

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Klinische Medizin
Prof. Dr. Peter Zabel

**Untersuchungen zur Prozessierung von
Gräserpollenallergenen an den
Grenzflächen des Respirationstraktes**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät -

vorgelegt von
Cornelia Blume
aus Hamburg

Lübeck, 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Klassifizierung von allergischen Reaktionen	2
1.2. Pathomechanismus der Typ I-Allergie	3
1.3. Gräserpollen als Auslöser allergischer Reaktionen.....	6
1.4. Allergene des Lieschgrases <i>Phleum pratense</i>	8
1.5. Die Epithel-Barriere des Respirationstraktes	9
1.6. Bedeutung der Antigen-präsentierenden Zellen	11
1.7. Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Chemikalien	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3. Geräte	16
2.1.4. Antikörper.....	16
2.1.5. Humanes Material	17
2.1.6. Zelllinien.....	18
2.1.7. Medien	19
2.1.8. Computerprogramme	20
2.2. Methoden	20
2.2.1. Proteinbiochemische Methoden	20
2.2.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.2.1.2. Tris-Tricine-Elektrophorese.....	22
2.2.1.3. Zweidimensionale Elektrophorese	24
2.2.1.4. Coomassie-Färbung	27
2.2.1.5. Silberfärbung.....	28
2.2.1.6. Konservieren von Gelen.....	29
2.2.1.7. Immunoblot	29
2.2.1.8. Proteinfärbung auf Blots.....	31
2.2.1.9. Proteinbestimmung	32

2.2.1.10. Herstellung von Pollenextrakt	32
2.2.1.11. Isolierung von natürlichem Phl p 1	33
2.2.1.12. Isolierung von natürlichem Phl p 6	34
2.2.1.13. Herstellung von rekombinantem Phl p 6	35
2.2.1.14. Tryptischer Verdau.....	37
2.2.1.15. MALDI-TOF-MS	37
2.2.1.16. ESI-FT-ICR-MS.....	38
2.2.1.17. Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie	39
2.2.1.18. CD-Spektroskopie	40
2.2.1.19. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen	41
2.2.1.20. Inkubation von nPhl p 6 mit Nasensekret.....	41
2.2.1.21. Inkubation von nPhl p 6 und nPhl p 1 mit BAL-Flüssigkeit	42
2.2.2. Zellbiologische Methoden	42
2.2.2.1. Kultivierung der A549-, Calu-3- und NCI-H727-Zellen	42
2.2.2.2. Generierung von Dendritischen Zellen.....	43
2.2.2.3. Durchflusscytometrie.....	44
2.2.2.4. Allergenaufnahme durch die Epithel-Zelllinien	45
2.2.2.5. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie zur intrazelluläre Lokalisation der Allergene	46
2.2.2.6. Aufnahme von Allergenen durch Dendritische Zellen	47
2.2.3. Statistische Auswertung der Daten	47
3. Ergebnisse	48
3.1. Charakterisierung von Phl p 6.....	48
3.1.1. 2-DE und Immunoblotting	48
3.1.2. ESI-FT-ICR-MS-Analyse von nPhl p 6 und rPhl p 6.....	50
3.1.3. Tryptischer Verdau von nPhl p 6 und rPhl p 6.....	52
3.1.4. FTIR-Spektroskopie	54
3.1.5. CD-Spektroskopie	56
3.2. Einfluss von Nasensekret und BAL-Flüssigkeit auf nPhl p 6.....	58
3.3. Interaktion von nPhl p 6 und nPhl p 1 mit den Epithelzellen des Respirationstraktes.....	60
3.3.1. Analyse der Allergenaufnahme durch die Epithel-Zelllinien des Respirationstraktes	61

3.3.2. Analyse des Mechanismus der Allergenaufnahme	63
3.3.3. Intrazelluläre Lokalisation der Allergene	64
3.4. Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 durch Dendritische Zellen	69
3.4.1. Allergenaufnahme durch Dendritische Zellen	71
3.4.2. Zeitabhängige Aufnahme	72
3.4.3. Konzentrationsabhängige Aufnahme	74
3.4.4. Inhibition der Aufnahme	76
3.4.5. Einfluss der Allergene auf die Expression der Oberflächenmarker der DCs.....	77
4. Diskussion	80
4.1. Strukturelle Charakterisierung der Allergene	81
4.2. Interaktion der Allergene mit den Sekreten des Respirationstraktes	84
4.3. Interaktion der Allergene mit den Epithelzellen der Lunge	86
4.3. Allergen-Aufnahme durch DCs	91
4.4. Bedeutung der Allergen-Prozessierung für die Therapie allergischer Erkrankungen: ein Ausblick.....	95
5. Zusammenfassung	98
6. Summary	100
7. Literaturverzeichnis	102
8. Anhang	114
9. Veröffentlichungen	116
9.1. Originalarbeiten	116
9.2. Abstrakts	116
9.3. Vorträge.....	117
10. Lebenslauf	118
11. Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

Außer den SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
2-DE	Zweidimensionale Elektrophorese
AMD	Amilorid
AP	Alkalische Phosphatase
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (englisch "antigen presenting cell")
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparaginsäure
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz
BSA	Rinderserumalbumin (englisch "bovine serum albumin")
c	Konzentration
C=O	Carbonylgruppe
CCD	Cytochalasin D
CD	Zelloberflächenmarker (englisch "cluster of differentiation")
CD-Spektroskopie	Circulardichroismus -Spektroskopie
cDNA	komplementäre DNA (englisch "complementary DNA")
DC	Dendritische Zelle (englisch "dendritic cell")
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's PBS
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ESI-FT-ICR	Elektrospray-Ionisation-Fourier Transform-Ionencyclotronresonanz
FACS	englisch für "fluorescence activated cell sorter"
Fc	konstante Region des Antikörpers (englisch "fragment crystallisable")
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (englisch "foetal calf serum")
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	englisch für "fast protein liquid chromatography"
FSC	Vorwärtsstreulicht (englisch "Forwardscatter")
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
GM-CSF	englisch für "Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor"
h	Stunde (englisch "hour")
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HBSS	englisch für "Hanks Balanced Salt Solutions"
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HLA	englisch für "Human Leucocyte Antigen"
HPLC	englisch für "High Performance Liquid Chromatography"
HRP	Peroxidase des Meerrettichs (englisch "horseradish peroxidase")
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
LC	Langerhans-Zellen (englisch "Langerhans cell")
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	englisch für "matrix assisted laser desorption/ionisation"
MBP	Maltose-Bindeprotein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch "major histocompatibility complex")
min	Minute
MMP	Methyl- α -D-mannopyranosid
MS	Massenspektrometrie
n	natürlich
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	englisch für "peripheral blood mononuclear cells"
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (englisch "Phosphate-buffered Saline")
PE	Phycoerythrin
Phl p	Allergen des Wiesenlieschgrases (<i>Phleum pratense</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
r	rekombinant
RP	englisch für "Reversed Phase"
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch "sodium dodecyl sulfate")
SSC	Seitwärtsstreulicht (englisch "Sidescatter")
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (englisch "Tris-buffered Saline")
TBS-T	TBS mit Tween 20
TCR	T-Zellrezeptor (englisch "T cell receptor")
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	englisch "time of flight"
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	englisch "unit"
UV	Ultraviolett
v/v	englisch "volume per volume"
w/v	englisch "weight per volume"
w/w	englisch "weight per weight"
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1. Einleitung

Der Begriff „Allergie“ wurde im Jahre 1906 von Clemens von Pirquet eingeführt und bezeichnete damals eine durch Antigene spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus. Im Zusammenhang mit dem Begriff „Allergie“ wird auch oft von „Atopie“ gesprochen, die von Coca und Cooke (1923) als eine genetisch bedingte Prädisposition für die Erkrankungen des bronchialen Asthmas und des Heuschnupfens bezeichnet wurde. Heute wird die Allergie als eine durch immunologische Mechanismen verursachte Überempfindlichkeitsreaktion des Organismus und die Atopie als individuell oder familiär bedingte Neigung zur Produktion von Immunglobulin E (IgE) und zur Entwicklung der typischen Symptome wie Asthma, allergische Rhinitis und atopisches Ekzem definiert (Johansson *et al.*, 2001).

Die allergischen Erkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten besonders in den Industrienationen stark zugenommen. Die Prävalenzen von Symptomen wie Asthma, Heuschnupfen und atopisches Ekzem wurden in einem internationalen Vergleich für Kinder in der Studie „International Study of Asthma and Allergy in Childhood“ (ISAAC) und für Erwachsene anhand von Atemwegssymptomen und allergischer Sensibilisierung in der Studie „European Community Respiratory Health Survey in Adults“ (ECRHS) ermittelt. Die Symptome des allergischen Asthmas wiesen bei den 13- bis 14-jährigen Kindern in Deutschland eine Prävalenz von ca. 15 % auf und lag damit im internationalen Vergleich im oberen Mittelfeld (ISAAC Steering Committee, 1998). Bei 20- bis 44-jährigen Erwachsenen lag die Prävalenz der allergischen Rhinitis bei bis zu 23 % im internationalen Vergleich ebenfalls im Mittelfeld (Heinrich *et al.*, 2002). Als Ursachen für die anhaltende Zunahme der allergischen Erkrankungen werden besonders veränderte Umweltfaktoren vermutet, wie z.B. eine zunehmende Luftverschmutzung (Ring *et al.*, 2001). Aufgrund der steigenden Prävalenz, der Behandlungskosten und des volkswirtschaftlichen Schadens durch verminderte Leistungsfähigkeit zählen allergische Erkrankungen zu den größten gesundheitlichen Problemen der Gesellschaft.

1.1. Klassifizierung von allergischen Reaktionen

Die allergischen Erkrankungen lassen sich aufgrund von unterschiedlichen Pathomechanismen in verschiedene Gruppen gliedern. Coombs und Gell (1963) unterschieden vier verschiedene Typen allergischer Immunreaktionen. Oft ist jedoch eine scharfe Trennung der unterschiedlichen Typen nicht möglich, da diese *in vivo* nebeneinander bzw. synergistisch ablaufen können. In Abb. 1 sind die Reaktionen der Typen I bis IV schematisch dargestellt.

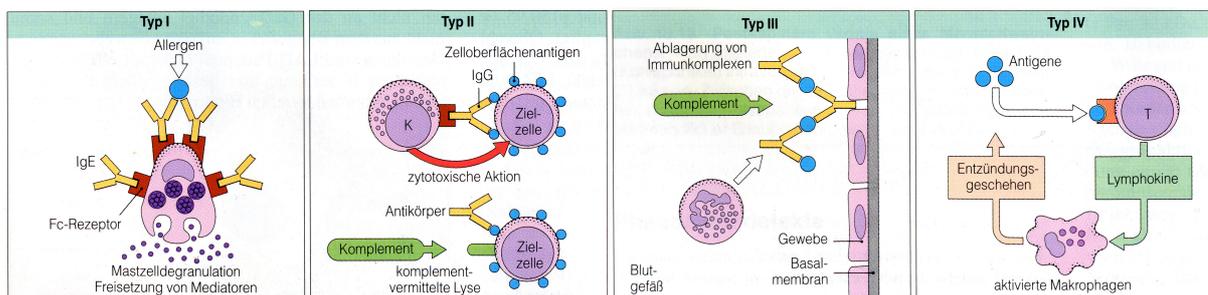


Abb. 1: Klassifikation der allergischen Immunantwort anhand des Pathomechanismus in vier Typen. (verändert nach Roitt *et al.*, 2001)

Allergische Reaktionen vom Typ I werden auch als Allergien vom Soforttyp bezeichnet, da die Symptome bei sensibilisierten Personen schon innerhalb von Minuten nach Allergenkontakt in Erscheinung treten können. Die Typ I-Allergie wird durch IgE-Antikörper vermittelt und die Symptome können von einer allergischen Rhinitis, einem bronchialem Asthma, einer Urtikaria und einem atopischem Ekzem bis zum anaphylaktischen Schock reichen.

Die allergische Reaktion vom Typ II beruht auf einer cytotoxischen Immunreaktion. Diese wird durch Allergen-spezifische Antikörper der Klassen IgG und IgM vermittelt. Bei einer Reaktion der Antikörper mit dem zellgebundenen Allergen kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, wodurch eine Lyse der Zelle ausgelöst wird. Beispiele der Typ II-Allergie sind die hämolytische Anämie, die Agranulozytose und die Rhesusunverträglichkeit.

Eine Typ III-Allergie, auch Immunkomplex-Reaktion genannt, wird ebenfalls von IgG und IgM vermittelt. Die Allergen-spezifischen Antikörper bilden mit den Allergenen, die in Lösung oder Matrix-assoziiert vorliegen, Immunkomplexe. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems und infolge dessen zu einer Infiltration von Phagozyten. Diese setzen lysosomale Proteasen frei, die eine Schädigung des Gewebes verursachen. Bei einer Typ III-Allergie wird durch die Allergene eine Entzündung ausgelöst. Typische Beispiele sind die Serumkrankheit, Vaskulitis und Alveolitis.

Im Gegensatz zu den Typ I- bis III-Allergien wird die Typ IV-Allergie nicht durch Antikörper sondern durch T-Zellen vermittelt. Nach der Erkennung des zellgebundenen Allergens durch sensibilisierte T-Helferzellen (T_H -Zellen) werden diese zu einer Freisetzung von Cytokinen aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Migration von cytotoxischen T-Zellen und Makrophagen an den Ort der Allergenbelastung und eine Entzündung entsteht. Die Symptome der Typ IV-Allergie treten erst nach einer Verzögerung von ca. 24 – 48 h nach dem Allergenkontakt auf. Die Typ IV-Allergie wird auch als zelluläre Immunreaktion oder Spätreaktion bezeichnet. Als klinische Beispiele sind das Kontaktekzem, z.B. bei einer Nickel-Allergie, und Arzneimittel-Exantheme zu nennen.

1.2. Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Im Fokus dieser Arbeit steht die Gräserpollenallergie, die zu der Gruppe der Typ I-Allergien gehört. Aus diesem Grund soll hier auf den Pathomechanismus näher eingegangen werden. Der Reaktionsmechanismus gliedert sich in zwei Phasen, einer Sensibilisierungs- und einer Effektorphase (Abb. 2). Die Sensibilisierungsphase legt den Grundstein für die allergische Immunantwort und verläuft ohne die typischen Symptome. Erst nach einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kommt es in der Effektorphase zur Ausbildung der Symptome einer Allergie.

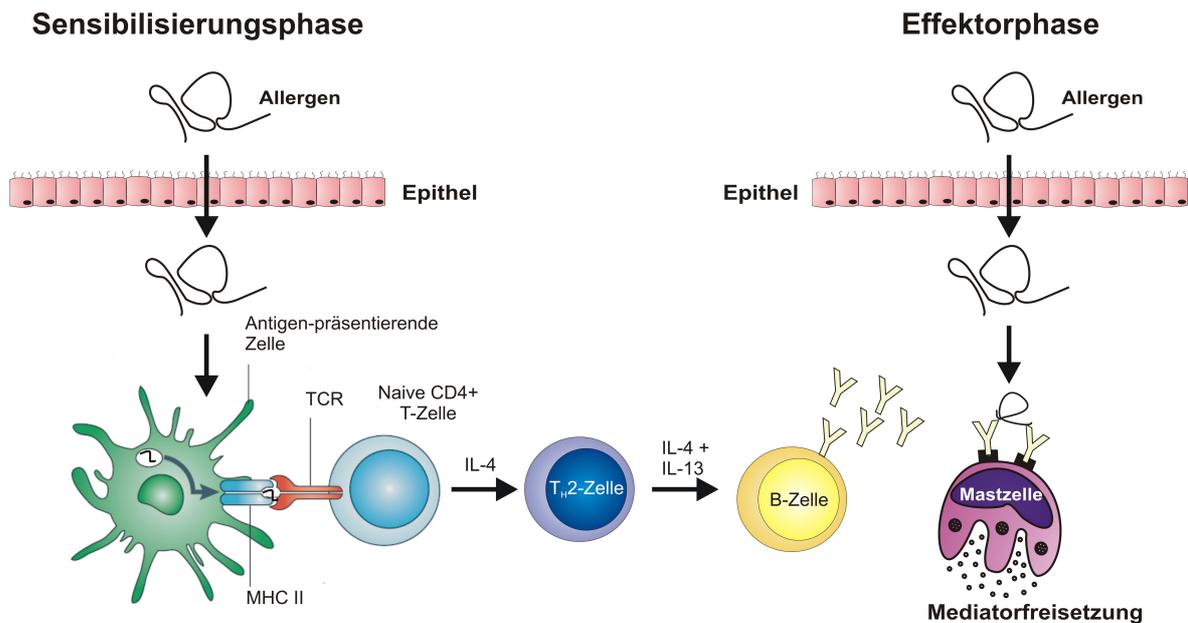


Abb. 2: Pathomechanismus der Typ I-Allergie (verändert nach Hawrylowicz und O'Garra, 2005; Roitt *et al.*, 2001)

Nach dem Überwinden der Epithel-Barriere werden die Allergene von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, wie z.B. Dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen. Die Allergene werden von den APC während ihrer Wanderung von der Peripherie in die lymphatischen Organe prozessiert und die Fragmente anschließend auf der Zellmembran über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) in den Lymphknoten präsentiert (Lambrecht, 2001). An diesen MHC II-Fragment-Komplex können naive T-Helferzellen (T_H-Zellen) über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR), der für das Fragment spezifisch ist, und den Oberflächenmarker CD4 binden. Für eine Aktivierung der T_H-Zellen werden jedoch noch weitere costimulierende Faktoren benötigt. So bindet z.B. der Oberflächenmarker der T_H-Zellen CD28 an B7 der DCs und der CD40-Ligand an CD40 (Lenschow *et al.*, 1996; van Kooten und Banchereau, 2000). Die naiven T_H-Zellen werden durch eine solche Bindung an die APCs zur Reifung und klonalen Expansion aktiviert.

Die reifen T_H-Zellen lassen sich anhand ihrer Cytokinmuster in zwei Subtypen klassifizieren, die T_H1-Zellen und T_H2-Zellen (Mosmann und Coffman, 1989). Die T_H1-Zellen sekretieren insbesondere die Cytokine Interferon (IFN) γ , Tumor-

Necrose Faktor (TNF) β und Interleukin (IL) 2. Diese Cytokine bewirken eine Aktivierung der zellvermittelten Immunreaktion, z.B. durch Makrophagen gegen intrazelluläre Pathogene (Belardelli, 1995). Dagegen werden von den T_H2 -Zellen unter anderem die Cytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sekretiert, die eine Aktivierung von B-Zellen und eine humorale Antwort mit IgE und IgG1 gegen extrazelluläre Pathogene induzieren (Locksley, 1994). Eine Differenzierung in T_H1 -Zellen oder T_H2 -Zellen wird neben der Art der Costimulatoren und des Antigens auch durch das umgebene Cytokin-Milieu während der Interaktion mit den APCs beeinflusst. Das Cytokin IL-12 unterstützt eine Differenzierung zu T_H1 -Zellen (Manetti *et al.*, 1993), wogegen das Cytokin IL-4 eine T_H2 -Polarisation der Immunreaktion induziert (Le Gros *et al.*, 1990). Die Allergen-spezifischen T-Zellen weisen nach ihrer Aktivierung ein für T_H2 -Zellen typisches Cytokinmuster auf und spielen somit bei der Allergie eine zentrale Rolle, da sie mit B-Zellen interagieren und diese zur Differenzierung zu IgE produzierenden Plasmazellen aktivieren (Parronchi *et al.*, 1991; Wierenga *et al.*, 1990).

Die B-Zellen, die die Allergene ebenfalls internalisieren, prozessieren und die Peptide über MHC II präsentieren, werden erst durch Allergen-spezifische T_H2 -Zellen aktiviert, wenn zum einen der Peptide-MHC II-Komplex durch den TCR der T_H2 -Zellen spezifisch gebunden wird. Zum anderen benötigt die B-Zelle weitere Costimuli, wie eine Bindung des CD40-Liganden der T_H2 -Zellen an CD40 der B-Zelle und zusätzliche Cytokine (Banchereau *et al.*, 1994; Clark und Ledbetter, 1994). Durch diese Faktoren wird die B-Zelle zur Proliferation und zur Differenzierung zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle angeregt. Ausschlaggebend für eine Allergie ist die Differenzierung der B-Zelle zu einer IgE-produzierenden Plasmazelle, die neben der Art der Costimuli insbesondere durch die Cytokine IL-4 und IL-13 ausgelöst wird (Bacharier *et al.*, 1998; de Vries, 1998).

Die IgE-Antikörper binden an den hochaffinen $Fc\epsilon$ -Rezeptor ($Fc\epsilon$ RI), der unter anderem von Mastzellen, Basophilen und aktivierten Eosinophilen exprimiert wird (Kinet, 1999). In der Effektorphase wird das Allergen bei einem erneuten Kontakt von den IgE- $Fc\epsilon$ RI-Komplexen gebunden. Da Allergene mindestens zwei

IgE-Epitope besitzen, können die IgE-FcεRI-Komplexe der Mastzellen durch das Allergen quervernetzt werden. Diese Quervernetzung führt zu einer Konformationsänderung und Aggregation der Komplexe und löst eine Aktivierung der Mastzellen und Basophilen aus (Metzger, 1992; Turner und Kinet, 1999). Dies führt zu einer Degranulation der Zellen und zur Freisetzung der enthaltenden Mediatoren, wie z.B. Histamin, Chymase und Tryptase. Weiterhin wird die *de novo* Synthese von proinflammatorischen Lipidmediatoren, wie Prostaglandine und Leukotriene, sowie die Synthese und Freisetzung von Cytokinen, wie IL-4 und IL-13, angeregt (Galli, 2000). Die Mediatoren der Mastzellen verursachen innerhalb von Minuten nach Allergenkontakt die Symptome der sogenannten Sofortphase, wie eine bronchiale Muskelkontraktion, Vasodilatation, Erhöhung der Vasopermeabilität und erhöhte Schleimsekretion (Metcalf *et al.*, 1997; Williams und Galli, 2000). Die Spätphase der allergischen Reaktion beginnt erst ca. 4 Stunden nach dem Allergenkontakt. Sie ist durch eine von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen vermittelte Infiltration von Eosinophilen in das Gewebe gekennzeichnet, deren Degranulation eine Entzündungsreaktion hervorruft (Massey, 1993).

1.3. Gräserpollen als Auslöser allergischer Reaktionen

Die am weitesten verbreiteten allergischen Erkrankungen gehören zur Gruppe der Typ I-Allergien, deren häufigsten Symptome allergisches Bronchialasthma und allergische Rhinitis sind. Diese Symptome werden durch eine Sensibilisierung gegen inhalative Allergene verursacht. Die wichtigsten inhalativen Allergene stammen in Europa von der Hausstaubmilbe und den Hasel-, Birken- und Gräserpollen. Nach Schätzungen leiden ca. 20 % der europäischen Bevölkerung bzw. 40 % der atopischen Patienten unter einer Gräserpollenallergie (Burney *et al.*, 1997; D'Amato *et al.*, 1998). Die Gräser, die zu den windbestäubenden Pflanzen gehören, setzen in Deutschland in der Zeit von Mai bis August große Mengen an Pollen frei. In diesem Zeitraum treten auch die Symptome bei Gräserpollen-Allergikern auf.

Weltweit werden die Extrakte aus den Pollen von 20 bis 30 verschiedenen Gräser-Spezies in der Diagnostik verwendet, wobei die Pollen der Gräserarten *Lolium perenne* (Lolchgras) und *Phleum pratense* (Lieschgras) die größte Allergenvielfalt besitzen (Andersson und Lidholm, 2003). Beim Kontakt der Pollen mit wässrigen Lösungen werden die Allergene innerhalb kürzester Zeit freigesetzt (Vrtala *et al.*, 1993). Die Allergene der Gräser können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und ihren biochemischen Eigenschaften in 11 verschiedene Gruppen gegliedert werden. In Tab. 1 sind die Eigenschaften der Allergengruppen dargestellt. Dabei setzt sich jede Gruppe aus verschiedenen Isoformen zusammen, wobei nicht alle Gruppen in jeder Gräsergattung vertreten sind. Allen Pollenallergenen ist gemeinsam, dass sie ein relativ geringes Molekulargewicht von maximal 70 kDa aufweisen, hydrophile Eigenschaften besitzen und relativ stabile Proteine sind.

Tab. 1: Eigenschaften der in Gräsern vertretenden Allergengruppen.
(Zusammengefasst nach Andersson und Lidholm, 2003).

	Masse	pI	Kohlenhydrat-Anteil	IgE-Prävalenz
Gruppe 1	31 – 35 kDa	4,5 – 8,5	5 – 10 %	90 – 95 %
Gruppe 2	10 – 12 kDa	4,5 – 5,5	---	40 – 60 %
Gruppe 3	10 – 12 kDa	9,0 – 9,5	---	ca. 60 % Sequenz-identität zu Gruppe 2
Gruppe 4	50 – 67 kDa	8,5 – 10,0	10 – 15 %	80 %
Gruppe 5	27 – 33 kDa	4,0 – 8,5	---	65 – 85 %
Gruppe 6	ca. 13 kDa	4,3 – 5,5	---	60 – 70 %
Gruppe 7	ca. 9 kDa	4,0 – 4,5	---	10 %
Gruppe 10	12 kDa	ca. 9	---	gering, IgE-Bindung kontrovers diskutiert
Gruppe 11	18 kDa	5,0 – 6,0	ca. 8 %	bis zu 66 %
Gruppe 12	14 kDa	4,0 – 5,0	---	15 – 30 %
Gruppe 13	55 – 60 kDa	6,5 – 7,5	Glykoprotein	50 %

1.4. Allergene des Lieschgrases *Phleum pratense*

Der Pollen des Lieschgrases ist eine der wichtigsten Allergenquellen, da das Lieschgras in ganz Nord- und Mitteleuropa verbreitet ist und im Pollen alle Allergengruppen enthalten sind. Reagieren mehr als 50 % der Gräserpollenallergiker auf ein Allergen, so wird es als Majorallergen bezeichnet (King *et al.*, 1995). Im Pollen des Lieschgrases sind 4 Majorallergene vertreten, das Gruppe 1-Allergen Phl p 1, das Gruppe 5-Allergen Phl p 5, das Gruppe 6-Allergen Phl p 6 und das Gruppe 13-Allergen Phl p 13. Auf die für diese Arbeit relevanten Allergene Phl p 1 und Phl p 6, die sich in ihrer Struktur stark voneinander unterscheiden, soll hier näher eingegangen werden.

Das Phl p 1 besitzt eine Masse von 31 bis 35 kDa und weist einen Kohlenhydratanteil von ca. 5 % seiner Masse auf (Petersen *et al.*, 1993). Der Aminosäurerest Asn 9 weist eine N-Glykosylierung und der Rest Hyp 5 eine O-Glykosylierung auf (Wicklein *et al.*, 2004). Weiterhin besitzt Phl p 1 sieben Cysteinreste, die an der Ausbildung von 3 Disulfidbrücken beteiligt sind (Petersen *et al.*, 1995c). Die genaue Verknüpfung ist jedoch noch unklar. Phl p 1 weist aufgrund der Sequenz eine Homologie zu der Proteinfamilie der β -Expansine auf, die bei der Fruchtreife und der Zellwandstreckung eine Rolle spielen (Cosgrove, 1997). Weiterhin wird für Phl p 1 eine Cysteinprotease-Aktivität postuliert (Grobe *et al.*, 1999). Gegenüber den Gruppe 1-Allergenen weisen 95 % der Gräserpollenallergiker eine IgE-Reaktivität auf (Freidhoff *et al.*, 1986).

Das Gruppe 6-Allergen Phl p 6 ist ein ca. 13 kDa großes Protein, das hauptsächlich in zwei Formen mit einem pI von 5,2 und 5,5 vorliegt (Petersen *et al.*, 1995a). Aus einer cDNA-Bibliothek des Lieschgras-Pollens konnte die cDNA-Sequenz des Phl p 6 bestimmt und eine Proteinsequenz von 110 Aminosäuren abgeleitet werden (Petersen *et al.*, 1995b). Eine weitere, nur an zwei Aminosäurepositionen (AS 14 und AS 95) abweichende Sequenz für das Phl p 6 wurde von Vrtala *et al.* (1999) beschrieben, die ebenfalls auf einer Klonierung aus einer cDNA-Bibliothek basierte. Eine biologische Funktion konnte für das Phl p 6 bislang nicht identifiziert werden. Das Phl p 6 besitzt bei den Gräserpollenallergikern eine IgE-Prävalenz von über 70 % (Vrtala *et al.*, 1999)

1.5. Die Epithel-Barriere des Respirationstraktes

Die Gräserpollen treten über den Respirationstrakt beim Einatmen mit dem Organismus in Kontakt. Da nur Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 5 µm in die unteren Atemwege gelangen können, dringt der Pollen aufgrund seines Durchmessers von ca. 30 µm nur bis zu den oberen Atemwegen vor (Wilson *et al.*, 1973). Dort werden die Allergene infolge einer Hydratisierung der Pollen durch das Sekret, das die Epithelien des Respirationstraktes überzieht, schnell freigesetzt (Vrtala *et al.*, 1993). Diese Freisetzung der Allergene in den oberen Atemwegen erklärt Symptome wie die allergische Rhinitis, jedoch nicht die der unteren Atemwege, wie die des allergischen Asthmas. Dazu müssen die Allergene bis in die Bronchiolen und Alveolen vordringen, was nur für Partikel kleiner als 5 µm möglich ist (Driessen und Quanjer, 1991). Als Allergenträger können zum einen Pollenfragmente und die im Pollen enthaltenden Stärkekörner fungieren (Schäppi *et al.*, 1997). Besonders nach Regenfällen werden die Fragmente und Stärkekörner, die einen Durchmesser von ca. 2,5 µm aufweisen, aus den Pollen freigesetzt und können Asthmaanfälle bei den Patienten auslösen (Taylor *et al.*, 2002). Zum anderen können die Allergene von Feinstäuben, wie z.B. Dieselruß, gebunden werden und so bis in die unteren Atemwege gelangen (Knox *et al.*, 1997).

Das die Epithelien überziehende Sekret, mit dem die Allergene zuerst in Kontakt treten, setzt sich aus mucösen Glykoproteinen, Lipiden, Salzen und sekretorischen Proteinen zusammen (Boat und Cheng, 1980). Der Protein-Anteil wird unter anderem von Immunglobulinen (IgA), Surfactant-Proteinen und auch Proteasen und deren Inhibitoren gebildet und stellt die erste Barriere zur Abwehr von Pathogenen dar (Lopez-Vidriero, 1989). Um eine allergische Reaktion auslösen zu können, müssen die Allergene diese Barriere überwinden. Hierbei kann eine Fragmentierung der Allergene durch die im Sekret enthaltenden Proteasen stattfinden. Bufe *et al.* (1998) konnten zeigen, dass das Nasensekret eine Fragmentierung des Lieschgras-Allergens Phl p 5b verursacht und dadurch das immunogene Potential des Allergens sogar erhöht werden kann.

Die zweite Barriere stellen die Epithelien des Respirationstraktes dar. Diese weisen starke Unterschiede im Aufbau je nach ihrer Lokalisation auf (Abb. 3). Die Trachea, die Bronchien und die Bronchiolen besitzen ein Flimmerepithel, das die Sekrete mit anhaftenden Partikeln zum Rachenraum transportiert. Dagegen besitzt das respiratorische Epithel in den Alveolen keine Microvilli und weist auch nur eine dünne Sekretschicht auf, um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten. Ein Überwinden dieser Barriere kann durch eine Schädigung des Epithels, die z.B. durch die Allergene selbst verursacht wird, erfolgen. Für das Hauptallergen der Hausstaubmilbe, das Der p 1, wurde eine Cysteinprotease-Aktivität beschrieben, die zu einem Aufbrechen der tight junctions des Epithels führen kann (Wan *et al.*, 1999). Weiterhin wurde die Freisetzung des Cytokins IL-8 durch bronchiale Epithelzellen nach einer Inkubation mit Gräserpollen-Extrakt beschrieben (Tomee *et al.*, 1998), was auch auf eine immunologische Interaktion zwischen Allergenen und Epithelzellen schließen lässt.

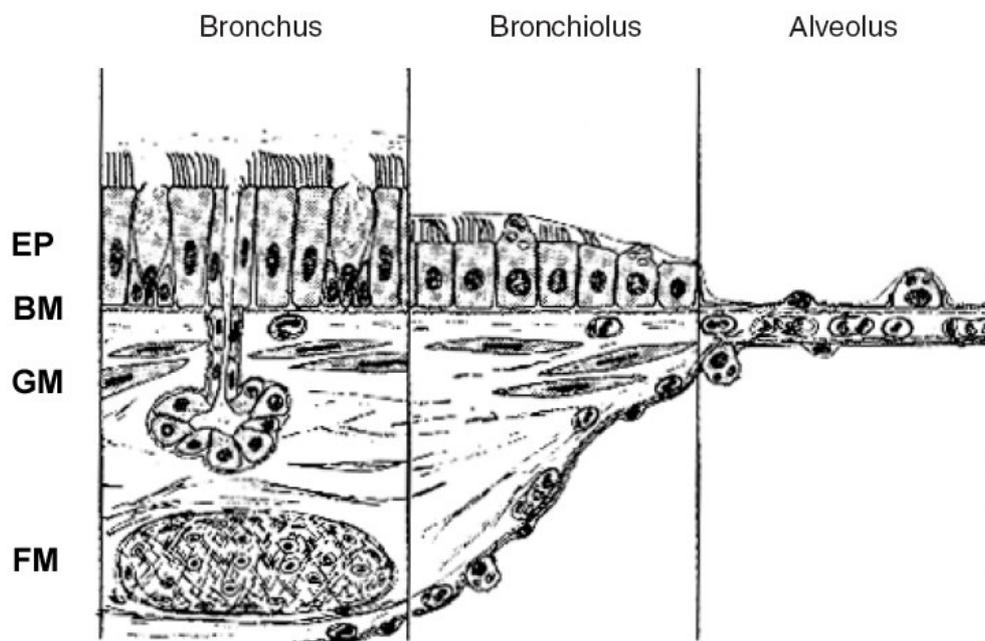


Abb. 3: Aufbau des Epithels in den verschiedenen Regionen des Respirationstraktes. EP: Epithelzellen; BM: Basalmembran; GM: Glatte Muskulatur; FM: Fibrin-Mantel. (nach Fuchs *et al.*, 2002)

1.6. Bedeutung der Antigen-präsentierenden Zellen

Die Antigen-präsentierenden Zellen spielen bei der Sensibilisierung gegen die Allergene eine zentrale Rolle, da sie maßgeblich die Differenzierung der T_H-Zellen in T_H2-Zellen beeinflussen. Eine detaillierte Analyse der Mechanismen zur Allergen-Aufnahme, Prozessierung und Präsentation ist deshalb von großer Bedeutung für das Verständnis der Entstehung allergischer Erkrankungen und zur Ableitung von Therapien.

Die Antigen-präsentierenden Zellen, zu denen B-Zellen, Makrophagen und DCs gehören, unterscheiden sich stark in ihrem Antigen-prozessierendem und präsentierendem Potential (Mellman und Steinman, 2001; Schneider und Sercarz, 1997). Die B-Zellen internalisieren hauptsächlich Antigene spezifisch über membrangebundene Immunglobuline und präsentieren die Peptide des Antigens über MHC II. Die primäre Funktion der B-Zellen ist jedoch die Antikörper-Sekretion (Trombetta und Mellman, 2005). Die Makrophagen sind stark in den peripheren Geweben vertreten und internalisieren Antigene hauptsächlich unspezifisch durch Phagozytose. Die Effizienz der Antigenpräsentation und T_H-Zell-Stimulation der Makrophagen ist im Vergleich zu den anderen APCs jedoch sehr gering, da sie relativ wenig MHC II-Komplexe exprimieren. Ihre primäre Funktion liegt daher bei der angeborenen Immunität in der Neutralisation von Mikroorganismen (Trombetta und Mellman, 2005). Die Funktion der DCs, die ebenfalls stark in den peripheren Geweben vertreten sind, liegt als einzige Zellgruppe der APCs nur in der Antigenaufnahme und -präsentation. Sie zeichnen sich durch eine hohe Endocytoserate und starke Effizienz der T_H-Zell-Stimulation aus (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Da die DCs bei der Antigenpräsentation eine zentrale Rolle spielen, soll im Folgenden näher auf die Bedeutung dieser Zellen eingegangen werden.

DCs sind in den Epithelien, die mit der Umwelt in Kontakt stehen, in interzellulären Zwischenräumen zu finden und bilden ein enges Netzwerk (Holt *et al.*, 1989). Hier erfolgt die Aufnahme von Antigenen entweder spezifisch über Rezeptor-vermittelte Endocytose oder unspezifisch durch Phagozytose bzw. Makropinocytose. An der Rezeptor-vermittelten Aufnahme sind z.B. die Fc-Rezeptoren für Immunglobuline

(Fanger *et al.*, 1996) und Lectin-Rezeptoren beteiligt, wie z.B. der Mannose-Rezeptor oder der Kohlenhydrat-Rezeptor DEC-205 (Engering *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1995). Die Rezeptor-vermittelte Endocytose wird über die sogenannten Clathrin-coated pits vermittelt (Stahl und Schwartz, 1986). Die unspezifische Aufnahme von Antigenen erfolgt bei den DCs hauptsächlich über Makropinocytose (Sallusto *et al.*, 1995). Dabei wird die extrazelluläre Flüssigkeit durch Umlagerungen der Zellmembran vermittelt durch das Actinfilament-Gerüst in Vesikeln, den Pinosomen, mit einem Durchmesser von ca. 2 µm eingeschlossen (Racoosin und Swanson, 1989). Anschließend werden die in den Pinosomen enthaltenden Antigene lysosomal prozessiert und präsentiert. Die DCs exprimieren während der Antigenaufnahme nur sehr geringe Mengen an MHC II-Komplexen und costimulierenden Molekülen auf ihrer Oberfläche, so dass die Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation nicht effektiv ist (Cella *et al.*, 1997; Pierre *et al.*, 1997a). In diesem Zustand werden die DCs als unreife DCs bezeichnet.

Eine effektive Präsentation der Antigene erfolgt erst nach einer Differenzierung der unreifen DCs zu sogenannten reifen DCs. Während dieser Reifung wandern die DCs von den peripheren Geweben in die T-Zell-Zone der Lymphknoten, wo sie auf die naiven T_H-Zellen treffen. Die Wanderung der DCs wird dabei über die Expression von Chemokin-Rezeptoren reguliert (Randolph *et al.*, 2005). Eine Reifung der DCs erfolgt erst nach einem Stimulus, der entweder direkt über die Interaktion der Pathogene mit Rezeptoren, den „pattern-recognition receptors“ (PRRs), oder indirekt, z.B. über inflammatorische Cytokine, erfolgen kann (Gallucci und Matzinger, 2001). Durch einen Reifungsstimulus wird die Aufnahme von Antigenen gehemmt und die Expression von MHC II-Peptid-Komplexen sowie costimulierenden Molekülen auf der Oberfläche erhöht (Cella *et al.*, 1997; Pierre *et al.*, 1997b; Zhou und Tedder, 1996). Zu diesen costimulierenden Molekülen bzw. Reifungsmarkern zählen die Oberflächenmarker CD80 und CD86, die zur B7-Molekülfamilie gehören (Lenschow *et al.*, 1996), und CD83, ein Mitglied der Ig-Superfamilie (Lechmann *et al.*, 2002). Ein starker Stimulus für die Reifung von DCs sind bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Rescigno *et al.*, 1998). LPS führt in der ersten Phase der Immunreaktion durch die Induktion einer IL-12-Freisetzung zu einer T_H1-Polarisierung und im weiteren Verlauf zu einer

T_H2-Polarisierung (Langenkamp *et al.*, 2000). Neben der Art des Reifungssignals hat auch die Antigenkonzentration einen Einfluss auf die Expression der costimulierenden Moleküle und Freisetzung von Cytokinen, wodurch eine Polarisierung der T_H-Zellen verursacht wird. Eine niedrige Antigenkonzentration führt zu einer T_H2-Polarisation, eine hohe Antigenkonzentration dagegen zu einer gemischten T_H1/T_H2-Polarisation der T_H-Zellen (Tanaka *et al.*, 2000).

Dieses Modell der Reifung und Wanderung der DCs zu den Lymphknoten stellt beim Menschen die Situation *in vivo* jedoch nur stark vereinfacht dar. So wurden in den Lymphknoten neben den reifen DCs auch unreife DCs und Zwischenstufen der Reifung gefunden (Fujii *et al.*, 2004; Steinman *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass DCs mit diesem Zwischenstufen-Phänotyp bei der Induktion von Toleranz eine Rolle spielen (Heath und Carbone, 2001). Neben einer Unterscheidung in unreife und reife DCs können noch verschiedene Klassen von DCs anhand ihrer Vorläuferzellen, der Gewebeverteilung und ihren Oberflächenmarker unterschieden werden. In der Epidermis sind z.B. die Langerhans-Zellen (LCs) lokalisiert, die sich durch sogenannte Birbeck-Granula, einer CD1a-Expression und ein T_H1-polarisierendes Potential auszeichnen (Strobl *et al.*, 1998). Die Bedeutung der verschiedenen Subtypen der DCs für das Immunsystem ist jedoch bis jetzt noch weitestgehend unklar (Banchereau *et al.*, 2000; Liu, 2001). Außerdem stammen die meisten Erkenntnisse über die DCs aus *in vitro* Zellkultur-Systemen, wie z.B. den aus Monocyten durch IL-4 und GM-CSF generierten DCs. Dadurch sind zwar Untersuchungen an einer definierten Zellpopulation durchführbar, aber eine Übertragung auf die *in vivo*-Situation ist nur bedingt möglich (O'Neill und Wilson, 2004).

1.7. Zielsetzung

Um eine Sensibilisierung und anschließend eine allergische Reaktion auslösen zu können, müssen die Gräserpollenallergene die Epithelbarriere des Respirationstraktes überwinden. Das Epithel ist mit Sekreten überzogen, die neben Mucus auch Proteasen und Proteaseinhibitoren enthalten. Hier kann es zu ersten Interaktionen mit den Allergenen kommen, wie z.B. eine Fragmentierung

der Allergene durch die im Sekret enthaltenden Proteasen. Weiterhin können die Allergene von den Epithelzellen sowie den APCs aufgenommen und prozessiert werden. Durch eine Fragmentierung bzw. eine intrazelluläre Prozessierung könnte die Struktur der Allergene so verändert werden, dass das Allergie auslösende Potential der Allergene erhöht und dadurch eine Sensibilisierung gefördert wird. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer solchen Fragmentierung durch das Sekret und die intrazelluläre Prozessierung der Allergene durch Epithelzellen und APCs.

Um die entstehenden Fragmente eindeutig identifizieren zu können, ist eine exakte Charakterisierung der Allergene und ihrer Isoformen eine wichtige Voraussetzung. Am Beispiel des Gruppe 6-Allergens des Lieschgrases Phl p 6, für das auf der Basis von cDNA-Analysen zwei Isoformen beschrieben wurden, wurde in dieser Arbeit eine detaillierte Charakterisierung auf Proteinebene anhand von elektrophoretischen und massenspektrometrischen Methoden durchgeführt. Weiterhin sollte geprüft werden, ob rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes Phl p 6 eine zum natürlichen Phl p 6 identische Struktur aufweist und somit als definiertes Protein für die Untersuchungen eingesetzt werden kann. Zusätzlich sollte die Faltung beider Proteine, die besonders für die Untersuchungen zur Fragmentierung und intrazellulären Prozessierung von Bedeutung ist, anhand spektroskopischer Methoden miteinander verglichen werden.

Nach der Charakterisierung des Phl p 6 sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob Nasensekret bzw. BAL-Flüssigkeit eine Fragmentierung des Phl p 6 verursachen kann. Anschließend wurde auf der Ebene der Epithelzellen die Allergenaufnahme anhand von Zelllinien untersucht, die ihrem Ursprung nach aus verschiedenen Regionen des Respirationstraktes stammen. Um ein allgemeines Prinzip für die Aufnahme und Prozessierung der Allergene ableiten zu können, sollte zum Vergleich auch das wesentlich komplexer aufgebaute Allergen Phl p 1 eingesetzt werden. Weiterhin sollte auf der Ebene der APCs die Allergenaufnahme untersucht und charakterisiert werden. Dazu sollten in dieser Arbeit DCs aus den Monocyten nicht-atopischer Personen generiert werden, um die Mechanismen der Allergenaufnahme vor einer Sensibilisierung bzw. während einer Toleranz gegenüber den Allergenen zu analysieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) in Analyse-Qualität bezogen. Doppelt destilliertes Wasser (H_2O_{bidest}) wurde durch eine Milli-Q-academic-Anlage (Millipore, Schwalbach) mit einem Widerstand von $18,2 M\Omega \times cm$ bei $25\text{ }^\circ C$ gewonnen.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Die chromatographischen Medien und Säulen wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Des weiteren wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

Zellkulturplatten 96 well/ 24 well/ 6 well	Nunc [™] (Wiesbaden)
Zellkulturschalen 25 cm ² / 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhausen)
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Pipetten, steril 1 ml/ 2 ml/ 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Corning (Schiphol-Rijk, Niederlande)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml/ 10 ml/ 15 ml/ 50 ml	Sarstedt, Greiner
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt
Filtrationseinheit 125 ml	Schleicher & Schuell (Dassel)

2.1.3. Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte häufig verwendet:

FPLC-Anlage	ÄKTAprime (Amersham Biosciences)
HPLC-Anlage	ÄKTapurifier (Amersham Biosciences)
Speedvac	SPD12P (Thermo Savant, Holbrook, USA)
Gefriertrocknungsanlage	LYOVAC GT2 (Leybold-Heraeus, Köln)

2.1.4. Antikörper

Zum Nachweis von Phl p 1 wurden die monoklonalen Antikörper (mAk) Bo14, HB7 und IG12 eingesetzt. Phl p 6 wurde mit dem mAk Bo12 nachgewiesen. Diese vier mAk wurden von Dr. Wolf-Meinhard Becker und PD Dr. Arnd Petersen zur Verfügung gestellt. Für Immunoblots wurden die mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten sekundären Antikörper Ziege anti-Maus IgG/IgM (H+L) (Dianova, Hamburg) und Maus anti-human IgE (Allergopharma, Reinbek) verwendet. In der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden neben den mAk Bo14 und Bo12 auch Maus anti-human CD29 (Immunotech, Marseille, Frankreich) und Maus anti-human CD71 (BD Biosciences, Heidelberg) und als sekundärer Antikörper Ziege anti-Maus IgG markiert mit Alexa 568 (Molecular Probes, Karlsruhe) verwendet. Für eine durchflusscytometrische Charakterisierung der Dendritischen Zellen wurden Phycoerythrin (PE) markierte Maus anti-human Antikörper spezifisch für CD1a, CD14, CD83, HLA-DR und den Mannose-Rezeptor CD206 der Firma BD Biosciences verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 2 nochmals aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Antikörper. PE: Phycoerythrin; AP: Alkalische Phosphatase; FACS: Durchflusscytometrie; IB: Immunoblot; KM: Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Spezifität	Klon	Konjugation	Quelle	Anwendung
Maus anti-human CD1a	HI149	PE	BD Biosciences (Heidelberg)	FACS
Maus anti-Human CD14	MφP9	PE	BD Biosciences	FACS
Maus anti-human CD83	HB15e	PE	BD Biosciences	FACS
Maus anti-human CD206	19	PE	BD Biosciences	FACS
Maus anti-human HLA-DR	L243	PE	BD Biosciences	FACS
Isotypenkontrolle, Maus IgG _{2a}	G155-178	PE	BD Biosciences	FACS
Maus anti-human CD29	IOT29	---	Immunotech (Marseille, Frankreich)	KM
Maus anti Phl p 1	Bo14 HB7 IG12	---	W.M. Becker/ A. Petersen FZ Borstel	IB, KM
Maus anti Phl p 6	Bo12	---	W.M. Becker FZ Borstel	IB, KM
Ziege anti-Maus IgG/IgM (H+L), polyklonal	---	AP	Dianova (Hamburg)	IB
Maus anti-human IgE		AP	Allergopharma (Reinbek)	IB
Ziege anti-Maus IgG (H+L), polyklonal	---	Alexa Fluor® 568	Molecular Probes (Karlsruhe)	KM

2.1.5. Humanes Material

Die Blutspender und Patienten wurden über die Verwendung des Materials aufgeklärt und hatten ihre Zustimmung schriftlich erteilt. Die Versuche wurden von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Die Seren von Patienten mit manifestierter Gräserpollenallergie, die durch einen Hauttest und Radio-Allergen-Sorbent-Test (RAST) bestätigt wurde, wurden von Dr. Frank Eberhardt (Medizinische Klinik Borstel) zur Verfügung gestellt. Die Nasensekret-Proben

wurden von Dr. Kristina Kolbow (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) und die BAL-Flüssigkeiten wurden von der Laborgruppe Klinische Immunpharmakologie, Forschungszentrum Borstel, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dendritische Zellen wurden ausschließlich aus dem Blut von gesunden, nicht atopischen Spendern generiert. Die Spender wiesen alle einen Gesamt-IgE-Titer unter 20 IU/ml und einen negativen RAST-Test gegen 15 verbreitete Allergene auf, unter anderem von Gräser- und Birkenpollen.

2.1.6. Zelllinien

E.coli-Stamm JM109 (Stratagene)

Genotyp: e14⁻(McrA⁻) recA1 end A1 gyrA96 thi-1 HsdR17 (r_K⁻m_K⁺)
supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac1^qZΔM15]

transfiziert mit dem Vektor pMal-C-phlp6.1 (PD Dr. Arnd Petersen LG Molekulare und Klinische Allergologie, Forschungszentrum Borstel)

A549-Zelllinie

Die A549-Zelllinie von der "American Type Culture Collection" (ATCC) bezogen (ATCC-Nr. CCL-185). Die A549-Zelllinie wurde aus einem Lungentumor eines 58-jährigen kaukasischen Patienten im Jahre 1972 isoliert. Diese Adenokarzinomzelllinie besitzt die Eigenschaften von humanen Typ II Lungenalveolarepithelzellen (Lieber *et al.*, 1976).

Calu-3-Zelllinie

Die Zelllinie Calu-3 (ATCC-Nr. HTB-55) wurde von der ATCC bezogen. Diese Zelllinie stammt von einem Adenokarzinom eines 25-jährigen männlichen Kaukasiers.

NCI-H727-Zelllinie

Die Zelllinie NCI-H727 (ATCC-Nr. CRL-5815) wurde von der ATCC bezogen. Das nicht-kleinzellige Tumorgewebe wurde aus der Lunge einer 65-jährigen Patientin aus Kaukasien vor Beginn der Therapie entnommen.

2.1.7. Medien

Die Bakterien wurden in Luria Broth (LB)-Medium mit folgender Zusammensetzung kultiviert:

LB-Medium, pH 7,4 10 g/l Pepton (Roth)
 5 g/l Hefeextrakt (Roth)
 10 g/l NaCl

Die Medien und Zusätze für die Zelllinien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma PAA LABORATORIES (Cölbe) bezogen und wiesen folgende Zusammensetzung auf:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

500 ml DMEM high glucose
50 ml FCS (Biochrom, Berlin)
5 ml 200 mM L-Glutamin
5 ml Penicillin (10.000 U)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung

Calu-3-Medium 50 % DMEM high glucose
 50 % F-12 Nutrient Mixture Ham (GIBCO, Karlsruhe)
 10 % FCS (Biochrom, Berlin)
 1 % Penicillin (10.000 U)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung

Die Medien und Zusätze für die Primärzellen wurden von der Firma GIBCO bezogen und setzten sich wie folgt zusammen:

Fi-Medium 475 ml RPMI 1640
 25 ml hitzeinaktiviertes FCS
 1 ml 10 mg/ml Gentamycin
 5 ml 200 mM L-Glutamin
 500 µl 50mM β-Mercaptoethanol
 Das Fi-Medium wurde steril filtriert.

Hu-DC-Medium	450 ml RPMI 1640
	50 ml hitzeinaktiviertes FCS
	1 ml 10 mg/ml Gentamycin
	5 ml 200 mM L-Glutamin
	500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol
	Das Hu-DC-Medium wurde steril filtriert.

2.1.8. Computerprogramme

Neben Standardcomputerprogrammen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Computerprogramme verwendet:

Software	Verwendungszweck
GOR (Garnier <i>et al.</i> , 1996) (http://www.expasy.ch)	Kalkulation der Sekundärstruktur von Proteinen
JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., Heidelberg)	Statistische Auswertung
PeptideMass (http://www.expasy.ch)	Kalkulation der Masse von Peptiden
WinMDI 2.8 (http://facs.scripps.edu/software.html)	Analyse der FACS-Daten

2.2. Methoden

2.2.1. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Anlagerung des anionischen Detergenzes SDS werden die Proteine denaturiert und proportional zur Länge der Polypeptidkette negativ geladen, so dass im elektrischen Feld durch die Porengröße der Gelmatrix eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt. Über den Vergleich mit Proteinen bekannter Masse lassen sich die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine bestimmen.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

SDS-Probenpuffer (nach Laemmli)	200 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 mM EDTA 25 % (v/v) Glycerin 3 % (v/v) β -Mercaptoethanol 2 % (w/v) SDS 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Elektrodenpuffer (nach Laemmli)	50 mM Tris, pH 8,3 384 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Tab. 3: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels der diskontinuierlichen SDS-PAGE. Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei Gelansätze.

	Trenngel, 15%	Sammelgel, 4%
H ₂ O _{bidest}	3,9 ml	2,9 ml
Acrylamid (Rotiphorese 30, Roth)	8,1 ml	850 μ l
Trenngelpuffer	4 ml	---
Sammelgelpuffer	---	1,3 ml
Pyronin G-Lösung 1 % (w/v)	---	16 μ l
SDS-Lösung 10 % (w/v)	163 μ l	51 μ l
TEMED	16 μ l	5 μ l
APS-Lösung 10 % (w/v)	100 μ l	30 μ l

In dieser Arbeit wurde die vertikale diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) mit dem PerfectBlue Breitformat-Doppelgelsystem Twin ExW S (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein System aus zwei übereinander geschichteten Gelen mit verschiedenen Porengrößen und Puffersystemen verwendet, einem Trenngel und darüber einem Sammelgel. Die Zusammensetzungen des 4 %igen Sammelgels und des 15 %igen Trenngels sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Beladen des Gels für 5 min bei 95 °C erhitzt. In dem oben genannten Elektrodenpuffer erfolgte die Elektrophorese bei 50 V/ 500 mA/ 150 W für 20 min. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Als Molekulargewichtsstandard wurde der SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range (BioRad, München) verwendet.

2.2.1.2. Tris-Tricine-Elektrophorese

Die Tris-Tricine-Elektrophorese ist eine speziell für niedermolekulare Proteine zwischen 1 kDa und 100 kDa entwickelte Elektrophorese. Die nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführte Tris-Tricine-Elektrophorese wurde mit der Protean II XL Vertical Electrophoresis Cell der Firma BioRad (München) durchgeführt. Das 0,8 mm dicke Gel setzt sich aus einem Trenngel, einem aufgelagerten Spacergel und einem Sammelgel zusammen. Im Gegensatz zur SDS-PAGE werden hier unterschiedliche Puffer für die Anode und Kathode verwendet und Tricine anstelle des Zwitterions Glycin eingesetzt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Gelpuffer	3 M Tris-HCl, pH 8,5 0,3 % (w/v) SDS
Probenpuffer	0,2 M Tris 0,2 M Tricine 17,5 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 0,2 M DTT 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau

Anodenpuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer (pH 8,0 - 8,5)	0,1 M Tris 0,1 M Tricine 0,1 % (w/v) SDS

Die Zusammensetzungen der Gele sind in Tab. 4 angegeben. Für ein Gel wurden 20 ml des Trenngels in die Gelkassette gegossen und direkt anschließend mit 4 ml des Spacergels überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der beiden Gelschichten wurde das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde 2 % Jodacetamid zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach dem Beladen des Gels erfolgte die Elektrophorese zuerst für 1 h bei 75 V/ 70 mA/ 50 W und anschließend bei 600 V/ 70 mA/ 50 W. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Als Molekulargewichtsstandard wurde der vorgefärbte Proteinmarker Multimark der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Tab. 4: Zusammensetzung des Sammel-, Spacer- und Trenngels der Tris-Tricine-Elektrophorese. Die Ansätze sind für zwei Gele ausreichend.

	Sammelgel	Spacergel	Trenngel
H ₂ O _{bide} st	5,4 ml	5,0 ml	3,4 ml
Gelpuffer	1,9 ml	5,0 ml	15,0 ml
Acrylamid (Rotiphorese 30, Roth)	1,1 ml	5,0 ml	21,6 ml
Glycerin-Lösung 87 % (v/v)	---	1,7 ml	10,0 ml
TEMED	8,3 µl	8,3 µl	25,0 µl
APS-Lösung 40 % (w/v)	15,0 µl	15,0 µl	53,2 µl

2.2.1.3. Zweidimensionale Elektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese (2-DE) ermöglicht eine Auftrennung von komplexen Proteingemischen anhand von zwei unabhängigen Parametern, die charakteristisch für jedes Protein sind. Im ersten Schritt, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. Dabei wandert jedes Protein bis zu dem Punkt im pH-Gradienten des Gels, an dem seine Netto-Gesamtladung gleich Null ist. Im zweiten Schritt werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE getrennt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Rehydratisierungspuffer	8 M Harnstoff 0,5 % (v/v) NP-40 10 mM DTT 0,4 % (v/v) Servalyt 3-10 (Serva) 0,1 % (v/v) Servalyt 4-6 (Serva)
Puffer für Anodengelstreifen	0,45 M Tris-Acetat pH 6,6 4,0 g/l SDS 0,05 g/l Orange G 406 ml/l Acrylamid (Rotiphorese 30, Roth)
Puffer für Kathodengelstreifen	0,08 M Tris-HCl, pH 7,1 0,8 M Tricin 6 g/l SDS 406 ml/l Acrylamid (Rotiphorese 30, Roth)
Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,8 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS Spatelspitze Bromphenolblau
Gelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Tab. 5: Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung für ein IEF-Gradientengel (1. Dimension der 2-DE). Die Immobiline wurden von Amersham Biosciences bezogen.

	Saure Lösung	Basische Lösung
Immobiline II pK 3,6	270,0 µl	---
Immobiline II pK 4,6	---	28,0 µl
Immobiline II pK 6,2	119,0 µl	12,5 µl
Immobiline II pK 7,0	22,0 µl	119,5 µl
Immobiline II pK 8,5	81,5 µl	38,0 µl
Immobiline II pK 9,3	---	87,5 µl
Acrylamid (Rotiphorese 40, Roth)	1,1 ml	1,1 ml
Glycerin	3,1 ml	---
H ₂ O _{bidest}	6,3 ml	9,6 ml
TEMED	2,5 µl	2,5 µl
APS-Lösung, 10 % (w/v)	25,3 µl	25,3 µl

Die 2-DE wurde in dieser Arbeit nach einer von Görg *et al.* (1988) entwickelten Methode in der horizontalen Elektrophoresekammer DESAPHOR HF (Desaga, Heidelberg) durchgeführt. Für die erste Dimension wurde ein 0,5 mm dickes 11 x 24 cm großes Gradientengel mit immobilisierten Ampholyten auf einen GelBond® PAG Film (Amersham Biosciences) gegossen. Die Zusammensetzung der sauren und basischen Lösung ist in Tab. 5 gezeigt. Vor dem Gießen des Gradientengels wurden beide Lösungen entgast. Der Gradientenmischer wurde mit jeweils 9,5 ml der Lösungen beschickt. Anschließend wurden als Polymerisationskatalysatoren 2,5 µl TEMED und 25,3 µl einer 10 %igen (w/v) APS-Lösung zu der sauren und basischen Lösung gegeben und das Gradientengel gegossen. Das Gel wurde für 10 min bei RT und für weitere 60 min

bei 50 °C auspolymerisiert. Anschließend wurde es 6 mal für 10 min in H₂O_{bidest} gewaschen und für 30 min in einer 1,5 %igen (v/v) Glycerin-Lösung inkubiert. Das Gel wurde über Nacht getrocknet, zum Schutz mit einer Gel-Fix[®] Folie (Serva) abgedeckt und bei –20 °C bis zur Verwendung gelagert. Für die IEF wurden ca. 3 mm breite Gelstreifen in Gradientenrichtung abgeschnitten und über Nacht in Rehydratisierungspuffer rehydratisiert. Anschließend wurden die Gelstreifen auf die auf 20 °C gekühlte Platte der Elektrophoresekammer gelegt. Die salzfreie Probe in einem maximalen Volumen von 20 µl wurde mit Hilfe von IEF/SDS Applikationsstreifen (Amersham Biosciences) in der Mitte des Streifens aufgetragen. Die Enden des Gelstreifens wurden durch einen mit H₂O_{bidest} getränkten IEF-Elektrodenstreifen (Amersham Biosciences) bedeckt. Auf diese Streifen wurden die Elektroden gelegt, die Kathode am basischen Ende und die Anode am sauren Ende des Streifens. Die IEF erfolgte für 60 min bei 200 V und unbegrenzter Stromstärke und Leistung. Anschließend wurde für 5 bis 6 Stunden bei 5000 V, 2 mA und 5 Watt fokussiert. Nach Beendigung der IEF wurden die Streifen bei –80 °C gelagert. Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte der zu untersuchenden Proteine erfolgte durch Vergleich mit dem IEF-Marker 3-10, Liquid Mix der Firma Serva.

Tab. 6: Zusammensetzung der leichten und der schweren Lösung für ein SDS-Gradientengel (2. Dimension der 2-DE).

	Leichte Lösung	Schwere Lösung
Acrylamid (Rotiphorese 30, Roth)	1,68 ml	6,66 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
SDS-Lösung, 10 % (w/v)	100 µl	100 µl
H ₂ O _{bidest}	5,7 ml	---
TEMED	3,3 µl	3,3 µl
APS-Lösung, 10 % (w/v)	33,0 µl	33,0 µl
Sucrose	---	1,5 g

In der zweiten Dimension wurde eine horizontale SDS-PAGE mit einem 4 - 20 %igem Gradientengel durchgeführt. Das 0,5 mm dicke und 11 x 24 cm große Gel wurde auf einen GelBond[®] PAG Film (Amersham Biosciences) gegossen. Die Zusammensetzung der leichten und schweren Lösung ist in Tab. 6 angegeben. Die Gelstreifen der ersten Dimension wurden für 15 min in Äquilibriumspuffer mit 1 % (w/v) DTT bei RT reduziert und anschließend für 15 min in Äquilibriumspuffer mit 2,5 % (w/v) Jodacetamid alcyliert. Zwei Streifen wurden nebeneinander auf der grobporigeren Seite des Gradientengels luftblasenfrei platziert. Auf der Anoden- und Kathodenseite wurden vorgefertigte Gelstreifen (hergestellt aus: 20 ml Anoden- bzw. Kathodengelstreifen-Puffer + 25 µl TEMED + 250 µl 10 %ige (w/v) APS-Lösung) einer Größe von ca. 1 x 1 x 25 cm gelegt und mit den jeweiligen Elektroden in Kontakt gebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 °C für 30 min bei 600 V/ 20 mA/ 30 W und anschließend bei 600 V/ 50 mA/ 30 W. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande den Anoden-Streifen erreicht hatte. Als Molekulargewichtsstandard wurde der SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range (BioRad, München) verwendet.

2.2.1.4. Coomassie-Färbung

In einem Gel getrennte Proteine lassen sich mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bis zu einer Nachweisgrenze von 200 ng bis 400 ng pro Bande anfärben. Dazu wurde das Gel 10 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärber-Lösung unter mehrfachem Wechseln der Lösung solange entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar wurde.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Lösung A	2,5 g CuSO ₄ in 325 ml H ₂ O _{bideest} gelöst
Lösung B	0,25 g Coomassie-Brilliant-Blue R-250 0,25 g Crocein-Scarlet in 125 ml Isopropanol und 50 ml Eisessig gelöst
Coomassie-Färbelösung	Gemisch aus Lösung A und B

2.2.1.5. Silberfärbung

In dieser Arbeit wurde die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988) angewendet, mit der sich Proteine in einem Gel bis zu einer Nachweisgrenze von 5 bis 30 ng pro Bande detektieren lassen.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Fixierlösung	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Eisessig
Inkubationslösung	30 % (v/v) Ethanol 500 mM Natriumacetat kurz vor Gebrauch Zugabe von: 2 % (v/v) Glutaraldehyd 1,27 mM NaS ₂ O ₃
Silberlösung	1 g/l Silbernitrat
Entwickler	25 g/l Na ₂ CO ₃ 0,01 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung	50 mM EDTA

Nach dem Beenden der Elektrophorese wurde das Gel für 2 h in Fixierlösung und anschließend über Nacht in Inkubationslösung unter Schwenken inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für jeweils 10 min in H₂O_{bidest} wurde das Gel für 1 h in Silberlösung versetzt mit 0,02 % (v/v) Formaldehyd inkubiert. Die Proteinbanden wurden nach einem kurzen Waschen des Gels mit H₂O_{bidest} durch die Zugabe von Entwickler sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde bei der gewünschten Intensität durch eine Inkubation in Stopplösung beendet. Anschließend wurde das Gel in H₂O_{bidest} gewaschen und konserviert.

2.2.1.6. Konservieren von Gelen

Zum Konservieren wurden die gefärbten SDS-PAGE-Gele in Glycerinpuffer (1,5 % Glycerin, 7 % Eisessig) und die Tris-Tricine-Gele in 7,5 % Glycerin, 7 % Eisessig über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Blättern Einmachhaut getrocknet.

2.2.1.7. Immunoblot

Beim Immunoblot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Gel auf eine Blotting-Membran transferiert und anschließend über spezifische Antikörper immunenzymatisch nachgewiesen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Blotting-Membran erfolgte mit dem Semidry-Blotting-Verfahren nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) oder anhand eines Thermoblots, bei dem die Proteine durch das Erwärmen auf 50 °C auf die Blotting-Membran transferiert werden. Mit dem Thermoblot-Verfahren können mehrere identische Blots von einem Gel hergestellt werden.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer für das Blotting:

Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl, pH 10,0 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 9,4 10 % Methanol 20 mM 6-Aminohexansäure

Für das **Semidry-Blotting-Verfahren** wurden zwei Lagen in Anodenpuffer I getränktes Gel-Blotting Papier (Schleicher & Schuell) und eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Blotting-Papier luftblasenfrei auf die Anode des Semidry-Blotters (Phase, Lübeck) gelegt. Hierauf wurde anschließend die mit Anodenpuffer II äquilibrierte Nitrozellulose (NC)-Membran (Schleicher & Schuell,

Dassel), das Gel, drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blotting-Papier und die Kathoden-Platte des Blotters luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm².

Beim **Thermoblot-Verfahren** wurde ein auf Gelbond[®] fixiertes Gel auf eine 50 °C warme Heizplatte gelegt. Die NC-Membran wurde in Anodenpuffer II äquilibriert und auf dem Gel luftblasenfrei platziert. Anschließend wurden drei in Anodenpuffer II äquilibrierte Lagen Blotting-Papier und ein trockener Stapel Papierhandtücher auf die NC-Membran geschichtet. Der gesamte Stapel wurde durch eine Glasplatte und ein 5 kg schweres Gewicht beschwert. Nach 3 min wurde die NC-Membran entfernt. Um mehrere identische Blots zu erhalten, wurde das Verfahren bis zu 3 mal wiederholt. Die Blotting-Zeit erhöhte sich dann auf 6 min bzw. 9 min.

Zusammensetzung der Lösungen für den immunenzymatischen Nachweis:

TBS-T	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂ 0,05 % (v/v) Tween 20
TBS, pH 9,5	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
NBT-Lösung	0,3 % (w/v) NBT in TBS, pH 9,5
BCIP-Lösung	0,5 % (w/v) BCIP

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran erfolgte der **immunenzymatische Nachweis** von spezifischen Proteinen. Dazu wurde der Blot für mindestens 30 min in TBS-T blockiert und anschließend mit der Lösung des Primärantikörpers über Nacht bei RT inkubiert. Die monoklonalen Antikörper und Patientenserum wurden in einer Verdünnung von 1:20 (v/v) in TBS-T eingesetzt.

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in TBS-T wurde der Blot für mindestens 2 h mit dem entsprechenden AP-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Der Antikörper Ziege anti-Maus IgG (H+L) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 (v/v) und der anti-human IgE 1:2000 (v/v) eingesetzt. Anschließend wurde der Blot zweimal für jeweils 10 min in TBS-T und einmal für 10 min in TBS, pH 9,5 gewaschen. Die spezifischen Proteinbanden wurden über einen Farbniederschlag sichtbar gemacht, der durch die enzymatische Aktivität der an die sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase katalysiert wurde. Dazu wurde kurz vor Gebrauch eine Substratlösung aus der auf 37 °C vorgewärmten NBT-Lösung und der BCIP-Lösung in einem Verhältnis von 30:1 (v/v) hergestellt (Leary *et al.*, 1983) und zu dem Blot gegeben. Die Farbreaktion wurde durch Waschen des Blots in H₂O_{bidest} gestoppt und der Blot anschließend getrocknet.

2.2.1.8. Proteinfärbung auf Blots

Auf NC-Membranen transferierte Proteine lassen sich unspezifisch durch India Ink Tinte bis zu einer Nachweisgrenze von 80 bis 200 ng/Bande anfärben (Hancock und Tsang, 1983). Alternativ können die Proteine auch durch Ponceau S bis zu einer Nachweisgrenze von 50 bis 150 ng/Bande angefärbt werden. Der Vorteil letzterer Methode liegt darin, dass die Färbung reversibel ist und eine anschließende spezifische immunenzymatische Färbung durchgeführt werden kann.

Für eine Färbung mit India Ink wurde der Blot nach dem Blockieren für mindestens 2 h in einer 0,1%igen (v/v) India Ink (Pelikan, Hannover) in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Farbe durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt.

Bei einer Färbung mit Ponceau S wurde der Blot vor dem Blockieren für ca. 10 min in einer Lösung aus 2 % Ponceau S und 3 % Trichloressigsäure inkubiert. Die überschüssige Farbe wurde durch Waschen in H₂O_{bidest} entfernt. Farbreste wurden beim anschließenden Blockieren für die immunenzymatische Färbung mit TBS-T entfernt.

2.2.1.9. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde anhand einer von Bradford (1976) entwickelten Methode durchgeführt, die auf dem Prinzip beruht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue durch die Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

20 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurde mit 980 µl Coomassie Protein Assay Reagenz (Pierce, Bonn) versetzt und die Extinktion gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bei einer Wellenlänge von 595 nm in dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Konzentration wurde anhand einer Standardreihe mit Konzentrationen zwischen 64,5 µg/ml bis 1 mg/ml BSA ermittelt.

Die Konzentration von gereinigten Proteinen bekannter Struktur kann alternativ durch das Messen der Absorption bei 280 nm ermittelt werden. Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie Cystin weisen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum auf. Aus diesem Grund kann die Konzentration (c) des Proteins über die Extinktion bei der Wellenlänge von 280 nm ($E_{280\text{nm}}$) und das Molekulargewicht (MW) nach folgender Formel bestimmt werden:

$$c \text{ [mg/ml]} = \frac{\text{MW} \times E_{280} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon_{280\text{nm}}}$$

Der theoretische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ wurde nach Gill und von Hippel (1989) berechnet und betrug für Phl p 6 $\epsilon_{280\text{nm}} = 5960$ und für Phl p 1 $\epsilon_{280\text{nm}} = 46785$.

2.2.1.10. Herstellung von Pollenextrakt

20 g Pollen wurden in 80 ml Extraktionspuffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert und unter Schütteln für 60 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 28.000 x g und 4 °C wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand filtriert. Der Extrakt

wurde über eine Ausschlusschromatographie mit der FPLC-Anlage entsalzt. Dazu wurde eine XK 26/70 Säule gefüllt mit der Matrix Sephadex G-25 und 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat als Laufmittel verwendet. Der Protein enthaltende Peak wurde gepoolt, portioniert und lyophilisiert. Der Extrakt wurde bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.11. Isolierung von natürlichem Phl p 1

Natürliches (n) Phl p 1 wurde aus dem Gräserpollen-Extrakt nach einer Methode von Suck *et al.* (1999) unter Verwendung von drei aufeinanderfolgenden chromatographischen Trennschritten isoliert. Der erste chromatographische Trennschritt wurde mittels einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt. Proteine, die hydrophobe Gruppen auf ihrer Oberfläche aufweisen, interagieren mit der Matrix. Dagegen kommt es zu keiner Interaktion mit der Matrix bei Proteinen mit nur hydrophilen Gruppen auf ihren Oberflächen. Diese Proteine befinden sich somit im Durchlauf. In einer anschließenden Gelfiltration wurden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt. Der letzte Schritt umfasste eine Entsalzung anhand einer speziellen Gelfiltration, die aufgrund der geringen Porengröße der Matrix eine Trennung von Proteinen und Salzen ermöglicht.

Zusammensetzung der Laufmittel für die Chromatographien:

Laufmittel für die HIC	1 M Ammoniumsulfat
------------------------	--------------------

Laufmittel für die Gelfiltrationen	0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat
------------------------------------	--------------------------------

Die chromatographischen Trennungen wurden an der FPLC-Anlage durchgeführt. Alle Puffer wurden zuvor durch Filter der Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$ gereinigt. Der Gräserpollenextrakt wurde wie unter 2.2.1.10 beschrieben hergestellt; auf eine Entsalzung und Lyophilisieren wurde jedoch verzichtet. Für die HIC wurde eine XK 26/20 Säule gefüllt mit Phenyl Sepharose High Performance verwendet. Der Extrakt wurde auf 1 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf die zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend bei einer Flussrate von 8 ml/min

gewaschen. Dabei wurden die Protein enthaltenden Fraktionen gesammelt. Bei einer HIC von Pollenextrakt befinden sich neben Phl p 13, Phl p 2 und Phl p 3 auch das Phl p 1 im Durchlauf. Die Protein enthaltenden Fraktionen des Durchlaufes wurden gepoolt und durch Ultrafiltration mit einer Amicon Rührzelle und einer Biomax PBGC Membran mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa (Millipore) eingeengt.

Für die Gelfiltration wurde eine mit der Matrix Superdex 75 gefüllte XK 50/30 Säule verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 5 ml/min. Der erste von der Säule eluierte Proteinpeaks enthielt Phl p 13, der zweite das Phl p 1 und der dritte setzte sich aus einem Gemisch aus Phl p 2 und Phl p 3 zusammen. Die Fraktionen des Phl p 1 enthaltende Peak wurde gepoolt und anschließend mit einer HiTrap Desalting Säule entsalzt. Das Phl p 1 wurde portionsweise lyophilisiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.12. Isolierung von natürlichem Phl p 6

Die Isolation von nPhl p 6 aus dem Pollenextrakt erfolgte nach einer Methode von Suck *et al.* (2003). Dabei wurden die hohe Affinität des Phl p 6 zu Ni^{2+} -Ionen und seine hydrophoben Eigenschaften ausgenutzt. Zuerst wurde eine Affinitätschromatographie mit Ni^{2+} -Chelat durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Trennung anhand einer HIC und einer Gelfiltration.

Zusammensetzung der Laufmittel für die Chromatographien:

Laufmittel A	50 mM Natriumphosphat, pH 7,5 500 mM NaCl
Laufmittel B	50 mM Natriumphosphat, pH 7,5 500 mM NaCl 500 mM Imidazol
Laufmittel C	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 M Ammoniumsulfat

Laufmittel D	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
Laufmittel E	0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat

Für die Ni²⁺-Chelat- Affinitätschromatographie wurde eine mit Chelating Sepharose Fast Flow gefüllte XK 26/20 Säule mit 0,2 M NiCl₂ beladen, mit H₂O_{bidest} gewaschen und mit Laufmittel A bei einer Flussrate von 5 ml/min äquilibriert. Der Pollenextrakt wurde direkt nach der Entsalzung (siehe unter 2.2.1.10) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule gewaschen, bis keine Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm mehr detektierbar waren. An die Säule gebundene Proteine wurden über einen linearen Gradienten zu Laufmittel B von 0 bis 100 % über ein Volumen von 600 ml eluiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und anschließend durch eine HIC aufgetrennt. Eine XK 26/20 Säule gefüllt mit Phenyl Sepharose High Performance wurde mit Laufmittel C äquilibriert und mit der zuvor auf 1 M Ammoniumsulfat eingestellten Probe beladen. Nach dem Waschen der Säule wurden an die Matrix gebundene Proteine durch einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Laufmittel D über ein Volumen von 600 ml eluiert. Das nPhl p 6 eluiert im ersten Proteinpeak zwischen 30 % und 60 % Laufmittel D. Die Fraktionen dieses Peaks wurden gepoolt und durch Ultrafiltration mit einer Amicon Rührzelle und einer Biomax PBGC Membran mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 5 kDa (Millipore) auf ein Volumen von ca. 5 ml eingengt. Anschließend wurde eine Gelfiltration mit einer XK 50/30 Säule gefüllt mit der Matrix Superdex 75 und dem Laufmittel E durchgeführt. Im letzten Schritt der Isolierung wurde nPhl p 6 mit einer HiTrap Desalting Säule und Laufmittel E entsalzt. Das nPhl p 6 wurde portionsweise in der Speedvac getrocknet und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.13. Herstellung von rekombinantem Phl p 6

Rekombinantes (r) Phl p 6 wurde in dem *E. coli*-Stamm JM109, der mit dem Vektor pMal-C-phlp6.1 transformiert wurde, als Fusionsprotein aus rPhl p 6 und Maltose-Bindeprotein (MBP) exprimiert. Nach dem Aufschluss der Bakterien wurde das rPhl p 6-MBP-Fusionsprotein über eine Affinitätschromatographie mit

einer Matrix, an die Amylose gekoppelt war, anhand der Affinität des MBP zu der Amylose isoliert. Anschließend erfolgte eine enzymatische Abspaltung des MBP von rPhI p 6 und eine chromatographische Trennung des rPhI 6 analog zur Isolierung des nPhI p 6.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Laufmittel A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA

Laufmittel B	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 mM Maltose

Die *E. coli*-Zellen wurden in 20 ml LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 bis 0,7 bei 578 nm unter Schütteln bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,3 µM Isopropylthiogalactosid induziert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für weitere 3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4 °C für 20 min bei 4000 x g pelletiert, in 30 ml Säulenpuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Der Bakterienaufschluss erfolgte mit einer French Press zweimal bei 1000 bar. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 25.000 x g für 30 min wurde der Überstand 1:2 (v/v) mit Säulenpuffer verdünnt. Eine XK 16/40 Säule gefüllt mit Amylose-Resin (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) wurde mit Laufmittel A äquilibriert und mit dem verdünnten Überstand beladen. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml/min gewaschen, bis keine Proteine im Durchlauf mehr nachweisbar waren. Die Elution des MBP-rPhI p 6 erfolgte mit Laufmittel B und die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt. Die Abspaltung des MBP erfolgte durch Faktor Xa (Sigma), der in einem Verhältnis von 1:100 (w/w) zugegeben wurde. Der Verdau erfolgte bei 4 °C für mindestens 24 h und wurde durch eine SDS-PAGE überprüft. Anschließend wurde rPhI p 6 wie unter 2.2.1.12

beschrieben zuerst mit einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographie und einer Gelfiltration isoliert und entsalzt. Das rPhl p 6 wurde portionsweise in der Speedvac getrocknet und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.14. Tryptischer Verdau

Die Proteine wurden in $0,1\text{ M}$ Ammoniumhydrogencarbonat mit 5 mM CaCl_2 pH $8,0$ gelöst. Zu dieser Proteinlösung wurde modifiziertes Trypsin in Sequenzierungsgrad (Roche, Mannheim) in einem Verhältnis von $1:20$ (w/w) gegeben und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dem Trocknen in der Speedvac wurde zur Analyse des tryptischen Verdau eine Reversed Phase (RP)-HPLC durchgeführt. Die Proteine bzw. Peptide binden aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an die Matrix mit Liganden aus Kohlenwasserstoffketten. Im Gegensatz zur HIC ist bei der RP-HPLC die Bindung der Proteine an die Matrix wesentlich stärker und es kommt z.T. zu einer Denaturierung. Für die Auftrennung von Peptiden werden in der Regel Säulen-Matrices mit Liganden aus Kohlenwasserstoffketten mit 18 Kohlenstoffatomen (C18-Säulen) verwendet. Hier wurde die Säule HyPurity Elite C18 5μ (Thermo, Dreieich) und die HPLC-Anlage verwendet. Die Probe wurde in Laufmittel A ($0,1\text{ }\%$ (v/v) TFA) gelöst und auf die mit Laufmittel A äquilibrierte Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min gegeben. Nach dem Waschen der Säule für 5 min mit Laufmittel A wurden die Peptide mit einem Gradienten über 9 min zu $60\text{ }\%$ Laufmittel B ($80\text{ }\%$ (v/v) Acetonitril, $0,1\text{ }\%$ (v/v) TFA) und anschließend in 10 min bis $100\text{ }\%$ Laufmittel B eluiert. Zur Massenbestimmung der Peptide mit MALDI-TOF-MS wurden die Fraktionen in der Speedvac getrocknet.

2.2.1.15. MALDI-TOF-MS

Mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) kann die Molekülmasse von Proteinen und Polypeptiden bestimmt werden. Die Polypeptide bzw. Proteine werden in einer Matrix aus 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure-Kristallen eingelagert. Diese Zimtsäure-Protein-Kristalle werden im Hochvakuum des Massenspektrometers

durch einen UV-Laser bestrahlt. Durch die Absorption der Strahlung werden Protonen der Matrix auf die Proteine übertragen, die dadurch positiv geladen werden. Durch ein elektrisches Feld werden diese Protein-Ionen stark in Richtung Kathode beschleunigt. Dabei ist die Geschwindigkeit der Ionen proportional zum reziproken Wert der Quadratwurzel des Produktes aus Masse und Ladung. Durch einen Schlitz in der Kathode werden die Ionen gebündelt und gelangen in ein feldfreies Vakuum-Flugrohr. Da die Protein-Ionen unterschiedliche Verhältnisse von Masse zu Ladung und daher Geschwindigkeiten aufweisen, benötigen sie unterschiedliche Zeiten zum Durchfliegen dieser Flugröhre, an deren Ende ein Detektor die Flugzeiten der Ionen misst. Dieses Analyseverfahren wird als TOF (time of flight) bezeichnet.

Für die Massenbestimmung von Peptiden wurde die Probe in Lösung A (0.1% TFA in Acetonitril) gelöst. Auf einem Probenhalter wurden 0,5 µl einer gesättigten Matrix-Lösung aus 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure in Lösung A mit 0,5 µl der Probe in einem Verhältnis von 2:1 (v/v) gemischt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Peptidmassen mit einem Reflex III Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen) in linearer- und Reflektor-TOF-Konfiguration mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit dem Programm Biotools (Bruker Daltonics).

2.2.1.16. ESI-FT-ICR-MS

Eine exaktere Massenbestimmung als mit der MALDI-TOF-MS ist mit der hochauflösenden Elektrospray-Ionisation Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (ESI-FT-ICR-MS) möglich. Bei dieser Methode wird die Probe durch Versprühen mit Hilfe einer Kapillare und angelegter Hochspannung in die Gasphase gebracht und ionisiert. Die Bestimmung der Masse erfolgte mit dem Massenspektrometer Apex II (Bruker Daltonics) ausgestattet mit einem aktiv abgeschirmten 7 Telsa Magneten und einer Apollo Ionenquelle. Die Proteine wurden in einem 50:50:0,001 (v/v/v) Gemisch aus Methanol, H₂O_{bidest} und Essigsäure mit einer Flussrate von 2 µl/min versprüht. Die

Spektren wurden von der Ladung der Ionen bereinigt und als neutrale Moleküle dargestellt.

2.2.1.17. Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

Mit Hilfe der IR-Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen bestimmt werden. Proteine weisen mehrere charakteristische Absorptionsbanden im infraroten Wellenlängenbereich auf, die auf Schwingungen bestimmter funktioneller Gruppen im Polypeptidgerüst zurückzuführen sind. Traditionell wird in der IR-Spektroskopie als Maßeinheit die Wellenzahl verwendet, die definiert ist als Quotient aus Frequenz und Lichtgeschwindigkeit. Die sogenannte Amid I Absorptionsbande liegt in einem Wellenzahlbereich von 1600 bis 1700 cm^{-1} und ist im Wesentlichen eine Streckschwingung der Carbonylgruppe (C=O) des Polypeptidgerüsts. Da die Carbonylgruppe an der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundärstruktur beteiligt ist, werden die C=O-Streckschwingungen durch diese beeinflusst. Somit ist die Frequenzlage und Form der IR-Absorptionsbande stark von der Sekundärstruktur abhängig. Nach Susi *et al.* (1967) liegen in D_2O die Maxima von α -helicalen Strukturen in einem Wellenzahlbereich von 1649 bis 1657 cm^{-1} und von β -Faltblatt-Strukturen zwischen 1621 - 1635 cm^{-1} und 1671 - 1679 cm^{-1} . Ungeordneten Strukturen weisen Maxima zwischen 1640 - 1647 cm^{-1} und von β -Schleifen zwischen 1681 - 1696 cm^{-1} und 1658 - 1671 cm^{-1} auf.

Die IR-Spektroskopie wurde an einem IFS-55 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Die lyophilisierten Proben wurden in D_2O gelöst und ein Absorptionsspektrum der Proben in einer CaF_2 -Küvette bei RT aufgenommen. Von diesem Absorptionsspektrum wurde das des Lösungsmittels subtrahiert. Dieses Spektrum wurde mit dem Programm CUR-FIT (entwickelt von D. Moffat, National Research Council, Ottawa, Kanada) durch eine Kurve approximiert, die sich als Summe mehrerer Gauss-Kurven darstellen lässt. Die Maxima dieser Gauss-Kurven wurden den Sekundärstrukturen zugeordnet. Die Flächen erlauben eine grobe Einschätzung der Häufigkeit der jeweiligen Struktur.

2.2.1.18. CD-Spektroskopie

Die Messung des Circular dichroismus (CD) ist eine spektroskopische Methode, die unter anderem zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen eingesetzt wird. Die CD-Spektroskopie basiert auf dem Effekt, dass chirale, d.h. optisch aktive Moleküle links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich absorbieren. Die Differenz der Extinktionskoeffizienten des links (ϵ_L) und rechts (ϵ_R) zirkular polarisierten Lichtes $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ist die Messgröße, die man bei der CD-Spektroskopie erhält. Sie wird als Elliptizität bezeichnet. Wird die Elliptizität in Bezug zum Molekulargewicht des Proteins gesetzt, so spricht man von der molaren Elliptizität. Die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins wird aus der Kombination von Referenz-CD-Spektren berechnet, die von Poly-L-Lysin erstellt wurden. Poly-L-Lysin kann abhängig vom pH-Wert und der Temperatur in α -Helix, β -Faltblattstruktur oder als ungeordnete Struktur vorliegen. Alternativ werden auch die Spektren von Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur herangezogen.

Die CD-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Holger Notbohm, (Abteilung Medizinische Molekularbiologie, Universität zu Lübeck) an einem Jasco- J-715 Spektropolarimeter (JASCO Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Gross-Umstadt) durchgeführt. Für die Messungen wurde eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Proteine wurden in H_2O_{bidest} gelöst und ein CD-Spektrum bei 20 °C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Um den Schmelzpunkt des Proteins zu bestimmen, wurde ein CD-Spektrum bei der Wellenlänge von 222 nm aufgenommen, bei dem die Temperatur um 1 °C/min von 30 °C auf 100 °C erhöht wurde. Anschließend wurde ein CD-Spektrum über den Wellenlängenbereich von 190 nm bis 250 nm bei 100 °C gemessen. Nach dem kontrollierten, gleichmäßigen Abkühlen der Probe auf 20 °C wurde erneut ein CD-Spektrum über den Wellenlängenbereich aufgenommen.

2.2.1.19. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen

Die Markierung von Proteinen mit Fluoreszenz-Farbstoffen erfolgte kovalent über die ϵ -Aminogruppe der Lysinreste. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sigma) und Alexa Fluor® 488 5-TFP (Molecular Probes) mit Absorptionsmaxima bei 495 nm und Emissionsmaxima bei 518 nm verwendet.

Für die Fluoreszenz-Markierung wurden die Proteine in 0,2 M Natriumhydrogencarbonat in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/ml gelöst. Für die FITC-Markierung wurden zu 200 μ l bzw. 400 μ l dieser Proteinlösung die 10 mg/ml FITC-Lösung in DMSO in einem Molekulargewichtsverhältnis von 50:1 zugegeben. Für eine Markierung mit Alexa488 wurde der Proteinlösung 100 μ g des wasserlöslichen Alexa Fluor® 488 5-TFP pro mg Protein zugegeben. Die Proteinlösungen wurden mit den reaktiven Fluoreszenz-Farbstoffen für 2 h bei RT unter Rollen inkubiert. Anschließend wurde eine 1,5 M Lysin-Lösung zugegeben und für weitere 2 h bei RT unter Rollen inkubiert. Dadurch konnten die noch freien reaktiven FITC-Moleküle mit den Aminogruppen des Lysins reagieren. Anschließend wurden die Proteine von den niedermolekularen Bestandteilen chromatographisch mit einer HiTrap Desalting Säule getrennt. Die markierten Proteine wurden portionsweise mit einer Speedvac getrocknet und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.20. Inkubation von nPhl p 6 mit Nasensekret

Um einen Einfluss des Nasensekrets auf nPhl p 6 zu untersuchen, wurden 10 μ g nPhl p 6 mit 100 μ l Nasensekret bei 37 °C für mindestens 12 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in der Speedvac eingengt, in einer Tris-Tricine-Elektrophorese aufgetrennt und das Phl p 6 anhand eines Immunoblots mit dem mAk Bo12 nachgewiesen.

2.2.1.21. Inkubation von nPhl p 6 und nPhl p 1 mit BAL-Flüssigkeit

Für die Untersuchung des Einflusses der BAL-Flüssigkeit auf die Allergene, wurde 1 ml der BAL-Flüssigkeit mit 2,5 µg nPhl p 6 bzw. nPhl p 1 versetzt und bei 37 °C für mindestens 12 h inkubiert. Nach dem Einengen in der Speedvac wurde eine SDS-PAGE oder Tris-Tricine-Elektrophorese mit anschließendem Immunoblot und Nachweis der Allergene mit mAk, Patientenserum oder einem polyklonalem Kaninchenhyperimmunserum (zur Verfügung gestellt von Dr. W.-M. Becker, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung der A549-, Calu-3- und NCI-H727-Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die A549- und die NCI-H727-Zelllinie wurden in DMEM und die Calu-3-Zelllinie in Calu-3-Medium kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Ab einer Zelldichte von ca. 80 % Konfluenz erfolgte eine Subkultivierung.

Zusammensetzung des verwendeten Puffers:

PBS, pH 7,4	8 mM Na ₂ HPO ₄
(Phosphat-buffered Saline)	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	3 mM KCl
	137 mM NaCl
	zum Sterilisieren autoklaviert

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO) bedeckt und durch eine Inkubation von 5 min bei 37 °C abgelöst. Durch Zugabe von Medium wurde das Trypsin inhibiert und die Zellen anschließend bei 250 x g pelletiert. Nach dem Resuspendieren in Medium wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten überführt.

2.2.2.2. Generierung von Dendritischen Zellen

Die Dendritischen Zellen (DCs) wurden aus Monocyten des Blutes nach einem modifizierten Protokoll von Romani *et al.* (1996) generiert. Dazu wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, „peripheral blood mononuclear cells“) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden aus den PBMCs die Monocyten durch eine Kurzzeit-Adhärenz an der Oberfläche von Kulturschalen isoliert. Durch die Zugabe der Cytokine IL-4 und GM-CSF wurden die Monocyten zur Differenzierung zu DCs stimuliert.

Heparin-Vollblut wurde in einem Verhältnis von 1:2 mit D-PBS (PAA LABORATORIES) verdünnt. In einem 50 ml Röhrchen wurden 25 ml des verdünnten Blutes auf ein 15 ml Lymphoprep-Kissen (Progen, Heidelberg) geschichtet und für 45 min bei 20 °C und 700 x *g* ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der Dichte des Lymphopreps (1,077 g/ml) sammeln sich die schwereren Erythrozyten und Granulozyten unter dem Lymphoprep-Kissen und die PBMCs (Lymphocyten, Monocyten und Thrombocyten) an der Interphase des Lymphoprep-Kissens mit dem Plasma an. Die Interphase mit den PBMCs wurde vorsichtig abgenommen und dreimal in D-PBS mit 5 mM EDTA gewaschen. Dadurch wurde der größte Teil der Thrombocyten entfernt. Zur Isolierung der Monocyten wurden 5 bis 7 x 10⁷ PBMCs in 10 ml Fi-Medium in 75 cm² Zellkulturschalen ausgesät und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Monocyten adhären an der Plastikoberfläche der Kulturschale, so dass die nicht adhärenen Lymphocyten und restlichen Thrombocyten durch viermaliges Waschen in jeweils 10 ml HBSS (PAA LABORATORIES) entfernt werden konnten. Aus diesen Monocyten wurden die DCs durch Zugabe von 15 ml Hu-DC-Medium versetzt mit jeweils 500 U/ml rekombinantem humanem IL-4 und GM-CSF (Immunotools, Friesoythe) generiert. Nach 2 bis 3 Tagen wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt und erneut die beiden Cytokine in einer Konzentration von jeweils 500 U/ml zugegeben. Nach 5 Tagen wurden die unreifen DCs geerntet und in der gewünschten Konzentration auf Kulturplatten verteilt. Um reife DCs zu erhalten, wurden 10 ng/ml reines LPS aus dem *E. coli*-Stamm K235 mit einem Proteingehalt unter 0.008 % (zur Verfügung gestellt von Dr. Stephanie Vogel, Department of Microbiology and Immunology, University

of Maryland, USA) über Nacht zugegeben. Am 6. Tag erfolgte neben einer durchflusscytometrischen Charakterisierung der unreifen und reifen DCs anhand der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD83, CD206 und HLA-DR auch die Untersuchungen zur Aufnahme von Allergenen.

2.2.2.3. Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie (FACS, „fluorescence activated cell sorter“) ist ein effektives Verfahren zur Analyse von verschiedenen Zelltypen gemischter Suspensionen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Die Zellen werden vor der Analyse mit Antikörpern bzw. Proteinen markiert, an die Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt sind. Bei der Analyse werden die Zellen in einer dünnen Glaskapillare einzeln an einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet. Zum einen kommt es zu einer Streuung des Lichtes. Die Intensität des Streulichtes mit einem geringen Winkel von 3° bis 10°, das sogenannte Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC) ist ein Maß für die Größe der Zellen. Dagegen ist das Streulicht in einem Winkel von 90°, das Seitwärtsstreulicht oder der Sidescatter (SSC), ein Maß für die Granularität der Zellen. Zum anderen werden die Fluoreszenz-Farbstoffe zur Emission von Licht angeregt, dessen Intensität durch Fotosensoren mit entsprechenden Filtern für die Wellenlängen des jeweiligen Farbstoffes gemessen wird. Die Intensität des ausgestrahlten Lichts ist dabei proportional zur Dichte des detektierten Farbstoffes und damit auch zum Antikörper bzw. Protein. Der Sensor FL-1 ist mit einem Filter von 530 nm ausgestattet und misst das emittierte Licht von FITC. Dagegen misst der Sensor FL-2 mit einem Filter von 585 nm das emittierte Licht von Phycoerythrin (PE). Der Sensor FL-3 erfasst Licht einer Wellenlänge von 630 nm, das durch den Farbstoff Propidiumjodid emittiert wird. Da alle drei Farbstoffe unterschiedliche Emissionsspektren besitzen, ist eine gleichzeitige Charakterisierung über diese drei Farbstoffe möglich.

In dieser Arbeit wurden die Durchflusscytometer FACScalibur (BD Biosciences) und Epics XL-MCL (Beckmann Coulter, Krefeld) verwendet. Die Analyse der Zellen erfolgte in FACS-Puffer (10 % BSA, 1 % Natriumazid in PBS, pH 7,4). Die

Daten wurden mit dem Programm WinMDI 2.8 analysiert und entweder als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale Dichteplots dargestellt.

2.2.2.4. Allergenaufnahme durch die Epithel-Zelllinien

Auf 24 well-Kulturplatten wurde die Zelllinien A549 mit 100.000 Zellen pro well, die NCI-H727-Zelllinie mit 200.000 Zellen pro well und die Calu-3-Zelllinie mit 300.000 Zellen pro well in 1,5 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden für zwei Tage im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde 500 µl frisches Medium zugeben. Die Fluoreszenzmarkierten Proteine wurden in einer Konzentrationen von 20 µg/ml in das Medium gegeben und mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Für die FACS-Analysen wurden die Zellen anschließend mit 200 µl Trypsin/EDTA (GIBCO) abgelöst. Nach ca. 5 min wurden 500 µl FACS-Puffer zugegeben und die FACS-Analyse durchgeführt. Die Autofluoreszenz der Zellen wurde von den mittleren Fluoreszenz-Intensitäten der Zellen bei einer Inkubation mit den Allergenen abgezogen.

Um die Makropinocytose zu inhibieren, wurden die A549-Zellen vor der Allergen-Zugabe für 30 min mit Cytochalasin D (Sigma) in einer Konzentration von 1 µM und die NCI-H727-Zellen mit 1,25 mM Cytochalasin D inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µg/ml nPhl p 1-FITC bzw. nPhl p 6-FITC und nach 2 h wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen mit dem FACS analysiert. Die Autofluoreszenz der Zellen wurde von der Fluoreszenz-Intensität der Zellen bei einer Inkubation mit den Allergenen abgezogen. Die Fluoreszenz-Intensität der Kontrolle ohne Inkubation mit Cytochalasin D wurde als 100 %-Wert festgelegt und die Fluoreszenz-Intensitäten der Zellen bei einer Inkubation mit Cytochalasin D dazu in Bezug gesetzt.

2.2.2.5. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie zur intrazelluläre Lokalisation der Allergene

Für die Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 mm in 24 well-Platten wie unter 2.2.2.4 beschrieben kultiviert und mit den Allergenen inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen in PBS wurde für 30 min mit 10 % (w/v) BSA in PBS blockiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen und mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum spezifischen Nachweis der Allergene wurden die mAk Bo14 und Bo12 unverdünnt eingesetzt. Eine Markierung der Zellmembran wurde ohne eine Permeabilisierung der Zellen mit dem Antikörper anti-human CD29 in einer Verdünnung von 1:500 in 10 % (w/v) BSA in PBS durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem sekundären Antikörper anti-Maus IgG-AlexaFluor 568 in einer Verdünnung von 1:500 in 10 % (w/v) BSA in PBS für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert und die Deckgläschen mit „DABCO anti-fading solution“ (Johnson *et al.*, 1982) auf Objektträger gebracht. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop Leica TCS SP (Leica, Bensheim, Deutschland).

DABCO anti-fading solution: 2,5% DABCO (1,4-diaza-bi-cyclo-2,2,2-octan)
 in 80% Glycerin

Eine Anfärbung der Lysosomen erfolgte mit dem Farbstoff LysoTracker Red (Cambrex, Verviers, Belgien), der infolge des sauren pH-Wertes der Lysosomen ein Emissionsmaximum bei 590 nm aufweist. Dazu wurde das Medium nach der Inkubation der Zellen mit den Allergenen entfernt und durch 500 µl DMEM versetzt mit 50 nM LysoTracker Red ersetzt. Nach einer Inkubation von 30 min wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min in 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit „DABCO anti-

fading solution“ auf Objektträger gebracht und mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert.

2.2.2.6. Aufnahme von Allergenen durch Dendritische Zellen

Am Tag 5 der Generierung von DCs wurden auf 96-well-Platten mit flachem Boden 200.000 DCs in 200 µl Hu-DC-Medium ausplattiert und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Zugabe von FITC-markiertem nPhl p 1 bzw. nPhl p 6 erfolgte am Tag 6. Nach dieser Inkubation wurden die DCs durchflusscytometrisch analysiert.

Für die Analyse des Aufnahme-Mechanismus wurden die DCs 30 min mit 25 mM Methyl- α -D-mannopyranosid (MMP), 1 mM Amiloride (AMD) bzw. 2,5 µM Cytochalasin D (CCD) präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der FITC-markierten Allergene. Nach einer Inkubation von 2 h wurde die FACS-Analyse durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität der Kontrolle ohne Inhibitor wurde als 100 %-Wert festgelegt und die Fluoreszenz-Intensitäten der Zellen bei einer Inkubation mit Inhibitor dazu in Bezug gesetzt.

2.2.3. Statistische Auswertung der Daten

Die Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt. Zur statistischen Auswertung bei Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes JMP IN 5.1 eine one-way ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt, gefolgt von dem Tukey-Test. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,02$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von Phl p 6

Um eine Prozessierung von Gräserpollenallergenen untersuchen zu können, ist eine genaue strukturelle Kenntnis der Allergene von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde das natürliche Phl p 6 aus dem Pollen des Lieschgrases *Phleum pratense* isoliert und anschließend mittels 2-DE und Immunoblotting sowie mit massenspektrometrischen Methoden charakterisiert. Zum Vergleich wurde in *E. coli* exprimiertes rPhl p 6 eingesetzt. Die Sekundärstruktur von nPhl p 6 und rPhl p 6 wurde anhand von FTIR- und CD-Spektroskopie bestimmt, um eine vergleichbare Faltung beider Formen zu überprüfen und damit eine Verwendung des definierten rPhl p 6 anstatt des komplexen nPhl p 6 für weitere Untersuchungen zu ermöglichen.

3.1.1. 2-DE und Immunoblotting

Für eine Charakterisierung von nPhl p 6 und rPhl p 6 anhand des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichtes wurde eine 2-DE durchgeführt. Zusätzlich wurde die IgE-Reaktivität von nPhl p 6 sowie rPhl p 6 mit Immunoblots unter Verwendung von Serum Gräserpollen-allergischer Patienten untersucht. In Abb. 4A ist eine 2-DE mit anschließender Silberfärbung von nPhl p 6 gezeigt. Für das nPhl p 6 konnten nur bei der erwarteten Masse von ca. 12 kDa Proteine nachgewiesen werden, d.h., dass nPhl p 6 in hoher Reinheit aus dem Pollen isoliert werden konnte. Bei dieser Masse von ca. 12 kDa waren sieben Spots in einem pI-Bereich von 5,2 bis 6,6 detektierbar. Dabei wiesen die beiden Hauptspots einen pI von 5,5 und 6,0 auf. Die sieben Spots mit unterschiedlichem pI könnten auf verschiedene Isoformen zurückzuführen sein, bei denen der isoelektrische Punkt z. B. durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren unterschiedlich ist. Alle sieben Spots wiesen eine IgE-Reaktivität auf wie in Abb. 4B anhand eines Immunoblots mit Patientenserum gezeigt.

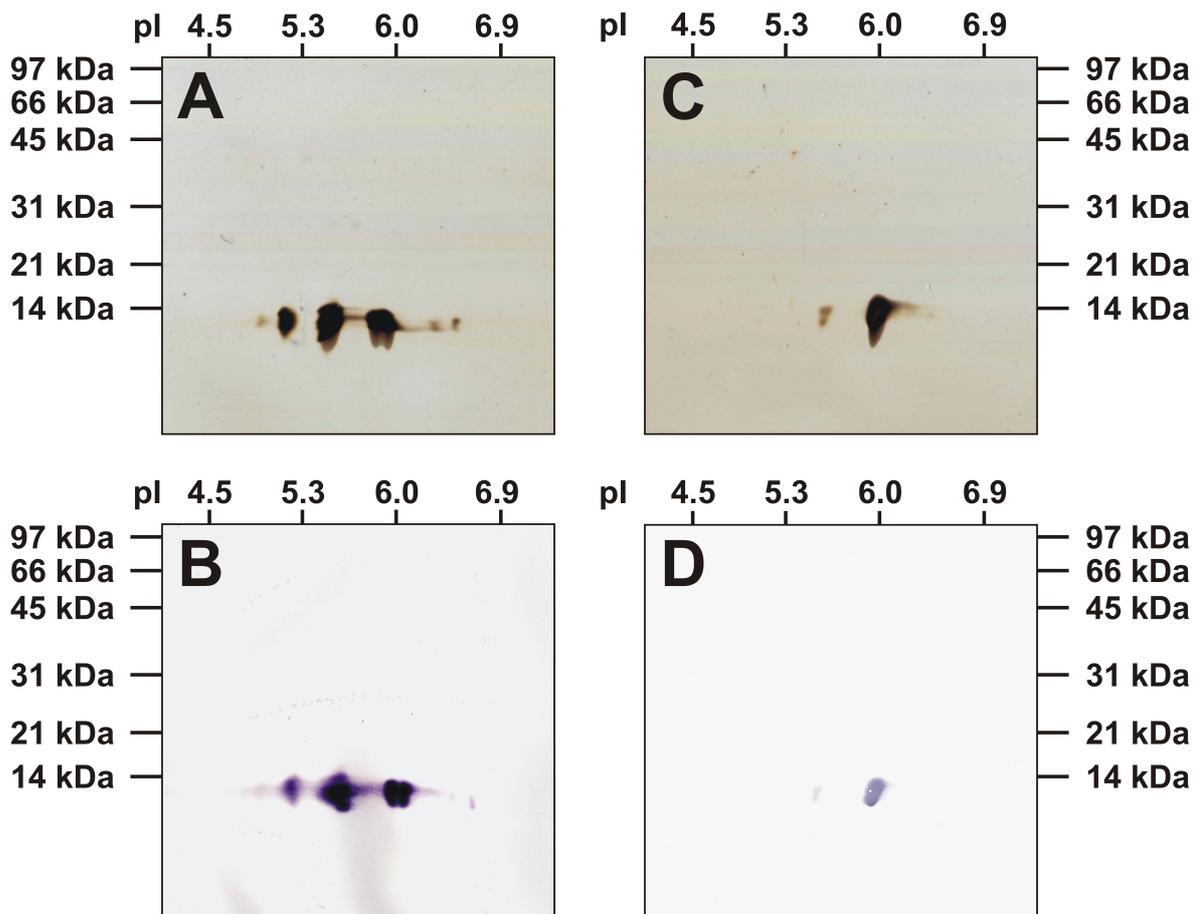


Abb. 4: 2-DE und Nachweis der IgE-Reaktivität von nPhl p 6 und rPhl p 6.
A und C: Silber gefärbtes 2-DE-Gel von nPhl p (A) bzw. rPhl p 6 (C).
B und D: Immunoblot nach 2-DE von nPhl p 6 (B) bzw. rPhl p 6 (D) mit dem Nachweis der IgE-Reaktivität unter Verwendung von Serum eines Gräserpollen-sensibilisierten Patienten.

In einem Silber gefärbten 2-DE-Gel zeigte rPhl p 6 einen Hauptspot bei einer Masse von ca. 12 kDa und einem pI von 6,0 (Abb. 4C). Dieser Spot war identisch zu einem der Hauptspots des natürlichen Phl p 6. Zusätzlich wies rPhl p 6 bei der gleichen Masse noch einen weiteren, jedoch sehr schwachen Spot bei einem pI von ca. 5,5 auf. Dieser Spot besaß ebenso wie der Hauptspot eine IgE-Reaktivität (Abb. 4D), so dass es sich hierbei nicht um eine bakterielle Verunreinigung handeln konnte.

3.1.2. ESI-FT-ICR-MS-Analyse von nPhl p 6 und rPhl p 6

Um die genaue Masse von rPhl p 6 sowie von den sich im pl unterscheidenden Formen des nPhl p 6 zu bestimmen, wurde eine ESI-FT-ICR-MS-Analyse durchgeführt. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden rPhl p 6 und nPhl p 6 zusätzlich mittels RP-HPLC gereinigt. In Abb. 5A ist das ladungsbereinigte Massenspektrum von rPhl p 6 gezeigt. Der Peak wies eine Masse von 11785,02 Da auf. Dies entsprach der theoretisch berechneten Masse für die Form des Phl p 6, der die cDNA-Sequenz von Vrtala *et al.* (1999) zugrunde gelegt wurde.

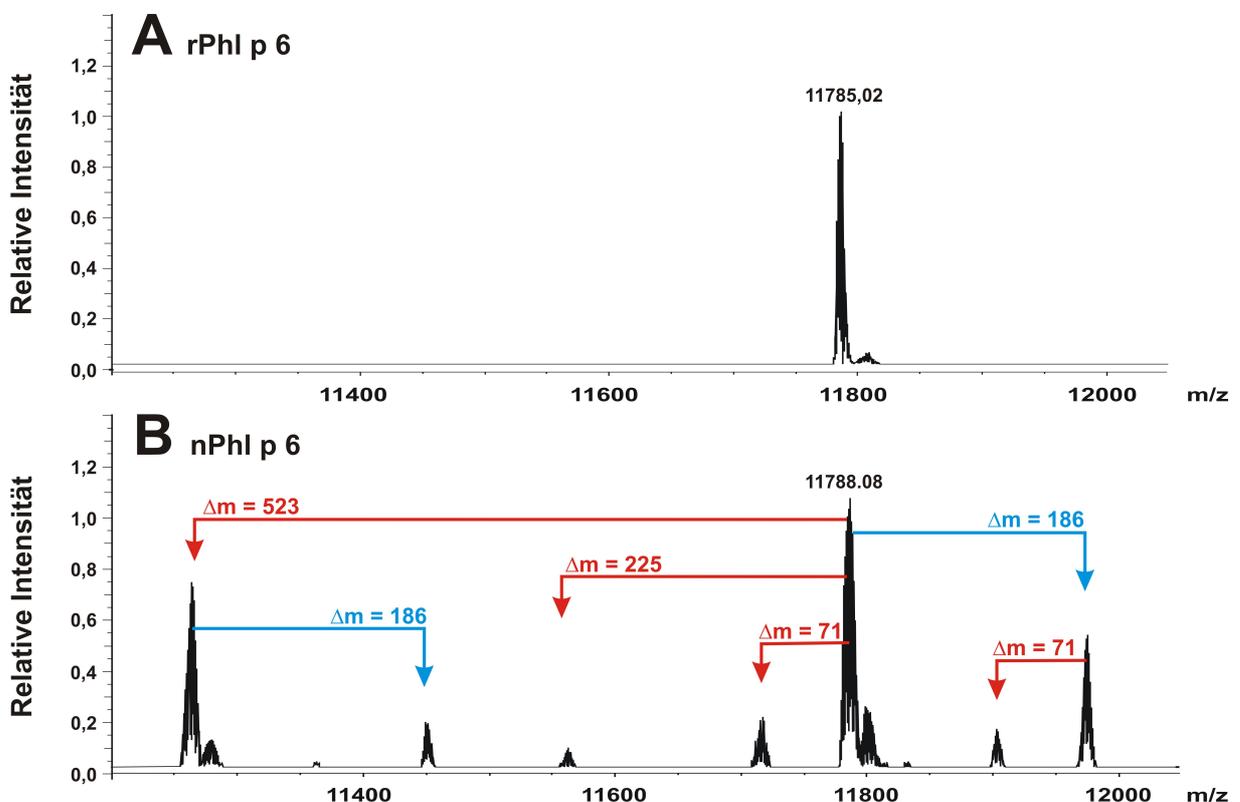


Abb. 5: ESI-FT-ICR-Massenspektrum von rPhl p 6 (**A**) und nPhl p 6 (**B**). Die Massendifferenzen zwischen den Peaks des nPhl 6 sind durch Pfeile angegeben.

Das ladungsbereinigte ESI-MS-Spektrum von nPhl p 6 wies sieben Peaks in einem Massenbereich von 11264 bis 11975 Da (Abb. 5B) auf. Der Hauptpeak lag bei einer Masse von 11788,08 und damit zwischen den beiden theoretisch

berechneten Massen der Formen von Petersen *et al.* (1995b) und Vrtala *et al.* (1999). Diese zwei auf cDNA-Ebene beschriebenen Formen des Phl p 6 unterscheiden sich in nur 2 Aminosäuren und weisen damit eine Massendifferenz von nur 5 Da auf. Die Isotopenverteilung des Hauptpeaks von nPhl p 6 ist in Abb. 6A gezeigt. Im Vergleich zum rPhl p 6 (Abb. 6B) wies das nPhl p 6 einen wesentlich breiteren und auch unsymmetrischen Peak auf. Dies deutete auf ein Gemisch aus Proteinen unterschiedlicher Masse hin. Eine theoretisch berechnete Isotopenverteilung für die beiden von Petersen *et al.* (1995b) und Vrtala *et al.* (1999) beschriebenen Formen ist in Abb. 6C gezeigt. Eine Addition beider Isotopenverteilungen war mit der Verteilung identisch, die für nPhl p 6 gemessen wurde. Beide bisher nur auf cDNA-Ebene beschriebenen Formen sind somit als Isoformen des Phl p 6 anzusehen.

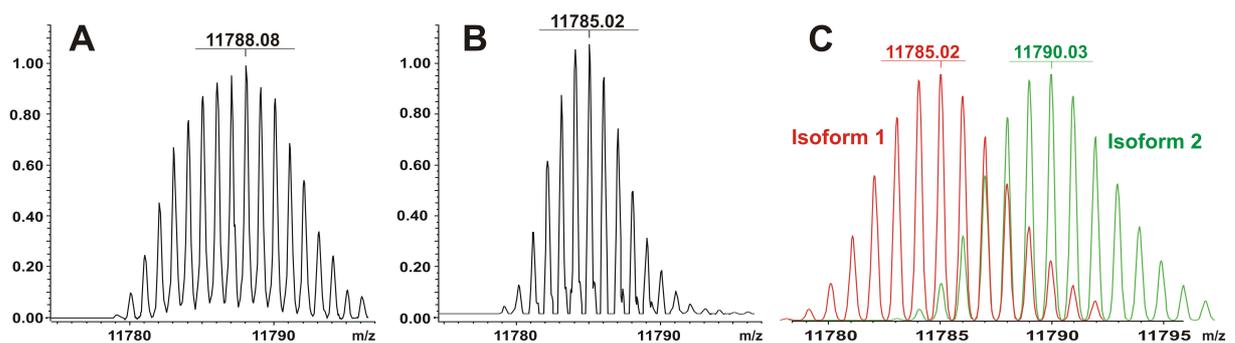


Abb. 6: Isotopenverteilung des Hauptpeaks von nPhl p 6 (**A**), des Peaks von rPhl p 6 (**B**) und die theoretisch berechnete Isotopenverteilung der Isoformen nach Petersen *et al.* (1995b) in rot und Vrtala *et al.* (1999) in grün (**C**).

Anhand der Massendifferenzen zwischen den Peaks des nPhl p 6 (Abb. 5B) konnten weitere Modifikationen identifiziert werden (siehe auch Tab. 7). Zwischen den Hauptpeaks des nPhl p 6 bestand eine Massendifferenz von 523 Da. Diese Differenz entsprach einer Deletion von 6 Aminosäuren am C-Terminus des Phl p 6. Eine Differenz von 225 Da entsprach einer Deletion von drei Aminosäuren und von 71 Da einer Deletion von nur einer Aminosäure am C-Terminus des Phl p 6. Dagegen war die um 186 Da höhere Masse auf eine Addition der beiden

Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Glycin (G) am N-Terminus zurückzuführen. Diese beiden Aminosäuren sind Teil der N-terminalen Signalsequenz des Phl p 6. Alle Peaks des Massenspektrums von nPhl p 6 wiesen in einer Vergrößerung eine unsymmetrische und breite Isotopenverteilung auf, wie für den Hauptpeak des nPhl p 6 in Abb. 6A gezeigt. Das bedeutet, dass beide Isoformen des nPhl p 6 am C-Terminus durch Deletionen von 1, 3 bzw. 6 Aminosäuren und am N-Terminus durch eine Addition der Aminosäuren EG modifiziert sein können. Weitere posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, konnten für nPhl p 6 trotz Vorhandensein einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle nicht nachgewiesen werden.

Tab. 7: Massendifferenzen zwischen den Peaks des nPhl p 6 (siehe Abb. 5B) mit zugehörigen Modifikationen in der Aminosäuresequenz.

gemessene Massendifferenz [Da]	Aminosäure-Sequenz	theoretische Massendifferenz [Da]	vermutete Modifikation
523,29	AVKPGA	523,63	Deletion am C-Terminus
225,08	PGA	225,25	Deletion am C-Terminus
186,08	EG	186,17	Addition am N-Terminus
71,02	A	71,08	Deletion am C-Terminus

3.1.3. Tryptischer Verdau von nPhl p 6 und rPhl p 6

Neben der ESI-MS-Analyse wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt, um die Aminosäure-Austausche der beiden Isoformen an Position 14 und 95 exakt nachzuweisen. Rekombinantes sowie natürliches Phl p 6 wurden durch Trypsin verdaut, über eine RP-HPLC gereinigt und anschließend mit MALDI-TOF-MS analysiert. Von den 11 möglichen Fragmenten des rPhl p 6 konnten die Massen von 7 Fragmenten und einem Fragment mit einer ausgelassenen Schnittstelle den theoretischen Massen zugeordnet werden. Die identifizierten Fragmente deckten ca. 72 % der Sequenz des rPhl p 6 ab und sind in Abb. 7 dargestellt.

```

rPhl p 6:  1  GKATTEEQKL IEDINASFRA AMATTANVPP ADKYKTFEAA  40
           41  FTVSSKRNLA DAVSKAPQLV PKLDEVYNAA YNAADHAAPE  80
           81  DKYEAFVLHF SEALHIIAGT PEVHAVKPGA  110

```

Abb. 7: Tryptischer Verdau von rPhl p 6. Die mit MALDI-TOF-MS nachgewiesenen Fragmente sind durch schwarze Linien in der Sequenz des rPhl p 6 markiert.

Die identifizierten Fragmente des nPhl p 6 waren in ihrer Position identisch zu den Fragmenten des rPhl p 6 und sind in Abb. 8 dargestellt. Es wurden ebenfalls ca. 72 % der Sequenz des Phl p 6 abgedeckt. Das Fragment von AS 10 bis AS 19 enthält die Aminosäuresubstitution an Position 14. Fragmente für beide Isoformen konnten im tryptischen Verdau nachgewiesen werden. Dagegen wurde kein Fragment mit der AS-Substitution an Position 95 identifiziert. Die von Petersen *et al.* (1995b) beschriebene Isoform enthält durch die Substitution an dieser Stelle eine zusätzliche Schnittstelle. Für diese Isoform konnte ein C-terminales Fragment (AS 96 bis AS 104) mit einer Deletion von sechs AS nachgewiesen werden. Alle weiteren C-terminalen Fragmente konnten mit der MALDI-TOF-MS nicht detektiert werden.

```

Isoform 1:  1  GKATTEEQKL IEDINASFRA AMATTANVPP ADKYKTFEAA  40
Isoform 2:  1  GKATTEEQKL IEDVNASFRA AMATTANVPP ADKYKTFEAA  40

Isoform 1: 41  FTVSSKRNLA DAVSKAPQLV PKLDEVYNAA YNAADHAAPE  80
Isoform 2: 41  FTVSSKRNLA DAVSKAPQLV PKLDEVYNAA YNAADHAAPE  80

Isoform 1: 81  DKYEAFVLHF SEALHIIAGT PEVHAVKPGA  110
Isoform 2: 81  DKYEAFVLHF SEALRIIAGT PEVHAVKPGA  110

```

Abb. 8: Tryptischer Verdau von nPhl p 6. Mit MALDI-TOF-MS nachgewiesene Fragmente für beide Isoformen sind durch blaue Linien in den Sequenzen gekennzeichnet. Die schwarze Linie kennzeichnet das C-terminale Fragment, das nur für die Isoform 2 identifiziert werden konnte.

3.1.4. FTIR-Spektroskopie

Um die Sekundärstrukturen von rPhI p 6 und nPhI p 6 zu bestimmen und miteinander zu vergleichen, wurde die FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Die Absorption des IR-Lichtes wurde in D₂O in einem Wellenzahlbereich von 1600 cm⁻¹ und 1700 cm⁻¹ gemessen. Die Absorptionsbande wurde durch eine Kurve approximiert, die sich durch mehrere Gauss-Kurven darstellen ließ. In Abb. 9 sind diese approximierten Kurven und die Gauss-Kurven für nPhI p 6 und rPhI p 6 gezeigt. Die Maxima der Gauss-Kurven wurden den verschiedenen Sekundärstrukturen zugeordnet, wobei die Größe der Flächen und die Höhe dieser Kurven einen groben Anhaltspunkt für die Ausprägung der zugehörigen Sekundärstrukturen gab.

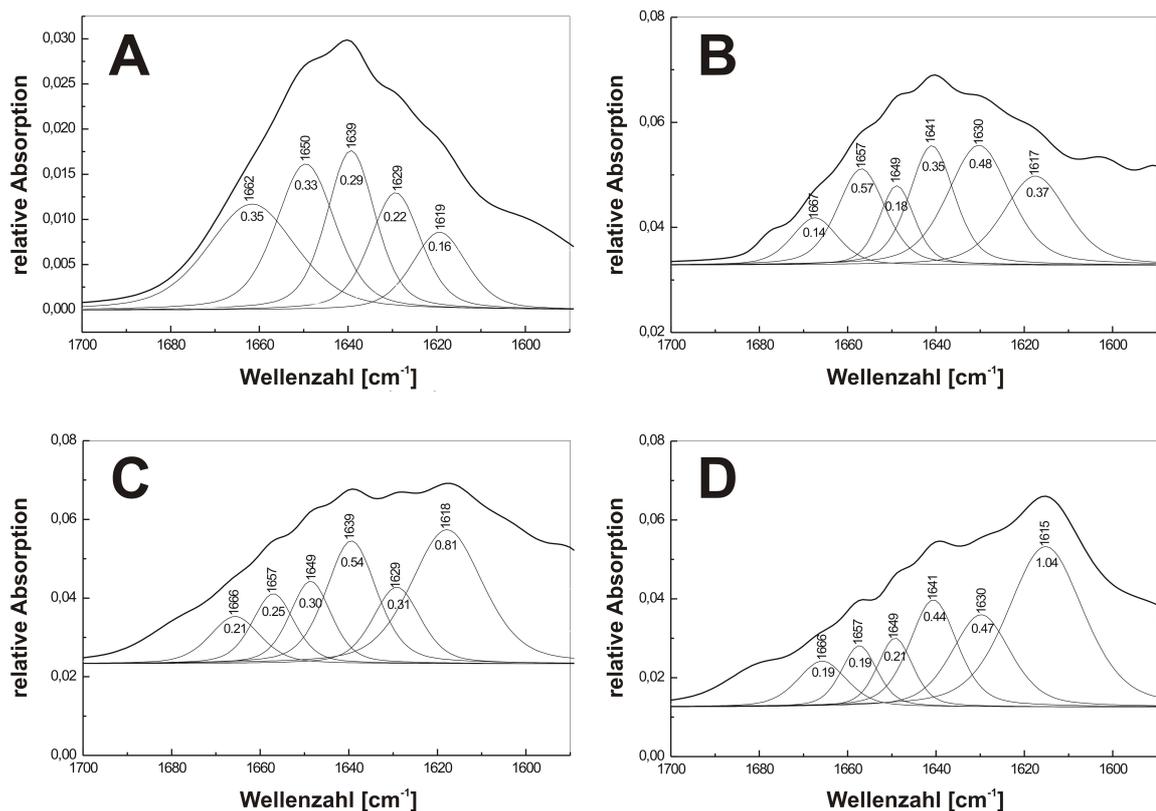


Abb. 9: FTIR-Absorptionsspektrum von nPhI p 6 und rPhI p 6 in D₂O. **A und B:** Absorptionsspektrum von nPhI p 6 (A) und rPhI p 6 (B) bei 20 °C. **C und D:** FTIR-Spektren von nPhI p 6 (C) und rPhI p 6 (D) nach Denaturierung bei 100 °C.

Das natürliche und das rekombinante Phl p 6 zeigten Absorptionsspektren mit sehr ähnlichen Maxima. Die stärkste Absorption lag für nPhl p 6 bei 1639 cm^{-1} und rPhl p 6 bei 1641 cm^{-1} im Absorptionsbereich von ungeordneten Strukturen. Die zugehörige Gauss-Kurve besaß jedoch nicht den größten Flächenanteil und damit haben ungeordnete Strukturen nicht den größten Anteil an der Struktur des Phl p 6. Eine größere Fläche wies dagegen die Gauss-Kurve mit einem Maximum bei 1650 cm^{-1} für nPhl p 6 und 1657 cm^{-1} für rPhl p 6 auf. Diesen Absorptionsmaxima entsprachen α -helicalen Strukturen, die somit auch einen größeren Anteil an der Struktur des Phl p 6 als ungeordnete Strukturen besitzen. Im Absorptionsbereich von β -Faltblatt-Strukturen weisen nPhl p 6 bei 1629 cm^{-1} und rPhl p 6 bei 1630 cm^{-1} Maxima auf. Aufgrund der größeren Fläche der zugehörigen Gauss-Kurve des rPhl p 6 im Vergleich zu nPhl p 6 ließ sich ein größerer Anteil an β -Faltblatt-Strukturen für rPhl p 6 ableiten. Weiterhin zeigten nPhl p 6 und rPhl p 6 ein Maximum bei 1662 cm^{-1} bzw. 1667 cm^{-1} , das im Absorptionsbereich von β -Schleifen lag. Hier konnte aufgrund der Flächen der Gauss-Kurven ein größerer Anteil an β -Schleifen für nPhl p 6 als bei rPhl p 6 vermutet werden. Das Absorptionsmaximum bei 1619 cm^{-1} für nPhl p 6 bzw. 1617 cm^{-1} für rPhl p 6 war auf eine Absorption von IR-Strahlung durch die Seitenketten der Aminosäuren zurückzuführen. Somit wiesen nPhl p 6 und rPhl p 6 große α -helicale und ungeordnete Bereiche auf und im Vergleich zueinander besaß das rPhl p 6 einen größeren Anteil an β -Faltblatt-Struktur.

Bei einer Denaturierung von nPhl p 6 und rPhl p 6 kam es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 1615 cm^{-1} bzw. 1618 cm^{-1} . Diese Maxima wurden durch die Absorption der AS-Seitenketten verursacht. Die größte Absorption, die den Sekundärstrukturen zugeordnet werden konnte, lag bei 1639 cm^{-1} für nPhl p 6 und 1641 cm^{-1} für rPhl p 6 und war auf ungeordnete Strukturen zurückzuführen. Die jeweiligen Gauss-Kurven besaßen die größte Fläche und somit waren denaturiertes nPhl p 6 und auch rPhl p 6 hauptsächlich ungeordnet strukturiert.

3.1.5. CD-Spektroskopie

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Sekundärstruktur mittels FTIR-Spektroskopie ist die CD-Spektroskopie. Diese Methode ermöglicht eine Berechnung der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen und die Bestimmung des Schmelzpunktes. Ein weiterer Vorteil ist der relativ geringe Verbrauch an Protein im Vergleich zu einer weiteren, jedoch exakteren Methode der IR-Spektroskopie. Die CD-Spektren wurden für nPhI p 6 und rPhI p 6 bei 20 °C, bei 100 °C und erneut nach dem Abkühlen auf 20 °C aufgenommen und sind in Abb. 10 gezeigt.

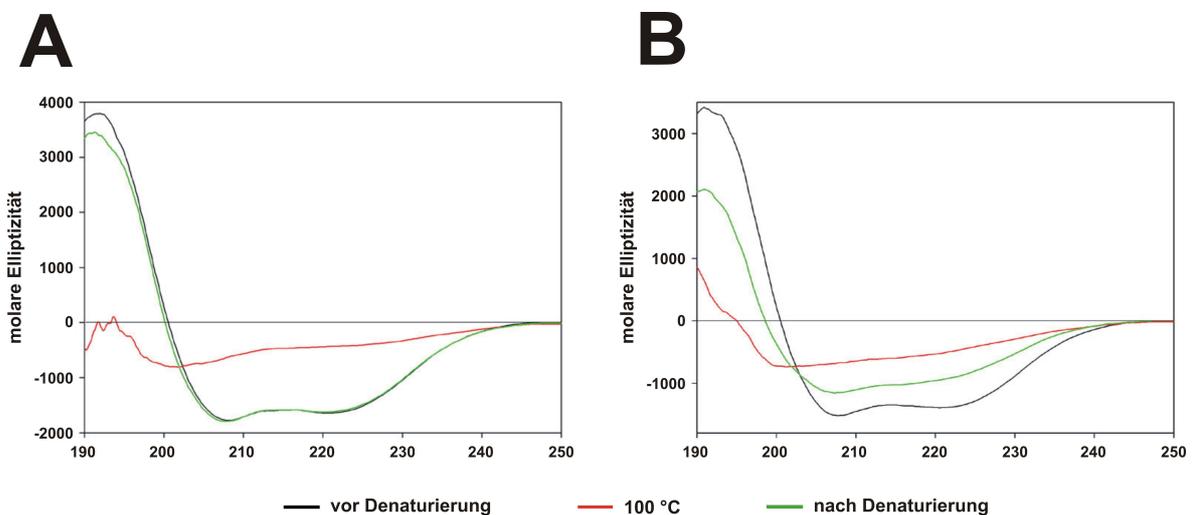


Abb. 10: CD-Spektrum von nPhI p 6 (**A**) und rPhI p 6 (**B**). Die schwarze Linie zeigt das CD-Spektrum bei 20 °C, die rote Linie bei 100 °C und die grüne Linie nach dem Abkühlen auf 20 °C.

Das CD-Spektrum von nPhI p 6 wies bei einer Wellenlänge von ca. 192 nm ein Maximum und bei ca. 207 nm und 222 nm Minima in der molaren Elliptizität auf. Dieses Spektrum zeigte große Ähnlichkeit mit dem Referenz-Spektrum von Poly-L-Lysin, das α -helical strukturiert ist. Anhand solcher Referenz-Spektren von Proteinen bekannter Struktur konnte für nPhI p 6 ein Anteil von ca. 56 % α -helicaler, 8 % β -Faltblatt und 35 % ungeordneter Strukturen ermittelt werden. Ein Erhitzen auf 100 °C führte zu einem Verlust des Maximums und der Minima im CD-Spektrum, das mit Spektren ungeordneter Strukturen identisch war. Nach dem Abkühlen auf 20 °C war das CD-Spektrum wieder nahezu identisch zum Spektrum

vor dem Erhitzen. Dies bedeutete, dass nPhl p 6 die Ausgangsstruktur wieder vollständig annahm.

Das CD-Spektrum von rPhlp6 bei 20 °C besaß nahezu identische Maxima und Minima wie das Spektrum von nPhl p 6. Für rPhl p 6 wurden jedoch im Vergleich zu nPhl p 6 wesentlich geringere Anteile an α -helicalen Strukturen von 41 % und an ungeordneten Strukturen von 43 % ermittelt. Dagegen war der Anteil an β -Faltblatt von 16 % wesentlich größer beim rPhl p 6 als beim nPhl p 6. Ein Erhitzen auf 100 °C führte beim rPhl p 6 ebenfalls zu einem vollständigen Verlust der geordneten Strukturen. Nach dem Abkühlen zeigte rPhl p 6 jedoch ein verändertes CD-Spektrum mit einem geringeren Maximum bei einer Wellenlänge von 192 nm und deutlicheren Minima bei 207 nm und 222 nm. Somit war die Struktur des rPhl p 6 im Gegensatz zum nPhl p 1 nach dem Abkühlen nicht mit der Struktur vor dem Erhitzen identisch.

Der Schmelzpunkt von nPhl p 6 und rPhl p 6 wurde durch das Messen der Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm und dem Erhitzen von 30°C auf 100 °C ermittelt. In Abb. 11 ist die Elliptizität von nPhl p 6 und rPhl p 6 in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt.

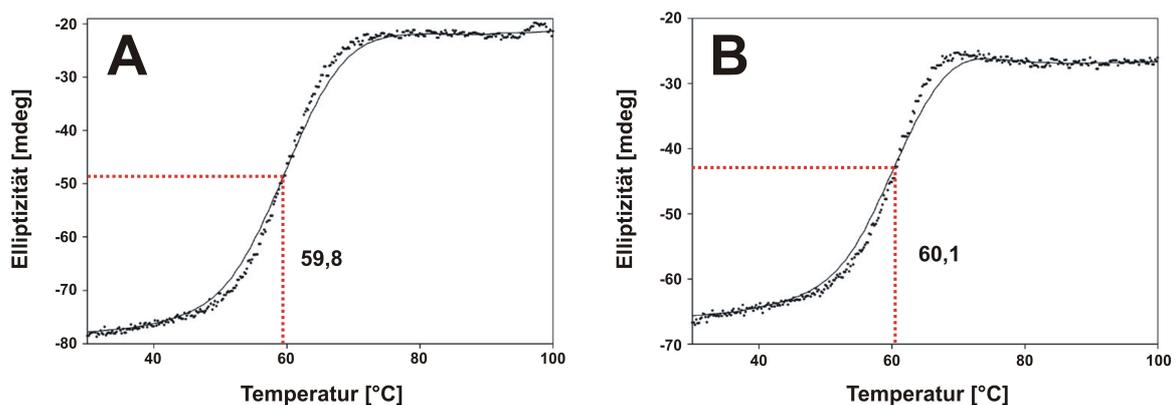


Abb. 11: Elliptizität von nPhl p 6 (A) und rPhl p 6 (B) bei 222 nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Die schwarzen Punkte geben die einzelnen Messpunkte und die schwarze Linie die Funktion dieser Messpunkte an. Die Wendepunkte sind durch rote gepunktete Linien dargestellt und bezeichnen die Schmelzpunkte von nPhl p 6 und rPhl p 6.

Die Messpunkte wurden durch eine Funktion approximiert, wobei der Wendepunkt dieser Funktion als Schmelzpunkt definiert ist. Für nPhl p 6 lag der Schmelzpunkt bei 59,8 °C und für rPhl p 6 bei 60,1 °C. Somit wiesen beide Proteine einen fast identischen Schmelzpunkt und eine hohe thermische Stabilität auf.

3.2. Einfluss von Nasensekret und BAL-Flüssigkeit auf nPhl p 6

Um zu untersuchen, ob die Allergene durch die Sekrete des Respirationstraktes prozessiert werden, wurde nPhl p 6 mit Nasensekret bzw. BAL-Flüssigkeit inkubiert und anschließend mittels Elektrophorese und Immunoblot auf die Entstehung von Fragmenten hin analysiert. Der Einfluss des Nasensekretes von insgesamt 26 Patienten auf nPhl p 6 wurde untersucht. Aus diesem Kollektiv gaben 13 Patienten an, unter einer Allergie zu leiden, wobei unterschiedliche Sensibilisierungen vorlagen. Neben Gräserpollen-Allergien traten unter anderem auch Birkenpollen-, Haselpollen- und Hausstaubmilben-Allergien auf. Eine detaillierte Diagnose z.B. mittels Hauttest lag jedoch nicht vor. Von diesen 13 allergischen Patienten wurden zur Zeit der Probenentnahme 6 medikamentös behandelt, 4 Patienten mit einem antiallergischem Nasenspray, ein Patient mit Antihistaminikum und 1 Patient wurde mit einem Antibiotikum behandelt. Eine Fragmentierung des nPhl p 6 durch das Nasensekret dieser 26 untersuchten Patienten konnte anhand von Immunoblots mit Bo12 nicht nachgewiesen werden.

Neben dem aus den oberen Atemwegen stammenden Nasensekret wurde auch die aus den unteren Atemwegen stammende BAL-Flüssigkeit auf proteolytische Aktivität gegenüber dem nPhl p 6 untersucht. Die BAL-Flüssigkeit stammte von einem Spenderkollektiv aus insgesamt 42 Patienten, die aufgrund von Atemwegsbeschwerden in der Klinik des Forschungszentrum Borstel medizinisch betreut wurden. Auch hier konnte anhand von Immunoblots unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Bo12, eines Kaninchenhyperimmunserums sowie den Seren von Gräserpollen-sensibilisierten Patienten keine Fragmentierung des nPhl p 6 nachgewiesen werden.

Zum Vergleich wurde der Einfluss der BAL-Flüssigkeit auf das in der Struktur wesentlich komplexere nPhl p 1 untersucht. Aus dem untersuchten Kollektiv von 150 Patienten verursachte die BAL-Flüssigkeit von 22 Patienten eine deutliche Fragmentierung des nPhl p 1, die durch monoklonale Antikörper und auch ein Kaninchenhyperimmunserum nachgewiesen wurde. Nach einer Inkubation von über 12 h konnten neben unfragmentiertem nPhl p 1 auch Fragmente mit einer Größe von ca. 14, 20 und 30 kDa detektiert werden, wobei nicht alle drei Fragmente bei einem Patienten zu finden waren. In

Abb. 12 ist eine Tris-Tricine-Elektrophorese mit anschließendem Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern für eine Auswahl an BAL-Flüssigkeiten von Patienten gezeigt, die eine Fragmentierung des nPhl p 1 verursachten. Eine IgE-Reaktivität konnte für diese Fragmente jedoch nur in 15 Fällen durch die Verwendung von Seren Gräserpollen-allergischer Patienten nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen BAL-Flüssigkeiten von 22 Patienten mit deutlicher Fragmentierung des nPhl p 1 konnte bei 31 weiteren Patienten eine schwache Fragmentierung festgestellt werden. Bei letzteren konnte nur ein Fragment bei ca. 30 kDa mit den monoklonalen Antikörpern und dem Kaninchenhyperimmunserum nachgewiesen werden, jedoch konnte für dieses Fragment anhand von Seren Gräserpollen-allergischer Patienten keine IgE-Reaktivität detektiert werden.

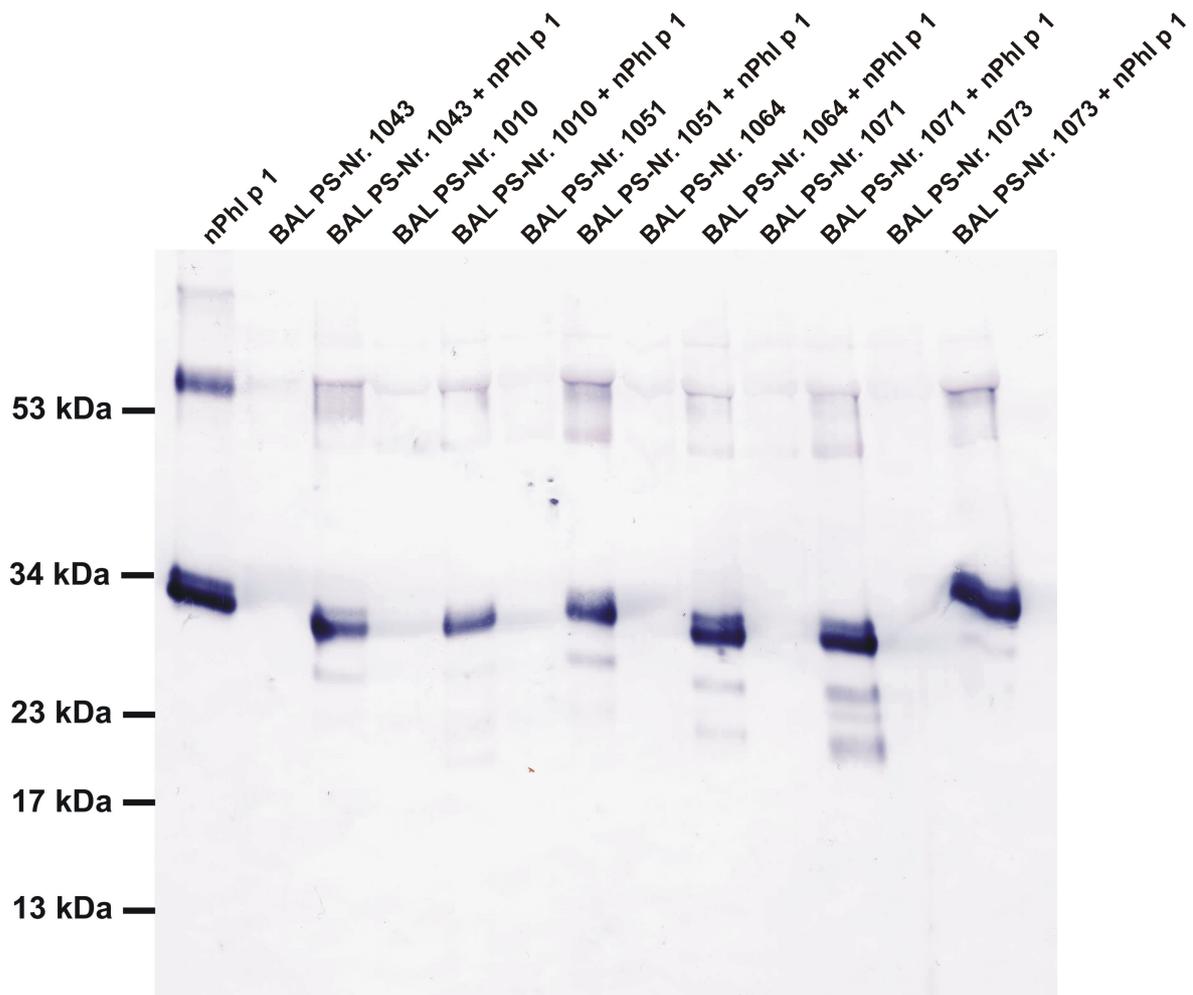


Abb. 12: Fragmentierung des nPhl p 1 durch BAL-Flüssigkeit. Nach der Inkubation von nPhl p 1 mit BAL-Flüssigkeit wurde eine Tris-Tricine-Elektrophorese mit anschließendem Immunoblot mit einem Gemisch aus den mAk Bo14, IG12, und HB7 durchgeführt. (BAL: BAL-Flüssigkeit; PS-Nr.: Patienten-Nummer)

3.3. Interaktion von nPhl p 6 und nPhl p 1 mit den Epithelzellen des Respirationstraktes

Um eine Interaktion der Allergene auf der Epithel-Ebene des Respirationstraktes zu untersuchen, wurden die drei Zelllinien A549, NCI-H727 und Calu-3 verwendet. Diese Karzinom-Zelllinien sind epithelialen Ursprungs, sie stammen jedoch aus unterschiedlichen Regionen des Respirationstraktes und weisen unterschiedliche

Phänotypen auf. In dieser Arbeit wurde die Aufnahme des Fluoreszenz-markierten Allergens nPhl p 6 und zum Vergleich auch das strukturell stark unterschiedliche nPhl p 1 durch die Zelllinien anhand der Durchflusscytometrie und der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie untersucht.

3.3.1. Analyse der Allergenaufnahme durch die Epithel-Zelllinien des Respirationstraktes

Die Aufnahme der FITC-markierten Allergene durch die Epithel-Zelllinien wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten analysiert, um mögliche Unterschiede im Aufnahmeverhalten zwischen den Zelllinien aufzuzeigen. Dazu wurden die Zellen für 2, 6, 12 und 24 h mit 20 µg/ml nPhl p 6-FITC bzw. nPhl p 1-FITC inkubiert und die mittlere Fluoreszenzintensität mittels Durchflusscytometrie bestimmt. In Abb. 13 und Abb. 14 ist die Aufnahme der Allergene für die drei verwendeten Zelllinien dargestellt.

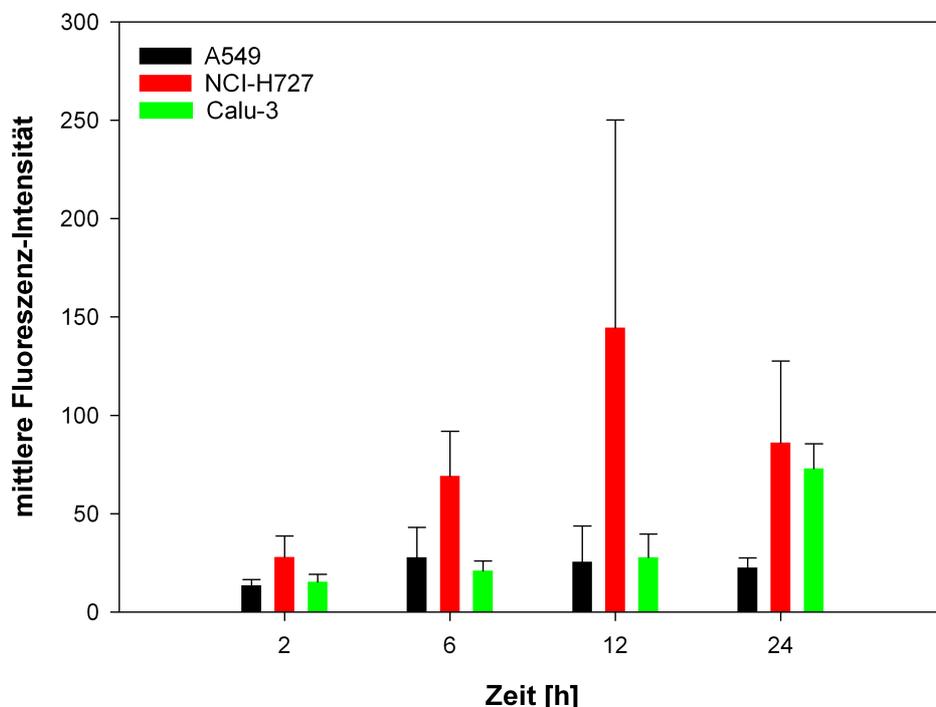


Abb. 13: Zeitabhängige Aufnahme von nPhl p 6-FITC durch A549-, NCI-H727- und Calu-3-Zellen (n=4).

Für alle drei verwendeten Zelllinien konnte nach einer Inkubationszeit von 2 h mit nPhl p 6-FITC ein deutliches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden, was auf eine Aufnahme von nPhl p 6-FITC durch die Zellen schließen lässt. Die A549-Zellen wiesen über den gesamten Zeitraum eine relativ gleichbleibende mittlere Fluoreszenz-Intensität auf. Bei den NCI-H727-Zellen erhöht sich die mittlere Fluoreszenz-Intensität bis zu einer Inkubation von 6 h und ist nach 12 und 24 h relativ gleichbleibend. Der Vergleich zwischen den Zelllinien zeigte, dass die NCI-H727-Zellen bei einer Inkubation mit nPhl p 6-FITC die stärksten Fluoreszenz-Intensitäten aufwiesen.

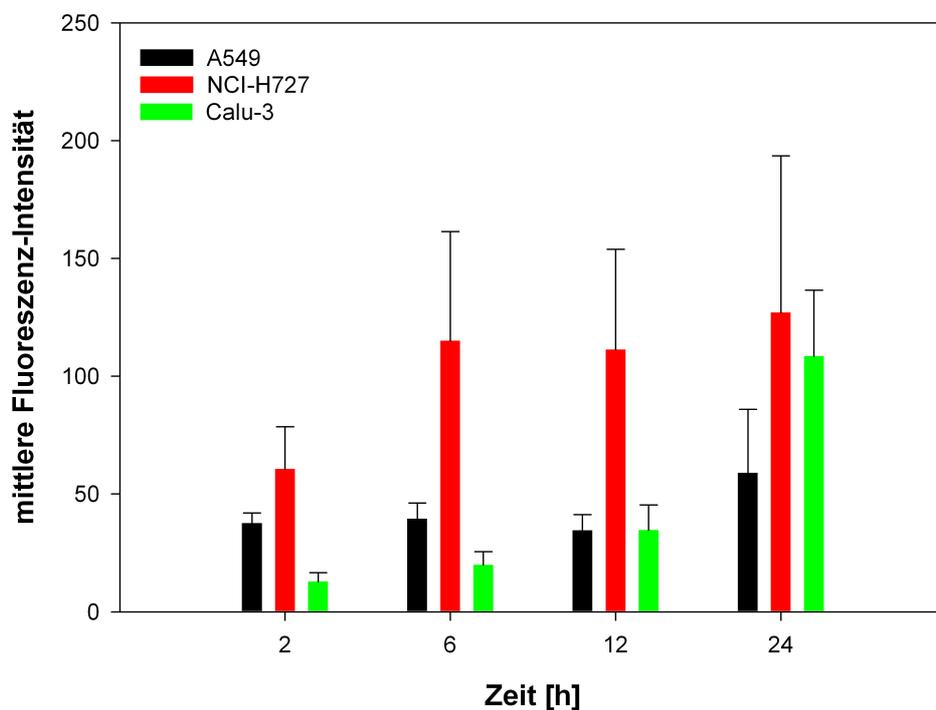


Abb. 14: Zeitabhängige Aufnahme von 20 µg/ml nPhl p 1-FITC durch A549, NCI-H727 und Calu-3-Zellen (n=4).

Die Zelllinien A549 und NCI-H727 zeigten bei einer Inkubation mit dem Allergen nPhl p 1-FITC ein zum nPhl p 6-FITC vergleichbares Aufnahmeverhalten. Die NCI-H727-Zellen wiesen auch hier die stärksten Fluoreszenzsignale auf. Bei der Zelllinie NCI-H727 erhöhte sich die Fluoreszenz bis zu einer Inkubationszeit von 6 h und ist dann gleichbleibend. Die A549-Zelllinie zeigte bei einer Inkubation mit nPhl p 1-FITC über einen Zeitraum von bis zu 24 h ein gleichbleibendes Fluoreszenzsignal. Im Vergleich zu diesen beiden Zelllinien steigerte sich das

Fluoreszenzsignal bei einer Inkubation der Calu-3-Zellen mit nPhl p 1-FITC kontinuierlich und erreichte sein Maximum bei 24 h. Das Signal erreichte erst nach 12 h eine vergleichbare Stärke zu dem der A549-Zellen. Die Fluoreszenz-Intensitäten waren bei einer Inkubation mit nPhl p 1-FITC höher als beim nPhl p 6-FITC.

3.3.2. Analyse des Mechanismus der Allergenaufnahme

Für die Analyse des Mechanismus der Allergenaufnahme wurde der Inhibitor Cytochalasin D eingesetzt, der die Makropinocytose hemmt. Die Zellen wurden für 30 min mit Cytochalasin D in einer nicht toxischen Konzentration präinkubiert. Anschließend wurde 20 µg/ml FITC-markiertes Allergen zugeben und die mittlere Fluoreszenzintensität mit dem Durchflusscytometer bestimmt. Als Negativkontrolle wurde auch die Aufnahme von FITC-markiertem Transferrin untersucht. Der Mechanismus der Allergenaufnahme wurde für die Zelllinien A549 und NCI-H727 bestimmt, da diese Zelllinien die Allergene und Transferrin nach einer Inkubationszeit von 2 h deutlich aufnehmen. In Abb. 15 ist der Einfluss von Cytochalasin D auf die Aufnahme von nPhl p 1-FITC, nPhl p 6-FITC und Transferrin-FITC durch A549- sowie NCI-H727-Zellen gezeigt.

Die Aufnahme von nPhl p 1-FITC durch A549-Zellen konnte durch 1 µM Cytochalasin D auf ca. 50 % der Aufnahme der Kontrolle signifikant reduziert werden. Bei den NCI-H727-Zellen führte Cytochalasin D in einer Konzentration von 1,25 mM ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion in der Aufnahme von nPhl p 1-FITC auf ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Somit wurde nPhl p 1-FITC hauptsächlich durch Makropinocytose von den Epithel-Zelllinien aufgenommen.

Im Gegensatz zu nPhl p 1-FITC führte Cytochalasin D zu keiner signifikanten Reduktion in der Aufnahme von nPhl p 6-FITC im Vergleich zur Kontrolle sowohl bei den A549-Zellen als auch bei den NCI-H727-Zellen. Jedoch wurde bei den NCI-H727-Zellen die Aufnahme im Mittel auf ca. 75 % der Kontrolle und bei den A549-Zellen auf ca. 90 % reduziert. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass die Makropinocytose nicht wesentlich an einer Aufnahme des nPhl p 6-FITC durch die A549- und NCI-H727-Zellen beteiligt ist.

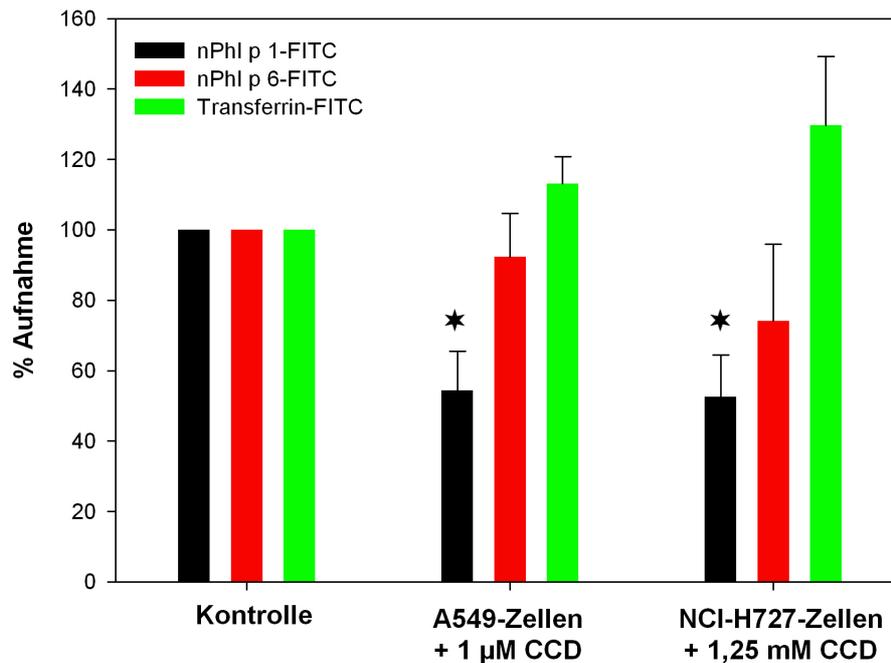


Abb. 15: Aufnahme von FITC-markiertem nPhl p 1, nPhl p 6 sowie Transferrin durch A549- und NCI-H727-Zellen in Abhängigkeit von Cytochalasin D (CCD). Die Allergene und das Transferrin wurden in einer Konzentration von jeweils 20 µg/ml eingesetzt. *: $p < 0,02$ versus Kontrolle

Der Einfluss von Cytochalasin D auf die Aufnahme des Transferrins, die hauptsächlich Rezeptor-vermittelt erfolgt und von der Makropinocytose unabhängig ist, wurde als Negativ-Kontrolle gewählt. Eine Inhibition der Aufnahme durch Cytochalasin D konnte für beide Zelllinien nicht festgestellt werden. Vielmehr war die Aufnahme von Transferrin-FITC leicht erhöht. Dies könnte auf eine Erhöhung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme bei einer Inhibition der Makropinocytose hindeuten.

3.3.3. Intrazelluläre Lokalisation der Allergene

Um nachzuweisen, dass die Epithelzellen die Allergene aufnehmen und das FITC-Fluoreszenzsignal mit den Allergenen korreliert, wurden die FITC-markierten Allergene über monoklonale Antikörper anhand der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie in den Zellen nachgewiesen. Weiterhin erfolgte eine Lokalisation in

den Zellen über eine Färbung der Zellmembran mit einem Antikörper gegen CD29 und mit dem Farbstoff LysoTracker Red, der die Lysosomen anfärbt. Dazu wurden die Zellen für 2 oder 6 h mit 20 µg/ml nPhl p 6-FITC bzw. nPhl p 1-FITC inkubiert und anschließend erfolgte eine Färbung mit den Antikörpern bzw. LysoTracker Red. In Abb. 16 ist der Nachweis der FITC-markierten Allergene mit monoklonalen Antikörpern gegen Phl p 6 und Phl p 1 für die Zelllinie A549 gezeigt.

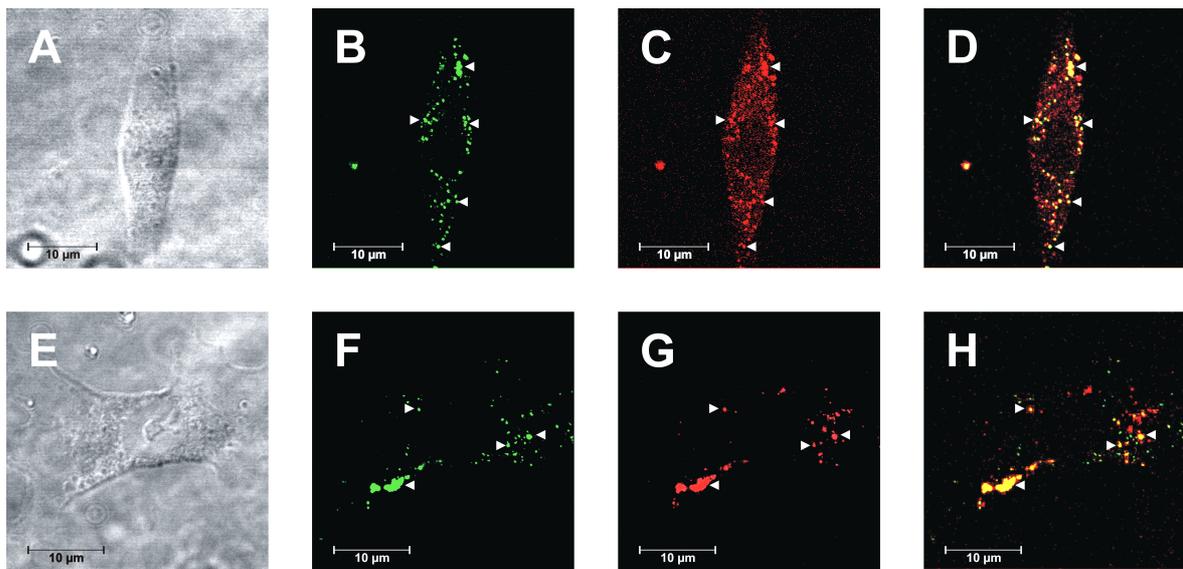


Abb. 16: Nachweis von FITC-markiertem nPhl p 6-FITC (**A bis D**) bzw. nPhl p 1-FITC (**E bis H**) in A549-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern Bo12 (Phl p 6-spezifisch) und Bo14 (Phl p 1-spezifisch). **A und E:** Phasen-Kontrast-Aufnahme der untersuchten Zelle. **B und F:** Nachweis des FITC-Signals. **C und G:** Detektion des Signals zum Nachweis der monoklonalen Antikörpern. **D und H:** Überlagerung des FITC-Signals mit dem des Nachweises des monoklonalen Antikörpers. Eine gelbe Färbung zeigt eine Kolokalisation an und ist z.T. durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Ein direkter Nachweis der FITC-markierten Allergene anhand der FITC-Fluoreszenz zeigte eine Lokalisation in Versikel-ähnlichen Strukturen (Abb. 16B und F). Bei einer Permeabilisierung der Zellen konnten die Allergene durch einen indirekten Nachweis mit monoklonalen Antikörpern, die für die Allergene spezifisch

sind, ebenfalls in Vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisiert werden (Abb. 16C und G). Dabei wurde die FITC-Fluoreszenz zum größten Teil von der roten Fluoreszenz des Nachweises der Allergen-spezifischen Antikörper überlagert (Abb. 16D und H). Anhand dieser Korrelation des FITC-Signal mit dem der Allergene konnte eine Aufnahme der Allergene in die Zellen gezeigt werden. Wurden die Zellen nicht permeabilisiert, so dass die Antikörper nicht in die Zelle diffundieren konnten, wurde beim anschließenden Nachweis der monoklonalen Antikörper auch kein Fluoreszenz-Signal detektiert. Dies zeigte ebenfalls eine Lokalisation der Allergene in den Zellen an.

Um nachzuweisen, dass die Fluoreszenz-markierten Allergene in die Zellen aufgenommen werden und nicht nur an der Zellmembran anhaften, wurde die intrazelluläre Lokalisation der Allergenen im Vergleich zur Zellmembran analysiert. Die A549- und NCI-H727-Zellen wurden für 6 h mit 20 µg/ml der Fluoreszenz-markierten Allergenen inkubiert und anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellmembran mit einem Antikörper spezifisch für CD29. In Abb. 17 und Abb. 18 ist eine Analyse der CD29 angefärbten A549-Zellen mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gezeigt.

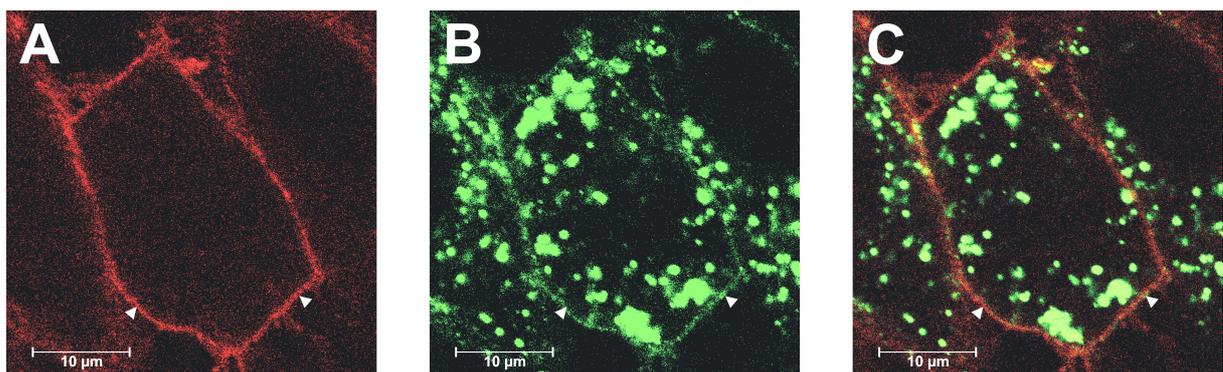


Abb. 17: Nachweis von nPhl p 6-FITC und der Membran mit einem anti-CD29-Antikörper in A549-Zellen mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop. **A:** Fluoreszenzsignal zur Detektion der anti-CD29-Antikörper. **B:** Nachweis der Fluoreszenz von nPhl p 6-FITC. **C:** Überlagerung des Nachweises der anti-CD29- und FITC-Fluoreszenz. Eine gelbe Färbung, die z.T. durch die weißen Pfeilspitzen markiert ist, zeigt eine Kolokalisation an.

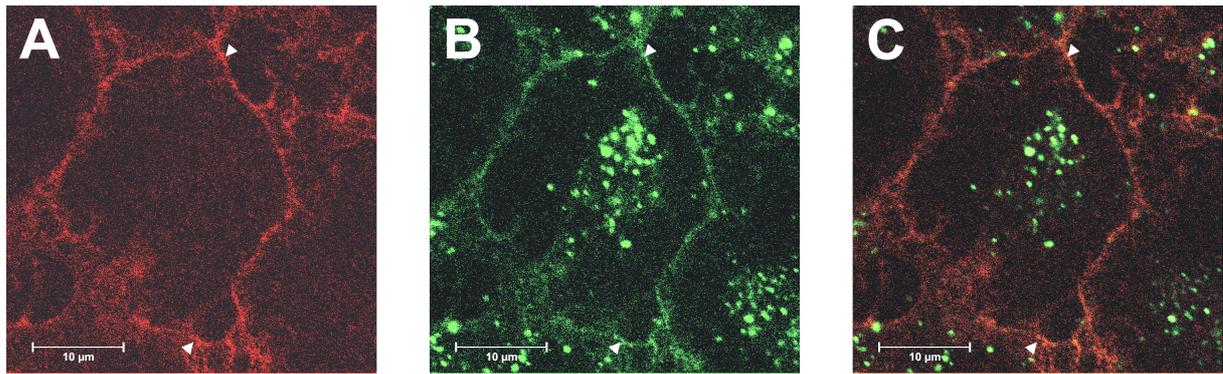


Abb. 18: Intrazelluläre Lokalisation von nPhl p 1-Alexa488 in A549-Zellen. Nach einer Inkubation von 2 h mit nPhl p 1-Alexa488 wurden die Zellen mit einem CD29-spezifischen Antikörper gefärbt und mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert. **A:** Fluoreszenzsignal zum Nachweis des anti-CD29-Antikörpers. **B:** Detektion der Alexa488-Fluoreszenz des nPhl p 1. **C:** Überlagerung der anti-CD29-Fluoreszenz mit der Alexa488-Fluoreszenz. Eine gelbe Färbung zeigt eine Kolokalisation an, die z.T. durch weiße Pfeilspitzen markiert ist.

Es konnte sowohl für das nPhl p 6 (Abb. 17) als auch für nPhl p 1 (Abb. 18) nur eine leichte grüne Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran, die über CD29 spezifisch angefärbt wurde, detektiert werden. Der größte Teil der Fluoreszenz-markierten Allergene befand sich in Vesikel-ähnlichen Strukturen im Cytosol der Zelle. Somit wurden die Fluoreszenz-markierten Allergene in die Zellen aufgenommen. Bei den NCI-H727-Zellen waren die Allergene ebenfalls in Vesikel-ähnlichen Strukturen im Cytosol lokalisiert, so dass eine Aufnahme der Allergene analog zu den A549-Zellen erfolgte (siehe Anhang, Abb. 27 und Abb. 28).

Eine Lokalisation der Allergene in intrazellulären Kompartimenten mit einem sauren pH-Wert wurde anhand des Farbstoffes LysoTracker Red analysiert. Die A549-Zellen wiesen eine Vielzahl an sauren Vesikeln auf, die anhand des sauren pH-Wertes als Lysosomen identifiziert wurden (Abb. 19 und Abb. 20). Die FITC-markierten Allergene nPhl p 6 bzw. nPhl p 1, die in Vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisiert waren, wiesen jedoch nur eine geringe Übereinstimmung mit den sauren Kompartimenten in der Zelle auf. Somit gelangte nur ein geringer Teil

der Allergene in die Lysosomen. Der größte Teil der Allergene war in Vesikeln lokalisiert, die keinen sauren pH-Wert aufwiesen. Auch bei einer Inkubation über einen Zeitraum von 24 h war der Anteil der Allergene, die in Lysosomen lokalisiert waren, nicht erhöht.

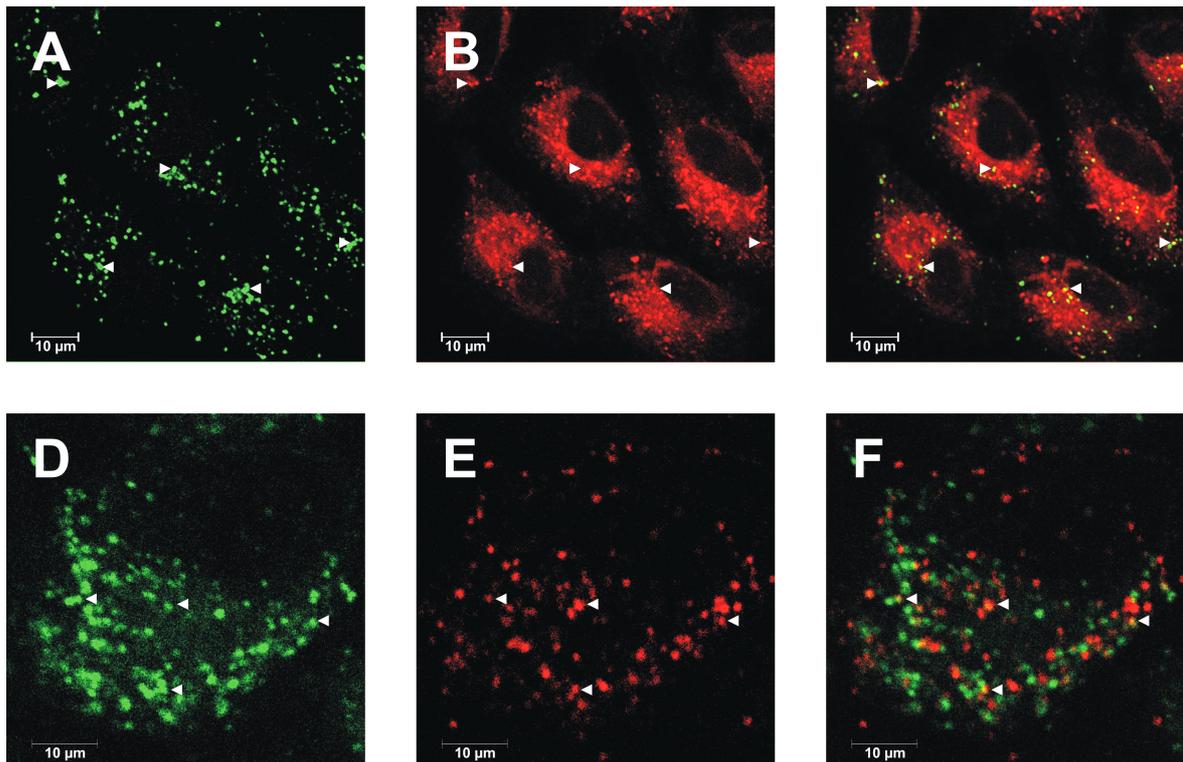


Abb. 19: Nachweis von nPhl p 6-FITC und der Lysosomen in A549-Zellen. Nach einer Inkubation von 2 h (**A – C**) bzw. 6 h (**D – F**) mit nPhl p 6-FITC wurden die Lysosomen mit LysoTrackerRed gefärbt und die Zellen mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert. **A und D:** Nachweis der FITC-Fluoreszenz von nPhl p 6. **B und E:** Nachweis der Fluoreszenz von LysoTrackerRed. **C und F:** Überlagerung des FITC- und LysoTrackerRed-Signals. Eine gelbe Färbung (weiße Pfeile) zeigt eine Kolo-kalisation an.

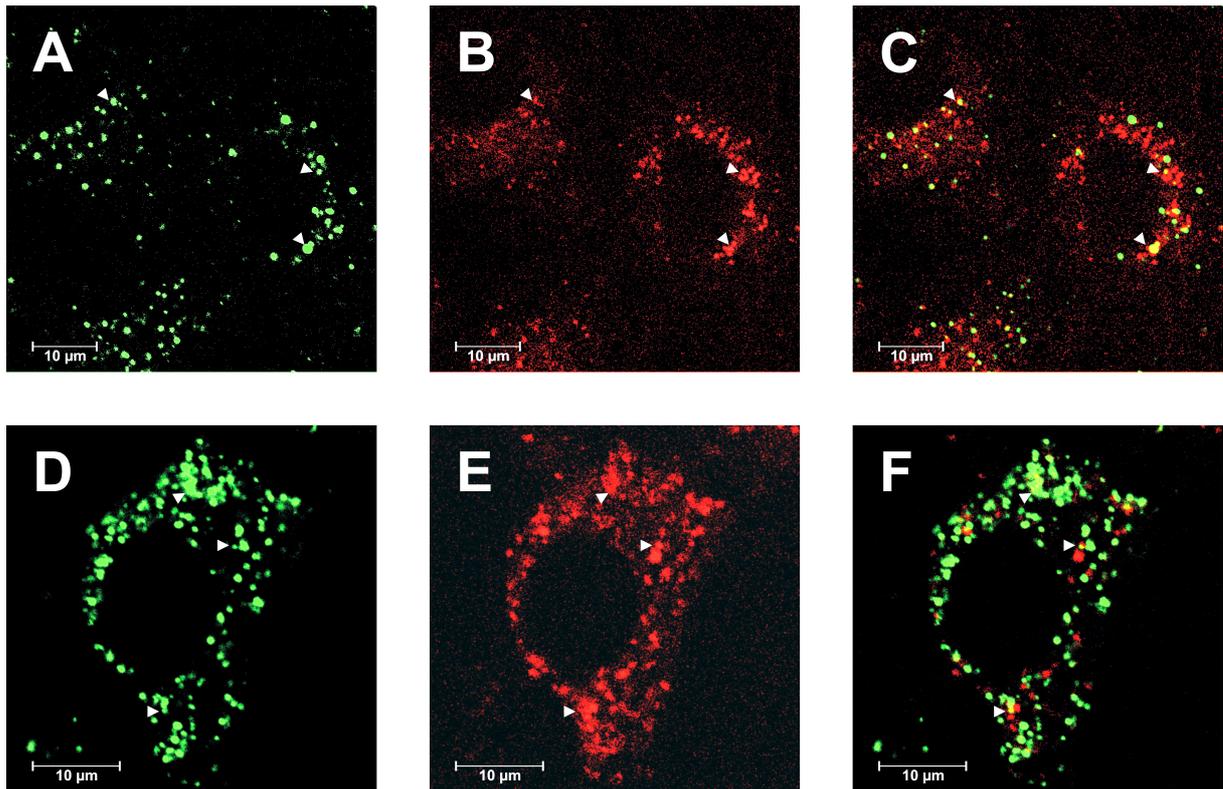


Abb. 20: Lokalisation von nPhl p 1-FITC und von den Lysosomen in A549-Zellen. Die A549-Zellen wurden für 2 h (**A – C**) bzw. 6 h (**D – F**) mit dem Allergen inkubiert und nach einer Färbung der Lysosomen mit LysoTrackerRed mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert. **A und D:** Detektion des FITC-Fluoreszenz von nPhl p 1. **B und E:** Nachweis der Fluoreszenz von LysoTrackerRed. **C und F:** Überlagerung des FITC- und LysoTrackerRed-Signals. Eine gelbe Färbung ist z.T. durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet und zeigt eine Kolo-kalisation an.

3.4. Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 durch Dendritische Zellen

Um die Allergenaufnahme durch APCs beim Bestehen einer Toleranz gegenüber den Allergenen zu untersuchen, d.h. bevor eine Sensibilisierung ausgelöst wird, wurden DCs aus den Monocyten von nicht atopischen Spendern unter Zugabe der Cytokine IL-4 und GM-CSF generiert. Eine Reifung der DCs wurde durch LPS induziert. Nach sechs Tagen in Kultur erfolgte eine Charakterisierung der DCs

anhand der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD83, HLA-DR und CD206, dem Mannose-Rezeptor, um eine vollständige Differenzierung von DCs aus den Monocyten sicherzustellen und um den Reifungsgrad der DCs zu bestimmen. In Abb. 21 ist die Charakterisierung der unreifen und reifen DCs anhand dieser fünf Oberflächenmarker dargestellt.

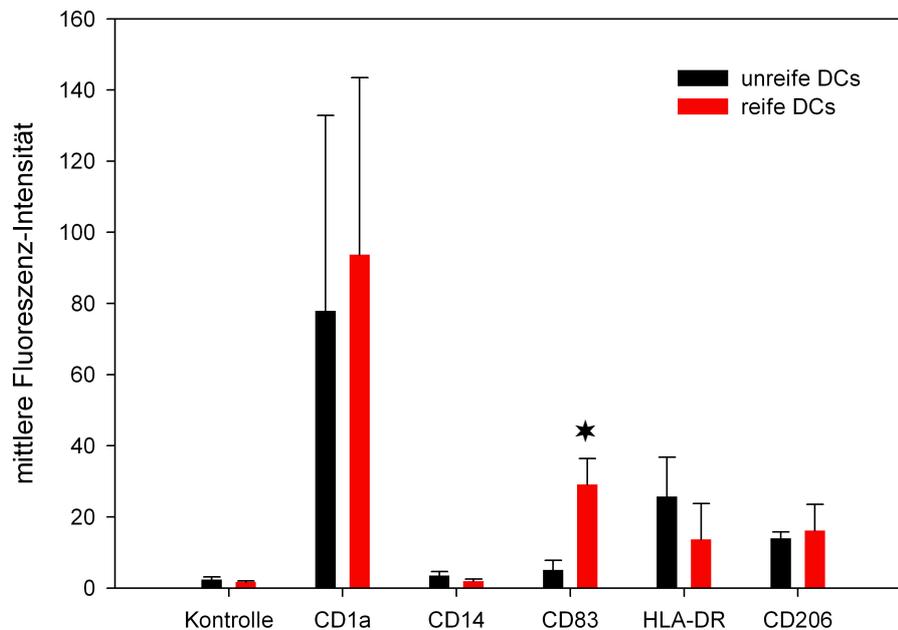


Abb. 21: Charakterisierung von unreifen und reifen DCs anhand der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD83, CD206 und HLA-DR. *: $p < 0,02$ versus CD83 unreifer DCs.

Sowohl unreife als auch reife DCs sind stark CD1a positiv und CD14 negativ. CD1a ist ein typischer Marker für DCs und CD14 ist ein für Monocyten typischer Marker. Somit konnten durch die Cytokine IL-4 und GM-CSF alle Monocyten zur vollständigen Differenzierung zu DCs angeregt werden. Anhand der drei Marker CD83, CD206 und HLA-DR wurden unreife und reife DCs charakterisiert: Die unreifen und auch reifen DCs sind HLA-DR und CD206 positiv, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen unreifen und reifen DCs gibt. Dagegen wurde bei den reifen DCs eine signifikant erhöhte Expression von CD83 im Vergleich zu den unreifen DCs nachgewiesen. Da CD83 ein typischen Oberflächenmarker für reife DCs ist, konnte somit eine Reifung der DCs durch LPS induziert werden.

3.4.1. Allergenaufnahme durch Dendritische Zellen

Um die Aufnahme von Allergenen durch DCs und die dabei auftretenden individuellen Schwankungen zu untersuchen, wurden unreife und reife DCs eines 9 Personen umfassenden Spenderkollektives mit 10 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 6-FITC bzw. der dazu annähernd äquimolaren Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 1-FITC für 2 h inkubiert und anschließend die mittlere Fluoreszenz-Intensität mit dem Durchflusscytometer bestimmt. In Abb. 22 ist die Aufnahme der Allergene durch unreife und reife DCs sowie die Schwankungsbreite innerhalb des Spenderkollektives dargestellt.

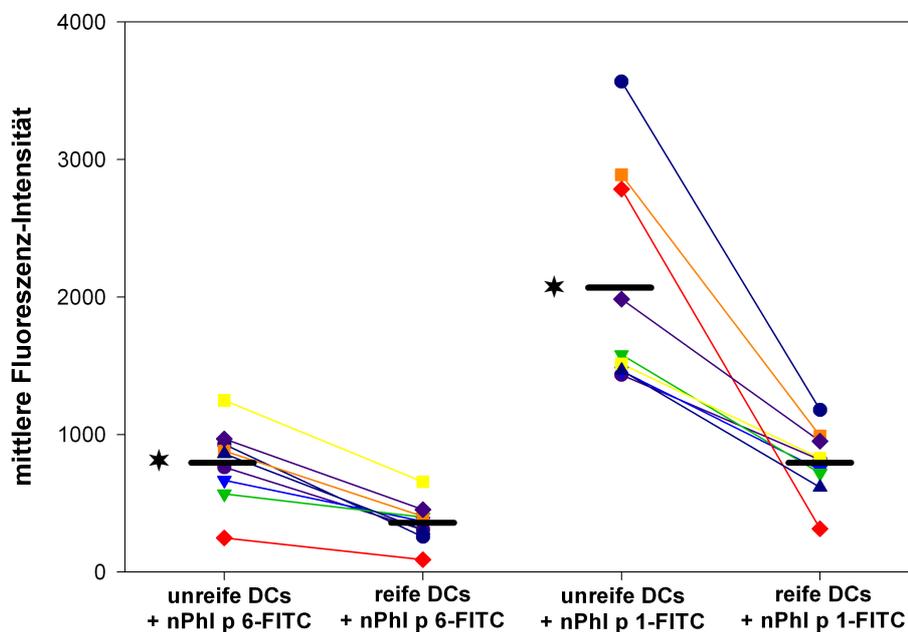


Abb. 22: Aufnahme von FITC-markiertem nPhl p 6 und nPhl p 1 durch unreife und reife DCs. Die DCs wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 6-FITC bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 1-FITC für 2 h inkubiert und die mittlere Fluoreszenz-Intensität mit dem FACS ermittelt. Die Fluoreszenz-Intensitäten der unreifen und reifen DCs sind für jeden Spender durch farbige Linien gekennzeichnet. Der Mittelwert ist durch eine schwarze Linie markiert. *: $p < 0,02$ versus reife DCs.

Die unreifen DCs nahmen im Gegensatz zu den reifen DCs die Allergene Phl p 6 als auch Phl p 1 signifikant stärker auf. Dabei war die Schwankungsbreite relativ hoch, was auf individuelle Unterschiede in der Aufnahme innerhalb des

Spenderkollektives zurückzuführen war. Die stärkeren mittleren Fluoreszenz-Intensitäten bei einer Aufnahme des nPhl p 1-FITC war durch eine stärkere Fluoreszenz-Markierung des nPhl p 1 im Vergleich zum nPhl p 6 zu erklären. Phl p 1 besitzt 27 Lysinreste, an die FITC potentiell gekoppelt werden kann, Phl p 6 dagegen nur 9 Lysinreste.

3.4.2. Zeitabhängige Aufnahme

Um die Art der Aufnahme von Allergenen durch DCs näher zu charakterisieren, wurde eine zeitabhängige Aufnahme untersucht. Dazu wurden unreife und auch reife DCs mit 10 µg/ml FITC-markiertem nPhl p 6 bzw. mit der äquimolaren Konzentration von 25 µg/ml nPhl p 1 über unterschiedliche Zeiträume inkubiert und die FITC-Fluoreszenz-Intensität mit dem FACS ermittelt. Gleichzeitig wurden tote Zellen durch Propidiumjodid (PI) angefärbt. Aufgrund der starken individuellen Schwankungen ist in Abb. 23 die zeitabhängige Aufnahme von FITC-markiertem nPhl p 6 und nPhl p 1 exemplarisch für einen Spender gezeigt. Das Kollektiv bestand für nPhl p 6-FITC aus 4 Spendern und nPhl p 1-FITC aus 2 Spendern.

Die maximale Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 war für unreife DCs bei allen getesteten Spendern nach 4 h erreicht. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Aufnahme von Allergenen für unreife in Vergleich zu reifen DCs signifikant erhöht. Die reifen DCs der getesteten Spender erreichten erst nach ca. 6 bis 8 h die maximale Aufnahme und hielten dieses Niveau dann bis zu einem Zeitpunkt von 24 h. Dagegen nahm die Fluoreszenz-Intensität der unreifen DCs nach dem Erreichen des Maximums relativ schnell wieder ab. Nach ca. 8 bis 10 h glichen sich die Fluoreszenz-Intensitäten der unreifen DCs dem Niveau der reifen DCs an. Eine Färbung der toten Zellen mit Propidiumjodid ergab für nPhl p 6-FITC über den gesamten Zeitraum von 24 h einen gleichbleibenden Prozentsatz an toten Zellen von ca. 5 %. Eine direkte Korrelation zwischen PI-positiven Zellen und der Abnahme in der FITC-Fluoreszenz-Intensität der unreifen DCs konnte für Phl p 6 nicht festgestellt werden. Die Kinetiken der Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 wiesen keine Unterschiede auf.

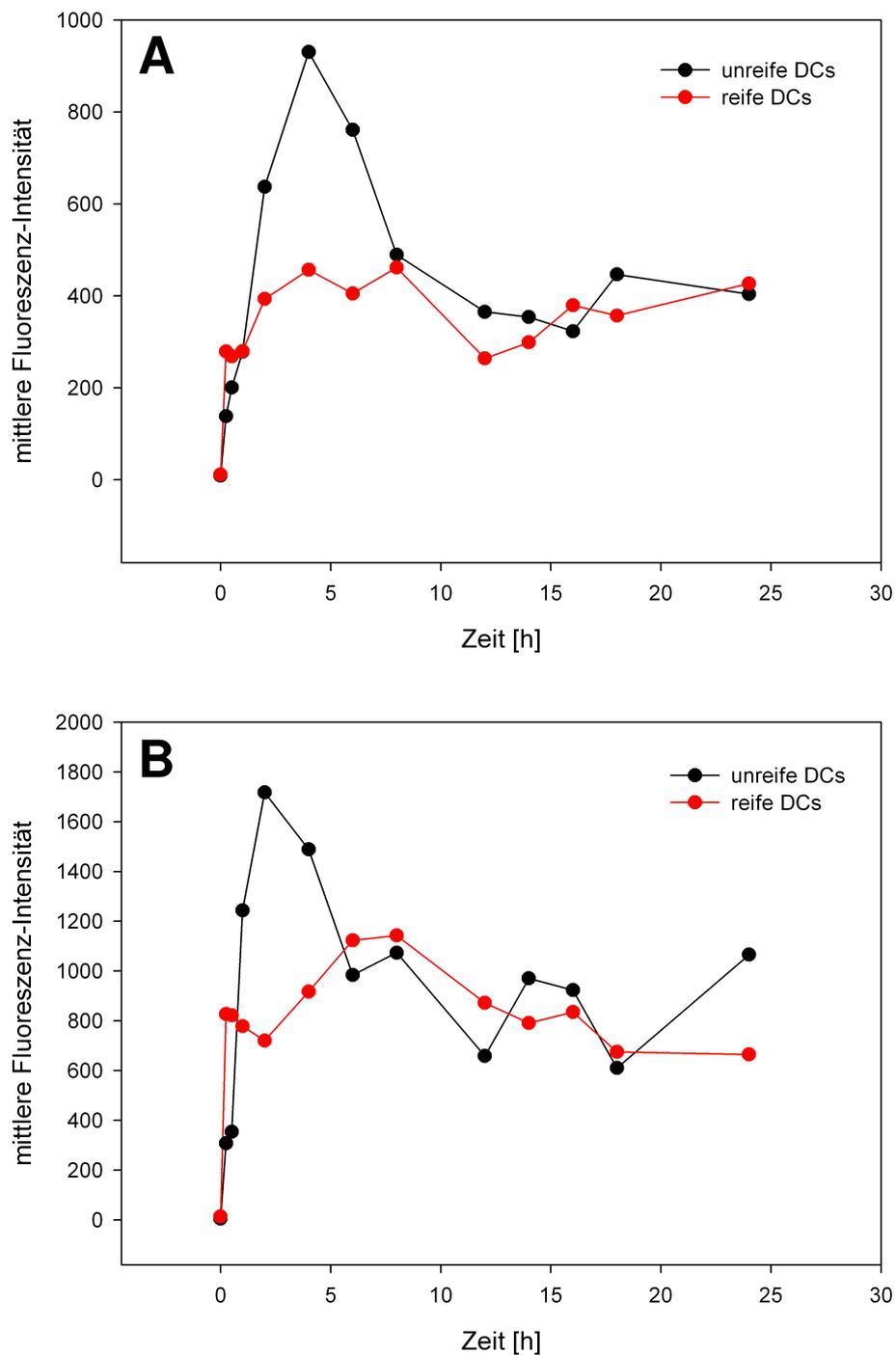


Abb. 23: Zeitabhängige Aufnahme von nPhl p 6-FITC (**A**) und nPhl p 1-FITC (**B**) durch unreife und reife DCs. Die DCs wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 6-FITC bzw. einer dazu äquimolaren Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 1-FITC inkubiert und die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten mit dem FACS ermittelt.

3.4.3. Konzentrationsabhängige Aufnahme

Die konzentrationsabhängige Aufnahme von Allergenen wurde ebenfalls untersucht, um Hinweise über die Art der Aufnahme zu erhalten. Die DCs wurden mit FITC-markierten Allergenen in steigender Konzentration für 2 h inkubiert und die mittlere Fluoreszenz-Intensität mittels Durchflusscytometrie bestimmt. Tote Zellen wurden durch PI angefärbt. In Abb. 24 ist die konzentrationsabhängige Aufnahme von nPhl p 6-FITC und nPhl p 1-FITC aufgrund der individuellen Schwankungen exemplarisch für einen Spender aus einem Kollektiv von 3 gezeigt.

Bei unreifen DCs kam es bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml nPhl p 6-FITC zu einem linearen Anstieg in der Fluoreszenz-Intensität. Bei höheren Konzentrationen nahm die mittlere Fluoreszenz-Intensität jedoch stark ab. Gleichzeitig nahm der Prozentsatz an PI-positiven, d.h. toten Zellen, stark zu. Zwischen dem Abfall in der FITC-Fluoreszenz und dem Anstieg der PI-positiven Zellen bestand eine starke Korrelation. Somit wurde der Abfall der FITC-Fluoreszenz-Intensität durch ein Absterben der DCs verursacht, was auf eine toxische Wirkung des FITC-markierten Allergene zurückzuführen war. Bei den reifen DCs, die das nPhl p 6-FITC wesentlich schwächer aufnahmen, wurde ein starker Abfall in der FITC-Fluoreszenz und ein Anstieg der PI-positiven Zellen erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml nPhl p 6-FITC ermittelt. Bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml nPhl p 6-FITC nahm die mittlere FITC-Fluoreszenz-Intensität der reifen DCs linear zu.

Analog zum nPhl p 6-FITC führte eine Inkubation von nPhl p 1-FITC mit unreifen DCs bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml und mit reifen DCs bis zu 50 µg/ml zu einem linearen Anstieg der Fluoreszenz-Intensitäten und damit zu einer Aufnahme von nPhl p 1. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einem starken Abfall der FITC-Fluoreszenzintensität, der mit einem Anstieg der PI-positiven Zellen korrelierte. Somit bestand kein Unterschied bei der konzentrationsabhängigen Aufnahme zwischen den beiden Allergenen.

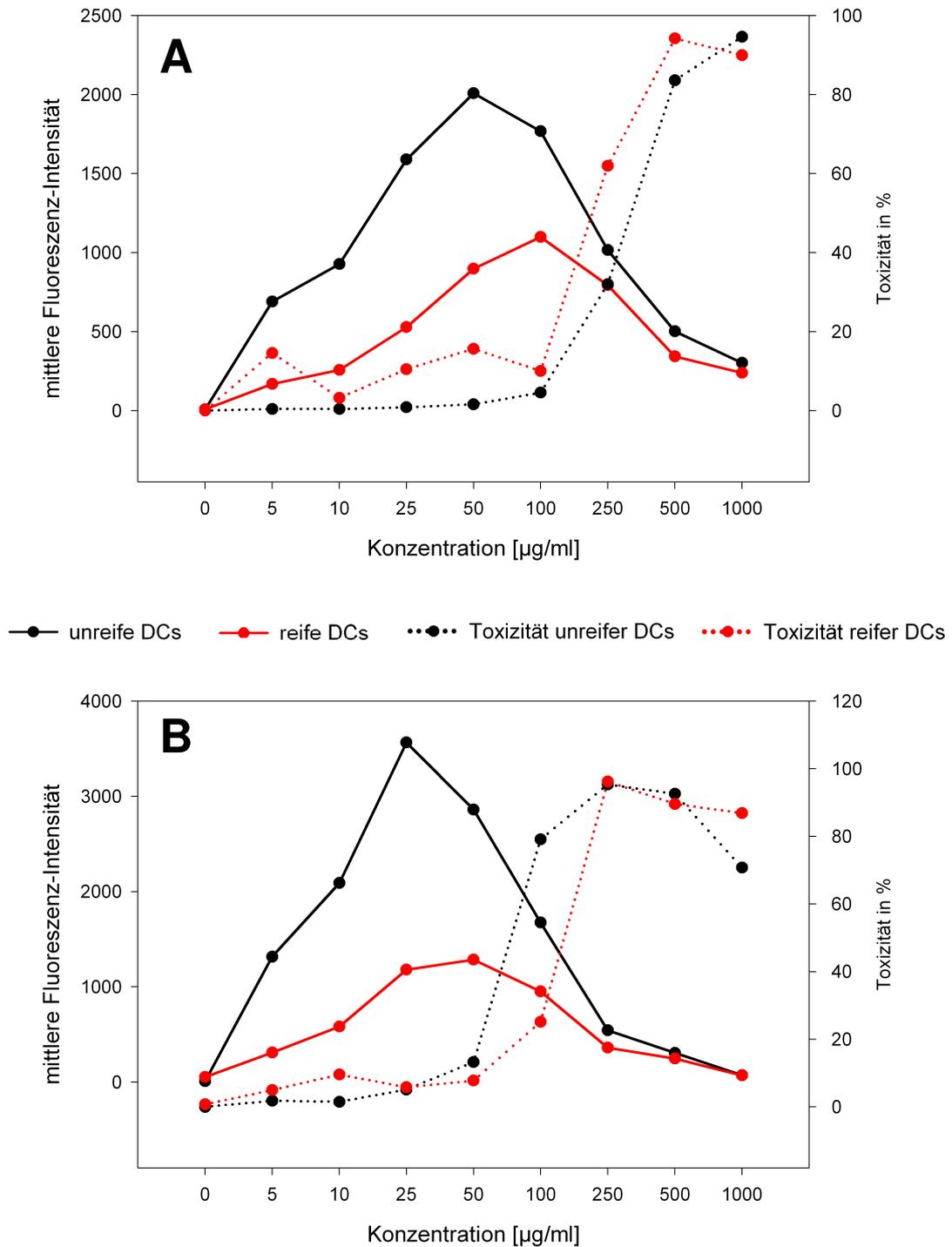


Abb. 24: Konzentrationsabhängige Aufnahme von nPhl p 6-FITC (**A**) und nPhl p 1-FITC (**B**) durch unreife und reife DCs. Nach einer Inkubation von 2 h wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität mit dem FACS ermittelt. Schwarze, durchgezogene Linie: Fluoreszenz-Intensität der unreifen DCs; rote, durchgezogene Linie: Fluoreszenz-Intensität der reifen DCs, schwarze, gepunktete Linie: Toxizität der unreifen DCs; rote, gepunktete Linie: Toxizität der reifen DCs.

3.4.4. Inhibition der Aufnahme

Um den Mechanismus der Aufnahme beider Allergene nPhl p 6 und nPhl p 1 zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Als Inhibitor des Mannose-Rezeptors wurde Methyl- α -D-mannopyranosid (MMP) eingesetzt, das die spezifische Aufnahme von Antigenen über diesen Rezeptor kompetitiv hemmt. Durch Amiloride (AMD) und Cytochalasin D (CCD) wird dagegen die unspezifische Aufnahme von Antigenen über die Makropinocytose inhibiert. Die unreifen DCs wurden 30 min mit den Inhibitoren in der höchsten, noch nicht toxisch wirkenden Konzentration präinkubiert und anschließend für 1 h mit 10 μ g/ml nPhl p 6-FITC bzw. nPhl p 1-FITC inkubiert. Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten wurden mit dem FACS ermittelt. In Abb. 25 ist die Aufnahme der Allergene in Abhängigkeit von den Inhibitoren für ein Kollektiv aus 3 Spendern gezeigt.

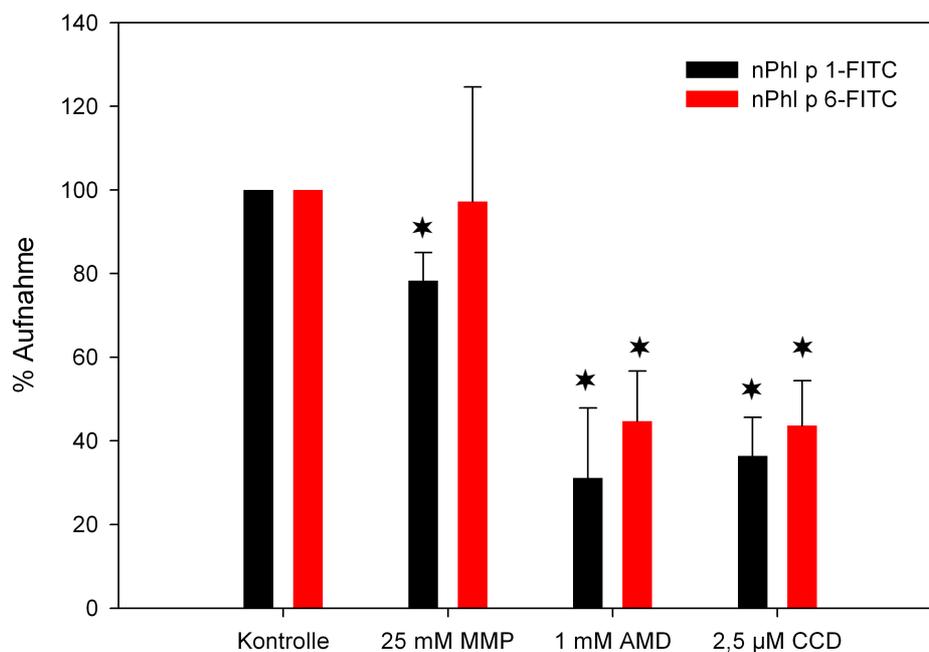


Abb. 25: Aufnahme von nPhl p 1-FITC und nPhl p 6-FITC durch unreife DCs in Abhängigkeit von den Inhibitoren MMP, AMD und CCD. Die DCs wurden nach einer Präinkubation mit den Inhibitoren von 30 min für 1 h mit 10 μ g/ml nPhl p 1-FITC bzw. nPhl p 6-FITC inkubiert und die Fluoreszenz-Intensitäten mit dem FACS ermittelt. Die Fluoreszenz-Intensitäten wurden in Bezug zu den Kontrollen ohne Inhibitoren gesetzt, die als 100 % Aufnahme definiert wurden. *: $p < 0,02$ versus Kontrolle.

Der Inhibitor des Mannose-Rezeptors MMP führte in einer Konzentration von 25 mM zu einer Reduktion der Aufnahme von nPhl p 6-FITC auf ca. 85 % und von nPhl p 1-FITC auf 80 % in Bezug zur Kontrolle ohne Inhibitor. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen nPhl p 6 und nPhl p 1. Die beiden Inhibitoren der Makropinocytose AMD und CCD führten dagegen in einer Konzentration von 1 mM bzw. 2,5 μ M zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme von nPhl p 6 als auch von nPhl p 1 auf ca. 30 bis 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen den beiden Allergenen besteht somit kein signifikanter Unterschied.

Die Aufnahme des glykosylierten nPhl p 1 konnte durch den Inhibitor des Mannose-Rezeptors MMP auf ca. 80 % signifikant reduziert werden. Da nPhl p 1 glykosyliert ist, wäre auch für nPhl p 1 eine Aufnahme über den Mannose-Rezeptor möglich. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu der Aufnahme des nicht glykosylierten nPhl p 6, die durch MMP auf ca. 85 % reduziert wurde. Somit spielte der Mannose-Rezeptor keine wesentliche Rolle bei der Aufnahme des Phl p 1 durch DCs. Eine Inhibition der Aufnahme durch AMD und CCD ließ auf eine unspezifische Aufnahme beider Allergene hauptsächlich über Makropinocytose schließen.

3.4.5. Einfluss der Allergene auf die Expression der Oberflächenmarker der DCs

Um zu überprüfen, ob die Allergene eine Reifung der DCs induzieren, wurde der Einfluss der Allergene auf die Oberflächenmarker untersucht. Dazu wurden unreife und zur Kontrolle auch reife DCs mit den Allergenen über 24 h inkubiert und anschließend anhand der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD83, CD206 und HLA-DR durchflusscytometrisch charakterisiert. In Abb. 26 ist der Einfluss der Allergene auf die Oberflächenmarker eines Kollektives aus 5 Spendern für nPhl p 6-FITC und 3 Spendern für nPhl p 1-FITC gezeigt.

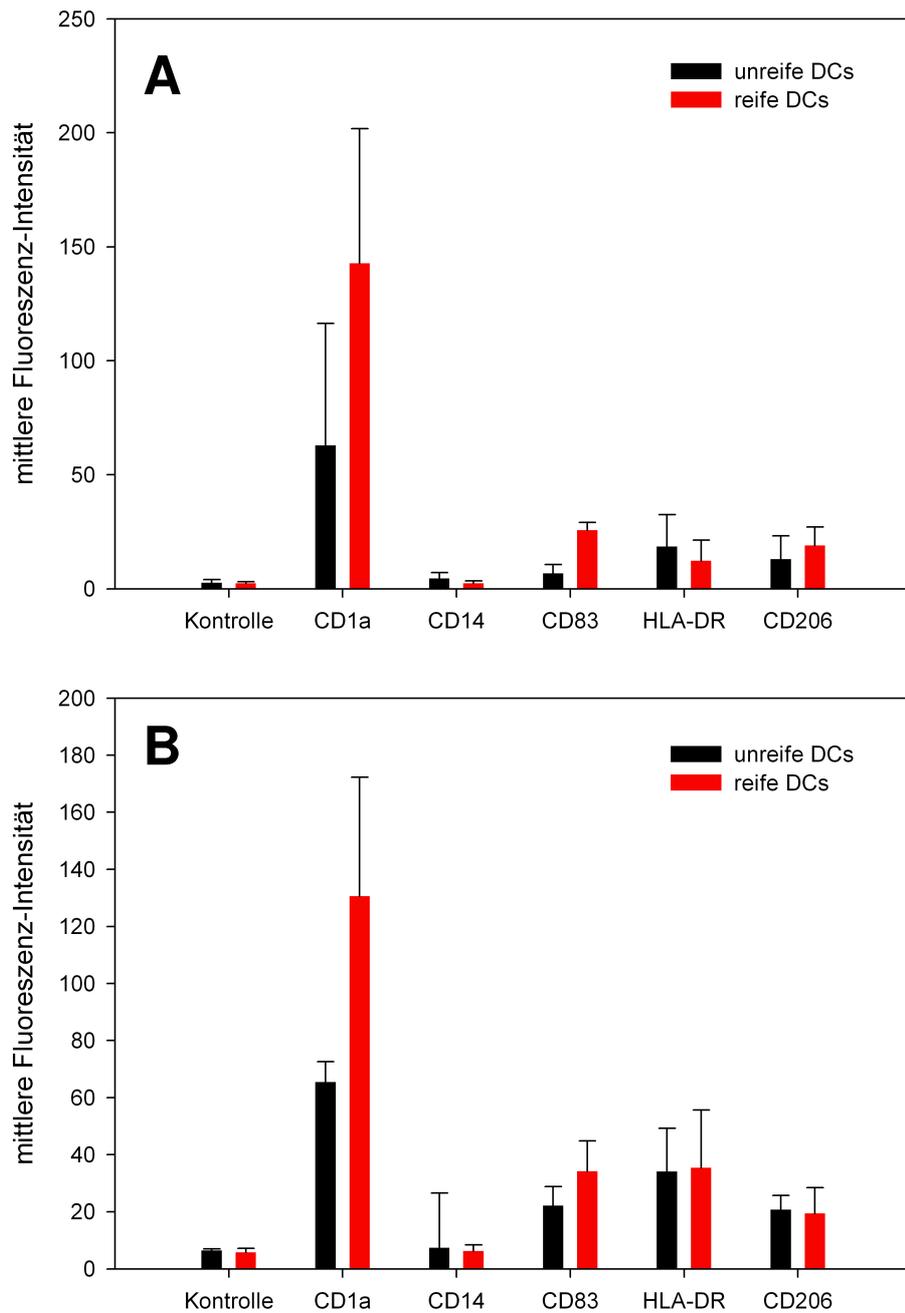


Abb. 26: Einfluss von nPhl p 6-FITC (**A**) und nPhl p 1-FITC (**B**) auf die Expression der Oberflächenmarker von unreifen und reifen DCs. Die DCs wurden für 24 h mit den annähernd äquimolaren Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 6-FITC bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ nPhl p 1-FITC inkubiert und anschließend erfolgte die Analyse zur Expression der Oberflächenmarker mit dem FACS.

Eine Inkubation von unreifen und auch reifen DCs mit nPhl p 6-FITC führte zu keiner Veränderung in der Expression der getesteten Oberflächenmarker im Vergleich zur Kontrolle ohne Allergen (vergleiche dazu Abb. 21). Das Allergen nPhl p 6 konnte somit keine Reifung der DCs induzieren.

Im Vergleich zu nPhl p 6-FITC und zur Kontrolle ohne Allergen (Abb. 21) führte nPhl p 1-FITC bei unreifen DCs zu einer verstärkten Expression von CD83 und HLA-DR. Die Expression der anderen Marker war vergleichbar zur Kontrolle ohne Allergen und zu einer Inkubation mit nPhl p 6-FITC. Auch die reifen DCs besaßen bei einer Inkubation mit nPhl p 1-FITC auf ihrer Oberfläche tendenziell, jedoch nicht signifikant eine größere Anzahl der Marker CD83 und HLA-DR im Vergleich zur Kontrolle und zu nPhl p 6-FITC. Somit induzierte das Allergen Phl p 1 im Gegensatz zu nPhl p 6 eine Reifung der unreifen DCs.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Struktur der Allergene beim Kontakt mit dem Organismus über den Respirationstrakt verändert wird und wie die Allergene mit den Epithelzellen sowie Immunzellen interagieren. Dabei standen besonders die Interaktionen der Allergene mit den Immunzellen von Nicht-Atopikern im Fokus, da diese die „normale“ Reaktion gegenüber den an sich harmlosen Allergenen darstellen und die Bildung einer Toleranz gegen diese begünstigen können. Die Gräserpollen kommen über den Respirationstrakt zuerst mit dem Sekret in Kontakt, wo die Allergene schnell aus dem Pollen extrahiert werden. Nachdem die Allergene die Ebene der Sekrete überwunden haben, treffen sie auf die Epithelzellen und nach dem Passieren dieser Barriere auf die APCs. Auf diesen drei Ebenen, dem Sekret, den Epithelzellen und den APCs, wurden die Interaktionen und Prozessierungen der Allergene in dieser Arbeit untersucht.

Als Modell-Allergen wurde für diese Untersuchungen das Gruppe 6 Allergen des Lieschgrases *Phleum pratense* ausgewählt, da das Phl p 6 eine IgE-Prävalenz von über 70% besitzt (Vrtala *et al.*, 1999) und damit zu den Majorallergenen gehört. Weiterhin ist aufgrund der Analyse von cDNA-Bibliotheken eine einfache Proteinstruktur zu erwarten (Petersen *et al.*, 1995b; Vrtala *et al.*, 1999), eine detaillierte Charakterisierung auf Proteinebene erfolgte bislang jedoch nicht. Für die Untersuchung der Interaktion und Prozessierung von Allergenen ist eine solche detaillierte Charakterisierung eine wichtige Voraussetzung und wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss der Sekrete des Respirationstraktes und die Aufnahme durch die Epithelzellen und DCs untersucht. Um einen allgemeinen Mechanismus für eine Allergenaufnahme und -prozessierung ableiten zu können, wurde zum Vergleich auch das durch posttranslationale Modifikationen wesentlich komplexer aufgebaute Gruppe 1-Allergen nPhl p 1 eingesetzt, für das zahlreiche Isoformen beschrieben wurden (Petersen *et al.*, 1993).

4.1. Strukturelle Charakterisierung der Allergene

In dieser Arbeit wurde das Allergen Phl p 6 auf Proteinebene anhand elektrophoretischer und massenspektrometrischer Methoden charakterisiert. Für das nPhl p 6 konnten zwei Isoformen detektiert werden, deren Massen sich in 5 Da unterscheiden. Diese Massendifferenz besteht zwischen den beiden von Petersen *et al.* (1995b) und Vrtala *et al.* (1999) anhand von cDNA-Analysen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für das Phl p 6. Diese cDNA-Sequenzen, die 110 Aminosäuren kodieren, unterscheiden sich in zwei Nukleotiden, die in der Proteinsequenz auch zu einem Austausch von zwei Aminosäuren führen. An den Positionen 14 und 95 beschrieben Petersen *et al.* (1995b) die Aminosäuren Valin sowie Arginin und Vrtala *et al.* (1999) Isoleucin und Histidin. Auf Proteinebene führen diese Austausche zu einer Massendifferenz von nur 5 Da. Diese Massendifferenz, die zu gering ist, um elektrophoretisch detektiert werden zu können, konnte anhand der hochauflösende ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie identifiziert werden. Somit konnten beide zuvor nur aus cDNA-Sequenzen abgeleiteten Isoformen des nPhl p 6 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Anhand der ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie und des tryptischen Verdau konnten keine Proteine bzw. Fragmente mit einer höheren Masse als die aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten identifiziert werden, so dass posttranslationale Modifikationen für das nPhl p 6 auszuschließen sind, obwohl an Position 17 ein Sequenzmotiv für eine N-Glykosylierungsstelle zu finden ist (Petersen *et al.*, 1995b). Neben diesen beiden Isoformen, die sich in nur zwei Aminosäuren unterschieden, konnten noch 6 N- und C-terminale Varianten identifiziert werden. Eine Addition von 186 Da entspricht genau den zwei zusätzlichen Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin, die auch von Petersen *et al.* (1995a) durch eine N-terminale Sequenzierung eines Proteinspots des nPhl p 6 mit einem pI von 5,2 am N-Terminus nachgewiesen wurden. Eine Analyse der cDNA-Sequenz ergab, dass diese beiden Aminosäuren in der Leadersequenz des Phl p 6 enthalten sind. Durch eine veränderte Abspaltung dieser Leadersequenz ist eine Addition von Aminosäuren am N-Terminus möglich. Weiterhin konnten für das nPhl p 6 Formen identifiziert werden, deren Molekulargewicht um 71, 225 bzw. 523 Massen geringer als erwartet ist. Diese Massendifferenzen decken sich auf maximal 0,34 Massen genau mit Deletionen von 1, 3 oder 6 Aminosäuren am

C-Terminus des nPhl p 6. Die Ursache für eine solche Deletion könnte in einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese oder auch einer beginnenden Degradation des Proteins liegen.

Für das in *E. coli* exprimierte rPhl p 6 konnte die theoretisch berechnete Masse mit der ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie exakt ermittelt werden. Um das klar definierte rPhl p 6 für die Untersuchungen zur Interaktion mit den Sekreten und Zellen des Respirationstraktes verwenden zu können, muss jedoch die dreidimensionale Struktur und damit die Proteinfaltung des rPhl p 6 mit der des nPhl p 6 vergleichbar sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Sekundärstruktur anhand der IR-FT-Spektroskopie bestimmt. Die Absorptionsspektren deuten für das rPhl p 6 auf einen erhöhten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen hin. Eine prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturen konnte anhand dieser Methode jedoch nicht ermittelt werden, da das Absorptionsspektrum der Amid I-Band von einer Absorption des Wassers im selben Wellenzahlbereich überlagert wird und dadurch je nach Wassergehalt der Probe starke Schwankungen auftreten können. So ist dieser Wassergehalt z.B. stark von der Luftfeuchtigkeit abhängig. Um jedoch einen eventuell vorhandenen Unterschied in der Proteinfaltung zu bestätigen und um eine prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturen zu berechnen, wurde eine weitere Methode angewendet, die auf einem alternativen Messprinzip beruht und nicht durch äußere Faktoren, wie z.B. der Luftfeuchtigkeit, beeinflussbar ist. Anhand der CD-Spektroskopie konnten die Unterschiede in der Proteinfaltung zwischen rPhl p 6 und nPhl p 6 ebenfalls nachgewiesen werden. Das rPhl p 6 besitzt mit 16 % einen höheren Anteil an β -Faltblatt-Strukturen als das nPhl p 6, das nur einen Anteil von 8 % aufweist. Aufgrund dieser Unterschiede in der Proteinfaltung wurde auf eine Verwendung des rPhl p 6 für die Untersuchung der Interaktionen verzichtet und das in dieser Arbeit exakt definierte nPhl p 6 eingesetzt, das sich aus nur zwei Isoformen zusammensetzt.

Die hier zur Charakterisierung des Phl p 6 angewendeten Methoden aus dem Bereich der Proteomics, wie z.B. 2-DE, tryptischer Verdau und Massenspektrometrie eignen sich besonders, um die Struktur von isolierten, reinen Proteinen zu bestimmen. Aufgrund des relativ geringen Molekulargewichtes

der Gräserpollenallergene von bis zu 70 kDa ist ein Überführen der Allergenen in die Gasphase bei der ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie ohne Degradationsprodukte möglich. Eine Charakterisierung anhand dieser Methoden wäre auch für die bisher wenig untersuchten Allergene Phl p 2 und Phl p 3 denkbar, die eine ähnliche Größe wie das Phl p 6 und keine Glykosylierungen aufweisen. Dagegen stoßen diese Methoden bei komplexeren Allergenen wie dem Phl p 1 und dem Phl p 13 an ihre Grenzen, da die zahlreichen Modifikationen wie Glykosylierungen, Disulfidbrücken und Hydroxylierungen die Anzahl der Variablen stark erhöhen. Die Massenspektren würden breite, sich überlappende Peaks aufweisen, die nur schwer einzelnen, exakten Isoformen zuzuordnen sind. Für die Charakterisierung solcher Allergene ist eine Kombination von proteinbiochemischen und massenspektrometrischen Methoden sinnvoll.

Anhand von proteinbiochemischen Methoden konnte für das ebenfalls in dieser Arbeit eingesetzte ca. 31 – 36 kDa große nPhl p 1 eine Vielzahl an Isoformen in einem pI-Bereich von 6,4 bis 8,5 und ein Kohlenhydratanteil von ca. 5 % des Molekulargewichtes nachgewiesen werden (Petersen *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1995c). Die Glykosylierung des nPhl p 1 konnte von Wicklein *et al.* (2004) mittels Massenspektrometrie detailliert analysiert werden. An der Aminosäureposition 9 besitzt das nPhl p 1 eine N-Glykosylierungsstelle mit einem Glykan vom komplexen Typ und an der Position 5 eine O-Glykosylierung mit einem Arabinoserest. Eine Analyse der cDNA-Sequenz zeigte, dass Phl p 1 in der Proteinsequenz 7 Cysteinreste besitzt, die an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sein können (Petersen *et al.*, 1995c). Weitere posttranslationale Modifikationen wie Hydroxylierungen von Prolin-Resten konnten ebenfalls für das nPhl p 1 mittels Proteinsequenzierung identifiziert werden, die die IgE-Reaktivität beeinflussen (Petersen *et al.*, 1998). Weiterhin postulieren Grobe *et al.* (1999) eine Cysteinprotease-Aktivität für das nPhl p 1.

4.2. Interaktion der Allergene mit den Sekreten des Respirationstraktes

Der als Allergenträger fungierende Pollen trifft in den oberen Atemwegen auf das die Schleimhäute überziehende Sekret. Hier kommt es in kurzer Zeit zu einer Freisetzung der im Pollen enthaltenen Proteine, wodurch auch die Allergene aus dem Pollen extrahiert werden (Vrtala *et al.*, 1993). Für die freigesetzten Allergene ist mit den Bestandteilen der Sekrete eine Vielzahl an Wechselwirkungen möglich. In dieser Arbeit wurde besonders eine Wechselwirkung mit den im Sekret enthaltenen Proteasen untersucht. Die Proteasen im Sekret dienen hauptsächlich als erste Abwehrmechanismen für Pathogene, so dass sie auch eine Fragmentierung der Allergene verursachen können. Dadurch wird zum einen die Aufnahme über das Epithel aufgrund einer geringeren Größe erleichtert und zum anderen kann das immunogene Potential der Allergene erhöht werden. So konnte für das Allergen Phl p 5b gezeigt werden, dass eine Fragmentierung durch im Nasensekret enthaltene Proteasen zu einer erhöhten IgE-Reaktivität führt (Bufe *et al.*, 1998). Eine solche Fragmentierung könnte besonders bei Atopikern eine Sensibilisierung fördern.

Bei Entzündungen der Lunge, wie z.B. der COPD, kommt es zu einer Infiltration von Neutrophilen und in der Folge davon zu einer erhöhten Mediator-Freisetzung der Neutrophilen. Zu diesen Mediatoren gehören neben Defensinen, Cytokinen und Lipidmediatoren auch Serin- und Metalloproteinasen, deren Freisetzung das Gleichgewicht zwischen Proteasen und deren Inhibitoren im Sekret stören (Hiemstra *et al.*, 1998). Damit ist besonders bei Entzündungen die Wahrscheinlichkeit einer Allergen-Fragmentierung erhöht. In dieser Arbeit konnte jedoch für das nPhl p 6 keine Fragmentierung durch Nasensekret und auch durch BAL-Flüssigkeit festgestellt werden. Besonders die BAL-Flüssigkeiten, die von Patienten mit akuten Atemwegserkrankungen stammten, zeigten auch nach einer 24-stündigen Inkubation keine Fragmentierung des nPhl p 6. Dies könnte durch die hohe Stabilität des Phl p 6 gegenüber Proteasen begründet sein. Im Gegensatz dazu konnte eine Fragmentierung für das komplexere nPhl p 1 in 35 % der untersuchten BAL-Flüssigkeiten detektiert werden. Diese Patienten wiesen

einen besonders hohen Gehalt an Neutrophilen in der BAL-Flüssigkeit auf, so dass hier eine Fragmentierung des nPhl p 1 durch Proteasen vermutet werden kann, die von den Neutrophilen freigesetzt wurden. Zu diesen Proteasen gehören unter anderem die Serin-Proteasen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 (Lee und Downey, 2001; Rao *et al.*, 1991; Selak *et al.*, 1988). Selbst nach einer 24-stündigen Inkubation ist die Fragmentierung des nPhl p 1 nicht vollständig und eine erhöhte IgE-Reaktivität analog zum Phl p 5b (Bufe *et al.*, 1998) konnte auch nicht detektiert werden. Eine Erhöhung der IgE-Reaktivität durch die Sekrete des Respirationstraktes, was eine Sensibilisierung fördern könnte, konnte somit weder für nPhl p 6 noch für nPhl p 1 nachgewiesen werden.

Die Allergene müssen bis in die unteren Atemwege vordringen, um eine asthmatische Reaktion auslösen zu können. Dies ist nur für Partikel mit einem Durchmesser von unter 5 µm möglich (Hoehne und Reed, 1971; Wilson *et al.*, 1973). Der Pollen, der aufgrund seines Durchmessers von ca. 30 µm nur bis in die oberen Atemwege gelangen und dort durch eine Allergenfreisetzung eine allergische Reaktion auslösen kann, scheidet als Allergenträger für die unteren Atemwege aus. Dagegen können Fragmente der Pollen oder Stärkekörner, die einen Durchmesser von bis zu 2,5 µm aufweisen und aus den Pollen bei einer Hydratisierung freigesetzt werden, als Allergenträger fungieren (Schäppi *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2002). Weiterhin können die Allergene über ein Anheften an Feinstäube, wie z.B. Dieselrußpartikel, bis zu den respiratorischen Epithelien vordringen (Knox *et al.*, 1997). Besonders die erhöhte Belastung durch Feinstäube und die damit korrelierende steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen in den Industrienationen unterstreichen die Bedeutung der Feinstäube als Allergenträger.

Über den Ort der Sensibilisierung gegen inhalative Allergene besteht bisher jedoch noch Unklarheit. Im Tiermodell konnte nur bei einer systemischen Immunisierung mit Allergenen eine Sensibilisierung nachgewiesen werden, wogegen eine inhalative Allergenexposition keine Ausbildung der typischen Symptome in der Lunge zur Folge hatte (Epstein, 2004). Dies macht eine Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt möglich, da der Pollen aufgrund seiner Größe vermehrt abgeschluckt wird. Diese Hypothese wird durch Befunde gestärkt, welche bei Mäusen eine T_H2-vermittelte Immunantwort durch die Gabe

von Allergenen über das Futter bei gleichzeitiger medikamentöser Neutralisation der Magensäure zeigen (Untersmayr *et al.*, 2003). Eine systemische Immunisierung und anschließende inhalative Exposition der Allergene kann auch die Organspezifität der Gräserpollenallergie erklären.

4.3. Interaktion der Allergene mit den Epithelzellen der Lunge

Für das Phl p 6 konnte keine und für das Phl p 1 nur in einigen Fällen eine geringfügige Fragmentierung durch die Sekrete festgestellt werden. Daraus ist abzuleiten, dass die Allergene meist intakt zu den Epithelzellen gelangen. Um jedoch eine Immunreaktion auslösen zu können, müssen die Allergene die Epithelbarriere überwinden. Neben einem parazellulären Überwinden dieser Barriere ist eine Endocytose der Allergene durch die Epithelzellen und eine anschließende Exocytose auf der basalen Epithelseite möglich. Während einer solchen Transcytose können die Allergene prozessiert werden. In dieser Arbeit wurde die Aufnahme der Allergene Phl p 6 und Phl p 1 durch die Epithelzellen, der zugrunde liegende Mechanismus und die intrazelluläre Lokalisation anhand der Zelllinie A549 untersucht. Die A549-Zellen, die aus einem Lungenkarzinom isoliert wurden, gehören zu den am besten untersuchten Lungenepithelzellen. Diese Zelllinie stammt aus dem respiratorischen Epithel und gleicht den Typ II-Zellen des alveolären Epithels (Lieber *et al.*, 1976). Die Typ II-Zellen kleiden nur ca. 7 % der Alveolen aus und sind für die Produktion von Surfactant und die Aufnahme von Partikeln verantwortlich, die bis zu den Alveolen vordringen. Weiterhin bilden sie die Stammzellen für die Typ I-Zellen, die ca. 93 % der Alveolen auskleiden und an denen der Gasaustausch stattfindet (Crapo *et al.*, 1982).

Anhand von durchflusscytometrischen Analysen konnte eine Aufnahme von FITC-markiertem nPhl p 6 und nPhl p 1 durch die A549-Zellen nachgewiesen werden. Nach ca. 6 Stunden ist das Maximum in der Aufnahme erreicht, auch nach 24 h ist die Aufnahme nicht erhöht. Dass eine Aufnahme von Proteinen über das respiratorische Epithel erfolgt, wurde vielfach beschrieben (Kim und Malik,

2003) und ist von großer Bedeutung für die Regulation des Wassergehaltes im Sekret (Hastings *et al.*, 2004). Die Proteine werden von den Epithelzellen z.T. durch eine Transcytose in das Interstitium zwischen Epithel und dem Endothel der Kapillaren abgegeben. Von dort gelangen sie anschließend in die Blutbahn. Eine Transcytose von exogenen Proteinen konnte für die Peroxidase des Meerrettichs (HRP) in einem trans-well-Kultursystem von primären humanen Typ-II-Epithelzellen gezeigt werden (Matsukawa *et al.*, 1996). Eine Endocytose und anschließende Exocytose würde das Plateau in der Aufnahme der Allergene nach 6 h durch die A549-Zellen erklären. Für die Untersuchung einer Transcytose in einem trans-well-Kultursystem sind die A549-Zellen jedoch nicht geeignet, da sie bei einem Kontakt mit benachbarten Epithelzellen keine tight junctions ausbilden. Dadurch würde ein parazelluläres Überwinden der Epithelbarriere durch die Allergene überwiegen.

Im Gegensatz zu den A549-Zellen kann die Zelllinie Calu-3 tight junctions ausbilden (Wan *et al.*, 2000) und wäre somit besser für die Untersuchung einer Transcytose der Allergene geeignet. Die Calu-3-Zellen haben ihren Ursprung jedoch im bronchialen Epithel, das zum respiratorischen Epithel starke Unterschiede in der Morphologie aufweist. Sie zeigen eine kumulative Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 über einen Zeitraum von 24 h. Ein Plateau in der Aufnahme beider Allergene konnte nicht festgestellt werden. Dies macht eine Transcytose der Allergene durch diese Zelllinie eher unwahrscheinlich. Die Ursache hierfür könnte in einer anderen Aufgabe infolge der Herkunft dieser Zelllinie aus dem bronchialen Epithel liegen. Die Epithelien der Bronchien sind mehrreihig und weisen ein Flimmerepithel zum Transport von Sekret und Partikeln auf. Weiterhin setzt sich das Bronchialepithel aus einer Vielzahl von unterschiedlich differenzierten Zelltypen zusammen, so dass spezialisierte Zellen wie z.B. die Clara-Zellen für regulatorische Funktionen verantwortlich sind (Jeffery und Li, 1997). Ihrer Abstammung nach könnte die Funktion der Calu-3-Zellen hauptsächlich in der Bildung einer Barriere zur Umwelt liegen, wodurch diese Zelllinie andere Mechanismen zur Proteinaufnahme als z.B. die A549-Zellen besitzt. Somit stellt die Zelllinie Calu-3 für die Untersuchung der Allergenaufnahme ein ungeeignetes Modellsystem dar und deshalb wurde auf einen Einsatz dieser Zelllinie für weitere Untersuchungen verzichtet.

Die Endocytose von Proteinen durch die Lungenepithelzellen kann entweder spezifisch über eine Vermittlung von Rezeptoren oder unspezifisch durch Makropinocytose erfolgen. Beide Mechanismen zur Aufnahme wurden für primäre humane Typ II-Epithelzellen beschrieben. Die endogenen Proteine wie Albumin und das Surfactant-Protein SP-A werden Rezeptor-vermittelt aufgenommen (John *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 1989). Dagegen konnte für das exogene Protein HRP eine unspezifische Aufnahme über Makropinocytose nachgewiesen werden (Matsukawa *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde der Mechanismus zur Allergenaufnahme anhand eines Inhibitors analysiert. Cytochalasin D blockiert die Polymerisation von Aktinfilamenten und da diese an der Bildung von Makropinosomen beteiligt sind, kommt es zu einer Reduktion der Makropinocytose (Miranda *et al.*, 1974; Racoosin und Swanson, 1989). Die Aufnahme von nPhl p 1 durch die A549-Zellen konnte durch Cytochalasin D signifikant gehemmt werden. Somit wird Phl p 1 ebenso wie die HRP durch Makropinocytose aufgenommen. Dagegen konnte die Aufnahme von nPhl p 6 nicht durch Cytochalasin D gehemmt werden, so dass die Makropinocytose nicht wesentlich an der Aufnahme des nPhl p 6 beteiligt ist. Da eine Aufnahme von nPhl p 6 durch die Analyse der intrazellulären Lokalisation anhand der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie eindeutig gezeigt werden konnte, ist eine über Rezeptoren vermittelte Internalisierung des nPhl p 6 möglich. Die Typ II-Zellen exprimieren eine Vielzahl an Rezeptoren, unter anderem den Transferrin-Rezeptor. Die Bildung der Endosomen ist bei der Rezeptor-vermittelten Aufnahme, wie die des Transferrins, unabhängig von den Aktinfilamenten und wird somit nicht durch Cytochalasin D gehemmt. Die Aufnahme des Transferrins wurde in dieser Arbeit als Negativ-Kontrolle untersucht und es konnte keine verminderte Aufnahme durch Cytochalasin D festgestellt werden.

Analog zu den A549-Zellen werden die Allergene nPhl p 6 und nPhl p 1 auch von der Epithelzelllinie NCI-H727 aufgenommen. Diese Zelllinie hat ihren Ursprung im bronchialen Epithel und besitzt endokrine Eigenschaften (Hegedus *et al.*, 1987). Wie die A549-Zellen bildet sie ebenfalls keine tight junctions aus. Die Allergenaufnahme, die auch durch die Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie nachgewiesen wurde, erreicht auch bei den NCI-H727-Zellen nach ca. 6 h ein Plateau. Dies lässt wie auch bei den A549-Zellen eine Transcytose der Allergene

vermuten. Die Aufnahme des nPhl p 1 konnte auch bei den NCI-H727-Zellen durch Cytochalasin D gehemmt werden. Somit internalisieren die NCI-H727-Zellen das Allergen nPhl p 1 analog zu den A549-Zellen unspezifisch durch Makropinocytose. Dagegen führt Cytochalasin D zu keiner signifikanten Reduktion der Aufnahme von nPhl p 6, was auch bei den NCI-H727-Zellen auf einen anderen Mechanismus als die Makropinocytose zur Aufnahme des nPhl p 6 hindeutet.

Um die Prozessierung der Allergene in den Epithelzellen zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Allergene in den Zellen anhand der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie analysiert. Sowohl nPhl p 6 als auch nPhl p 1 konnten anhand der direkten Fluoreszenz-Markierung als auch über monoklonale Antikörper in den Zellen in Vesikel-ähnlichen Strukturen nachgewiesen werden. Anhand dieser Lokalisation des Phl p 6 in Vesikeln kann eine Aufnahme des Phl p 6 aufgrund einer Diffusion infolge des geringen Molekulargewichtes ausgeschlossen werden, da keine gleichmäßige Verteilung im Cytosol festgestellt wurde. Einige dieser Vesikel, in denen die Allergene lokalisiert waren, wiesen einen sauren pH-Wert auf und konnten somit als Lysosomen identifiziert werden. Die Allergene in Vesikeln ohne sauren pH-Wert deuten vielmehr auf eine Transcytose hin, da es hierbei zu keiner Ansäuerung der Vesikel und auch zu keinem Abbau von Proteinen kommt (Tuma und Hubbard, 2003). Die in den sauren Vesikeln enthaltenen Allergene machen eine lysosomale Prozessierung wahrscheinlich. Jedoch ist der Prozentsatz der Proteine, die neben einer Transcytose in den lysosomalen Abbauweg gelangen, relativ gering, was eine deutliche Trennung dieser beiden Prozesse bedeutet. Kim *et al.* (2003) konnten zeigen, dass alveolare Epithelzellen über 90 % des apikal applizierten Albumins in intakter Form auf der basalen Epithelseite abgeben. In Bezug auf die Allergene bedeutet dies, dass der größte Teil der Allergene bei einer Aufnahme durch die Epithelzellen nicht prozessiert wird und intakt ins Interstitium gelangt. Dort werden die intakten Allergene von APCs aufgenommen und anschließend prozessiert.

Neben einer Transcytose der Allergene ist auch eine Prozessierung und anschließende Präsentation der Allergene über MHC II-Komplexe durch die Epithelzellen möglich, da ein Teil der Allergene ebenfalls in den Lysosomen nachgewiesen werden konnte. Für primäre humane Typ II-Zellen und auch für

A549-Zellen konnte eine Expression von MHC-II-Komplexen nachgewiesen werden, was auf eine akzessorische Antigenpräsentation der Epithelzellen hindeutet (Kalb *et al.*, 1991). Das Antigen KLH (englisch für "keyhole limpet hemocyanin") wird von Lungenepithelzellen und auch von primären Epithelzellen in Lysosomen aufgenommen und es konnte in den Vesikeln eine Kolo­kalisierung mit MHC II-Komplexen gezeigt werden (Salik *et al.*, 1999). Eine Expression der Proteasen Cathepsin S, V sowie H, die bei APCs an der lysosomalen Prozessierung von Antigenen beteiligt sind, konnten ebenfalls für die respiratorischen Epithelzellen nachgewiesen werden (Oei *et al.*, 2004). Außerdem konnte durch Epithelzellen eine Proliferation von T_H-Zellen induziert werden, wobei die Effektivität jedoch wesentlich geringer ist als bei den professionellen APCs wie Makrophagen und DCs (Mezzetti *et al.*, 1991). Eine lysosomale Prozessierung und anschließende Präsentation der Allergene durch die Epithelzellen könnten bei einer Sensibilisierung eine wichtige Rolle spielen.

Die Epithelbarriere des Respirationstraktes kann von den Allergenen zusätzlich zur Transcytose auch auf dem parazellulären Weg überwunden werden. Für das Hauptallergen der Hausstaubmilbe Der p 1 konnte eine Cysteinprotease-Aktivität nachgewiesen werden, die zu einem Aufbrechen der tight junctions von bronchialen Epithelzellen führt (Wan *et al.*, 1999). Dadurch können die Allergene in das Interstitium gelangen und direkt mit den APCs interagieren. Außerdem induziert Der p 1 bei den Epithelzellen eine Freisetzung von Chemokinen, die eine Migration von DCs zum Ort der Chemokin-Freisetzung auslösen (Pichavant *et al.*, 2005). Analog zu den Allergenen der Hausstaubmilbe konnte auch in dem Extrakt der Gräserpollen von *Lolium perenne* eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden, die in einem *in vitro*-Modell zu einem Ablösen von Lungenepithelzellen führt (Hassim *et al.*, 1998). Da Grobe *et al.* (1999) für das Gruppe 1-Allergen des Lieschgrases Phl p 1 eine Cysteinprotease-Aktivität postulieren, ist ein Aufbrechen der tight junctions von den Epithelzellen durch Phl p 1 und somit ein parazelluläres Überwinden der Epithelbarriere für Phl p 1 ebenfalls möglich.

4.3. Allergen-Aufnahme durch DCs

Auf der Ebene der Sekrete und der Epithelzellen wird nur ein sehr geringer Prozentsatz der Allergene fragmentiert oder prozessiert, so dass der größte Teil der Allergene intakt ins Interstitium gelangt und dort durch die APCs aufgenommen wird. Unter den APCs nehmen die unreifen DCs die Antigene am effektivsten auf und präsentieren sie nach einer Reifung auch am effektivsten. Da die DCs maßgeblich an einer T_H2 -Polarisation der Immunantwort beteiligt sind, die zu einer Sensibilisierung führt, wurde in dieser Arbeit die Allergen-Aufnahme durch die DCs charakterisiert.

Im Blut bilden die DCs nur einen geringen Prozentsatz von ca. 0,1 % der Zellen, wogegen in den peripheren Geweben, wie z.B. der Lunge, bis zu 700 DCs pro cm^2 gefunden wurden (Schon-Hegrad *et al.*, 1991). Bei der Isolierung der DCs aus dem Blut bzw. dem Gewebe kommt es jedoch zu einer Reifung der DCs, so dass die Antigene von den DCs nicht bzw. nur sehr schwach aufgenommen werden (Van Voorhis *et al.*, 1982). In dieser Arbeit wurden deshalb aus Monocyten, die die Vorläuferzellen der DCs bilden, durch die Zugabe der Cytokine IL-4 und GM-CSF unreife DCs generiert. Anhand dieser *in vitro* Methode differenzieren sich aus den Monocyten nach 6 Tagen in Kultur unreife DCs, die Antigene sowohl über Makropinocytose als auch Rezeptor-vermittelt aufnehmen (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). In dieser Arbeit wurde durch eine Analyse der exprimierten Oberflächenmarker eine vollständige Differenzierung der Monocyten in unreife DCs und nach einer Zugabe von LPS auch in reife DCs nachgewiesen.

Um auch auf der Ebene der APCs die Mechanismen der Allergenaufnahme von gesunden, nicht sensibilisierten Personen zu untersuchen, wurden die DCs ausschließlich aus den Monocyten von nicht atopischen Spendern generiert. Es konnte gezeigt werden, dass die FITC-markierten Allergene von den unreifen DCs signifikant stärker aufgenommen werden als von den reifen DCs. Dies steht im Einklang mit den Befunden von Sallusto *et al.* (1995), die bei einer Reifung der DCs durch LPS eine Reduktion der spezifischen und unspezifischen Antigenaufnahme zeigen konnten. Die unreifen DCs sind auf die Antigenaufnahme und die reifen DCs dagegen auf die Antigenpräsentation spezialisiert. Die schnelle

Aufnahme der Allergene mit einem Maximum nach 4 h bestätigt die Effektivität der Antigenaufnahme durch die DCs. Innerhalb des getesteten Spenderkollektives treten bei der Allergenaufnahme starke individuelle Schwankungen auf, die auf unterschiedliche, genetisch bedingte Kapazitäten in der Aufnahme von Antigenen zurückzuführen sind. Nach dem Erreichen des Maximums in der Aufnahme von nPhl p 6 und nPhl p 1 nach ca. 4 h kommt es im weiteren Zeitverlauf zu einer Angleichung der Fluoreszenz-Intensitäten der unreifen DCs an die der reifen DCs. Diese Abnahme der Fluoreszenz-Intensitäten kann zum einen durch einen Abbau und zum anderen durch eine Exocytose der Allergene erklärt werden. Bei unreifen DCs konnte jedoch selbst nach einer 19-stündigen Inkubation noch bis zu 80 % der aufgenommenen HRP und des Lysozyms intakt nachgewiesen werden, wogegen bei den reifen DCs nur ca. 10 % der Proteine intakt vorlagen (Trombetta *et al.*, 2003). Als Ursache konnte eine Ansäuerung der Lysosomen, die durch LPS als Reifungssignal vermittelt wurde, nachgewiesen werden. Dadurch wurde das pH-Optimum der lysosomalen Proteasen erreicht, was zu einer gesteigerten Prozessierung der Antigene führte. Dagegen vermuten Levine und Chain (1992) und Noirey *et al.* (2000) eine Abgabe der internalisierten Antigene durch unreife DCs, die mit einem Recycling der Vesikel-Membran aufgrund der hohen Endocytose-Rate der unreifen DCs gekoppelt ist.

Anhand einer konzentrationsabhängigen Aufnahme der Allergene sollte bestimmt werden, ob es sich um eine spezifische oder unspezifische Aufnahme handelt. Die spezifische Aufnahme über Rezeptoren führt aufgrund der begrenzten Kapazität zu einer Sättigung bei steigenden Allergen-Konzentrationen. Dagegen wird bei der unspezifischen Aufnahme über Makropinocytose keine Sättigung erreicht (Sallusto *et al.*, 1995). Für beide Allergene konnte bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml ein linearer Anstieg in der Aufnahme detektiert werden, bei höheren Konzentrationen war die Aufnahme wieder reduziert. Die Ursache dieser Reduktion lag möglicherweise in einer erhöhten Toxizität der FITC-markierten Allergene, entweder infolge der FITC-Markierung oder durch die Allergene. In der Literatur wurden FITC-markierte Proteine und Dextran in Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml ohne toxische Wirkung eingesetzt (Buentke *et al.*, 2000; Deslée *et al.*, 2002; Noirey *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1995). Somit weisen diese Befunde eher auf eine toxische Wirkung der Allergene hin. Aufgrund der Toxizität der FITC-

markierten Allergene konnte weder eine spezifische noch eine unspezifische Aufnahme nachgewiesen werden.

Um den Mechanismus der Allergenaufnahme zu analysieren, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. MMP ist ein kompetitiver Inhibitor des Mannose-Rezeptors CD206 und hemmt somit die spezifische Aufnahme von glykosylierten Antigenen (Buentke *et al.*, 2000). Der Mannose-Rezeptor ist sowohl gegenüber Mannose als auch Fucose, Glucose und N-Acetylgalactosamin spezifisch (Hitchen *et al.*, 1998). Eine Aufnahme über den Mannose-Rezeptor ist damit nur für nPhl p 1 aufgrund der Glykosylierung möglich, jedoch nicht für das unglykosylierte nPhl p 6. Da MMP nur zu einer geringen Reduktion der Aufnahme von nPhl p 1 führt, die jedoch nicht signifikant zum unglykosylierten nPhl p 6 ist, kann eine wesentliche Beteiligung des Mannose-Rezeptor an der Aufnahme des nPhl p 1 ausgeschlossen werden. Die unspezifische Aufnahme über Makropinocytose wurde durch Amiloride und Cytochalasin D inhibiert. Amiloride ist ein Inhibitor der Na⁺/H⁺-Austauschers, der über eine Ansäuerung des Cytosols zu einer reduzierten Aufnahme über die Makropinocytose führt (West *et al.*, 1989). Der Inhibitor Cytochalasin D blockiert die Polymerisation der Aktinfilamente und damit die Bildung von Makropinosomen (Miranda *et al.*, 1974; Racoosin und Swanson, 1989). Die Aufnahme der Allergene nPhl p 1 und nPhl p 6 durch DCs konnte sowohl durch Amiloride als auch Cytochalasin D signifikant gehemmt werden. Somit werden beide Allergene trotz der großen strukturellen Unterschiede hauptsächlich über Makropinocytose von den DCs aufgenommen.

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme der natürlichen Allergene durch DCs untersucht, da bei einer Verwendung von rekombinanten Allergenen aufgrund von strukturellen Unterschieden, wie z.B. der Glykosylierung und der Proteinfaltung, abweichende Mechanismen zur Allergenaufnahme zu erwarten sind. Die Aufnahme von rPhl p 1, das in *E. coli* exprimiert wurde und somit auch keine Glykosylierungen aufwies, wurde von Noirey *et al.* (2000) anhand von LCs untersucht. Eine Aufnahme von rPhl p 1 erfolgte nicht über den Mannose-Rezeptor, sondern über Makropinocytose, was über Inhibitionsexperimente gezeigt wurde. Somit wird rPhl p 1 von den LCs und das glykosylierte nPhl p 1 von DCs, die aus Monocyten generierten wurden, über den selben Mechanismus, die

Makropinocytose aufgenommen. Eine Aufnahme über den Mannose-Rezeptor konnte für das Hausstaubmilben-Allergen Der p 1 gezeigt werden (Deslée *et al.*, 2002). Jedoch ist die Makropinocytose ebenfalls stark an der Aufnahme beteiligt. Die Gruppe 1-Allergene der Hausstaubmilbe besitzen zwischen den Aminosäuren 53 - 55 eine N-Glykosylierungsstelle (Thomas *et al.*, 2002). Die Glykosylierung des Der p 1 setzt sich aus Galactose, Mannose und N-Acetylglucosamine zusammen (Chapman und Platts-Mills, 1980). Da sich die Glykosylierung bei Invertebraten und Pflanzen weitestgehend entsprechen (van Ree, 2002), ist für Der p 1 ein gleiches Glykosylierungsmuster zu vermuten wie es für nPhl p 1 von Wicklein *et al.* (2004) beschrieben wurde. Die N-Glykosylierung des nPhl p 1 liegt jedoch nahe des N-Terminus der Aminosäuresequenz an der Position 9 (Petersen *et al.*, 1995c). Trotz dieser N-terminalen Position der Kohlenhydratkette des nPhl p 1 kommt es zu keiner Bindung und Internalisierung über den Mannose-Rezeptor.

Die von den unreifen DCs aufgenommenen Antigene werden erst nach einem Reifungssignal in den Lysosomen durch Proteasen prozessiert und an die MHC II-Komplexe gebunden (Trombetta *et al.*, 2003). Anschließend werden die Peptid-MHC II-Komplexe an der Oberfläche mit weiteren costimulierenden Faktoren den T_H-Zellen präsentiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Allergene selbst ein Reifungssignal für die DCs darstellen. Für das nPhl p 6 konnte keine Reifung der DCs festgestellt werden, da die Expression des Reifungsmarkers CD83 nicht gesteigert wurde. Dagegen führte die Aufnahme von nPhl p 1 zu einer erhöhten Expression von CD83 bei den DCs. Die Ursache hierfür könnte durch eine leicht erhöhte LPS-Kontamination des nPhl p 1 im Vergleich zum nPhl p 6 erklärt werden. Der LPS-Gehalt der FITC-markierten Allergene wurde über die IL-8-Freisetzung von HEK293-Zellen analysiert, die mit dem Toll-like Rezeptor (TLR)-4, CD14 und MD2 transfiziert wurden. Das LPS bindet vermittelt durch CD14 und MD2 an den TLR-4, wodurch eine Signaltransduktionskaskade zur Freisetzung von IL-8 aktiviert wird. Für nPhl p 1 konnte jedoch keine signifikant erhöhte IL-8-Freisetzung durch die transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abb. 29), so dass der LPS-Gehalt zwischen nPhl p 1 und nPhl p 6 auch keine signifikanten Unterschiede aufweist. Dies macht eine durch nPhl p 1 induzierte Reifung der unreifen DCs allein verursacht durch eine LPS-Kontamination des nPhl p1 unwahrscheinlich.

Eine Reifung der DCs könnte auch durch das nPhl p 1 selbst induziert werden. So konnte für das Allergen Der p 1 bei den DCs von Hausstaub-sensibilisierten Patienten im Gegensatz zu denen von Nicht-Atopikern eine gesteigerte Expression von CD83 und eine T_H2 -Immunantwort nachgewiesen werden. Als Ursache konnte die Cysteinprotease-Aktivität des Der p 1 ermittelt werden (Hammad *et al.*, 2001). Da für Phl p 1 ebenfalls eine Cysteinprotease-Aktivität beschrieben wurde (Grobe *et al.*, 2002), ist für Phl p 1 bei Gräserpollenallergikern eine Reifung der DCs und T_H2 -Polarisation zu vermuten. Dagegen könnte bei den Nicht-Atopikern eine nicht ausgelöste Reifung der DCs durch die Allergene eine wichtige Rolle bei der Bildung von Toleranz spielen. Jonuleit *et al.* (2000) konnte zeigen, dass Antigen-beladene unreife DCs in den Lymphknoten eine Freisetzung von IL-10 verursachen und dadurch regulatorische T-Zellen aktiviert werden.

Zwischen Nicht-Atopikern und Atopikern sind weitere Unterschiede bei der Allergenaufnahme, Prozessierung und auch Präsentation zu erwarten. So konnte nur bei Allergikern eine erhöhte Expression des Mannose-Rezeptors nachgewiesen werden, was in einer erhöhten Aufnahme des Allergens Der p 1 resultierte (Deslée *et al.*, 2002). Eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen über den Mannose-Rezeptor führt zu einer bis zu 100-fach stärkeren Präsentation der Antigene und damit auch zu einer stärkeren Aktivierung der T-Zellen als eine Aufnahme über Makropinocytose (Engering *et al.*, 1997). Weiterhin wurden bei Atopikern in Genen, die mit allergischen Erkrankungen korrelieren, zahlreiche Polymorphismen identifiziert (Moffatt und Cookson, 1998). Diese Polymorphismen können bei den Atopikern eine veränderten Allergenaufnahme, -prozessierung und -präsentation verursachen. Dies kann letztendlich in einer verstärkten T_H2 -Polarisation der Immunantwort gegen die Allergene resultieren.

4.4. Bedeutung der Allergen-Prozessierung für die Therapie allergischer Erkrankungen: ein Ausblick

Die Prozessierung der Allergene entscheidet, welche Peptide des Allergens als T-Zellepitope über die MHC II-Komplexe der APCs präsentiert werden, und kann

die Polarisation der T_H-Zellen beeinflussen. Ob bei den Atopikern eine im Vergleich zu den Nicht-Atopikern veränderte Prozessierung der Allergene einen Einfluss auf die Polarisation der T_H-Zellen hat und eine Bildung von Toleranz unterstützt, ist noch unklar. Es konnte jedoch am Beispiel des Birkenpollen-Allergens Bet v 1 gezeigt werden, dass bei Nicht-Atopikern, die Bet v 1-spezifische IgG-Antikörper besitzen, die selben T_H-Zellepitope erkannt werden wie bei sensibilisierten Allergikern mit einer IgE-vermittelten Immunantwort (Ebner *et al.*, 1995). Aus einer Analyse der Mechanismen, die bei Nicht-Atopikern zur Bildung von Toleranz gegenüber den Allergenen führen, könnten neue Therapieansätze abgeleitet werden. Das Ziel einer solchen Therapie wäre eine Aktivierung von regulatorischen T_H-Zellen (T_R) oder auch eine Induktion von Anergie, was in beiden Fällen zu einer Hemmung der T_H2-vermittelten Immunreaktion führen würde. Eine Strategie zur Aktivierung von T_R-Zellen ist die Peptid-basierte Vakzinierung, bei der dem Patienten synthetische Peptide des Allergens aus 15 bis 20 Aminosäuren verabreicht werden (Larche, 2001). Am Beispiel des Katzenhaar-Allergens Fel d 1 konnte gezeigt werden, dass die Peptide bei sensibilisierten Patienten eine Hemmung der T_H1- und T_H2-Immunantwort und verstärkte Freisetzung von IL-10 verursachen (Oldfield *et al.*, 2002). Eine Entwicklung von Peptiden analog zur Prozessierung der Allergene bei den Nicht-Atopikern könnte bei den Atopikern zu einer gezielteren Induktion der Toleranz gegenüber den Allergenen führen.

Eine Voraussetzung für eine solche gezielte Therapie gegen spezifische Allergene ist jedoch eine Diagnostik, die das jeweilige Allergen-Profil des Patienten erfasst, wie z.B. die Komponenten-aufgelöste Diagnostik (Valenta *et al.*, 1999). Diese basiert auf der Verwendung von rekombinanten Allergenen, die gegenüber den herkömmlichen Allergenextrakten den Vorteil einer definierten Struktur besitzen und sich leichter standardisieren lassen (Chapman *et al.*, 2000). Hierzu müssen die rekombinanten Allergene jedoch die gleiche Struktur wie die natürlichen besitzen, damit bei der Diagnostik neben den sequenziellen und konformationellen auch die durch posttranslationale Modifikationen entstandenen IgE-bindenden Epitope erfasst werden können. Weiterhin müssen durch die rekombinanten Allergene alle IgE-Epitope erfasst werden, die aufgrund der hohen Variabilität innerhalb einer Allergengruppe durch die zahlreichen Isoformen auftreten können.

Dies setzt eine detaillierte Charakterisierung der Allergene voraus, wie sie in dieser Arbeit am Beispiel des Phl p 6 durchgeführt wurde.

Die exakte strukturelle Charakterisierung von Allergenen und die anschließende Bestimmung der IgE-bindenden Epitope ist weiterhin eine Voraussetzung, um eine gezielte Veränderung bzw. Mutation der Allergene durchzuführen, so dass die Allergenität vermindert werden kann. Diese sogenannten Hypoallergene lösen eine verminderte allergische Reaktion aus und können dadurch bei der zur Zeit am häufigsten angewendeten Therapie, der spezifischen Immuntherapie oder Hyposensibilisierung, höher dosiert werden. So kann die Allergenität der Extrakte durch ein Vernetzen der Proteine, z.B. mit Glutardialdehyd, herabgesetzt werden. Die so behandelten Allergenextrakte werden als Allergoide erfolgreich in der Therapie eingesetzt (Bousquet *et al.*, 1987). Da sie jedoch keine definierte Struktur besitzen und sich somit auch nicht standardisieren lassen, ist eine gezielte Mutation der IgE-bindenden Epitope von den Allergene ein weiterer vielversprechender Ansatz. Schramm *et al.* (1999) konnten zeigen, dass durch eine gezielte Mutationen der IgE-bindenden Epitope des Majorallergens Phl p 5b die IgE-Reaktivität vermindern werden konnte. Die T-Zell-Epitope wurden jedoch nicht verändert. Dadurch können die T-Zellen weiterhin aktiviert werden, jedoch kommt es zu keiner Aktivierung der IgE-produzierenden B-Zellen und keiner Mediatorfreisetzung bei den Mastzellen. Solche Mutationen machen eine Veränderung der Allergenstruktur mit dem Ziel möglich, die Polarisation der T_H-Zellen gezielt beeinflussen zu können. Dabei kann die Struktur der veränderten Allergene anhand der in dieser Arbeit zur Charakterisierung des Phl p 6 durchgeführten Methoden exakt ermittelt und mit den natürlichen Allergenen verglichen werden.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktionen zwischen Gräserpollenallergenen und den Grenzflächen des Respirationstraktes sowie den daraus resultierenden Prozessierungen der Allergene. Die Allergene treffen beim Einatmen zuerst auf das die Epithelien überziehende Sekret und kommen anschließend mit den Epithelzellen in Kontakt. Um eine Sensibilisierung auslösen zu können, müssen die Allergene diese Barriere überwinden und zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) im Interstitium gelangen. Auf diesen drei Ebenen, dem Sekret, den Epithelzellen und den APCs, wurden die Interaktionen und die Prozessierung der Allergene untersucht. Dabei standen besonders die Interaktionen bei Nicht-Atopikern im Vordergrund, da diese gegen die an sich harmlosen Proteine eine Toleranz zeigen. Als Modell für diese Untersuchungen wurde das Gruppe 6-Allergen des Lieschgrases *Phleum pratense* gewählt, das anhand von massenspektrometrischen Methoden detailliert charakterisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass nPhl p 6 zwei Isoformen besitzt, die sich in nur zwei Aminosäuren unterscheiden. Außerdem besitzt das nPhl p 6 noch N- und C-terminale Varianten, die auf zusätzliche Aminosäuren bzw. Deletionen zurückzuführen sind. Das wesentlich komplexere Gruppe 1-Allergen Phl p 1, für das zahlreiche Modifikationen beschrieben wurden, wurde zum Vergleich für die Untersuchung der Interaktionen und Prozessierung eingesetzt.

Auf der Ebene der Sekrete konnte keine Fragmentierung des nPhl p 6 nachgewiesen werden, so dass das nPhl p 6 intakt auf die Epithelzellen trifft. Auch für das wesentlich komplexer aufgebaute nPhl p 1 konnte in der überwiegenden Zahl der untersuchten Proben keine Fragmentierung durch BAL-Flüssigkeit gezeigt werden. Somit tritt auch das nPhl p 1 intakt mit den Epithelzellen in Kontakt. Dagegen konnte bei Patienten mit Atemwegsbeschwerden, die durch eine Neutrophilie verursacht wurden, eine Fragmentierung detektiert werden. Diese ist auf einen erhöhten Proteasegehalt im Sekret infolge der Infiltration von Neutrophilen und deren Degranulation zurückzuführen.

Eine Aufnahme der Allergene durch die Epithelzellen des Respirationstraktes konnte anhand der Durchflusszytometrie und der Konfokalen Laser-Scan-

Mikroskopie nachgewiesen werden. Dabei ist die Makropinocytose nicht wesentlich an der Aufnahme des nPhl p 6 beteiligt, was auf eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme hindeutet. Dagegen erfolgt die Aufnahme von nPhl p 1 unspezifisch über Makropinocytose. Beide Allergene konnten teilweise in den Lysosomen der Epithelzellen lokalisiert werden, so dass eine Prozessierung der Allergene wahrscheinlich ist. Dagegen deutet der relativ gering Anteil der Allergene in den Lysosomen sowie die über einen längeren Zeitraum gleichbleibende Aufnahmerate eher auf eine Transcytose in intakter Form ins Interstitium hin, wo sie von den APCs aufgenommen werden.

Die Dendritischen Zellen (DCs) zählen zu den effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass nPhl p 6 und nPhl p 1 von unreifen DCs, die aus den Monocyten von nicht-atopischen Spendern generiert wurden, wesentlich stärker aufgenommen wird als von reifen DCs. Beide Allergene werden über Makropinocytose aufgenommen, wobei eine Beteiligung des Mannose-Rezeptor selbst an der Aufnahme des glykosylierte nPhl p 1 ausgeschlossen werden konnte. Nur für nPhl p 1 konnte bei unreifen DCs eine leicht erhöhte Expression des Reifungsmarkers CD83 und damit eine Reifung der DCs festgestellt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen der Allergenaufnahme könnten eine zentrale Rolle bei der Sensibilisierung spielen.

6. Summary

The aim of this thesis is the investigation of the interactions between the grass pollen allergens and the surfaces of the respiratory tract, and the possible processing of the allergens on these surfaces. The allergens first come into contact with the secretions covering the epithelium and then finally with the epithelial cells. In order to cause a sensitisation, the allergens must cross the epithelial barrier and reach the interstitium. There, the allergens are internalised and processed by the antigen presenting cells (APCs). In this thesis, the interaction and processing of the allergens in the secretions, epithelial cells and the APCs was investigated. In particular the interactions in non-atopic individuals are of interest as they display a tolerance towards the allergens. For these investigations the group 6 allergen of timothy grass (*Phleum pratense*) was chosen as a model. The allergen was characterised in detail by mass spectrometric methods, where it could be shown, that the nPhl p 6 consists of two isoforms, that differ by two amino acids. Also a number of N- and C- terminal variations of the nPhl p 6 could be detected, which are the result of amino acid insertions or deletions. In order to have a standard with which to compare and contrast the results of the nPhl p 6 studies, the more complex group 1 allergen Phl p 1 for which many modifications have been described was utilised.

A processing of the nPhl p 6 by the secretions could not be shown, indicating that the nPhl p 6 comes into contact with the epithelial cells in an intact state, as does the majority of the nPhl p 1. It could also be shown that the BAL-fluids of patients with respiratory tract disorders degrades the more complex nPhl p 1. This is however, only in the case of secretions from patients displaying a neutrophilia, where the infiltration and degranulation of the neutrophiles results in an increased protease content of the secretion.

At the level of the epithelial cells the uptake of the allergens was analysed by flow cytometry and confocal microscopy. Macropinocytosis was not involved in the uptake of nPhl p 6, suggesting a receptor mediated mechanism. In contrast nPhl p 1 is non-specifically absorbed via macropinocytosis. The processing of the allergens by the epithelial cells is probable, since a small percentage of both

allergens are localised in lysosomes. However, there is evidence that the majority of the allergens in the epithelial cells remains intact, and is transferred via transcytosis into the interstitium, where they are taken up by the APCs.

As the dendritic cells (DCs) are the most effective antigen presenting cells, the allergen uptake by DCs of non-atopic individuals was also investigated. It could be shown that the uptake of nPhl p 6 and nPhl p 1 by monocyte derived immature DCs was significantly greater than for mature DCs. The uptake of both nPhl p 6 and nPhl p 1 in this case is non-specific and occurs via macropinocytosis. An involvement of the mannose receptor even in the case of the glycosylated nPhl p 1 was not observed. The allergen nPhl p 1 induces a small increase in the expression of the maturation marker CD83, whereas nPhl p 6 induces no maturation of DCs. The mechanism of allergen uptake by DCs investigated in this thesis may play a key role in the sensitisation towards allergens.

7. Literaturverzeichnis

- Andersson, K. und Lidholm, J.** (2003). Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130: 87-107.
- Bacharier, L. B., Jabara, H., und Geha, R. S.** (1998). Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 115: 257-269.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F., und Saeland, S.** (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu.Rev.Immunol.* 12: 881-922.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., und Palucka, K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18: 767-811.
- Belardelli, F.** (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS.* 103: 161-179.
- Boat, T. F. und Cheng, P. W.** (1980). Biochemistry of airway mucus secretions. *Fed.Proc.* 39: 3067-3074.
- Bousquet, J., Hejjaoui, A., Skassa-Brociek, W., Guerin, B., Maasch, H. J., Dhivert, H., und Michel, F. B.** (1987). Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *J.Allergy Clin.Immunol.* 80: 591-598.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
- Buentke, E., Zargari, A., Heffler, L. C., Avila-Carino, J., Savolainen, J., und Scheynius, A.** (2000). Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a+ dendritic cells. *Clin.Exp.Allergy.* 30: 1759-1770.
- Bufe, A., Gehlhar, K., Schramm, G., Schlaak, M., und Becker, W. M.** (1998). Allergenic activity of a major grass pollen allergen is elevated in the presence of nasal secretion. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157: 1269-1276.
- Burney, P., Malmberg, E., Chinn, S., Jarvis, D., Luczynska, C., und Lai, E.** (1997). The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J.Allergy Clin.Immunol.* 99: 314-322.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., und Lanzavecchia, A.** (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 388: 782-787.

- Chapman, M. D. und Platts-Mills, T. A.** (1980). Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J.Immunol.* 125: 587-592.
- Chapman, M. D., Smith, A. M., Vailes, L. D., Arruda, L. K., Dhanaraj, V., und Pomes, A.** (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 106: 409-418.
- Clark, E. A. und Ledbetter, J. A.** (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature.* 367: 425-428.
- Coca, A. F. und Cooke, R. A.** (1923). On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness. *J Immunol.* 8: 163-182.
- Coombs, R. R. A. und Gell, P. G. H.** (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In: "Clinical aspects of immunology". 2. Auflage. Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A. (eds.). Blackwell. Oxford, UK.
- Cosgrove, D. J.** (1997). Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 5504-5505.
- Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., und Weibel, E. R.** (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 126: 332-337.
- D'Amato, G., Spieksma, F. T., Liccardi, G., Jager, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wüthrich, B., und Bonini, S.** (1998). Pollen-related allergy in Europe. *Allergy.* 53: 567-578.
- de Vries, J. E.** (1998). The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J.Allergy Clin.Immunol.* 102: 165-169.
- Deslée, G., Charbonnier, A. S., Hammad, H., Angyalosi, G., Tillie-Leblond, I., Mantovani, A., Tonnel, A. B., und Pestel, J.** (2002). Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110: 763-770.
- Driessen, M. N. und Quanjer, P. H.** (1991). Pollen deposition in intrathoracic airways. *Eur.Respir.J.* 4: 359-363.
- Ebner, C., Schenk, S., Najafian, N., Siemann, U., Steiner, R., Fischer, G. W., Hoffmann, K., Szeffalusi, Z., Scheiner, O., und Kraft, D.** (1995). Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J.Immunol.* 154: 1932-1940.
- Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., und Pieters, J.** (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27: 2417-2425.

- Epstein, M. M.** (2004). Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int.Arch.Allergy Immunol.* 133: 84-100.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., und Guyre, P. M.** (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J.Immunol.* 157: 541-548.
- Freidhoff, L. R., Ehrlich-Kautzky, E., Grant, J. H., Meyers, D. A., und Marsh, D. G.** (1986). A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. *J.Allergy Clin.Immunol.* 78: 1190-1201.
- Fuchs, S., Gumbleton, M., Schäfer, U. F., und Lehr, C. M.** (2002). Models of the alveolar epithelium. In: "Cell culture models of biological barriers". Lehr, C. M. (eds.). Taylor & Francis. London.
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J., und Steinman, R. M.** (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J.Exp.Med.* 199: 1607-1618.
- Galli, S. J.** (2000). Mast cells and basophils. *Curr.Opin.Hematol.* 7: 32-39.
- Gallucci, S. und Matzinger, P.** (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr.Opin.Immunol.* 13: 114-119.
- Garnier, J., Gibrat, J. F., und Robson, B.** (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 266: 540-553.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* 182: 319-326.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S., Weser, J., Strahler, J. R., Hanash, S. M., Somerlot, L., und Kuick, R.** (1988). Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations. *Electrophoresis.* 9: 37-46.
- Grobe, K., Becker, W. M., Schlaak, M., und Petersen, A.** (1999). Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur.J.Biochem.* 263: 33-40.
- Grobe, K., Pöppelmann, M., Becker, W. M., und Petersen, A.** (2002). Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur.J.Biochem.* 269: 2083-2092.
- Hammad, H., Charbonnier, A. S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G. A., Tonnel, A. B., und Pestel, J.** (2001). Th2 polarization by Der p 1-pulsed

- monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood*. 98: 1135-1141.
- Hancock, K. und Tsang, V. C.** (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal.Biochem*. 133: 157-162.
- Hassim, Z., Maronese, S. E., und Kumar, R. K.** (1998). Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. *Thorax*. 53: 368-371.
- Hastings, R. H., Folkesson, H. G., und Matthay, M. A.** (2004). Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*. 286: L679-L689.
- Hawrylowicz, C. M. und O'Garra, A.** (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat.Rev.Immunol*. 5: 271-283.
- Heath, W. R. und Carbone, F. R.** (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol*. 19: 47-64.
- Hegedus, T. J., Falzon, M., Margaretten, N., Gazdar, A. F., und Schuller, H. M.** (1987). Inhibition of N-diethylnitrosamine metabolism by human lung cancer cell lines with features of well differentiated pulmonary endocrine cells. *Biochem.Pharmacol*. 36: 3339-3343.
- Heinrich, J., Richter, K., Frye, C., Meyer, I., Wolke, G., Wjst, M., Nowak, D., Magnussen, H., und Wichmann, H. E.** (2002). European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS). *Pneumologie*. 56: 297-303.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*. 9: 28-32.
- Hiemstra, P. S., van Wetering, S., und Stolk, J.** (1998). Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur.Respir.J*. 12: 1200-1208.
- Hitchen, P. G., Mullin, N. P., und Taylor, M. E.** (1998). Orientation of sugars bound to the principal C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. *Biochem.J*. 333 (Pt 3): 601-608.
- Hoehne, J. H. und Reed, C. E.** (1971). Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J.Allergy Clin.Immunol*. 48: 36-39.
- Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A., Phillips, M. J., und McMenamin, P. G.** (1989). Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. *Clin.Exp.Allergy*. 19: 597-601.
- ISAAC Steering Committee.** (1998). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 351: 1225-1232.

- Jeffery, P. K. und Li, D.** (1997). Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur.Respir.J.* 10: 1655-1662.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., und Nussenzweig, M. C.** (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 375: 151-155.
- Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., Van Cauwenberge, P., Hage-Hamsten, M., und Wüthrich, B.** (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 56: 813-824.
- John, T. A., Vogel, S. M., Minshall, R. D., Ridge, K., Tiruppathi, C., und Malik, A. B.** (2001). Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung. *J.Physiol.* 533: 547-559.
- Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D., und Holborow, E. J.** (1982). Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J.Immunol.Methods.* 55: 231-242.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., und Enk, A. H.** (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 192: 1213-1222.
- Kalb, T. H., Chuang, M. T., Marom, Z., und Mayer, L.** (1991). Evidence for accessory cell function by class II MHC antigen-expressing airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 4: 320-329.
- Kim, K. J. und Malik, A. B.** (2003). Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 284: L247-L259.
- Kim, K. J., Matsukawa, Y., Yamahara, H., Kalra, V. K., Lee, V. H., und Crandall, E. D.** (2003). Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 284: L458-L465.
- Kinet, J. P.** (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu.Rev.Immunol.* 17: 931-972.
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., und Thomas, W.** (1995). Allergen nomenclature. *Allergy.* 50: 765-774.
- 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: 246-251.

-
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods.* 10: 203-209.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lambrecht, B. N.** (2001). Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 1: 51-59.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., und Sallusto, F.** (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1: 311-316.
- Larche, M.** (2001). Inhibition of human T-cell responses by allergen peptides. *Immunology.* 104: 377-382.
- Le Gros, G., Ben Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D., und Paul, W. E.** (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J.Exp.Med.* 172: 921-929.
- Leary, J. J., Brigati, D. J., und Ward, D. C.** (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80: 4045-4049.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., und Steinkasserer, A.** (2002). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 129: 113-118.
- Lee, W. L. und Downey, G. P.** (2001). Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164: 896-904.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., und Bluestone, J. A.** (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14: 233-258.
- Levine, T. P. und Chain, B. M.** (1992). Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 8342-8346.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., und Todaro, G.** (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int.J.Cancer.* 17: 62-70.
- Liu, Y. J.** (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 106: 259-262.
- Locksley, R. M.** (1994). Th2 cells: help for helminths. *J.Exp.Med.* 179: 1405-1407.
- Lopez-Vidriero, M. T.** (1989). Mucus as a natural barrier. *Respiration.* 55 Suppl 1: 28-32.

- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., und Romagnani, S.** (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J.Exp.Med.* 177: 1199-1204.
- Massey, W. A.** (1993). Pathogenesis and pharmacologic modulation of the cutaneous late-phase reaction. *Ann.Allergy.* 71: 578-584.
- Matsukawa, Y., Yamahara, H., Lee, V. H., Crandall, E. D., und Kim, K. J.** (1996). Horseradish peroxidase transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm.Res.* 13: 1331-1335.
- Mellman, I. und Steinman, R. M.** (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106: 255-258.
- Metcalf, D. D., Baram, D., und Mekori, Y. A.** (1997). Mast cells. *Physiol Rev.* 77: 1033-1079.
- Metzger, H.** (1992). The receptor with high affinity for IgE. *Immunol.Rev.* 125: 37-48.
- Mezzetti, M., Soloperto, M., Fasoli, A., und Mattoli, S.** (1991). Human bronchial epithelial cells modulate CD3 and mitogen-induced DNA synthesis in T cells but function poorly as antigen-presenting cells compared to pulmonary macrophages. *J.Allergy Clin.Immunol.* 87: 930-938.
- Miranda, A. F., Godman, G. C., und Tanenbaum, S. W.** (1974). Action of cytochalasin D on cells of established lines. II. Cortex and microfilaments. *J.Cell Biol.* 62: 406-423.
- Moffatt, M. F. und Cookson, W. O.** (1998). Gene identification in asthma and allergy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 116: 247-252.
- Mosmann, T. R. und Coffman, R. L.** (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7: 145-173.
- Noirey, N., Rougier, N., Andre, C., Schmitt, D., und Vincent, C.** (2000). Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105: 1194-1201.
- O'Neill, H. C. und Wilson, H. L.** (2004). Limitations with in vitro production of dendritic cells using cytokines. *J.Leukoc.Biol.* 75: 600-603.
- Oei, E., Kalb, T., Beuria, P., Allez, M., Nakazawa, A., Azuma, M., Timony, M., Stuart, Z., Chen, H., und Sperber, K.** (2004). Accessory cell function of airway epithelial cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 287: L318-L331.

- Oldfield, W. L., Larche, M., und Kay, A. B.** (2002). Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised controlled trial. *Lancet*. 360: 47-53.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M. P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A. A., und Romagnani, S.** (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 4538-4542.
- Petersen, A., Becker, W. M., und Schlaak, M.** (1993). Characterization of grass group I allergens in timothy grass pollen. *J.Allergy Clin.Immunol.* 92: 789-796.
- Petersen, A., Bufe, A., Schlaak, M., und Becker, W. M.** (1995a). Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). I. Immunological and biochemical studies. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 108: 49-54.
- Petersen, A., Bufe, A., Schramm, G., Schlaak, M., und Becker, W. M.** (1995b). Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 108: 55-59.
- Petersen, A., Schramm, G., Bufe, A., Schlaak, M., und Becker, W. M.** (1995c). Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary DNA and protein level. *J.Allergy Clin.Immunol.* 95: 987-994.
- Petersen, A., Schramm, G., Schlaak, M., und Becker, W. M.** (1998). Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. *Clin.Exp.Allergy.* 28: 315-321.
- Pichavant, M., Charbonnier, A. S., Taront, S., Bricchet, A., Wallaert, B., Pestel, J., Tonnel, A. B., und Gosset, P.** (2005). Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115: 771-778.
- Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., und Mellman, I.** (1997a). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature.* 388: 787-792.
- Pierre, P., Turley, S. J., Meltzer, J., Mirza, A., Steinman, R., und Mellman, I.** (1997b). Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 417: 179-182.
- Racoosin, E. L. und Swanson, J. A.** (1989). Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J.Exp.Med.* 170: 1635-1648.
- Randolph, G. J., Angeli, V., und Swartz, M. A.** (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 5: 617-628.

-
- Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Gray, W. R., Gray, B. H., und Hoidal, J. R.** (1991). Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J.Biol.Chem.* 266: 9540-9548.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., und Ricciardi-Castagnoli, P.** (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J.Exp.Med.* 188: 2175-2180.
- Ring, J., Kramer, U., Schäfer, T., und Behrendt, H.** (2001). Why are allergies increasing? *Curr.Opin.Immunol.* 13: 701-708.
- Roitt, I. M., Brostoff, J., und Male, D. K.** (2001). Immunology. 6. Auflage. Mosby-Wolfe. London.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., und Schuler, G.** (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J.Immunol.Methods.* 196: 137-151.
- Ryan, R. M., Morris, R. E., Rice, W. R., Ciruolo, G., und Whitsett, J. A.** (1989). Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J.Histochem.Cytochem.* 37: 429-440.
- Salik, E., Tyorkin, M., Mohan, S., George, I., Becker, K., Oei, E., Kalb, T., und Sperber, K.** (1999). Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 21: 365-379.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., und Lanzavecchia, A.** (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182: 389-400.
- Sallusto, F. und Lanzavecchia, A.** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179: 1109-1118.
- Schägger, H. und 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: 368-379.
- Schäppi, G. F., Suphioglu, C., Taylor, P. E., und Knox, R. B.** (1997). Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *J.Allergy Clin.Immunol.* 100: 656-661.
- Schneider, S. C. und Sercarz, E. E.** (1997). Antigen processing differences among APC. *Hum.Immunol.* 54: 148-158.

- Schon-Hegrad, M. A., Oliver, J., McMenamin, P. G., und Holt, P. G.** (1991). Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J.Exp.Med.* 173: 1345-1356.
- Schramm, G., Kahlert, H., Suck, R., Weber, B., Stüwe, H. T., Müller, W. D., Bufe, A., Becker, W. M., Schlaak, M. W., Jäger, L., Cromwell, O., und Fiebig, H.** (1999). "Allergen engineering": variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J.Immunol.* 162: 2406-2414.
- Selak, M. A., Chignard, M., und Smith, J. B.** (1988). Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem.J.* 251: 293-299.
- Stahl, P. und Schwartz, A. L.** (1986). Receptor-mediated endocytosis. *J.Clin.Invest.* 77: 657-662.
- Steinman, R. M., Pack, M., und Inaba, K.** (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol.Rev.* 156: 25-37.
- Strobl, H., Riedl, E., Bello-Fernandez, C., und Knapp, W.** (1998). Epidermal Langerhans cell development and differentiation. *Immunobiology.* 198: 588-605.
- Suck, R., Hagen, S., Cromwell, O., und Fiebig, H.** (1999). Rapid and efficient purification of Phleum pratense major allergens Phl p 1 and group Phl p 2/3 using a two-step procedure. *J.Immunol.Methods.* 229: 73-80.
- Suck, R., Weber, B., Schaffer, B., Diedrich, E., Kamionka, T., Fiebig, H., und Cromwell, O.** (2003). Purification strategy for recombinant Phl p 6 is applicable to the natural allergen and yields biochemically and immunologically comparable preparations. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 787: 357-368.
- Susi, H., Timasheff, S. N., und Stevens, L.** (1967). Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. I. The amide I band in H₂O and D₂O solutions. *J.Biol.Chem.* 242: 5460-5466.
- Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G., und Sarfati, M.** (2000). Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J.Exp.Med.* 192: 405-412.
- Taylor, P. E., Flagan, R. C., Valenta, R., und Glovsky, M. M.** (2002). Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109: 51-56.
- Thomas, W. R., Smith, W. A., Hales, B. J., Mills, K. L., und O'Brien, R. M.** (2002). Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 129: 1-18.

- Tomee, J. F., van Weissenbruch, R., de Monchy, J. G., und Kauffman, H. F.** (1998). Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J.Allergy Clin.Immunol.* 102: 75-85.
- Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., und Mellman, I.** (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 299: 1400-1403.
- Trombetta, E. S. und Mellman, I.** (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 23: 975-1028.
- Tuma, P. L. und Hubbard, A. L.** (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* 83: 871-932.
- Turner, H. und Kinet, J. P.** (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* 402: B24-B30.
- Untersmayr, E., Scholl, I., Swoboda, I., Beil, W. J., Forster-Waldl, E., Walter, F., Riemer, A., Kraml, G., Kinaciyan, T., Spitzauer, S., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., und Jensen-Jarolim, E.** (2003). Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112: 616-623.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D., und Gronlund, H.** (1999). The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin.Exp.Allergy.* 29: 896-904.
- van Kooten, C. und Banchereau, J.** (2000). CD40-CD40 ligand. *J.Leukoc.Biol.* 67: 2-17.
- van Ree, R.** (2002). Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 129: 189-197.
- Van Voorhis, W. C., Hair, L. S., Steinman, R. M., und Kaplan, G.** (1982). Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J.Exp.Med.* 155: 1172-1187.
- von Pirquet, C.** (1906). Allergie. *Munch Med Wschr.* 30: 1457-1458.
- Vrtala, S., Fischer, S., Grote, M., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W. R., Valent, P., Reichelt, R., Kraft, D., und Valenta, R.** (1999). Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J.Immunol.* 163: 5489-5496.
- Vrtala, S., Grote, M., Duchene, M., van Ree, R., Kraft, D., Scheiner, O., und Valenta, R.** (1993). Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 102: 160-169.

- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Stewart, G. A., Thompson, P. J., Gruenert, D. C., Cannell, M. B., Garrod, D. R., und Robinson, C.** (2000). Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-. *Eur.Respir.J.* 15: 1058-1068.
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovey, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B., und Robinson, C.** (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J.Clin.Invest.* 104: 123-133.
- West, M. A., Bretscher, M. S., und Watts, C.** (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J.Cell Biol.* 109: 2731-2739.
- Wicklein, D., Lindner, B., Moll, H., Kolarich, D., Altmann, F., Becker, W. M., und Petersen, A.** (2004). Carbohydrate moieties can induce mediator release: a detailed characterization of two major timothy grass pollen allergens. *Biol.Chem.* 385: 397-407.
- Wierenga, E. A., Snoek, M., de Groot, C., Chretien, I., Bos, J. D., Jansen, H. M., und Kapsenberg, M. L.** (1990). Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J.Immunol.* 144: 4651-4656.
- Williams, C. M. und Galli, S. J.** (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105: 847-859.
- Wilson, A. F., Novey, H. S., Berke, R. A., und Surprenant, E. L.** (1973). Deposition of inhaled pollen and pollen extract in human airways. *N.Engl.J.Med.* 288: 1056-1058.
- Zhou, L. J. und Tedder, T. F.** (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 2588-2592.

8. Anhang

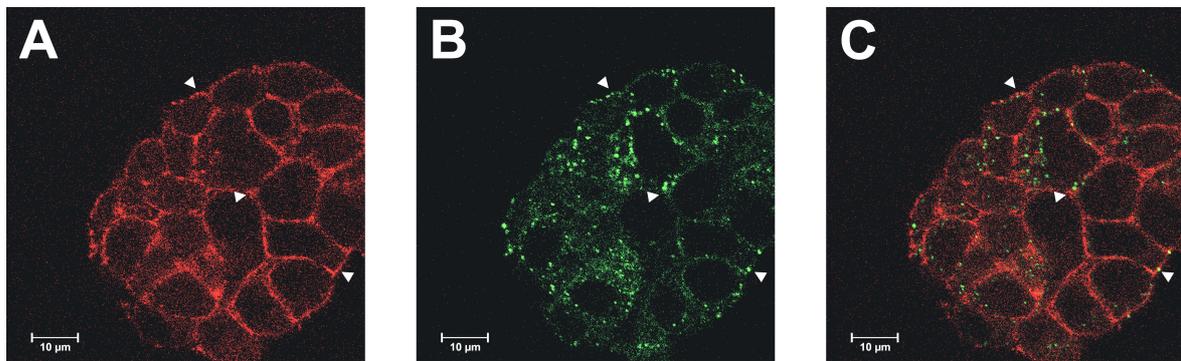


Abb. 27: Nachweis von nPhl p 6-FITC in NCI-H727-Zellen und Markierung der Membran über CD29. **A:** Fluoreszenzsignal zur Detektion der anti-CD29-Antikörper. **B:** Nachweis der Fluoreszenz von nPhl p 6-FITC. **C:** Überlagerung des Nachweises der anti-CD29- und FITC-Fluoreszenz. Eine gelbe Färbung zeigt eine Kolokalisation an, die z.T. durch weiße Pfeile gekennzeichnet ist.

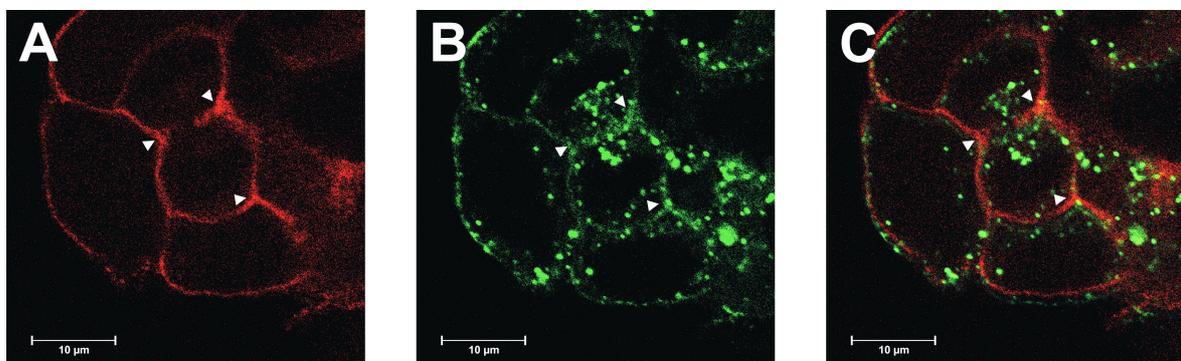


Abb. 28: Intrazelluläre Lokalisation von nPhl p 1-Alexa488 in NCI-H727-Zellen. Nach einer Inkubation von 2 h mit nPhl p 1-Alexa488 wurden die Zellen mit einem CD29-spezifischen Antikörper gefärbt und mit dem Kofokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert. **A:** Fluoreszenzsignal zum Nachweis des anti-CD29-Antikörpers. **B:** Detektion der Alexa488-Fluoreszenz des nPhl p 1. **C:** Überlagerung der anti-CD29-Fluoreszenz mit der Alexa488-Fluoreszenz. Eine gelbe Färbung zeigt eine Kolokalisation an, die z.T. durch weiße Pfeilspitzen markiert ist.

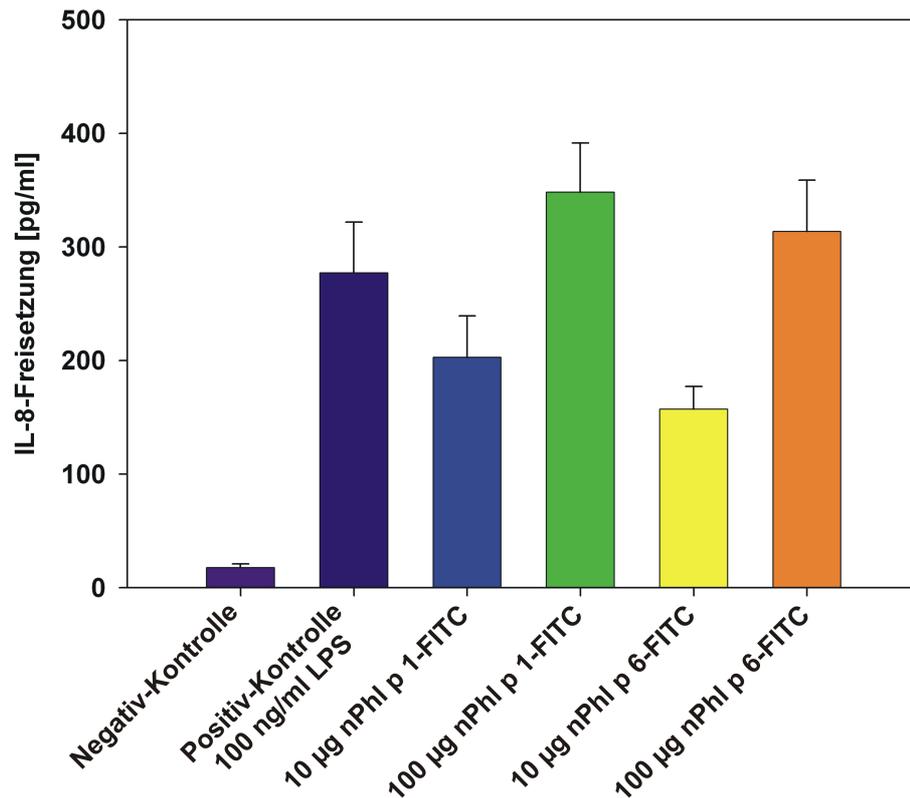


Abb. 29: Bestimmung des LPS-Gehaltes anhand der Freisetzung von IL-8 durch HEK293-Zellen, die mit TLR-4, MD2 und CD14 transfiziert wurden. Das LPS bindet vermittelt über CD14 und MD2 an den TLR-4, wodurch über die cytoplasmatische Region des TLR-4 eine Signaltransduktionskaskade zur IL-8-Freisetzung aktiviert wird. Die IL-8-Freisetzung der transfizierten HEK293-Zellen, die durch die FITC-markierten Allergene nPhl p 1 und nPhl p 6 induziert wurde, weist zwischen den beiden Allergenen keinen signifikanten Unterschied auf. Dies bedeutet, dass im LPS-Gehalt der Allergene ebenfalls kein signifikanter Unterschied besteht.

9. Veröffentlichungen

9.1. Originalarbeiten

Blume,C.; Lindner,B.; Becker,W.M.; Petersen,A. (2004). Microheterogeneity of the major grass group 6 allergen Phl p 6: Analysis by mass spectrometry. *Proteomics*. 4(5):1366-71.

9.2. Abstrakts

Blume, C., Lindner, B., Becker, W.M., Petersen, A. (2003). Investigations into the processing of Phl p 6, a major grass allergen on the mucosal interface. "Proteomic Forum München 2003" Programm und Abstrakts: 206

Blume, C., Lindner, B., Becker, W.M., Petersen, A. (2004). Untersuchungen zur Prozessierung von Gräserpollenallergenen an den Grenzflächen. *Allergo Journal*. 13: 33

Blume, C., Lindner, B., Becker, W.M., Petersen, A. (2004). Prozessierung von Gräserpollenallergenen an Grenzflächen. *Allergo Journal*. 13: S28

Blume, C., Förster, S., Becker, W.M., Behrendt, H., Petersen, A., Traidl-Hoffmann, C. (2005). Prozessierung und Präsentation von Allergenen durch Dendritische Zellen. *Allergo Journal*. 14: 33

Blume, C., Förster, S., Seitzer, U., Becker, W.M., Behrendt, H., Traidl-Hoffmann, C., Petersen, A. (2005). Processing and presentation of grass pollen allergens. *Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org.*, Suppl.No. 1: 471

Blume, C., Förster, S., Becker, W.M., Behrendt, H., Petersen, A., Traidl-Hoffmann, C. (2005). Uptake of grass pollen allergens by dendritic cells. *Immunobiology*, 210 (6-8): 573-574

Petersen, A., Blume, C., Grobe, K., Albrecht, D., Röschmann, K., Ulmer, A.J., Becker, W.M. (2005). Interaction of grass pollen allergens with the innate immune system. *Immunobiology*, 210 (6-8): 570

9.3. Vorträge

Prozessierung von Gräserpollen-Allergenen an den Grenzflächen; Charakterisierung der Allergene an Hand massenspektrometrischer Methoden.

Seminar am Zentrum Allergie und Umwelt, München, 3. März 2004

Untersuchungen zur Prozessierung von Gräserpollenallergenen an den Grenzflächen.

16. Mainzer Allergie Workshop, Mainz; 12.-14. März 2004

Prozessierung von Gräserpollenallergenen an Grenzflächen.

Allergie-Kongress 2004 [23. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAI); 7. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA); 28. Kongress des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA)], Aachen; 15.-19. September 2004

Prozessierung und Präsentation von Allergenen durch Dendritische Zellen.

17. Mainzer Allergie Workshop, Mainz; 11.-12. März 2005

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Cornelia Blume
Geburtsdatum 15.04.1978
Geburtsort Hamburg

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule in Hamburg
1988 – 1997 Charlotte-Paulsen-Gymnasium in Hamburg,
Abitur im Juni 1997

Hochschulbildung

10/1997 – 6/2002 Studium der Biologie an der Universität Hamburg
Hauptfach Zoologie
Nebenfächer Biochemie und Angewandte Botanik
Diplomarbeit am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
Thema: Untersuchungen zur Regulation der intrazellulären
Verteilung des „Regulators of G protein signaling“ (RGS) 16-
Proteins durch die cGMP-abhängige Kinase I α
Abschluss Diplom-Biologin

01/2003 Promotion am Forschungszentrum Borstel
Abteilung Klinische Medizin
Laborgruppe Klinische und Molekulare Allergologie
Thema: Untersuchungen zur Prozessierung von
Gräserpollenallergenen an den Grenzflächen des
Respirationstraktes
Assoziiert mit dem GRK288 „Strukturen und Mediatoren der
Zellinteraktion“

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Arnd Petersen für die Überlassung dieses spannenden Themas. Seine hilfreiche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre waren eine große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Laborgruppenleiter Dr. Wolf-Meinhard Becker möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Laborgruppe danken. Weiterhin möchte ich ihm für seine Unterstützung danken, die eine Durchführung von Teilen dieser Arbeit am Zentrum Allergie und Umwelt in München sowie die Präsentation meiner Daten auf zahlreichen Kongressen ermöglichte.

Prof. Dr. Peter Zabel danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie durchführen zu können.

Prof. Dr. Thomas Peters danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Claudia Traidl-Hoffmann vom Zentrum Allergie und Umwelt in München für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie die tatkräftige Unterstützung, stete Diskussionsbereitschaft und die Vermittlung der Methoden zur Generierung von DCs. Vor allem möchte ich ihr für die aufmunternden Gespräche danke.

Prof. Dr. Heidrun Behrendt danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung von Teilen dieser Arbeit und der freundlichen Aufnahme am Zentrum Allergie und Umwelt in München.

PD Dr. Buko Lindner danke ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Analysen sowie für die Diskussionsbereitschaft und für die hilfreichen Anregungen.

Mein großer Dank gilt PD Dr. Ulrike Seitzer für die Unterstützung bei der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie und die anregenden Diskussionen.

Prof. Dr. Klaus Brandenburg und Herrn Gerold von Busse möchte ich für die Unterstützung bei der IR-FT-Spektroskopie danken.

Prof. Dr. Holger Notbohm von der Universität zu Lübeck danke ich für die Durchführung der CD-Spektroskopie.

Für die Bestimmung des LPS-Gehaltes danke ich Suhad Al-Badri.

Den Mitarbeitern der Laborgruppe Klinische und Molekulare Allergologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders den technischen Mitarbeitern Marisa Böttger, Dany Warneke und Evelyn Knaak danke ich für den regen Erfahrungsaustausch und die Hilfe beim Erlernen zahlreicher Methoden.

Ebenso möchte ich den Mitarbeitern des Zentrums Allergie und Umwelt und besonders Stefanie Förster für die freundliche und fröhliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei Erlernen der Methoden zur Generierung der DCs danken.

Ganz großen Dank richte ich an meine Familie und meine Freunde für das Vertrauen und die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.