N.J., Kordel, J., Akke, M., Forsen, S. und Chazin, W.J. (1994)

Signal transduction versus buffering activity in Ca²⁺-binding proteins.

Nat. Struct. Biol. **1**(4): 239–245

Sklenár, V., Piotto, M., Leppik, R., und Saudek, V. (1993)

Gradient-tailored water suppression for ¹H-¹⁵N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity.

J. Magn. Res. **102A**: 241–245

Slichter, C.P. (1996)

Principles of magnetic resonance.

3rd ed. Springer, New York

Sluyterman L.A.Æ. und Elgersma, O. (1978)

Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles.

J. Chromatogr. **150**: 17–30

Sluyterman L.A.Æ. and J. Wijdenes (1981)

Chromatofocusing. III. The properties of a DEAE-agarose anion exchanger and its suitability for protein separations.

J. Chromatogr. **206**: 429–440

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985)

Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Anal. Biochem. **150**(1): 76–85

Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988)

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.

Gene **67**(1): 31–40

Smith, P.M., Xu, H., Swoboda, I., Singh, M.B. (1997)

Identification of a Ca²⁺ binding protein as a new Bermuda grass pollen allergen Cyn d 7: IgE cross-reactivity with oilseed rape pollen allergen Bra r 1.

Int. Arch. Allergy Immunol. **114**(3): 265–271

Steer, M.W., Steer, J.M. (1989)

Pollen tube tip growth.

New Phytol. **11**: 323–358

- Stelea, S.D., Pancoska, P., Benight, A.S. und Keiderling, T.A.** (2001)
Thermal unfolding of ribonuclease A in phosphate at neutral pH: deviations from the two-state model.
Protein Sci. **10**(5): 970–978
- Strynadka, N.C.J. und James, M.N.G.** (1991)
Towards an understanding of the effects of calcium on protein structure and function.
Curr. Opin. Struct. Biol. **1**: 905–913
- Studier, F.W. und Moffat, B.A.** (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. **189**, 113–130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W.** (1990)
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes
Meth. Enzymol. **185**, 60–89
- Sudhakar, K., Phillips, C.M., Owen, C.S. und Vanderkooi, J.M.** (1995)
Dynamics of parvalbumin studied by fluorescence emission and triplet absorption spectroscopy of tryptophan.
Biochemistry **34**: 1355–1363
- Suphioglu, C., Ferreira, F. und Knox, R.B.** (1997)
Molecular cloning and immunological characterization of Cyn d 7, a novel calcium binding allergen from Bermuda grass pollen.
FEBS Lett. **402**: 167–172
- Svensson, L.A., Thulin, E. und Forsen, S.** (1992)
Proline cis-trans isomers in calbindin D_{9k} observed by X-ray crystallography.
J. Mol. Biol. **223**: 601–606
- Talluri, S. und Wagner, G.** (1996)
An Optimized 3D NOESY-HSQC.
J. Magn. Res. **112B**: 200–205
- Théret, I., Baladi, S, Cox, J.A., Sakamoto, H. und Craescu, C.D.** (2000)
Sequential calcium binding to the regulatory domain of calcium vector protein reveals functional asymmetry and a novel mode of structural rearrangement.
Biochemistry **39**: 7920–7926
- Thomas, M.R.** (1994)
Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electrotransformation of *E. coli*.
BioTechniques **16**: 988–990
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994)
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
Nucleic Acids Res. **22**(22): 4673–4680
- Tjandra, N. und Bax, A.** (1997)
Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium.
Science **278**(5340): 1111–1114

- Toriyama, K., Okada, T., Watanabe, M., Ide, T., Ashida, T., Xu, H., Singh, M.B.** (1995)
A cDNA clone encoding an IgE-binding protein from Brassica anther has significant sequence similarity to Ca²⁺-binding proteins.
Plant Mol. Biol. **29(6)**: 1157–1165
- Tsujishita, Y. and Hurley, J.H.** (2000)
Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain.
Nat. Struct. Biol. **7(5)**: 408–414.
- Twardosz, A., Hayek, B., Seiberler, S., Vangelista, L., Elfman, L., Gronlund, H., Kraft, D., Valenta, R.** (1997)
Molecular characterization, expression in Escherichia coli, and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **239(1)**: 197–204.
- Unger, L., Harris, M.C.** (1974)
Stepping stones in allergy. Chapter 3. Immunology, infectious diseases and allergy. The early years. (Experimentation and discoveries).
Ann. Allergy **32(6)**: 348–360
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., et al.** (1992)
Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens.
J. Exp. Med. **175(2)**: 377–385.
- Varani, G., Aboul-ela, F.H. und Allain, F. H.–T.** (1996)
NMR investigation of RNA structure.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **29**: 51 – 127
- Venjaminov, S.Y. und Yang, J.T.** (1996)
Determination of protein secondary structure.
In: Fasman, G.D. (Ed.) Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press, New York
- Verdino, P.** (2001)
Allergy in 3D.
Konferenzreport ICMSB 2001
(news.bmn.com/conferences/list/view?fileyear=2001&fileacronym=ICMSB&fileday=day2&pagefile=story_4.html)
- Vial, T., Pont, J., Pham, E., Rabilloud, M., Descotes, J.** (1992)
Cefaclor-associated serum sickness-like disease: eight cases and review of the literature.
Ann. Pharmacother. **26(7–8)**: 910–914
- Vuister, G.W. und Bax, A.** (1993)
Quantitative J Correlation: A New Approach for Measuring Homonuclear Three-Bond J(HNH α) Coupling Constants in ¹⁵N-Enriched Proteins.
J. Am. Chem. Soc. **115**: 7772–7777
- Waite, K.J.** (1995)
Blackley and the development of hay fever as a disease of civilization in the nineteenth century.
Med Hist. **39(2)**: 186–196

Wawrzynczak, E.J. and Perham, R.N. (1984)

Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding human calmodulin.
Biochem. Int. **9**(2): 177–185

Wiechelman, K., Braun, R. Und Fitzpatrick, J. (1988)

Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.
Anal. Biochem. **175**: 231–237

Williams, T.C., Corson, D.C., Oikawa, K., McCubbin, W.D., Kay, C.M. und Sykes, B.D. (1986)

¹H NMR spectroscopic studies of calcium-binding proteins. 3. Solution conformations of rat α -parvalbumin.
Biochemistry **25**: 1835–1846

Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A. und Smith, L.J. (1999)

Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured using pulse field gradient NMR techniques.
Biochemistry **38**: 16424–16431

Wishart, D.S., Sykes, B.D. und Richards, F.M. (1991)

Relation between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure.
J. Mol. Biol. **222**: 311–333

Wishart, D.S., Sykes, B.D. und Richards, F.M. (1992)

The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy.
Biochemistry **31**: 1647–1651

Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S. und Sykes, B.D. (1995)

¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects.
J. Biomol. NMR **5**: 67–81

Woody, R.W. (1994)

Circular dichroism of peptides and proteins.
In: Nakanishi, K., Berova, N. und Woody, R.W. (Eds.) Circular dichroism. Principles and applications.
VCH, New York

Wüthrich, K. (1986)

NMR of Proteins and Nucleic Acids
Wiley Interscience, New York

Yang, J.T., Wu, C.C. und Martinez, H.M. (1986)

Calculation of protein conformation from circular dichroism.
Meth. Enzymol. **130**: 208–269

Yap, K.L., Ames, J.B., Swindells, M.B. und Ikura, M. (1999)

Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily.
Proteins **37**: 499–507

Yazdanbakhsh, M., van den Biggelaar, A. and Maizels, R.M. (2001)

T_H2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease.
Trends Immunol. **22**(7): 372–377

- Zhang, O., Kay, L.E., Olivier, J.P. und Forman–Kay, J.D.** (1994)
Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N–terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced–sensitivity pulsed field gradient NMR techniques
J. Biomol. NMR **4**: 845–858
- Zhang, M., Tanaka, T. und Ikura, M.** (1995)
Calcium–induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin.
Nat. Struct. Biol. **2(9)**: 758–767
- Zhang, O. und Forman–Kay, J.D.** (1997)
NMR studies of unfolded states of an SH3 domain in aqueous solution and denaturing conditions.
Biochemistry **36(13)**: 3959–3970
- Zenner, H.P.** (1987)
Rückblick und Perspektiven in der rhinologischen Allergologie.
HNO **35(8)**: 315–317

10. Anhang

10.1 Klone

| Klon | Interne Nummer in der Stammsammlung des Lehrstuhls für Biopolymere |
|---|---|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) / pET16a–betv4 | # 11/6/B |
| <i>E. coli</i> DH5 α / pGEX–6P–2–betv4_1 | # 4/9/B |
| <i>E. coli</i> BL21 / pGEX–6P–2–betv4_1 | # 4/9/C |
| <i>E. coli</i> DH5 α / pGEX–6P–2–betv4_2 | # 5/3/A |
| <i>E. coli</i> BL21 / pGEX–6P–2–betv4_2 | # 5/3/B |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) / pMW175–betv4 | # 11/6/C |

10.2 Experimentelle Randbedingungen für die Strukturrechnung

Die experimentellen Randbedingungen sind in einem verkürzten X–PLOR–Format angegeben.

10.2.1 Distanzbeschränkungen für die Strukturberechnung

```
( 2 and name HN) ( 2 and name HA) 3.5      ( 9 and name HN) ( 9 and name HB*) 3.5
( 2 and name HN) ( 2 and name HB1) 5.0      (10 and name HN) (10 and name HA) 3.5
( 2 and name HN) ( 2 and name HB2) 3.5      (10 and name HN) (10 and name HB2) 2.7
( 3 and name HN) ( 3 and name HA) 3.5      (10 and name HN) (10 and name HG2) 5.0
( 3 and name HN) ( 3 and name HB1) 3.5      (11 and name HE) (11 and name HD1) 2.7
( 3 and name HN) ( 3 and name HB2) 5.0      (11 and name HE) (11 and name HD2) 3.5
( 4 and name HN) ( 4 and name HA) 3.5      (11 and name HE) (11 and name HG1) 5.0
( 4 and name HN) ( 4 and name HB1) 3.5      (11 and name HE) (11 and name HG2) 3.5
( 4 and name HN) ( 4 and name HB2) 5.0      (11 and name HE) (11 and name HH1*) 3.5
( 4 and name HN) ( 4 and name HE1) 5.0      (11 and name HE) (11 and name HH2*) 3.5
( 6 and name HN) ( 6 and name HA) 3.5      (11 and name HN) (11 and name HA) 3.5
( 6 and name HN) ( 6 and name HA) 3.5      (11 and name HN) (11 and name HB1) 2.7
( 7 and name HN) ( 7 and name HA) 3.5      (11 and name HN) (11 and name HB2) 5.0
( 7 and name HN) ( 7 and name HB*) 3.5      (11 and name HN) (11 and name HD*) 5.0
( 8 and name HN) ( 8 and name HA) 3.5      (11 and name HN) (11 and name HG1) 5.0
( 8 and name HN) ( 8 and name HB1) 5.0      (11 and name HN) (11 and name HG2) 2.7
( 8 and name HN) ( 8 and name HB2) 5.0      (11 and name HN) (11 and name HH1*) 5.0
( 8 and name HN) ( 8 and name HE*) 5.0      (11 and name HN) (11 and name HH2*) 5.0
( 8 and name HN) ( 8 and name HG*) 2.7      (12 and name HN) (12 and name HA) 3.5
( 9 and name HN) ( 9 and name HA) 3.5      (12 and name HN) (12 and name HB1) 3.5
```

| | | | | | |
|--------------------|--------------------|-----|------------------|--------------------|-----|
| (12 and name HN) | (12 and name HB2) | 3.5 | (29 and name HN) | (29 and name HA) | 3.5 |
| (12 and name HN) | (12 and name HG1) | 5.0 | (29 and name HN) | (29 and name HB*) | 3.5 |
| (12 and name HN) | (12 and name HG2) | 5.0 | (30 and name HN) | (30 and name HA) | 3.5 |
| (13 and name HE) | (13 and name HB*) | 5.0 | (30 and name HN) | (30 and name HB1) | 2.7 |
| (13 and name HE) | (13 and name HD1) | 3.5 | (30 and name HN) | (30 and name HB2) | 3.5 |
| (13 and name HE) | (13 and name HD2) | 3.5 | (31 and name HN) | (31 and name HA) | 3.5 |
| (13 and name HE) | (13 and name HG1) | 5.0 | (31 and name HN) | (31 and name HB1) | 2.7 |
| (13 and name HE) | (13 and name HG2) | 5.0 | (31 and name HN) | (31 and name HB2) | 3.5 |
| (13 and name HE) | (13 and name HH2*) | 3.5 | (31 and name HN) | (31 and name HG) | 2.7 |
| (13 and name HN) | (13 and name HA) | 3.5 | (32 and name HN) | (32 and name HA1) | 3.5 |
| (13 and name HN) | (13 and name HB1) | 3.5 | (32 and name HN) | (32 and name HA2) | 2.7 |
| (13 and name HN) | (13 and name HB2) | 3.5 | (33 and name HN) | (33 and name HA) | 3.5 |
| (13 and name HN) | (13 and name HD*) | 5.0 | (33 and name HN) | (33 and name HB1) | 2.7 |
| (13 and name HN) | (13 and name HG1) | 5.0 | (33 and name HN) | (33 and name HB2) | 3.5 |
| (13 and name HN) | (13 and name HG2) | 5.0 | (33 and name HN) | (33 and name HG1) | 5.0 |
| (14 and name HN) | (14 and name HA) | 3.5 | (33 and name HN) | (33 and name HG2) | 5.0 |
| (14 and name HN) | (14 and name HB) | 2.7 | (34 and name HN) | (34 and name HA) | 3.5 |
| (14 and name HN) | (14 and name HD1*) | 5.0 | (34 and name HN) | (34 and name HB*) | 2.7 |
| (14 and name HN) | (14 and name HG2*) | 5.0 | (35 and name HN) | (35 and name HA) | 3.5 |
| (15 and name HN) | (15 and name HA) | 2.7 | (35 and name HN) | (35 and name HB1) | 2.7 |
| (15 and name HN) | (15 and name HB*) | 3.5 | (35 and name HN) | (35 and name HB2) | 3.5 |
| (15 and name HN) | (15 and name HD1) | 5.0 | (35 and name HN) | (35 and name HD1*) | 5.0 |
| (15 and name HN) | (15 and name HD2) | 5.0 | (35 and name HN) | (35 and name HD2*) | 5.0 |
| (15 and name HN) | (15 and name HE*) | 5.0 | (35 and name HN) | (35 and name HG) | 2.7 |
| (16 and name HN) | (16 and name HA) | 3.5 | (36 and name HN) | (36 and name HA) | 3.5 |
| (16 and name HN) | (16 and name HB*) | 2.7 | (36 and name HN) | (36 and name HB1) | 2.7 |
| (16 and name HN) | (16 and name HG*) | 5.0 | (36 and name HN) | (36 and name HB2) | 2.7 |
| (17 and name HE) | (17 and name HA) | 5.0 | (36 and name HN) | (36 and name HG1) | 5.0 |
| (17 and name HE) | (17 and name HB*) | 5.0 | (36 and name HN) | (36 and name HG2) | 5.0 |
| (17 and name HE) | (17 and name HD1) | 3.5 | (37 and name HN) | (37 and name HA) | 3.5 |
| (17 and name HE) | (17 and name HD2) | 3.5 | (37 and name HN) | (37 and name HB) | 3.5 |
| (17 and name HE) | (17 and name HG*) | 3.5 | (37 and name HN) | (37 and name HG2*) | 3.5 |
| (17 and name HE) | (17 and name HH1*) | 5.0 | (38 and name HN) | (38 and name HA) | 3.5 |
| (17 and name HE) | (17 and name HH2*) | 3.5 | (38 and name HN) | (38 and name HB1) | 2.7 |
| (17 and name HN) | (17 and name HA) | 3.5 | (38 and name HN) | (38 and name HB2) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (17 and name HB1) | 2.7 | (38 and name HN) | (38 and name HG) | 5.0 |
| (17 and name HN) | (17 and name HB2) | 3.5 | (39 and name HN) | (39 and name HA1) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (17 and name HD1) | 5.0 | (39 and name HN) | (39 and name HA2) | 2.7 |
| (17 and name HN) | (17 and name HG1) | 5.0 | (40 and name HN) | (40 and name HA) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (17 and name HG2) | 5.0 | (40 and name HN) | (40 and name HB1) | 2.7 |
| (18 and name HN) | (18 and name HA) | 3.5 | (41 and name HN) | (41 and name HA) | 3.5 |
| (18 and name HN) | (18 and name HB1) | 2.7 | (41 and name HN) | (41 and name HB) | 2.7 |
| (18 and name HN) | (18 and name HB2) | 3.5 | (41 and name HN) | (41 and name HD1*) | 5.0 |
| (18 and name HN) | (18 and name HD*) | 3.5 | (41 and name HN) | (41 and name HG11) | 5.0 |
| (18 and name HN) | (18 and name HE*) | 5.0 | (41 and name HN) | (41 and name HG12) | 5.0 |
| (19 and name HN) | (19 and name HA) | 3.5 | (41 and name HN) | (41 and name HG2*) | 3.5 |
| (19 and name HN) | (19 and name HB1) | 2.7 | (42 and name HN) | (42 and name HA) | 3.5 |
| (19 and name HN) | (19 and name HB2) | 2.7 | (42 and name HN) | (42 and name HB) | 3.5 |
| (20 and name HN) | (20 and name HA) | 3.5 | (42 and name HN) | (42 and name HG2*) | 2.7 |
| (20 and name HN) | (20 and name HB*) | 2.7 | (44 and name HN) | (44 and name HA) | 3.5 |
| (21 and name HD21) | (21 and name HA) | 5.0 | (44 and name HN) | (44 and name HB1) | 2.7 |
| (21 and name HD21) | (21 and name HD2) | 2.7 | (44 and name HN) | (44 and name HB2) | 2.7 |
| (21 and name HN) | (21 and name HA) | 3.5 | (45 and name HN) | (45 and name HA) | 3.5 |
| (21 and name HN) | (21 and name HB1) | 5.0 | (45 and name HN) | (45 and name HB1) | 2.7 |
| (21 and name HN) | (21 and name HB2) | 3.5 | (45 and name HN) | (45 and name HG1) | 3.5 |
| (21 and name HN) | (21 and name HD21) | 5.0 | (45 and name HN) | (45 and name HG2) | 5.0 |
| (21 and name HN) | (21 and name HD21) | 5.0 | (46 and name HN) | (46 and name HA) | 3.5 |
| (22 and name HN) | (22 and name HA1) | 2.7 | (46 and name HN) | (46 and name HB) | 3.5 |
| (22 and name HN) | (22 and name HA2) | 2.7 | (46 and name HN) | (46 and name HG1*) | 2.7 |
| (23 and name HN) | (23 and name HA) | 3.5 | (46 and name HN) | (46 and name HG2*) | 3.5 |
| (23 and name HN) | (23 and name HB1) | 5.0 | (47 and name HN) | (47 and name HA) | 3.5 |
| (23 and name HN) | (23 and name HB2) | 3.5 | (47 and name HN) | (47 and name HB1) | 2.7 |
| (24 and name HN) | (24 and name HA1) | 3.5 | (47 and name HN) | (47 and name HD1) | 5.0 |
| (24 and name HN) | (24 and name HA2) | 2.7 | (47 and name HN) | (47 and name HD2) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (25 and name HA) | 3.5 | (47 and name HN) | (47 and name HE1) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (25 and name HB1) | 3.5 | (47 and name HN) | (47 and name HE2) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (25 and name HD1) | 5.0 | (47 and name HN) | (47 and name HG1) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (25 and name HG1) | 3.5 | (47 and name HN) | (47 and name HG2) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (25 and name HG2) | 5.0 | (48 and name HN) | (48 and name HA) | 3.5 |
| (26 and name HN) | (26 and name HA) | 3.5 | (48 and name HN) | (48 and name HB1) | 2.7 |
| (26 and name HN) | (26 and name HB) | 2.7 | (49 and name HN) | (49 and name HA) | 2.7 |
| (26 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 | (49 and name HN) | (49 and name HB1) | 3.5 |
| (26 and name HN) | (26 and name HG12) | 3.5 | (49 and name HN) | (49 and name HB2) | 3.5 |
| (27 and name HN) | (27 and name HA) | 3.5 | (49 and name HN) | (49 and name HB2) | 3.5 |
| (27 and name HN) | (27 and name HB1) | 5.0 | (49 and name HN) | (49 and name HG1) | 5.0 |
| (27 and name HN) | (27 and name HB2) | 3.5 | (49 and name HN) | (49 and name HG2) | 3.5 |
| (27 and name HN) | (27 and name HG) | 5.0 | (50 and name HN) | (50 and name HA) | 3.5 |
| (28 and name HN) | (28 and name HA) | 3.5 | (50 and name HN) | (50 and name HB1) | 3.5 |
| (28 and name HN) | (28 and name HB*) | 3.5 | (50 and name HN) | (50 and name HB2) | 3.5 |

| | | | | | |
|--------------------|--------------------|-----|-------------------|--------------------|-----|
| (50 and name HN) | (50 and name HG1) | 3.5 | (71 and name HN) | (71 and name HB1) | 2.7 |
| (50 and name HN) | (50 and name HG2) | 5.0 | (71 and name HN) | (71 and name HB2) | 2.7 |
| (51 and name HN) | (51 and name HA) | 5.0 | (71 and name HN) | (71 and name HD2) | 5.0 |
| (51 and name HN) | (51 and name HB*) | 2.7 | (72 and name HN) | (72 and name HA) | 3.5 |
| (52 and name HN) | (52 and name HA) | 3.5 | (72 and name HN) | (72 and name HB*) | 2.7 |
| (52 and name HN) | (52 and name HB1) | 2.7 | (73 and name HN) | (73 and name HA) | 3.5 |
| (52 and name HN) | (52 and name HB2) | 3.5 | (73 and name HN) | (73 and name HB*) | 2.7 |
| (52 and name HN) | (52 and name HG1) | 3.5 | (74 and name HD*) | (74 and name HA) | 5.0 |
| (52 and name HN) | (52 and name HG2) | 5.0 | (74 and name HD*) | (74 and name HB*) | 5.0 |
| (53 and name HN) | (53 and name HA) | 3.5 | (74 and name HE) | (74 and name HB*) | 5.0 |
| (53 and name HN) | (53 and name HB) | 5.0 | (74 and name HE) | (74 and name HD*) | 3.5 |
| (53 and name HN) | (53 and name HD1*) | 5.0 | (74 and name HE) | (74 and name HG*) | 5.0 |
| (53 and name HN) | (53 and name HG11) | 5.0 | (74 and name HE) | (74 and name HH*) | 3.5 |
| (53 and name HN) | (53 and name HG12) | 5.0 | (74 and name HN) | (74 and name HA) | 3.5 |
| (53 and name HN) | (53 and name HG2*) | 3.5 | (74 and name HN) | (74 and name HB*) | 2.7 |
| (54 and name HN) | (54 and name HA) | 3.5 | (74 and name HN) | (74 and name HD1) | 5.0 |
| (54 and name HN) | (54 and name HB1) | 2.7 | (74 and name HN) | (74 and name HD2) | 5.0 |
| (54 and name HN) | (54 and name HB2) | 2.7 | (74 and name HN) | (74 and name HG*) | 3.5 |
| (55 and name HN) | (55 and name HA) | 3.5 | (75 and name HN) | (75 and name HA1) | 3.5 |
| (55 and name HN) | (55 and name HB) | 3.5 | (75 and name HN) | (75 and name HA2) | 3.5 |
| (55 and name HN) | (55 and name HG2*) | 3.5 | (76 and name HN) | (76 and name HA) | 3.5 |
| (56 and name HN) | (56 and name HA) | 3.5 | (76 and name HN) | (76 and name HB1) | 2.7 |
| (56 and name HN) | (56 and name HB1) | 5.0 | (76 and name HN) | (76 and name HD1*) | 5.0 |
| (56 and name HN) | (56 and name HB2) | 3.5 | (77 and name HN) | (77 and name HA) | 3.5 |
| (57 and name HN) | (57 and name HA1) | 3.5 | (77 and name HN) | (77 and name HB1) | 2.7 |
| (57 and name HN) | (57 and name HA2) | 2.7 | (77 and name HN) | (77 and name HD1*) | 3.5 |
| (58 and name HN) | (58 and name HA) | 3.5 | (77 and name HN) | (77 and name HD2*) | 3.5 |
| (58 and name HN) | (58 and name HB1) | 3.5 | (78 and name HN) | (78 and name HA) | 3.5 |
| (58 and name HN) | (58 and name HB2) | 3.5 | (78 and name HN) | (78 and name HB1) | 2.7 |
| (59 and name HN) | (59 and name HA1) | 3.5 | (78 and name HN) | (78 and name HD1) | 5.0 |
| (59 and name HN) | (59 and name HA2) | 2.7 | (78 and name HN) | (78 and name HD2) | 5.0 |
| (60 and name HN) | (60 and name HA) | 3.5 | (78 and name HN) | (78 and name HG1) | 3.5 |
| (60 and name HN) | (60 and name HB1) | 5.0 | (78 and name HN) | (78 and name HG2) | 3.5 |
| (60 and name HN) | (60 and name HB2) | 3.5 | (79 and name HN) | (79 and name HA) | 3.5 |
| (60 and name HN) | (60 and name HD*) | 3.5 | (79 and name HN) | (79 and name HB1) | 3.5 |
| (60 and name HN) | (60 and name HE*) | 5.0 | (79 and name HN) | (79 and name HB2) | 3.5 |
| (61 and name HN) | (61 and name HA) | 3.5 | (80 and name HN) | (80 and name HA) | 3.5 |
| (61 and name HN) | (61 and name HB) | 2.7 | (80 and name HN) | (80 and name HB) | 3.5 |
| (61 and name HN) | (61 and name HG1*) | 5.0 | (80 and name HN) | (80 and name HG1*) | 3.5 |
| (61 and name HN) | (61 and name HG2*) | 5.0 | (80 and name HN) | (80 and name HG2*) | 3.5 |
| (62 and name HN) | (62 and name HA) | 3.5 | (81 and name HN) | (81 and name HA) | 3.5 |
| (62 and name HN) | (62 and name HB1) | 3.5 | (81 and name HN) | (81 and name HB*) | 2.7 |
| (62 and name HN) | (62 and name HB2) | 3.5 | (82 and name HN) | (82 and name HA) | 2.7 |
| (63 and name HN) | (63 and name HA) | 3.5 | (82 and name HN) | (82 and name HB1) | 2.7 |
| (63 and name HN) | (63 and name HB1) | 2.7 | (82 and name HN) | (82 and name HB2) | 3.5 |
| (63 and name HN) | (63 and name HB2) | 3.5 | (82 and name HN) | (82 and name HD*) | 5.0 |
| (63 and name HN) | (63 and name HD*) | 5.0 | (82 and name HN) | (82 and name HG*) | 3.5 |
| (64 and name HE21) | (64 and name HE2) | 2.7 | (83 and name HN) | (83 and name HA) | 3.5 |
| (64 and name HE21) | (64 and name HG2) | 3.5 | (83 and name HN) | (83 and name HB) | 3.5 |
| (64 and name HE22) | (64 and name HA) | 5.0 | (83 and name HN) | (83 and name HD1*) | 5.0 |
| (64 and name HE22) | (64 and name HG) | 5.0 | (83 and name HN) | (83 and name HG11) | 3.5 |
| (64 and name HN) | (64 and name HA) | 3.5 | (83 and name HN) | (83 and name HG12) | 3.5 |
| (64 and name HN) | (64 and name HB1) | 3.5 | (84 and name HN) | (84 and name HA) | 3.5 |
| (64 and name HN) | (64 and name HB2) | 5.0 | (84 and name HN) | (84 and name HB1) | 5.0 |
| (64 and name HN) | (64 and name HG1) | 3.5 | (84 and name HN) | (84 and name HB2) | 3.5 |
| (64 and name HN) | (64 and name HG2) | 2.7 | (84 and name HN) | (84 and name HD*) | 5.0 |
| (65 and name HN) | (65 and name HA) | 3.5 | (2 and name HA) | (1 and name HA) | 5.0 |
| (65 and name HN) | (65 and name HG1) | 5.0 | (3 and name HN) | (2 and name HB1) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (66 and name HA) | 3.5 | (3 and name HN) | (2 and name HB2) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (66 and name HB1) | 3.5 | (3 and name HN) | (2 and name HN) | 3.5 |
| (66 and name HN) | (66 and name HB2) | 2.7 | (3 and name HN) | (2 and name HN) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (66 and name HD*) | 5.0 | (3 and name HN) | (4 and name HB2) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (66 and name HE*) | 5.0 | (4 and name HN) | (3 and name HA) | 3.5 |
| (67 and name HN) | (67 and name HA) | 3.5 | (4 and name HN) | (3 and name HB1) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (67 and name HB) | 3.5 | (4 and name HN) | (3 and name HB2) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (67 and name HG1) | 3.5 | (4 and name HN) | (5 and name HA) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (67 and name HG2*) | 3.5 | (4 and name HN) | (5 and name HD*) | 2.7 |
| (68 and name HN) | (68 and name HA) | 3.5 | (10 and name HN) | (9 and name HB*) | 3.5 |
| (68 and name HN) | (68 and name HB*) | 3.5 | (10 and name HN) | (9 and name HN) | 3.5 |
| (69 and name HN) | (69 and name HA) | 3.5 | (11 and name HN) | (10 and name HB2) | 2.7 |
| (69 and name HN) | (69 and name HB1) | 2.7 | (11 and name HN) | (10 and name HN) | 3.5 |
| (69 and name HN) | (69 and name HB2) | 2.7 | (12 and name HN) | (11 and name HN) | 3.5 |
| (69 and name HN) | (69 and name HD*) | 5.0 | (13 and name HN) | (12 and name HN) | 3.5 |
| (70 and name HN) | (70 and name HA1) | 3.5 | (13 and name HN) | (14 and name HN) | 3.5 |
| (70 and name HN) | (70 and name HA2) | 3.5 | (14 and name HN) | (13 and name HG2) | 5.0 |
| (71 and name HE) | (71 and name HA) | 5.0 | (14 and name HN) | (13 and name HN) | 3.5 |
| (71 and name HE) | (71 and name HD*) | 3.5 | (14 and name HN) | (15 and name HA) | 5.0 |
| (71 and name HE) | (71 and name HH*) | 3.5 | (14 and name HN) | (15 and name HA) | 5.0 |
| (71 and name HN) | (71 and name HA) | 3.5 | (14 and name HN) | (15 and name HN) | 3.5 |

| | | | | | |
|------------------|--------------------|-----|------------------|--------------------|-----|
| (15 and name HN) | (14 and name HN) | 3.5 | (42 and name HN) | (41 and name HN) | 5.0 |
| (16 and name HN) | (15 and name HA) | 3.5 | (44 and name HN) | (45 and name HB2) | 5.0 |
| (16 and name HN) | (15 and name HD2) | 3.5 | (45 and name HN) | (44 and name HA) | 5.0 |
| (16 and name HN) | (15 and name HD2) | 5.0 | (45 and name HN) | (44 and name HB1) | 5.0 |
| (16 and name HN) | (15 and name HE2) | 5.0 | (45 and name HN) | (44 and name HB2) | 3.5 |
| (16 and name HN) | (15 and name HN) | 3.5 | (45 and name HN) | (46 and name HG1*) | 5.0 |
| (16 and name HN) | (17 and name HN) | 3.5 | (45 and name HN) | (46 and name HN) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (16 and name HN) | 3.5 | (46 and name HN) | (45 and name HA) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (18 and name HD*) | 5.0 | (46 and name HN) | (45 and name HB1) | 3.5 |
| (17 and name HN) | (18 and name HN) | 3.5 | (46 and name HN) | (45 and name HB2) | 5.0 |
| (18 and name HN) | (17 and name HA) | 5.0 | (46 and name HN) | (45 and name HG1) | 5.0 |
| (18 and name HN) | (17 and name HB2) | 3.5 | (46 and name HN) | (45 and name HG2) | 5.0 |
| (19 and name HN) | (18 and name HB1) | 3.5 | (46 and name HN) | (47 and name HA) | 5.0 |
| (19 and name HN) | (18 and name HD*) | 5.0 | (46 and name HN) | (47 and name HB1) | 5.0 |
| (19 and name HN) | (18 and name HE*) | 5.0 | (46 and name HN) | (47 and name HB2) | 5.0 |
| (20 and name HN) | (19 and name HA) | 2.7 | (47 and name HN) | (46 and name HA) | 5.0 |
| (20 and name HN) | (19 and name HN) | 5.0 | (47 and name HN) | (46 and name HG1*) | 5.0 |
| (20 and name HN) | (21 and name HN) | 5.0 | (47 and name HN) | (48 and name HA) | 5.0 |
| (21 and name HN) | (20 and name HA) | 5.0 | (48 and name HN) | (47 and name HA) | 5.0 |
| (21 and name HN) | (20 and name HB*) | 3.5 | (48 and name HN) | (47 and name HB1) | 5.0 |
| (21 and name HN) | (20 and name HB*) | 3.5 | (48 and name HN) | (47 and name HB2) | 3.5 |
| (21 and name HN) | (22 and name HA1) | 5.0 | (48 and name HN) | (47 and name HG1) | 5.0 |
| (21 and name HN) | (22 and name HA2) | 5.0 | (48 and name HN) | (47 and name HN) | 3.5 |
| (21 and name HN) | (22 and name HN) | 3.5 | (48 and name HN) | (49 and name HG2) | 5.0 |
| (22 and name HN) | (21 and name HA) | 5.0 | (49 and name HN) | (48 and name HA) | 5.0 |
| (22 and name HN) | (21 and name HB2) | 5.0 | (49 and name HN) | (48 and name HB1) | 3.5 |
| (23 and name HN) | (22 and name HA1) | 3.5 | (49 and name HN) | (48 and name HN) | 3.5 |
| (23 and name HN) | (22 and name HN) | 3.5 | (49 and name HN) | (50 and name HN) | 3.5 |
| (23 and name HN) | (24 and name HA2) | 5.0 | (50 and name HN) | (51 and name HB*) | 5.0 |
| (24 and name HN) | (23 and name HA) | 5.0 | (51 and name HN) | (50 and name HA) | 5.0 |
| (24 and name HN) | (23 and name HB2) | 5.0 | (51 and name HN) | (50 and name HB2) | 3.5 |
| (24 and name HN) | (23 and name HN) | 3.5 | (51 and name HN) | (50 and name HG1) | 5.0 |
| (24 and name HN) | (25 and name HN) | 2.7 | (51 and name HN) | (50 and name HN) | 3.5 |
| (25 and name HN) | (24 and name HA1) | 3.5 | (52 and name HN) | (51 and name HB*) | 3.5 |
| (25 and name HN) | (24 and name HA2) | 3.5 | (53 and name HN) | (52 and name HB1) | 5.0 |
| (25 and name HN) | (26 and name HN) | 5.0 | (53 and name HN) | (52 and name HB2) | 3.5 |
| (26 and name HN) | (25 and name HA) | 2.7 | (53 and name HN) | (52 and name HN) | 3.5 |
| (26 and name HN) | (25 and name HB2) | 3.5 | (53 and name HN) | (54 and name HB1) | 5.0 |
| (27 and name HN) | (26 and name HA) | 2.7 | (53 and name HN) | (54 and name HN) | 2.7 |
| (27 and name HN) | (26 and name HB) | 5.0 | (54 and name HN) | (53 and name HA) | 5.0 |
| (27 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 | (54 and name HN) | (53 and name HD1*) | 5.0 |
| (27 and name HN) | (26 and name HG11) | 5.0 | (54 and name HN) | (53 and name HG2*) | 5.0 |
| (27 and name HN) | (26 and name HG12) | 5.0 | (54 and name HN) | (53 and name HN) | 3.5 |
| (28 and name HN) | (27 and name HA) | 3.5 | (55 and name HN) | (54 and name HA) | 2.7 |
| (28 and name HN) | (27 and name HG) | 5.0 | (55 and name HN) | (54 and name HB1) | 5.0 |
| (29 and name HN) | (28 and name HN) | 3.5 | (55 and name HN) | (56 and name HB2) | 5.0 |
| (29 and name HN) | (30 and name HN) | 3.5 | (56 and name HN) | (55 and name HA) | 3.5 |
| (30 and name HN) | (29 and name HA) | 3.5 | (56 and name HN) | (55 and name HB) | 5.0 |
| (30 and name HN) | (29 and name HA) | 3.5 | (56 and name HN) | (55 and name HG2*) | 5.0 |
| (30 and name HN) | (29 and name HB*) | 3.5 | (56 and name HN) | (57 and name HA2) | 5.0 |
| (30 and name HN) | (29 and name HN) | 3.5 | (56 and name HN) | (57 and name HN) | 2.7 |
| (30 and name HN) | (31 and name HN) | 3.5 | (57 and name HN) | (56 and name HA) | 3.5 |
| (31 and name HN) | (30 and name HA) | 3.5 | (57 and name HN) | (56 and name HB1) | 5.0 |
| (31 and name HN) | (30 and name HB1) | 3.5 | (57 and name HN) | (56 and name HB2) | 5.0 |
| (31 and name HN) | (30 and name HN) | 3.5 | (57 and name HN) | (58 and name HA) | 5.0 |
| (32 and name HN) | (31 and name HN) | 3.5 | (58 and name HN) | (57 and name HA) | 5.0 |
| (32 and name HN) | (33 and name HG1) | 5.0 | (58 and name HN) | (57 and name HA2) | 5.0 |
| (32 and name HN) | (33 and name HG2) | 5.0 | (58 and name HN) | (57 and name HN) | 3.5 |
| (33 and name HN) | (32 and name HA2) | 5.0 | (59 and name HN) | (58 and name HA) | 5.0 |
| (33 and name HN) | (32 and name HN) | 5.0 | (59 and name HN) | (58 and name HN) | 2.7 |
| (34 and name HN) | (33 and name HB2) | 3.5 | (59 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (34 and name HN) | (33 and name HG2) | 5.0 | (60 and name HN) | (59 and name HA2) | 3.5 |
| (34 and name HN) | (33 and name HN) | 3.5 | (60 and name HN) | (59 and name HN) | 2.7 |
| (34 and name HN) | (35 and name HA) | 3.5 | (60 and name HN) | (61 and name HN) | 5.0 |
| (35 and name HN) | (34 and name HA) | 3.5 | (61 and name HN) | (60 and name HA) | 2.7 |
| (36 and name HN) | (35 and name HA) | 5.0 | (61 and name HN) | (60 and name HB1) | 5.0 |
| (36 and name HN) | (35 and name HN) | 3.5 | (61 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (37 and name HN) | (36 and name HA) | 3.5 | (62 and name HN) | (61 and name HA) | 5.0 |
| (37 and name HN) | (36 and name HN) | 3.5 | (62 and name HN) | (61 and name HB) | 5.0 |
| (37 and name HN) | (38 and name HB2) | 5.0 | (62 and name HN) | (63 and name HD*) | 5.0 |
| (38 and name HN) | (37 and name HA) | 3.5 | (63 and name HN) | (62 and name HA) | 5.0 |
| (38 and name HN) | (37 and name HG2*) | 5.0 | (63 and name HN) | (62 and name HB1) | 5.0 |
| (39 and name HN) | (38 and name HA) | 3.5 | (63 and name HN) | (62 and name HN) | 5.0 |
| (39 and name HN) | (38 and name HB1) | 5.0 | (64 and name HN) | (63 and name HB1) | 5.0 |
| (39 and name HN) | (38 and name HB1) | 5.0 | (64 and name HN) | (63 and name HD*) | 5.0 |
| (39 and name HN) | (38 and name HB2) | 5.0 | (64 and name HN) | (63 and name HN) | 3.5 |
| (40 and name HN) | (39 and name HA1) | 3.5 | (64 and name HN) | (65 and name HB1) | 5.0 |
| (40 and name HN) | (39 and name HN) | 2.7 | (65 and name HN) | (64 and name HG1) | 5.0 |
| (42 and name HN) | (41 and name HA) | 2.7 | (65 and name HN) | (64 and name HN) | 3.5 |

| | | | | | |
|------------------|--------------------|-----|------------------|--------------------|-----|
| (65 and name HN) | (66 and name HD*) | 5.0 | (14 and name HN) | (17 and name HG2) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (65 and name HA) | 5.0 | (15 and name HN) | (12 and name HA) | 3.5 |
| (66 and name HN) | (67 and name HG2*) | 5.0 | (16 and name HN) | (13 and name HA) | 3.5 |
| (67 and name HN) | (66 and name HB1) | 5.0 | (17 and name HN) | (14 and name HA) | 3.5 |
| (67 and name HN) | (66 and name HB2) | 3.5 | (17 and name HN) | (14 and name HA) | 3.5 |
| (67 and name HN) | (66 and name HB2) | 3.5 | (17 and name HN) | (14 and name HG2*) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (66 and name HD*) | 5.0 | (18 and name HN) | (15 and name HA) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (66 and name HN) | 3.5 | (19 and name HN) | (16 and name HA) | 5.0 |
| (68 and name HN) | (67 and name HA) | 3.5 | (19 and name HN) | (16 and name HG1) | 5.0 |
| (68 and name HN) | (67 and name HB) | 5.0 | (19 and name HN) | (17 and name HN) | 5.0 |
| (68 and name HN) | (67 and name HG2*) | 5.0 | (21 and name HN) | (19 and name HA) | 5.0 |
| (68 and name HN) | (69 and name HN) | 3.5 | (22 and name HN) | (20 and name HA) | 5.0 |
| (69 and name HN) | (68 and name HB1) | 3.5 | (23 and name HN) | (21 and name HD2*) | 5.0 |
| (70 and name HN) | (69 and name HA) | 3.5 | (24 and name HN) | (22 and name HA1) | 5.0 |
| (70 and name HN) | (69 and name HB2) | 3.5 | (24 and name HN) | (22 and name HN) | 5.0 |
| (70 and name HN) | (69 and name HD*) | 5.0 | (25 and name HN) | (23 and name HA) | 5.0 |
| (70 and name HN) | (69 and name HN) | 3.5 | (27 and name HN) | (30 and name HB1) | 2.7 |
| (70 and name HN) | (71 and name HN) | 3.5 | (27 and name HN) | (30 and name HN) | 5.0 |
| (71 and name HN) | (70 and name HA1) | 3.5 | (27 and name HN) | (31 and name HG) | 5.0 |
| (71 and name HN) | (70 and name HA2) | 3.5 | (28 and name HN) | (30 and name HN) | 5.0 |
| (71 and name HN) | (72 and name HB*) | 5.0 | (30 and name HN) | (27 and name HA) | 5.0 |
| (72 and name HN) | (71 and name HA) | 3.5 | (30 and name HN) | (27 and name HN) | 5.0 |
| (72 and name HN) | (71 and name HB1) | 5.0 | (31 and name HN) | (26 and name HG11) | 5.0 |
| (72 and name HN) | (71 and name HB2) | 3.5 | (31 and name HN) | (26 and name HG12) | 5.0 |
| (72 and name HN) | (71 and name HN) | 2.7 | (31 and name HN) | (27 and name HN) | 5.0 |
| (73 and name HN) | (72 and name HA) | 3.5 | (31 and name HN) | (34 and name HB*) | 5.0 |
| (73 and name HN) | (72 and name HB) | 3.5 | (32 and name HN) | (29 and name HA) | 3.5 |
| (73 and name HN) | (72 and name HN) | 3.5 | (32 and name HN) | (34 and name HN) | 5.0 |
| (73 and name HN) | (74 and name HA) | 5.0 | (33 and name HN) | (30 and name HA) | 3.5 |
| (74 and name HN) | (73 and name HA) | 3.5 | (35 and name HN) | (32 and name HA1) | 3.5 |
| (74 and name HN) | (73 and name HN) | 3.5 | (35 and name HN) | (32 and name HA2) | 5.0 |
| (75 and name HN) | (74 and name HA) | 3.5 | (36 and name HN) | (33 and name HA) | 3.5 |
| (75 and name HN) | (74 and name HB1) | 3.5 | (37 and name HN) | (34 and name HA) | 3.5 |
| (75 and name HN) | (74 and name HD1) | 5.0 | (38 and name HN) | (35 and name HA) | 5.0 |
| (75 and name HN) | (74 and name HN) | 3.5 | (38 and name HN) | (35 and name HD2*) | 5.0 |
| (76 and name HN) | (75 and name HA1) | 3.5 | (39 and name HN) | (36 and name HA) | 3.5 |
| (76 and name HN) | (75 and name HA2) | 2.7 | (40 and name HN) | (38 and name HB2) | 5.0 |
| (76 and name HN) | (75 and name HN) | 3.5 | (42 and name HN) | (45 and name HB1) | 3.5 |
| (77 and name HN) | (76 and name HA) | 3.5 | (44 and name HN) | (42 and name HG2*) | 5.0 |
| (77 and name HN) | (76 and name HD1*) | 5.0 | (44 and name HN) | (47 and name HE1) | 5.0 |
| (77 and name HN) | (76 and name HD2*) | 5.0 | (44 and name HN) | (47 and name HE2) | 5.0 |
| (78 and name HN) | (77 and name HA) | 3.5 | (46 and name HN) | (41 and name HG12) | 5.0 |
| (78 and name HN) | (77 and name HD1*) | 5.0 | (46 and name HN) | (44 and name HA) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (78 and name HA) | 3.5 | (46 and name HN) | (44 and name HN) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (78 and name HB1) | 3.5 | (47 and name HN) | (44 and name HA) | 3.5 |
| (79 and name HN) | (78 and name HB2) | 3.5 | (47 and name HN) | (44 and name HN) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (78 and name HN) | 3.5 | (48 and name HN) | (45 and name HA) | 3.5 |
| (79 and name HN) | (80 and name HG1*) | 5.0 | (48 and name HN) | (45 and name HN) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (80 and name HG2*) | 5.0 | (48 and name HN) | (50 and name HB1) | 5.0 |
| (80 and name HN) | (79 and name HA) | 5.0 | (49 and name HN) | (47 and name HN) | 5.0 |
| (80 and name HN) | (79 and name HB1) | 5.0 | (49 and name HN) | (47 and name HN) | 5.0 |
| (80 and name HN) | (79 and name HB2) | 5.0 | (50 and name HN) | (46 and name HA) | 5.0 |
| (81 and name HN) | (80 and name HA) | 3.5 | (50 and name HN) | (47 and name HA) | 5.0 |
| (81 and name HN) | (80 and name HB) | 3.5 | (50 and name HN) | (48 and name HN) | 5.0 |
| (81 and name HN) | (80 and name HG1*) | 5.0 | (51 and name HN) | (48 and name HA) | 5.0 |
| (81 and name HN) | (80 and name HG2*) | 3.5 | (51 and name HN) | (49 and name HN) | 5.0 |
| (82 and name HN) | (81 and name HN) | 3.5 | (52 and name HN) | (49 and name HA) | 3.5 |
| (83 and name HN) | (82 and name HG1) | 5.0 | (52 and name HN) | (49 and name HN) | 5.0 |
| (83 and name HN) | (82 and name HG2) | 5.0 | (52 and name HN) | (50 and name HN) | 5.0 |
| (84 and name HN) | (83 and name HA) | 3.5 | (53 and name HN) | (50 and name HA) | 3.5 |
| (84 and name HN) | (83 and name HB) | 3.5 | (54 and name HN) | (51 and name HA) | 3.5 |
| (84 and name HN) | (83 and name HD1*) | 5.0 | (54 and name HN) | (52 and name HN) | 5.0 |
| (84 and name HN) | (83 and name HG12) | 5.0 | (55 and name HN) | (53 and name HG11) | 5.0 |
| (2 and name HN) | (4 and name HA) | 5.0 | (55 and name HN) | (53 and name HG12) | 5.0 |
| (2 and name HN) | (4 and name HB1) | 5.0 | (55 and name HN) | (57 and name HN) | 5.0 |
| (2 and name HN) | (4 and name HB2) | 5.0 | (57 and name HN) | (54 and name HB1) | 5.0 |
| (4 and name HN) | (2 and name HB1) | 5.0 | (57 and name HN) | (55 and name HA) | 5.0 |
| (6 and name HN) | (9 and name HB*) | 5.0 | (57 and name HN) | (59 and name HN) | 5.0 |
| (7 and name HN) | (4 and name HN) | 5.0 | (58 and name HN) | (60 and name HN) | 5.0 |
| (8 and name HN) | (3 and name HB1) | 5.0 | (59 and name HN) | (57 and name HA2) | 5.0 |
| (8 and name HN) | (3 and name HB2) | 5.0 | (59 and name HN) | (57 and name HN) | 5.0 |
| (10 and name HN) | (12 and name HN) | 5.0 | (60 and name HN) | (58 and name HN) | 5.0 |
| (11 and name HN) | (8 and name HA) | 3.5 | (62 and name HN) | (65 and name HB1) | 2.7 |
| (12 and name HN) | (9 and name HA) | 3.5 | (62 and name HN) | (65 and name HB2) | 3.5 |
| (12 and name HN) | (9 and name HB*) | 5.0 | (63 and name HN) | (66 and name HB2) | 5.0 |
| (13 and name HN) | (10 and name HA) | 3.5 | (63 and name HN) | (66 and name HN) | 5.0 |
| (13 and name HN) | (10 and name HA) | 3.5 | (64 and name HN) | (62 and name HA) | 5.0 |
| (13 and name HN) | (10 and name HA) | 3.5 | (64 and name HN) | (62 and name HB1) | 5.0 |
| (13 and name HN) | (15 and name HD2) | 5.0 | (64 and name HN) | (62 and name HB2) | 5.0 |

| | | | | | |
|------------------|--------------------|-----|------------------|--------------------|-----|
| (65 and name HN) | (62 and name HB1) | 5.0 | (84 and name HN) | (82 and name HA) | 5.0 |
| (65 and name HN) | (62 and name HB2) | 5.0 | (11 and name HE) | (67 and name HG2*) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (62 and name HN) | 5.0 | (18 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (63 and name HA) | 3.5 | (18 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 |
| (66 and name HN) | (63 and name HN) | 5.0 | (19 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 |
| (67 and name HN) | (64 and name HA) | 3.5 | (20 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 |
| (68 and name HN) | (64 and name HA) | 5.0 | (20 and name HN) | (26 and name HG11) | 5.0 |
| (69 and name HN) | (66 and name HA) | 3.5 | (20 and name HN) | (30 and name HB2) | 3.5 |
| (69 and name HN) | (67 and name HB) | 5.0 | (24 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (69 and name HN) | (67 and name HN) | 5.0 | (25 and name HA) | (62 and name HA) | 2.7 |
| (71 and name HN) | (68 and name HA) | 3.5 | (25 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (71 and name HN) | (68 and name HN) | 5.0 | (25 and name HN) | (60 and name HE*) | 5.0 |
| (73 and name HN) | (70 and name HA) | 5.0 | (26 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (73 and name HN) | (71 and name HA) | 5.0 | (26 and name HN) | (61 and name HB) | 3.5 |
| (74 and name HN) | (72 and name HA) | 5.0 | (26 and name HN) | (61 and name HG11) | 5.0 |
| (76 and name HN) | (73 and name HA) | 5.0 | (26 and name HN) | (61 and name HN) | 3.5 |
| (76 and name HN) | (74 and name HA) | 5.0 | (27 and name HN) | (19 and name HA) | 5.0 |
| (77 and name HN) | (74 and name HA) | 5.0 | (27 and name HN) | (60 and name HD*) | 5.0 |
| (78 and name HN) | (75 and name HN) | 5.0 | (31 and name HN) | (18 and name HA) | 5.0 |
| (78 and name HN) | (76 and name HA) | 5.0 | (34 and name HN) | (18 and name HD*) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (76 and name HA) | 3.5 | (35 and name HN) | (18 and name HD*) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (76 and name HD1*) | 5.0 | (54 and name HN) | (61 and name HG2*) | 5.0 |
| (79 and name HN) | (76 and name HD2*) | 5.0 | (60 and name HA) | (27 and name HA) | 2.7 |
| (80 and name HN) | (77 and name HA) | 5.0 | (60 and name HA) | (27 and name HD*) | 5.0 |
| (80 and name HN) | (77 and name HD1*) | 5.0 | (60 and name HN) | (27 and name HA) | 5.0 |
| (81 and name HN) | (77 and name HD1*) | 5.0 | (61 and name HN) | (26 and name HB) | 3.5 |
| (81 and name HN) | (78 and name HA) | 5.0 | (61 and name HN) | (26 and name HD1*) | 5.0 |
| (82 and name HN) | (79 and name HA) | 5.0 | (61 and name HN) | (26 and name HN) | 3.5 |
| (82 and name HN) | (80 and name HA) | 5.0 | (61 and name HN) | (27 and name HA) | 5.0 |
| (84 and name HN) | (81 and name HA) | 3.5 | (69 and name HN) | (53 and name HG11) | 5.0 |
| (84 and name HN) | (81 and name HB*) | 5.0 | (69 and name HN) | (53 and name HG12) | 5.0 |

10.2.2 Distanzbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken

| | | | | | |
|------------------|-------------------|-----|------------------|-------------------|-----|
| (15 and name HN) | (11 and name O) | 2.3 | (33 and name HN) | (30 and name O) | 2.3 |
| (15 and name N) | (11 and name O) | 3.3 | (33 and name N) | (30 and name O) | 3.3 |
| (16 and name HN) | (12 and name O) | 2.3 | (35 and name HN) | (31 and name O) | 2.3 |
| (16 and name N) | (12 and name O) | 3.3 | (35 and name N) | (31 and name O) | 3.3 |
| (17 and name HN) | (13 and name O) | 2.3 | (51 and name HN) | (47 and name O) | 2.3 |
| (17 and name N) | (13 and name O) | 3.3 | (51 and name N) | (47 and name O) | 3.3 |
| (19 and name HN) | (15 and name O) | 2.3 | (52 and name HN) | (48 and name O) | 2.3 |
| (19 and name N) | (15 and name O) | 3.3 | (52 and name N) | (48 and name O) | 3.3 |
| (25 and name HN) | (23 and name OD*) | 2.3 | (53 and name HN) | (49 and name O) | 2.3 |
| (25 and name N) | (23 and name OD*) | 3.3 | (53 and name N) | (49 and name O) | 3.3 |
| (26 and name HN) | (61 and name O) | 2.3 | (54 and name HN) | (50 and name O) | 2.3 |
| (26 and name N) | (61 and name O) | 3.3 | (54 and name N) | (50 and name O) | 3.3 |
| (31 and name HN) | (27 and name O) | 2.3 | (62 and name HN) | (65 and name OE*) | 2.3 |
| (31 and name N) | (27 and name O) | 3.3 | (62 and name N) | (65 and name OE*) | 3.3 |
| (32 and name HN) | (29 and name O) | 2.3 | (67 and name HN) | (63 and name O) | 2.3 |
| (32 and name N) | (29 and name O) | 3.3 | (67 and name N) | (63 and name O) | 3.3 |

10.2.3 Dihedrale Winkelbeschränkungen für die Strukturberechnung

```

( 7 and name C ) ( 8 and name N )
( 8 and name CA ) ( 8 and name C ) 10 -60 20 2
( 8 and name C ) ( 9 and name N )
( 9 and name CA ) ( 9 and name C ) 10 -60 20 2
( 9 and name C ) (10 and name N )
(10 and name CA ) (10 and name C ) 10 -60 20 2
(10 and name C ) (11 and name N )
(11 and name CA ) (11 and name C ) 10 -60 20 2
(11 and name C ) (12 and name N )
(12 and name CA ) (12 and name C ) 10 -60 20 2
(12 and name C ) (13 and name N )
(13 and name CA ) (13 and name C ) 10 -60 20 2
(13 and name C ) (14 and name N )
(14 and name CA ) (14 and name C ) 10 -60 20 2
(14 and name C ) (15 and name N )
(15 and name CA ) (15 and name C ) 10 -60 20 2
(15 and name C ) (16 and name N )
(16 and name CA ) (16 and name C ) 10 -60 20 2
(16 and name C ) (17 and name N )
(17 and name CA ) (17 and name C ) 10 -60 20 2
(19 and name C ) (20 and name N )
(20 and name CA ) (20 and name C ) 10 -60 20 2
(20 and name C ) (21 and name N )
(21 and name CA ) (21 and name C ) 10 -120 40 2
(22 and name C ) (23 and name N )
(23 and name CA ) (23 and name C ) 10 -120 40 2
(24 and name C ) (25 and name N )
(25 and name CA ) (25 and name C ) 10 -120 40 2
(25 and name C ) (26 and name N )
(26 and name CA ) (26 and name C ) 10 -120 40 2
(27 and name C ) (28 and name N )
(28 and name CA ) (28 and name C ) 10 -60 20 2
(29 and name C ) (30 and name N )
(30 and name CA ) (30 and name C ) 10 -60 20 2
(30 and name C ) (31 and name N )
(31 and name CA ) (31 and name C ) 10 -60 20 2
(32 and name C ) (33 and name N )
(33 and name CA ) (33 and name C ) 10 -60 20 2
(33 and name C ) (34 and name N )
(34 and name CA ) (34 and name C ) 10 -60 20 2
(34 and name C ) (35 and name N )
(35 and name CA ) (35 and name C ) 10 -60 20 2
(35 and name C ) (36 and name N )
(36 and name CA ) (36 and name C ) 10 -60 20 2
(36 and name C ) (37 and name N )
(37 and name CA ) (37 and name C ) 10 -60 20 2
(40 and name C ) (41 and name N )
(41 and name CA ) (41 and name C ) 10 -120 40 2
(45 and name C ) (46 and name N )
(46 and name CA ) (46 and name C ) 10 -60 20 2
(46 and name C ) (47 and name N )
(47 and name CA ) (47 and name C ) 10 -60 20 2
(47 and name C ) (48 and name N )
(48 and name CA ) (48 and name C ) 10 -60 20 2
(49 and name C ) (50 and name N )
(50 and name CA ) (50 and name C ) 10 -60 20 2
(50 and name C ) (51 and name N )
(51 and name CA ) (51 and name C ) 10 -60 20 2
(52 and name C ) (53 and name N )
(53 and name CA ) (53 and name C ) 10 -60 20 2
(53 and name C ) (54 and name N )
(54 and name CA ) (54 and name C ) 10 -60 20 2
(54 and name C ) (55 and name N )
(55 and name CA ) (55 and name C ) 10 -60 20 2
(55 and name C ) (56 and name N )
(56 and name CA ) (56 and name C ) 10 -120 40 2
(59 and name C ) (60 and name N )
(60 and name CA ) (60 and name C ) 10 -120 40 2
(60 and name C ) (61 and name N )
(61 and name CA ) (61 and name C ) 10 -120 40 2
(63 and name C ) (64 and name N )
(64 and name CA ) (64 and name C ) 10 -60 20 2
(64 and name C ) (65 and name N )
(65 and name CA ) (65 and name C ) 10 -60 20 2
(65 and name C ) (66 and name N )

```

```
(66 and name CA ) (66 and name C ) 10 -60 20 2
(66 and name C ) (67 and name N )
(67 and name CA ) (67 and name C ) 10 -60 20 2
(67 and name C ) (68 and name N )
(68 and name CA ) (68 and name C ) 10 -60 20 2
(73 and name C ) (74 and name N )
(74 and name CA ) (74 and name C ) 10 -60 20 2
(74 and name C ) (75 and name N )
(75 and name CA ) (75 and name C ) 10 -60 20 2
(75 and name C ) (76 and name N )
(76 and name CA ) (76 and name C ) 10 -60 20 2
(77 and name C ) (78 and name N )
(78 and name CA ) (78 and name C ) 10 -60 20 2
```

10.3 X-PLOR-Protokolle und Topologie- bzw. Parameter-Dateien

topo.ca2+

```
!@tophcsdx.pro
autogenerate angles=true end
autogenerate DIHEDRAL=true end
mass OCX1 15.999
mass OCX2 15.999
mass OCX3 15.999
mass OCX4 15.999
mass OCX5 15.999
mass OCX6 15.999
mass OCX7 15.999
mass CA2 40.080
resid CL1
  group
    atom CA2 type CA2 charge 2.0
  end
end
resid CL2
  group
    atom CA2 type CA2 charge 2.0
  end
end
{ *Append the metal cluster* }
{ *topology. * }
```

parameter.ca2+

```
REMARKS file: TOPPAR/parameter.elements
REMARKS Nonbonded parameters for some elements.
REMARKS Reference: program QUANTA, Molecular Simulations Inc.
set echo=false end
BOND C OCX1 1000.0 1.220 ! original type C OC
BOND C OCX2 1000.0 1.215 ! original type C O
BOND C OCX3 1000.0 1.220 ! original type C OC
BOND C OCX4 1000.0 1.215 ! original type C O
BOND C OCX5 1000.0 1.220 ! original type C OC
BOND C OCX6 1000.0 1.220 ! original type C OC
BOND C OCX7 1000.0 1.220 ! original type C OC
BOND OCX1 CA2 1000.0 2.317 ! Nobs = 4
BOND OCX2 CA2 1000.0 2.376 ! Nobs = 2
BOND OCX3 CA2 1000.0 2.274 ! Nobs = 4
BOND OCX4 CA2 1000.0 2.104 ! Nobs = 4
BOND OCX5 CA2 1000.0 2.454 ! Nobs = 4
BOND OCX6 CA2 1000.0 2.458 ! Nobs = 4
BOND OCX7 CA2 1000.0 2.376 ! Nobs = 2
```

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------|------|------------|--------|--------|---|----------|------------|----------|----------|-------|---------|-----|-------|
| ANGLE | CT | C | OCX1 | 500.0 | 118.00 | ! | original | type | CT | C | OC | | | |
| ANGLE | OC | C | OCX1 | 500.0 | 124.00 | ! | original | type | OC | C | OC | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX2 | 500.0 | 121.25 | ! | original | type | CT | C | O | | | |
| ANGLE | NH2 | C | OCX2 | 500.0 | 122.60 | ! | original | type | NH2 | C | O | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX3 | 500.0 | 118.00 | ! | original | type | CT | C | OC | | | |
| ANGLE | OC | C | OCX3 | 500.0 | 124.00 | ! | original | type | OC | C | OC | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX4 | 500.0 | 121.25 | ! | original | type | CT | C | O | | | |
| ANGLE | NH1 | C | OCX4 | 500.0 | 121.25 | ! | original | type | NH1 | C | O | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX5 | 500.0 | 118.00 | ! | original | type | CT | C | OC | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX6 | 500.0 | 118.00 | ! | original | type | CT | C | OC | | | |
| ANGLE | OCX5 | C | OCX6 | 500.0 | 124.00 | ! | original | type | OC | C | OC | | | |
| ANGLE | CT | C | OCX7 | 500.0 | 118.00 | ! | original | type | CT | C | OC | | | |
| ANGLE | OC | C | OCX7 | 500.0 | 124.00 | ! | original | type | OC | C | OC | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX2 | 500.0 | 82.00 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX3 | 500.0 | 85.50 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX4 | 500.0 | 83.10 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX5 | 500.0 | 106.60 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 94.00 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX2 | CA2 | OCX3 | 500.0 | 77.80 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX2 | CA2 | OCX4 | 500.0 | 154.00 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX2 | CA2 | OCX5 | 500.0 | 126.70 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX2 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 76.70 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX3 | CA2 | OCX4 | 500.0 | 79.90 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX3 | CA2 | OCX5 | 500.0 | 153.30 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX3 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 154.30 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX4 | CA2 | OCX5 | 500.0 | 78.00 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX4 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 125.60 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX5 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 50.70 | ! | Nobs = | | | | 4 | | | |
| ANGLE | OCX1 | CA2 | OCX7 | 500.0 | 82.00 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX7 | CA2 | OCX3 | 500.0 | 77.80 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX7 | CA2 | OCX4 | 500.0 | 154.00 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX7 | CA2 | OCX5 | 500.0 | 126.70 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| ANGLE | OCX7 | CA2 | OCX6 | 500.0 | 76.70 | ! | Nobs = | | | | 2 | | | |
| IMPRoper | C | X | X | OCX1 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | OC |
| IMPRoper | C | X | X | OCX2 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | O |
| IMPRoper | C | X | X | OCX3 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | OC |
| IMPRoper | C | X | X | OCX4 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | O |
| IMPRoper | OCX4 | C | NH1 | CT | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | O | C | NH1 | CT |
| IMPRoper | C | X | X | OCX5 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | OC |
| IMPRoper | C | X | X | OCX6 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | OC |
| IMPRoper | C | X | X | OCX7 | 750.0 | 0 | 0.000 | ! | original | type | C | X | X | OC |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX2 | OCX3 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 58.9 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX3 | OCX4 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 58.5 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX4 | OCX5 | 750.0 | 0 | 52.800 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 52.8 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX5 | OCX6 | 750.0 | 0 | 81.300 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 81.3 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX6 | OCX2 | 750.0 | 0 | 66.600 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 66.6 |
| IMPRoper | CA2 | OCX2 | OCX1 | OCX6 | 750.0 | 0 | 57.500 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 57.5 |
| IMPRoper | CA2 | OCX2 | OCX6 | OCX3 | 750.0 | 0 | 2.400 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 2.4 |
| IMPRoper | CA2 | OCX2 | OCX3 | OCX1 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 57.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX3 | OCX1 | OCX2 | 750.0 | 0 | 63.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 64.1 |
| IMPRoper | CA2 | OCX3 | OCX2 | OCX4 | 750.0 | 0 | -10.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | -10.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX3 | OCX4 | OCX1 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 59.2 |
| IMPRoper | CA2 | OCX4 | OCX1 | OCX3 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 60.7 |
| IMPRoper | CA2 | OCX4 | OCX3 | OCX5 | 750.0 | 0 | 13.300 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 13.3 |
| IMPRoper | CA2 | OCX4 | OCX5 | OCX1 | 750.0 | 0 | 48.500 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 48.5 |
| IMPRoper | CA2 | OCX5 | OCX1 | OCX4 | 750.0 | 0 | 67.100 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 67.1 |
| IMPRoper | CA2 | OCX5 | OCX4 | OCX6 | 750.0 | 0 | -18.600 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | -18.6 |
| IMPRoper | CA2 | OCX5 | OCX6 | OCX1 | 750.0 | 0 | 39.400 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 39.4 |
| IMPRoper | CA2 | OCX6 | OCX1 | OCX5 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 4 ... | Value = | | 60.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX6 | OCX5 | OCX2 | 750.0 | 0 | 7.600 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 7.6 |
| IMPRoper | CA2 | OCX6 | OCX2 | OCX1 | 750.0 | 0 | 52.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 52.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX7 | OCX3 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 58.9 |
| IMPRoper | CA2 | OCX1 | OCX6 | OCX7 | 750.0 | 0 | 66.600 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 66.6 |
| IMPRoper | CA2 | OCX7 | OCX1 | OCX6 | 750.0 | 0 | 57.500 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 57.5 |
| IMPRoper | CA2 | OCX7 | OCX6 | OCX3 | 750.0 | 0 | 2.400 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 2.4 |
| IMPRoper | CA2 | OCX7 | OCX3 | OCX1 | 750.0 | 0 | 60.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 57.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX3 | OCX1 | OCX7 | 750.0 | 0 | 63.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 64.1 |
| IMPRoper | CA2 | OCX3 | OCX7 | OCX4 | 750.0 | 0 | -10.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | -10.0 |
| IMPRoper | CA2 | OCX6 | OCX5 | OCX7 | 750.0 | 0 | 7.600 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 7.6 |
| IMPRoper | CA2 | OCX6 | OCX7 | OCX1 | 750.0 | 0 | 52.000 | ! | Nobs = | | 2 ... | Value = | | 52.0 |
| ! | | | eps | sigma | | | eps(1:4) | sigma(1:4) | | | | | | |
| ! | | | (kcal/mol) | (A) | | | | | | | | | | |
| ! | | | | | | | | | | | | | | |
| NONBonded | OCX1 | | 1.0244 | 2.7755 | | | 1.0244 | 2.7755 | ! | original | type | OC | | |
| NONBonded | OCX2 | | 0.2342 | 2.7755 | | | 0.2342 | 2.7755 | ! | original | type | O | | |
| NONBonded | OCX3 | | 1.0244 | 2.7755 | | | 1.0244 | 2.7755 | ! | original | type | OC | | |
| NONBonded | OCX4 | | 0.2342 | 2.7755 | | | 0.2342 | 2.7755 | ! | original | type | O | | |

```

NONBonded OCX5      1.0244 2.7755      1.0244 2.7755 ! original type OC
NONBonded OCX6      1.0244 2.7755      1.0244 2.7755 ! original type OC
NONBonded OCX7      1.0244 2.7755      1.0244 2.7755 ! original type OC
NONBonded CA2       0.0600 3.1070      0.0600 3.1070

```

```
set echo=true end
```

generate structure.inp

```

! generiert structure-output fuer koordinaten-generation

topology
    @../topallhdg.hs
end
parameter
    @../parallhdg.hs
end

segment
    name=""
    chain
    @../toph19.pep
    coordinates @../betv4_model.pdb
end

write structure output=../betv4.psf end

stop

```

generate ca2+.inp

```

topology
    @../topo.ca2+
end
segment
    name="CACL"
    molecule number=1 name=CL1 end
    molecule number=1 name=CL2 end
end

write structure output=../cluster/ca2+.psf end

stop

```

make cluster.inp

```

remarks file nmr/generate_template.inp
remarks generates a "template" coordinate set. This produces
remarks an arbitrary extended conformation with ideal geometry.
remarks author: Axel T. Brunger

{====>}
structure @../betv4.psf end          { * read structure file * }
structure @../cluster/ca2+.psf end

parameter
{====>}
    @../parallhdg.hs                { * read parameters * }
    @../parameter.ca2+
end

coordinates @../betv4_model_min.pdb end
coordinates @../cluster/ca2+.pdb end

```

```
topology
@../topallhdg.hs
@../topo.ca2+

residue PCA1
  modify atom 1OD1 type=OCX1 charge=-0.62 end
  modify atom 2OD1 type=OCX2 charge=-0.48 end
  modify atom 3OD1 type=OCX3 charge=-0.62 end
  modify atom 4O   type=OCX4 charge=-0.48 end
  modify atom 5OE1 type=OCX5 charge=-0.62 end
  modify atom 5OE2 type=OCX6 charge=-0.62 end

  add bond 1OD1 6CA2
  add bond 2OD1 6CA2
  add bond 3OD1 6CA2
  add bond 4O   6CA2
  add bond 5OE1 6CA2
  add bond 5OE2 6CA2

  add angle 1OD1 6CA2 2OD1
  add angle 1OD1 6CA2 3OD1
  add angle 1OD1 6CA2 4O
  add angle 1OD1 6CA2 5OE1
  add angle 1OD1 6CA2 5OE2
  add angle 2OD1 6CA2 3OD1
  add angle 2OD1 6CA2 4O
  add angle 2OD1 6CA2 5OE1
  add angle 2OD1 6CA2 5OE2
  add angle 3OD1 6CA2 4O
  add angle 3OD1 6CA2 5OE1
  add angle 3OD1 6CA2 5OE2
  add angle 4O   6CA2 5OE1
  add angle 4O   6CA2 5OE2
  add angle 5OE1 6CA2 5OE2

  add improper 6CA2 1OD1 2OD1 3OD1
  add improper 6CA2 1OD1 3OD1 4O
  add improper 6CA2 1OD1 4O   5OE1
  add improper 6CA2 1OD1 5OE1 5OE2
  add improper 6CA2 1OD1 5OE2 2OD1
  add improper 6CA2 2OD1 1OD1 5OE2
  add improper 6CA2 2OD1 5OE2 3OD1
  add improper 6CA2 2OD1 3OD1 1OD1
  add improper 6CA2 3OD1 1OD1 2OD1
  add improper 6CA2 3OD1 2OD1 4O
  add improper 6CA2 3OD1 4O   1OD1
  add improper 6CA2 4O   1OD1 3OD1
  add improper 6CA2 4O   3OD1 5OE1
  add improper 6CA2 4O   5OE1 1OD1
  add improper 6CA2 5OE1 1OD1 4O
  add improper 6CA2 5OE1 4O   5OE2
  add improper 6CA2 5OE1 5OE2 1OD1
  add improper 6CA2 5OE2 1OD1 5OE1
  add improper 6CA2 5OE2 5OE1 2OD1
  add improper 6CA2 5OE2 2OD1 1OD1
end

residue PCA2
  modify atom 1OD1 type=OCX1 charge=-0.62 end
  modify atom 2OD1 type=OCX7 charge=-0.62 end
  modify atom 3OD1 type=OCX3 charge=-0.62 end
  modify atom 4O   type=OCX4 charge=-0.48 end
  modify atom 5OE1 type=OCX5 charge=-0.62 end
  modify atom 5OE2 type=OCX6 charge=-0.62 end

  add bond 1OD1 6CA2
  add bond 2OD1 6CA2
  add bond 3OD1 6CA2
  add bond 4O   6CA2
  add bond 5OE1 6CA2
  add bond 5OE2 6CA2

  add angle 1OD1 6CA2 2OD1
  add angle 1OD1 6CA2 3OD1
  add angle 1OD1 6CA2 4O
  add angle 1OD1 6CA2 5OE1
  add angle 1OD1 6CA2 5OE2
  add angle 2OD1 6CA2 3OD1
  add angle 2OD1 6CA2 4O
```

```

add angle 2OD1 6CA2 5OE1
add angle 2OD1 6CA2 5OE2
add angle 3OD1 6CA2 4O
add angle 3OD1 6CA2 5OE1
add angle 3OD1 6CA2 5OE2
add angle 4O 6CA2 5OE1
add angle 4O 6CA2 5OE2
add angle 5OE1 6CA2 5OE2

add improper 6CA2 1OD1 2OD1 3OD1
add improper 6CA2 1OD1 3OD1 4O
add improper 6CA2 1OD1 4O 5OE1
add improper 6CA2 1OD1 5OE1 5OE2
add improper 6CA2 1OD1 5OE2 2OD1
add improper 6CA2 2OD1 1OD1 5OE2
add improper 6CA2 2OD1 5OE2 3OD1
add improper 6CA2 2OD1 3OD1 1OD1
add improper 6CA2 3OD1 1OD1 2OD1
add improper 6CA2 3OD1 2OD1 4O
add improper 6CA2 3OD1 4O 1OD1
add improper 6CA2 4O 1OD1 3OD1
add improper 6CA2 4O 3OD1 5OE1
add improper 6CA2 4O 5OE1 1OD1
add improper 6CA2 5OE1 1OD1 4O
add improper 6CA2 5OE1 4O 5OE2
add improper 6CA2 5OE1 5OE2 1OD1
add improper 6CA2 5OE2 1OD1 5OE1
add improper 6CA2 5OE2 5OE1 2OD1
add improper 6CA2 5OE2 2OD1 1OD1
end
end

patch PCA1
reference=1=(resid 19 and segid "")
reference=2=(resid 21 and segid "")
reference=3=(resid 23 and segid "")
reference=4=(resid 25 and segid "")
reference=5=(resid 30 and segid "")
reference=6=(resid 1 and segid "CACL")
end

patch PCA2
reference=1=(resid 54 and segid "")
reference=2=(resid 56 and segid "")
reference=3=(resid 58 and segid "")
reference=4=(resid 60 and segid "")
reference=5=(resid 65 and segid "")
reference=6=(resid 2 and segid "CACL")
end

write structure output=./betv4_ca2+.psf end

@min_betv4_cluster.inp

{ * write coordinates * }
remarks produced by nmr/generate_template.inp
write coordinates output=./betv4_ca2+.pdb end
stop

sa_betv4_8.inp

remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 60)

evaluate ($iniseed = 567313)

evaluate ($init_t = 2000 ) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 80000) !20000
evaluate ($cool1_steps = 120000) !30000
evaluate ($cool2_steps = 60000) !15000

evaluate ($fileroot = "../run_8/betv4_8")
evaluate ($template = "../extchain/dgsa_2.pdb")

```

```
structure @@../betv4_ca2+.psf end
parameter
    @@../parallhdg.hs
    @@../parameter.ca2+
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 @@../..noe/noes_8.txt
              @@../..hbondhsqc/hbonds_8.txt
    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
    @@../..hnha/dihangles_8.txt
end

couplings
    potential harmonic
    class phi
    force 1.0
    nres 300
    set echo on message on end
    set echo off message off end
end

evaluate ($ramacoff = -0.5*10.0**2)
evaluate ($krama = 1.0)

rama
    nres=10000
    cutoff=$ramacoff
    @/raid1/philipp/xplor-nih-1.1.0/gaussians/shortrange_gaussians.tbl
    @/raid1/philipp/xplor-nih-1.1.0/gaussians/new_shortrange_force.tbl
end

@/raid1/philipp/xplor-nih-1.1.0/gaussians/newshortrange_setup.tbl
!@/raid1/philipp/xplor-nih-1.1.0/gaussians/setup_nucleic_new.tbl

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.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 ($fname="./run_8/betv4_8_"+encode($count)+".prt")
set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end

end loop main

stop
write coordinates output="./run_8/ave_betv4_8.flp" end

stop
```

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1999 bis Februar 2002 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere unter Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt. Ihm danke ich sehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung, seine allzeitige Unterstützung und sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie für einige hilfreiche Anregungen.

Prof. Dr. Fátima Ferreira vom Institut für Genetik und Allgemeine Biologie der Universität Salzburg fühle ich mich für die Zurverfügungstellung des pMW175–betv4–Plasmids sehr zu Dank verpflichtet.

Ohne die Unterstützung von Dr. Silke Hoffmann hätte diese Arbeit nicht in dieser Form gedeihen können. Ich danke ihr für die Bereitstellung des Plasmids pGEX–6P–2–betv4, die Hilfe bei der Konstruktion des pET16b–betv4–Plasmids und ihre stetige Bereitschaft, Fragen in allen Belangen der Laborarbeit geduldig zu beantworten.

Dr. Kristian Schweimer danke ich sehr für die Aufnahme und Prozessierung mehrdimensionaler NMR–Spektren.

Ebenso danke ich Philipp Neudecker für die Aufnahme von NMR–Spektren und die Durchführung der Diffusionsmessungen. Besonders seine unermüdliche Motivation und Hilfe bei der Auswertung der Spektren und der Strukturberechnung trugen zum Fortgang der vorliegenden Arbeit bei. Außerdem bewies er bei der Gestaltung unseres gemeinsamen Büros große Toleranz.

Ferner danke ich Markus Zeeb und Dr. Jochen Balbach für ihre Tipps zur Diffusionsmessung.

Katrin Lehmann, meiner zweiten „Mitinsassin“ danke ich nicht nur für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen im Labor, sondern auch für ihre Hilfe bei der Auflockerung der „Höhlenzimmer“-Atmosphäre, und dass sie mir die immer wieder die Welt erklärt hat.

Petra Deuerling, Nadine Herz und Uli Herzing, den guten Geistern im Labor, danke ich sehr für alle großen und kleinen Handgriffe im Labor, Petra und Nadine im Speziellen für einige Proteinpräparationen. Besonderer Dank gebührt Euch aber wegen der guten Laune, die ihr verbreitet habt und die das Arbeiten immer wieder zu einem Vergnügen machten. Und Danke, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich habt.

Rainer Hofmann half mir bei allen großen und kleinen Problemen mit Rechnern und Software. Vielen Dank dafür. Auch für die Minze, aus denen ich den weltbesten Tee gebrüht habe.

Anke Eisenmann gilt mein Dank für die Relaxationsmessungen an Bet v 4 im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Gleichfalls danke ich Sigrun Rumpel für die Perfektionierung des Gießens von nativen Gradientengelen und die Präparation von Apo-Bet v 4 während ihrer Projektarbeit.

Irena Matecko von der Universität Linz danke ich für ihren intensiven Einsatz bei der Aufnahme von ESI-Massenspektren von Calcium- und Apo-Bet v 4 zur Bestimmung des Multimerisierungsgrades. Danke auch an Xaver Schratt vom Lehrstuhl für Bioorganische Chemie für die Messung der ESI-Massenspektren für die Molekulargewichtsbestimmung.

Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre stete Hilfsbereitschaft und anregende Diskussionen. Hierbei hervorzuheben ist Dr. Heinrich Sticht, der immer eine gute Idee parat hat und mir weiterhelfen konnte, wenn ich mit meinem (wissenschaftlichen) Latein am Ende war.

Meinen Eltern danke ich sehr, dass sie mir das Studium ermöglichten und mir immer freie Hand ließen.

Ralf, dir bin ich von Herzen dankbar, dass du immer für mich da bist. Du bist der beste Freund, den man sich nur wünschen kann.

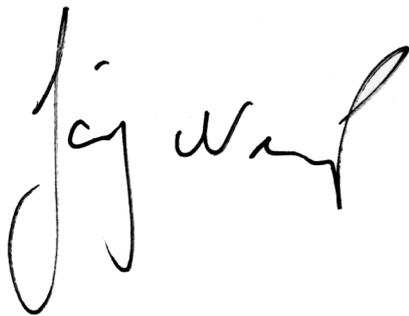
Dem Graduiertenkolleg „Biosynthese der Proteine und Regulation ihrer Aktivität“ und der DFG danke ich abschließend für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

12. Erklärung

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 20.02.2002

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jörg Nerkamp'. The signature is written in a cursive style with a large initial 'J' and a long, sweeping underline.

Jörg Nerkamp