



FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Vakgroep Biochemie, Fysiologie en Microbiologie
Laboratorium voor Zoöfysiologie

Het gif van honingbijen (*Apis mellifera* L.): van
proteoomanalyse tot recombinant productie van potentiële
allergenen

The venom of honeybees (*Apis mellifera* L.): from proteomics to
recombinant production of potential allergens

Nico Peiren

Promotor: Prof. Dr. F. J. Jacobs
Co-promotor: Dr. D. C. de Graaf

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de graad van
Doctor in de wetenschappen (Biochemie)
Academiejaar 2006-2007

Voorwoord

Het ei is gelegd. De volhouder wint. Mijn assistentschap begon in november 1998. Tijdens de beginperiode was er van wetenschappelijk onderzoek weinig sprake, want een ecooloog moest fysioloog worden, nieuwe practica moesten ontwikkeld worden, een nieuwe structuur binnen het labo vergde een aanpassing en het werken op twee locaties vormden een serieuze beproeving. Het duurde een tijd voor de trein op de sporen was gezet en het station gebouwd was. De trein evolueerde van een stoomtreintje over een dieseltrein tot een elektrisch model. Het onderzoek nam een andere wending door een aantal nieuwe toestellen op het labo. Een tweede versnelling kwam er door het toenemen van de kritische massa in de Ledeganckstraat en de samenwerking met andere labo's. Het proefschrift omvat de noeste arbeid van de laatste vier jaar. Zonder een aantal personen zou dit niet gerealiseerd kunnen zijn. Daarom wil ik een aantal mensen en groepen bedanken.

Prof. Dr. Frans Jacobs, mijn promotor, voor de kans die hij mij gegeven heeft om zijn assistent te worden en de suggestie om bijengif te onderzoeken. Voor het geven van de grote vrijheid in de keuzes die ik maakte.

Dr. Dirk de Graaf, mijn co-promotor, voor zijn niet aflatend enthousiasme en gedrevenheid, zijn sturing en hulp tijdens dit onderzoek. Hij was als een grote broer voor mij die maakte dat ik niet verdwaalde in de veelheid van informatie die op ons afkwam en de juiste keuzes maakte.

Rita voor de technische assistentie en de aangename tijd tijdens de practica.

Eddy, mijn enige kompaan in het begin in de Ledeganckstraat, voor het aangename gezelschap, het ontwikkelen, verbeteren en herstellen van sommige toestellen.

De mensen van de Sterre. Bernadette voor de administratieve ondersteuning. Haro voor het altijd paraat staan als er bijen moesten gevangen worden. De andere personen op het Informatiecentrum voor bijenteelt die me geholpen hebben waar ze konden.

De collega's van de Ledeganckstraat die de laatste 3 jaar het labo vervoegd hebben, Bieke 1, Bieke 2, Marleen en Yves. Voor hun hulp tijdens het doctoraat en de discussies.

Prof. Dr. Em. Paul De Rycke voor onderhoudende babbels en de ontwikkeling van onze website.

De collega's van de microbiologie die de eerste 5 jaar mij burens waren. Jullie hebben mij altijd bijgestaan als ik problemen kende. Voor het ter beschikking stellen van jullie infrastructuur. Paul voor het aanbrengen van bruikbare afdankertjes uit de Ledeganckstraat en de gesprekken wanneer nog maar weinig lichtjes brandden in het gebouw.

De mensen van de glycobiologie voor het oplossen van onze problemen over hun vakgebied.

Het labo voor eiwitbiochemie en eiwitengineering onder leiding van Prof. Dr. J. Van Beeumen en Prof. Dr. B. Devreese voor de leerrijke samenwerking. Frank, Kjell, Elke en Griet voor het onthullen van de geheimen van de proteïnen identificatie.

De onderzoeksgroep immunologie, allergologie en reumatologie van Prof. Dr. W. Stevens en Prof. Dr. D. Ebo, in Antwerpen, die ons onderdompelden in de allergologie.

Dr. J. Evans, United States departement of agriculture, Bee Research Laboratory, Beltsville, VSA, voor het van dichtbij kennis laten maken met het bijengenoemproject.

De leden van de lees- en examencommissie. Prof. Dr. B. Devreese (Voorzitter), Prof. Dr. R. Moritz (Halle, Duitsland), Prof. Dr. Ir. L. Tirry (UG), Prof. Dr. G. Brusselle (UG), Prof. Dr. W. Stevens (UA), Prof. Dr. P. Vandenabeele (UG), Prof. Dr. Em. J. Van Beeumen (UG), Prof. Dr. J. Vanfleteren (UG).

Mijn schoonvader voor de filosofische gesprekken en het nalezen van de scriptie.

Mijn ouders voor het onvoorwaardelijk steunen bij alle levenskeuzes die ik gemaakt heb.

Mijn vrouw voor haar niet aflatende steun, het begrip voor het late thuiskomen en het geven van vertrouwen. Zoals jou is er maar één.

2006 was een vruchtbaar jaar.

Nico Peiren

Inhoudstafel

HOOFDSTUK I: INLEIDING, DOELSTELLING EN KORTE INHOUD	1
<i>A. Inleiding en doelstelling.....</i>	<i>3</i>
<i>B. Korte inhoud</i>	<i>5</i>
HOOFDSTUK II: LITERATUUROVERZICHT.....	9
II.1 DE HONINGBIJ (<i>APIS MELLIFERA</i> L.)	11
<i>A. Biologie van de honingbij</i>	<i>13</i>
<i>B. Taxonomie.....</i>	<i>14</i>
II.2 HET BIJENGENOOM	17
II.3 HET ANGELAPPARAAT, DE GIFKLIEREN EN HET GIFRESERVOIR	23
<i>A. Inleiding</i>	<i>25</i>
<i>B. Het angelapparaat</i>	<i>25</i>
<i>C. De steekrespons</i>	<i>27</i>
<i>D. De gifklier en het gifreservoir.....</i>	<i>27</i>
II.4 DE BIJENGIFCOMPONENTEN.....	31
<i>A. Inleiding</i>	<i>33</i>
<i>B. Proteïnen.....</i>	<i>34</i>
<i>C. Peptide componenten.....</i>	<i>46</i>
II.5 ALLERGIE VEROOorzaakt DOOR BIJENSTEKEN	67
<i>A. De bijensteek en de symptomen.....</i>	<i>69</i>
<i>B. Situering bijengifallergie in de allergie</i>	<i>69</i>
<i>C. Antigeen penetratie, detectie, interceptie en verwerking</i>	<i>70</i>
<i>D. Antigeen presentatie en T-cel activering</i>	<i>71</i>
<i>E. De rol van de T-helpercellen (Th) en T-regulerende cellen (Treg).....</i>	<i>73</i>
<i>F. De rol van de B-cellen en germinale centra in de allergie</i>	<i>74</i>
<i>G. IgE en zijn rol in de mestcelactivatie.....</i>	<i>76</i>
HOOFDSTUK III: ANALYSE VAN DE PROTEÏNESAMENSTELLING VAN BIJENGIF VIA EEN PROTEOMISCHE BENADERING.....	83
<i>A. Samenvatting.....</i>	<i>85</i>
<i>B. Abstract.....</i>	<i>85</i>
<i>C. Introduction</i>	<i>85</i>
<i>D. Material and methods</i>	<i>86</i>
<i>E. Results and discussion.....</i>	<i>88</i>
HOOFDSTUK IV: MOLECULAIRE KLONERING EN EXPRESSIE VAN ICARAPINE, EEN NIEUW IGE-BINDEND BIJENGIFPROTEÏNE	95
<i>A. Samenvatting.....</i>	<i>97</i>
<i>B. Abstract.....</i>	<i>97</i>
<i>C. Introduction</i>	<i>97</i>
<i>D. Material and methods</i>	<i>98</i>
<i>E. Results</i>	<i>101</i>
<i>F. Discussion</i>	<i>106</i>
HOOFDSTUK V: MRJP9 EN PVF1: TWEE NIEUWE COMPONENTEN VAN BIJENGIF	109
<i>A. Inleiding</i>	<i>111</i>
<i>B. Materiaal en methoden</i>	<i>111</i>
<i>C. Resultaten</i>	<i>113</i>
<i>D. Besluit.....</i>	<i>123</i>
HOOFDSTUK VI: GENOMISCHE EN TRANSCRIPTIE ANALYSE VAN DE PROTEÏNE HETEROGENITEIT VAN HET BIJENGIFALLERGEEN API M 6.....	127
<i>A. Samenvatting.....</i>	<i>129</i>
<i>B. Abstract.....</i>	<i>129</i>
<i>C. Introduction</i>	<i>129</i>
<i>D. Results and discussion</i>	<i>130</i>
<i>E. Material and methods</i>	<i>135</i>

Inhoudstafel

HOOFDSTUK VII: PROTEOOMSTUDIE VAN EEN AANGERIJKT GIFPREPARAAT BEKOMEN DOOR LYSIS VAN DE GIFBLAAS EN DE GIFKLIEREN VAN DE HONINGBIJ (<i>APIS MELLIFERA</i> L.).	139
<i>A. Inleiding</i>	141
<i>B. Materiaal en methoden</i>	142
<i>C. Resultaten en discussie</i>	145
<i>D. Besluit</i>	164
HOOFDSTUK VIII: ALGEMEEN BESLUIT / GENERAL CONCLUSION	181
<i>A. Algemeen besluit</i>	183
<i>B. General conclusion</i>	185

Afkortingen

LIJST VAN AFKORTINGEN

2-DE	: two-dimensional gel electrophoresis
AA	: aminozuur/amino acid
AHP	: na-hyperpolarisatie
AK	: Arginine kinase
AMV	: Avian Myeloblastosis Virus
APC	: antigeen presenterende cellen
Api m	: <i>Apis mellifera</i> allergeen opgenomen in de officiële allergeenlijst van de IUIS
Arg	: arginine
Asn	: asparagine
Asp	: aspartaat
ATP	: adenosinetrifosfaat
BAC	: bacterial artificial chromosome
B-cel	: B staat voor Bursa van Fabricius
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: basenparen
CCL	: CC chemokine ligand
CD	: cluster of differentiation
CD40L	: cluster of differentiation 40 ligand
cDNA	: copy DNA
CDS	: coderende sequentie
CHAPS	: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CpG	: Cytosine-Guanine verbonden door een fosfodiester (phosphodiester)
CSA	: cyclosporin A
C-terminaal	: carboxyterminaal
CUB	: complement subcomponents C1r/C1s, Uegf and b one morphogenic protein 1
Cys	: cysteine
Cyp	: cyclophilines
Da	: Dalton
DC	: dendritische cel
DNA	: deoxyribonucleic acid
<i>E. Coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Fab	: antigen binding fragment
FcεR	: crystalizable fragment epsilon receptor
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
GlcNAc	: N-acetylglucosamine
Gln	: glutamine
Glu	: glutamaat
Gly	: glycine
GR	: glutathione reductase
GSP	: gene specific primer
GST	: glutathione-S-transferase
HIRS	: hyperimmune rabbit serum
His	: histidine
H ₂ O ₂	: waterstofperoxide
HPLC	: high pressure liquid chromatography
HRP	: horse radish peroxidase
ICAM	: intercellulaire adhesie molecule
IEF	: iso-elektrische focusing/ isoelectric focusing

Afkortingen

IFN	: interferon
IgE	: immunoglobuline E
IgG	: immunoglobuline G
IL	: interleukine
IPG	: immobilized pH gradient
IUIS.	: International Union of Immunological Societies
kDa	: kilodalton
Kr/Ar	: Krypton/Argon
LC	: liquid chromatography
LD50	: Lethale Dosis voor 50% van de geteste populatie
MALDI TOF/TOF-MS:	matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/time of flight-mass spectrometry
Man	: mannose
MCD	: mestcel degranulerend peptide
MCP	: monocyte chemotactic protein
Met	: Methionine
MHC	: major histocompatibility complex
Min	: minuten
mRNA	: messenger RNA
MRJP	: mayor royal jelly protein
N-terminaal	: aminoterminal
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
O ₂ ⁻	: superoxide
OBP	: odorant binding proteïne
OGS	: officiële genen set
OH	: hydroxyl radicaal
OX40	: =CD134, niet geklasseerde of niet-gestandaardiseerde O-antigeen groep 40
nHya	: natuurlijk hyaluronidase
nPLA2	: natuurlijk fosfolipase A2
PAMP	: pathogeen geassocieerde moleculaire patronen
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF	: platelet-derived growth factor
PDGFR	: platelet-derived growth factor receptor
Pfam	: proteins families database
PGE2	: prostaglandine E2
Phe	: Fenylalanine
pI	: iso-elektrisch punt
PLA2	: fosfolipase A2
PLB	: lysofosfolipase of fosfolipase B
PPlase	: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases
PRR	: pattern recognition receptors
PVDF	: Polyvinylidene Difluoride
PVF	: PDGF/VEGF factor
PVR	: PDGF/VEGF receptor
Q-TRAP LC-MS/MS:	hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
RAST	: radioallergosorbent test
rHya	: recombinant hyaluronidase
rPLA2	: recombinant fosfolipase A2
RZI	: reactieve zuurstof intermediären

Afkortingen

SDS-PAGE	: Sodium dodecylsulfaat polyacrylamide gel elektroforese
Sec	: seconde
Ser	: serine
SOD	: superoxide dismutase
SK _{Ca}	: geleidende Ca ²⁺ -geactiveerde K ⁺ -kanalen
sMel	: synthetisch melittine
T-cel	: T staat voor Thymus
TCR	: T-cel receptoren
TF	: tissue factor
TGF	: Transforming growth factor
Th1	: T-helpercellen die type 1 cytokines produceren
Th2	: T-helpercellen die type 2 cytokines produceren
TIL	: Trypsin Inhibitor like cysteine rich
TLR	: Toll-like receptoren
TNF	: tumor necrosis factor
Treg	: T-regulerende cellen
Trp	: Tryptofaan
Tyr	: Tyrosine
UTR	: untranslated region
VEGF	: vascular endothelial growth factor
VEGFR	: vascular endothelial growth factor receptor
WGS	: whole genome shotgun

Lijst van figuren

LIJST VAN FIGUREN

Fig. II.1:	Lichaamsbouw van een werkster van de honingbij.....	13
Fig. II.2:	Angelapparaat van een werkster zoals het in het abdomen georiënteerd is tijdens de steekreflex. Dit is tevens het deel dat achterblijft in de huid van het slachtoffer. De angel bestaat uit 1 stylet (st) en 2 lancetten (la). Deze elementen vormen samen een buis, de gifschacht (gs).....	26
Fig. II.3:	Het gistselsel: het gif wordt aangemaakt in de gevorkte gifklier (gk), het wordt opgevangen in het gifreservoir (gr), van daaruit komt het gif in de styletbol (sb) terecht. Het bewegingsmechanisme van de platen wordt overgedragen op de rami (ra). Deze beweging drijft ook de kleppen (k) aan, die maken dat het gif in de schacht gepompt wordt. De gifschacht wordt vooraan afgelijnd door de 2 lancetten (la).....	28
Fig. II.4:	Foto van het angelapparaat met een vol gifreservoir en het proximale deel van de gifklieren. Op het uiteinde van de angel is een gifdruppel gevormd.....	28
Fig. II.5:	Fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylserine zijn goede substraten voor het fosfolipase A2 (A2 in de tekening). De reactieproducten kunnen nadien nog aangevallen worden door lysofosfolipasen (L1 in de tekening).....	34
Fig. II.6:	Structuur van de actieve site van matuur bijengif PLA2 en het vooropgestelde katalytische mechanisme. Het His34 functioneert waarschijnlijk als Brønsted base om het aanvallende water te deprotoneren. Asp64 en Tyr87 vormen een waterstof bindend netwerk met het histidine aminozuur.....	35
Fig. II.7:	Hydrolyse op positie A gebeurt door het testiculaire type en geeft het tetrasaccharide {glucuronzuur N-acetylglucosamine glucuronzuur N-acetylglucosamine}, en wordt dan ook hyaluronoglucosaminidase genoemd. Hydrolyse op positie B genereert predominant het tetrasaccharide {N acetylglucosamine glucuronzuur N acetylglucosamine glucuronzuur}, en wordt dan ook hyaluronoglucuronidase genoemd.....	38
Fig. II.8:	Hyaluronzuur is een polysaccharide dat een hoge viskeuze oplossing genereert tussen de cellen. Hyaluronidase breekt dit zuur af, met als gevolg dat gifcomponenten de intracellulaire ruimte kunnen binnendringen en de celmembranen aanvallen.....	39
Fig. II.9:	Kristalstructuur van hyaluronidase	41
Fig. II.10:	Schematisch model van de structuur van in water opgelost en membraan gebonden melittine. De twee α -helix segmenten van residuen 1-11 en 2-21 zijn 60° gebogen ten opzichte van elkaar. Het COOH-terminaal segment van residuen 22-26 zijn nonhelicaal. De convexe zijde van de gebogen helix is hydrofiel, de concave zijde hydrofoob. De cirkels wijzen op positief geladen residuen.....	47
Fig. II.11:	De tetramere structuur van het melittine komt voor in een waterig milieu bij een hoge ionensterkte.....	48
Fig. II.12:	Schematisch model van tetrameer melittine in membranen. De bollen stellen de nonhelicale COOH-terminale segmenten van melittine voor; de cylinders, de membraangebonden α -helix segmenten met de hydrofobe zijden (wit) naar de dubbele lipidenmembraan gericht en de hydrofiele zijden (grijs) naar binnen gericht. Op die manier wordt er een polaire kern in de dubbele lipidenmembraan gevormd. De tryptofaan residuen (kleine cirkels) tonen de positie van de fluorescente donoren en acceptoren.....	49
Fig. II.13:	Schematische drie dimensionale structuur van apamine (A) en MCD (B).....	52
Fig. II.14:	Foto van een veralgemeende allergische reactie tengevolge van een bijensteek (Quinckes syndroom).....	69
Fig. II.15:	Weergave van de pathways en cellen die tot allergie leiden.....	71

Lijst van figuren

- Fig. III.1: Representative 2D-gel of the honeybee venom, out of three, stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. More information about the different spots can be found in Table III.1.....88
- Supplementary Fig. IV.1: Alignment of an *in silico* spliced honeybee genome sequence with different cDNA fragments of the bee venom component icarapin. The icarapin-gene is present on chromosome 1 (positions marked above the bar, along with coordinates of the chromosome) and characterized by three introns (depicted by black triangles; splicing sites given on top). Two transcript variants were found. (A) The first transcript variant is represented by the cloned 5'- RACE fragment (*clone 5.V4*) and full-size cDNA. (B) The second transcript variant is represented by the cloned 3'- RACE fragment (*clone 3.A4*) and is incomplete. It is characterized by an alternative splicing at intron 2, resulting in a transcript that is 12 base pairs shorter (here the relative positions with respect to transcript variant 1 are given). Both transcript variants have a TTTT-deletion mutation when compared to the genome sequence (depicted by a white triangle) in the 3'-UTR. Fragment lengths (in bp) are given below the bar and in boxes.....102
- Fig. IV.1: Alignment of the 41 (sometimes 37) residues of a consensus sequence found in a series of mostly unknown insect proteins, flanked by their start and stop positions. Species names on the left are followed by Genbank accession numbers and total length (in number of amino acids) of the protein fragment (in parentheses). "*" means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment; ":" means that conserved substitutions have been observed; "." means that semi-conserved substitutions are observed.....103
- Supplementary Fig. IV.2: Nucleotide and deduced amino acid sequences of icarapin transcript variant 1. The numbers on the left denote the nucleotide numbers. The start and stop codon are underlined. Residues -1 to -19 are from the signal peptide. Residue +1 denotes the first amino acid of the mature protein. "η" and "θ" are respectively putative N- and O-linked glycosylation sites.....104
- Fig. IV.2: IgE-specific staining of dot blots using sera from bee venom allergic patients (all were beekeepers except patient 4) and non-responsive stung control persons (neg.ctl.). In the blanco nitrocellulose strips no serum was added. Protein spots were made with recombinant icarapin, natural bee venom, a peroxidase conjugated immunoglobulin (pos.ctl.) or with buffer only.....105
- Fig. IV.3: Westernblots and Coomassie stained blots of affinity chromatography purified recombinant icarapin. IgE-specific staining was done with chemiluminescent substrate using sera from a bee venom allergic beekeeper (patient 1) and a non-responsive stung control person (neg.ctl.). The recombinant icarapin was localized using an anti-His monoclonal that was peroxidase conjugated and stained with the chemiluminescent substrate and with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), permitting to localize the His-tagged bands on the adjacent Coomassie Brilliant Blue G-250 stained strips. The arrow indicates the protein band that was cut out the blot and identified as icarapin by sequencing.....105
- Fig. IV.4: Immunolocalization of icarapin using a hyperimmune rabbit serum. (A) A strong fluorescent area at the cuticular lining of venom duct was seen, with some minor staining inside the secretory cells. (B) When the serum was depleted with affinity purified recombinant icarapin the signal disappeared completely. Scale is give in μm.....106
- Fig. V.1: Alignatie van de *in silico* gesplitste honingbijgenoom sequentie van MRJP9. MRJP9 was aanwezig in Group 11.12 van de genoom assembly 4.0. MRJP9 is gekarakteriseerd door 5 intronen (afgebeeld door zwarte driehoeken; splitsingsplaatsen worden er boven gegeven) en dit haplotype of het genoom toont een bijna perfecte sequentie gelijkenis met kloon 2. Een tweede waarschijnlijk gedeeltelijke genoom sequentie werd gevonden (groepUn2596) waarmee het voorste deel MRJP9 grotendeels mee overeen komt. De fragmentlengtes (in bp) worden gegeven onder de staaf.....114
- Fig. V.2: Alignatie van de *in silico* gesplitste honingbijgenoom sequentie met verschillend cDNA van PVF1. PVF1 was aanwezig in Group 2.38 van de genoom assembly 4.0. PVF1 is gekarakteriseerd door 5 intronen (afgebeeld door zwarte driehoeken; splitsingsplaatsen worden er boven gegeven). Een eerste transcript variant (PC 8), deze sequentie komt overeen met een voorspelde nucleotidensequentie. Een tweede variant (PC 9) heeft een identieke sequentie die 82 bp langer is. De fragmentlengtes (in bp) worden gegeven onder de staaf.....114
- Fig. V.3: De coderende nucleotidensequentie van kloon 2 van MRJP9 met de afgeleide aminozuursequentie. De aminozuurletter staat aan het begin van de vertalende nucleotidensequentie. N in de nucleotidensequentie duidt op moeilijk te interpreteren nucleotiden. Cijfers (tussen haakjes) bij AA duiden de 5 plaatsen waar er problemen zijn bij de nucleotide interpretatie.....116

Lijst van figuren

- Fig. V.4: De afgeleide aminozuursequentie van kloon 2 van MRJP9. Het voorspelde signaalpeptide is *cursief* weergegeven, de peptiden die met MS/MS teruggevonden werden zijn onderlijnd en de grijze AA duiden op de mogelijke AA die voortvloeien uit de onzekere nucleotiden interpretatie.....116
- Fig. V.5: De (coderende) nucleotidensequentie van kloon 8 (PC 8) en 9 (PC 9) van PVF1 met de afgeleide aminozuursequentie. De aminozuurletter staat aan het begin van de vertalende nucleotidensequentie. De onderlijnde sequentie komt overeen met de 82 bijkomende basenparen die in PC 9 voorkomen ten gevolge van alternatieve splitsing in vergelijking met PC 8.....118
- Fig. V.6: De afgeleide aminozuursequentie van PC 8 en PC 9 van PVF1. Het voorspelde signaal peptide is *cursief*, de peptiden die met MS/MS teruggevonden werden zijn onderlijnd.....119
- Fig. V.7: Fylogenie van de MRJP/yellow proteïnen van *Apis mellifera* en *Drosophila melanogaster* (dm)....119
- Fig. VI.1: Nucleotide and deduced amino acid sequences of Api m 6 transcript variant 1 (A) and 2 (B). The numbers on the left denote the nucleotide numbers. The start and stop codon are underlined. Residues -1 to -21 are from the signal peptide. Residue +1 denotes the first amino acid of the mature protein. In (C) the alignment of the deduced amino acid sequences of the two Api m 6 transcript variants is given.....133
- Fig. VI.2: Alignment of two in silico spliced honeybee genome sequences with different cDNA fragments of the bee venom allergen Api m 6. (A) Api m 6 was present in mapped scaffold 16.18 from genome assembly 4.0 (positions marked above the bar, along with coordinates for the corresponding Contig5339). Api m 6 is characterized by two introns (depicted by black triangles; splicing sites given on top) and this haplotype of the genome assembly showed a perfect sequence-level match with cloned 5'- (clone 5.1) and 3'-RACE fragments (clone 3.9). The predicted protein from this sequence is identical to the described Api m 6 variant 1. (B) A second transcript variant was found by cDNA sequencing (full cDNA). This transcript has a nearly identical match to unmapped scaffold GroupUn.6097 (Contig14926), the only difference being a TT-insertion mutation (depicted by a white triangle) in the 5'-UTR. The 3'-end of transcript variant 2 corresponds also to another cloned 3'-RACE fragment (clone 3.3). Fragment lengths (in bp) are given below the bar and in boxes ...134
- Fig. VII.1: 2D-gel van een aangerijkt bijengif preparaat, gekleurd met Coomassie Brilliant Blue G-250. De witte pijlen duiden op spots waar componenten inzitten die nog nooit in bijengif teruggevonden werden. De zwarte pijlen duiden op spots waar enkel bijengifproteïnen in gevonden werden. Meer informatie over de verschillende spots kunnen gevonden worden in Tabel VII.1 en VII.2.....144
- Fig. VII.2: Predictie van bijen enolase op basis van GB15039-PA en BI504105. De onderlijnde peptiden komen overeen met MS/MS data. De laatste 36 aminozuren (*cursief*) zijn door ons toegevoegd.....154

Lijst van tabellen

LIJST VAN TABELLEN

Tabel II.1: Samenvatting van de bijengifproteïnen en peptiden die ooit in bijengif vastgesteld werden.....	57
Table III.1: Protein identification on the 2-D gels of honeybee venom.....	91
Tabel VII.1: Proteïne identificatie van componenten op de 2-D gels van aangerijkt bijengif.....	166
Tabel VII.2: Proteïne identificatie van gekende bijengifcomponenten op de 2-D gels van aangerijkt bijengif...	171

Hoofdstuk I: Inleiding, doelstelling en korte inhoud

A. Inleiding en doelstelling

In de geïndustrialiseerde landen is allergie een steeds groter wordend medisch probleem. 25 tot 30% van de bevolking heeft er mee te kampen (Burr *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 2002; Umetsu *et al.*, 2002). Ook het aantal allergische reacties tegenover bijensteken neemt gestaag toe. Patiënten met een allergie tegenover bijengif kunnen zich laten testen en behandelen in gespecialiseerde centra.

De aanpak van Hymenoptera allergie lijkt op het eerste gezicht een succesverhaal, doch een zorgvuldige analyse van de literatuur leert dat zowel de diagnose als de immunotherapie (“venom immunotherapy”, VIT) verre van perfect zijn. Meer dan 20% van de individuen zonder voorgeschiedenis van veralgemeende steekreacties vertonen positieve testen. Enkel 30-50% van de personen met een positieve test zullen reageren op een volgende steek van het betreffende insect (Rueff *et al.*, 1996). Zowel de efficiëntie als de tolerantie zijn suboptimaal bij patiënten die VIT ondergaan en dit is nog meer uitgesproken bij bijengifallergie (Muller, 2001). Bij een uitgelokte steektest tijdens bijengif immunotherapie ligt de complete bescherming tussen de 80-90% (Muller *et al.*, 1992; Rueff *et al.*, 1996). Veralgemeende allergische neveneffecten tengevolge van bijengif immunotherapie injecties komen voor bij 20-40% van patiënten (Muller *et al.*, 1992). 1 jaar na het stopzetten van de VIT zijn de meeste personen volledig beschermd, maar 7 jaar na het stopzetten van de behandeling is de kans op een veralgemeende allergische reactie na een steek opgelopen tot 16-20% (Golden *et al.*, 1998; Lerch & Muller, 1998). Er is dus een nood om zowel de diagnose als de immunotherapie van Hymenoptera gifallergie te verbeteren (Muller, 2001).

Bij allergische reacties veroorzaakt door bijensteken wordt tot nu toe zowel in de diagnostiek als de therapie met natuurlijk bijengif gewerkt. Het nadeel van allergeenextracten is dat ze bestaan uit onvoldoende gekarakteriseerde allergeenmengsels en niet allergische en zelfs toxische componenten bevatten, wat ernstige neveneffecten kan veroorzaken (Akdis & Blaser, 2001; Valenta, 2002). De aanpak bij bijengifallergie zou sterk verbeterd kunnen worden indien de diagnose zou toelaten de componenten waartegen de persoon reageert aan te duiden om een latere geïndividualiseerde behandeling hierop af te stemmen. Echter, zelfs sterk gezuiverde natuurlijke allergenen bevatten nog sporenelementen van andere gifallergenen (Muller, 2001) wat een belangrijk obstakel is voor deze benadering.

Met de introductie van de gentehnologie in het allergologisch onderzoek wordt mogelijks een oplossing geboden voor de gestelde problematiek. Recombinant allergenen kunnen zowel voor diagnose als de therapie worden aangewend. Het is zelfs mogelijk hun

allergische eigenschappen te verminderen door wijzigingen aan te brengen in de recombinant homologen of de synthetische moleculen (Valenta, 2002). De voornaamste allergenen van de honingbij zijn nu recombinant beschikbaar (Api m 1, 2, 3 & 4). De specificiteit zowel in huidtesten als in de bepaling van gifspecifieke IgE antilichamen is duidelijk hoger in vergelijking met natuurlijke gifallergenen. Omwille van een verschillende finaliteit vraagt diagnose en therapie echter een verschillende aanpak. Inderdaad, er is vastgesteld dat de conformationele B-cel epitopen van de allergenen de allergische machinerie in werking stellen en de lineaire T-cel epitopen bescherming bieden. In het kader van de therapie kan men het allergeen zodanig modificeren dat de conformationele IgE bindende B-cel epitopen verbroken worden terwijl de lineaire T-cel epitopen bewaard blijven. De eerste zijn verantwoordelijk voor de neveneffecten terwijl de tweede de beschermende immuniteit mediëren. B-cel epitopen kunnen vernietigd worden door puntmutaties of door de proteïne slecht of niet op te vouwen. Een andere mogelijkheid is enkel T-cel epitoopeptiden te gebruiken. Recente studies met T-cel epitoopeptiden lijken veelbelovend (Fellrath *et al.*, 2003; Kussebi *et al.*, 2005; Karamloo *et al.*, 2005). Geïndividualiseerde cocktails van recombinant gifallergenen of isovormen lijken een mogelijkheid voor de toekomst. Bij het gebruik van de recombinant allergenen in de diagnostiek is de betrachting anders. Hier is het wel de bedoeling de recombinant componenten zodanig te construeren dat ze IgE bindend zijn met de conformationele B-epitopen.

Het voorgaande versterkt de nood om de samenstelling van bijengif zo correct mogelijk te kennen. De meeste bijengifcomponenten zijn beschreven in de jaren 50 tot 80 van de vorige eeuw. Hierbij lag de nadruk voornamelijk op het opsporen van bioactieve componenten in bijengif.

Met de vernieuwde interesse voor de bijengifallergie, is men tevens op zoek gegaan naar nieuwe bijengifcomponenten. Sinds 2001 zijn reeds 2 nieuwe allergenen beschreven (Kettner *et al.*, 2001; Winningham *et al.*, 2004). Met dit onderzoek willen we nieuwe performante analysetechnieken aanwenden om nog niet gekende gifcomponenten op te sporen en te identificeren. Aangezien de meeste (bijengif)allergenen proteïnen zijn, gaat onze aandacht uit naar deze groep. Daarnaast willen we een aantal van deze gifcomponenten in een recombinant vorm beschikbaar maken. Dit moet toelaten om de IgE-bindende eigenschappen van de proteïnen te bepalen. Finaal gaan we op zoek naar laag abundante gifcomponenten via de analyse van een aangerijkt gifpreparaat.

B. Korte inhoud

De structuur van deze doctoraalscriptie is als volgt:

Na de doelstelling (hoofdstuk I) wordt in hoofdstuk II een literatuuroverzicht gegeven vertrekkend van de honingbij, over het genoom, het angelapparaat, de gifcomponenten tot het mechanisme van allergie.

De daaropvolgende delen (hoofdstuk III-VII) behandelen het experimentele werk.

In een eerste fase werd het gif van de honingbij geanalyseerd door gebruik te maken van 2D gelelektroforese en massaspectrometrie. Dit heeft geleid tot de identificatie van drie nieuwe gifproteïnen. Component 1 werd geïdentificeerd als behorend tot de PDGF/VEGF familie (PVF1), component 2 was nog nooit eerder beschreven (icarapine) en component 3 behoort tot de MRJP proteïne familie (MRJP9). De resultaten hiervan worden gepresenteerd in hoofdstuk III.

In een tweede fase gaat onze aandacht uit naar component 2. Via de RACE techniek werd het volledige gen bepaald. Dit gen ligt op chromosoom 1. De CDS werd in een prokaryote vector tot expressie gebracht. De proteïne degradeert gemakkelijk vandaar dat het icarapine genoemd werd. Bovendien heeft het IgE-bindende eigenschappen, die beschreven worden in hoofdstuk IV.

Van component 1 en 3 kon de volledige CDS bepaald worden. Proteïne 1 behoort tot de PDGF/VEGF familie. Het werd geïdentificeerd als PVF1 door zijn sterke gelijkenis met PVF1 van *Drosophila melanogaster* en heeft homologie met slangengif VEGF. Component 3 (MRJP9) maakt deel uit van de MRJP/yellow familie. Het is een sleutelproteïne tussen de twee subfamilies. Dit wordt besproken in hoofdstuk V.

Tijdens het onderzoek kon ook aangetoond worden dat de aminozuur variatie van het bijengifallergeen Api m 6 te wijten is aan allelische variatie. Dit soort variatie bemoeilijkt en vertraagt de correcte assemblage van het bijengenoom. Dit proces wordt verduidelijkt in hoofdstuk VI.

Hoofdstuk I: Inleiding, doelstelling en korte inhoud

In een laatste fase wordt onderzocht of de “pool” van potentiële gifcomponenten kon worden uitgebreid door gebruik te maken van een aangerijkt bijengifpreparaat. Dit leidde tot 22 proteïnen die nog niet in bijengif gevonden werden. 7 componenten zijn gekend als anti-oxidantia en 8 componenten hebben homologen die allergische reacties bij de mens uitlokken (hoofdstuk VII).

Hoofdstuk VIII heeft een algemeen besluit van de doctoraalscriptie in het Nederlands en Engels.

Hoofdstuk I: Inleiding, doelstelling en korte inhoud

Referenties

- Akdis, C. A. & Blaser, K. 2001. Bypassing Ige and Targeting T Cells for Specific Immunotherapy of Allergy. *Trends in Immunology* 22: 175-178.
- Burr, M. L., Butland, B. K., King, S. & Vaughan-Williams E. 1989. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Archives of disease in childhood* 64: 1452-1456.
- Fellrath, J. M., Kettner, A., Dufour, N., Frigerio, C., Schneeberger, D., Leimgruber, A., Corradin, G. & Spertini, F. 2003. Allergen-Specific T-Cell Tolerance Induction With Allergen-Derived Long Synthetic Peptides: Results of a Phase I Trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 854-861.
- Golden, D. B. K., Kwiterovich, K. A., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L. M. 1998. Discontinuing Venom Immunotherapy: Extended Observations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 298-305.
- Karamloo, F., Schmid-Grendelmeier, P., Kussebi, F., Akdis, M., Salagianni, M., Von Beust, B. R., Reimers, A., Zumkehr, J., Soldatova, L., Housley-Markovic, Z., Muller, U., Kundig, T., Kemeny, D. M., Spangfort, M. D., Blaser, K. & Akdis, C. A. 2005. Prevention of Allergy by a Recombinant Multi-Allergen Vaccine With Reduced Ige Binding and Preserved T Cell Epitopes. *European Journal of Immunology* 35: 3268-3276.
- Kettner, A., Hughes, G. J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F. & Corradin, G. 2001. Api M 6: a New Bee Venom Allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 914-920.
- Kramer, U., Link, E., Oppermann, H., Ranft, U., Schafer, T., Thriene, B., Behrend, H. & Ring, J. 2002. Studying school beginners in western and eastern Germany: Allergy trends and sensitisations 1991-2000. *Gesundheitswesen* 64: 657-663.
- Kussebi, F., Karamloo, F., Rhyner, C., Schmid-Grendelmeier, P., Salagianni, M., Mannhart, C., Akdis, M., Soldatova, L., Markovic-Housley, Z., Von Beust, B. R., Kundig, T., Kemeny, D. M., Blaser, K., Cramer, R. & Akdis, C. A. 2005. A Major Allergen Gene-Fusion Protein for Potential Usage in Allergen-Specific Immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 323-329.
- Lerch, E. & Muller, U. R. 1998. Long-Term Protection After Stopping Venom Immunotherapy: Results of Re-Stings in 200 Patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 606-612.
- Muller, U., Helbling, A. & Berchtold, E. 1992. Immunotherapy With Honeybee Venom and Yellow Jacket Venom Is Different Regarding Efficacy and Safety. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 89: 529-535.
- Muller, U. R. 2001. New Developments in the Diagnosis and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 124: 447-453.
- Rueff, F., Przybilla, B., Muller, U. & Mosbech, H. 1996. The Sting Challenge Test in Hymenoptera Venom Allergy. *Allergy* 51: 216-225.
- Umetsu, D. T., McIntire, J. J., Akbari, O., Macaubas, C. & Dekruyff, R. H. 2002. Asthma: an Epidemic of Dysregulated Immunity. *Nature Immunology* 3: 715-720.
- Valenta, R. 2002. The Future of Antigen-Specific Immunotherapy of Allergy. *Nature Reviews Immunology* 2: 446-453.
- Winningham, K. M., Fitch, C. D., Schmidt, M. & Hoffman, D. R. 2004. Hymenoptera Venom Protease Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 928-933.

Hoofdstuk II: Literatuuroverzicht

II.1 De honingbij (*Apis mellifera* L.)

A. Biologie van de honingbij

De honingbij heeft, zoals alle insecten, een kop, een borststuk (thorax) en een achterlijf (abdomen), drie paar poten en twee paar vleugels (fig. II.1). Ze is opgebouwd uit verschillende verharde segmenten die door membranen verbonden zijn. Dit externe skelet dient als geraamte om de interne spieren vast te hechten en op die manier snelle en precieze bewegingen uit te voeren. Het beschermt de bij ook tegen waterverlies en predatoren. De bij heeft een lengte van 11-18 mm. Ze is bruin gekleurd, het voorste deel van het achterlijf bij sommige rassen is meer of minder geelrood. Het borststuk is geelbruin behaard, de achterlijfssegmenten hebben aan de basis lichte viltige haarbanden. De achterpoten van de werkster hebben korfjes aan de schenen en een zeer breed eerste tarslid.

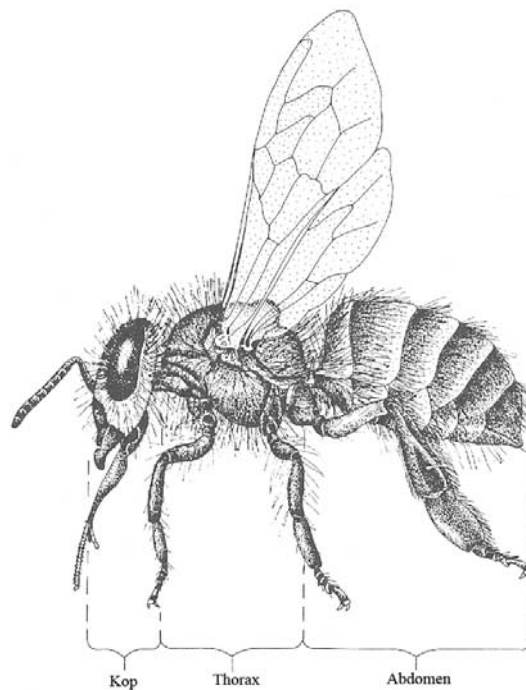


Fig. II.1: Lichaamsbouw van een werkster van de honingbij (Winston, 1987)

In de vrije natuur leven honingbijen op beschutte plekken, zoals in holle bomen. De meeste honingbijen worden nu echter door de mens gehouden in bijenkasten. De honingbij heeft als eusociaal insect één van de ingewikkeldste en boeiendste levenswijzen die er in de insectenwereld bestaan. In een kolonie komen drie kasten of typen bijen voor: een koningin,

werksters en darren. De kolonies vormen zeer volkrijke, meerjarige staten van 40000 tot ongeveer 80000 werksters in de zomer, die door maar één koningin worden gedomineerd. Het derde type bij zijn de mannelijke darren, die enkel instaan voor de bevruchting van de koningin. De darren zijn goed herkenbaar omdat ze iets groter zijn dan de werksters en grotere facetogen bezitten. Het zijn enkel de vrouwelijke exemplaren die een angel bezitten en dus kunnen steken (zie later). De koningin kan in het hoogseizoen tot 2000 eitjes per dag leggen, wat ongeveer het dubbele van haar eigen gewicht is. De koningin legt eitjes in de cellen van een raat. Na drie dagen kruipt een larfje uit het eitje. Dit larfje verpopt zich na zes dagen. Eenentwintig dagen na het leggen van het eitje knaagt de jonge bij het wasdekseltje stuk en kruipt uit de cel. Het larfje is nu uitgegroeid tot een werksterbij. De taakverdeling die de werkster opneemt heeft met haar leeftijd te maken. Direct nadat zij uit de cel is gekropen, begint haar werkzame leven. Haar eerste taak is het schoonpoetsen van cellen, enkele dagen later is zij ook in staat de nectar te bewerken. Na zes dagen kan zij de jonge larven verzorgen en voeden. Als de werkster vijftien dagen oud is, krijgt ze een bewakende taak aan de kastingang. Indringers zoals wespen of bijen uit andere volken, maar ook mensen, worden verjaagd, al dan niet door te steken. Als zij 21 dagen oud is, vliegt de werkster voor de eerste maal uit om nectar en stuifmeel te verzamelen. Deze taak blijft ze uitoefenen tot ze sterft van uitputting.

B. Taxonomie (Brusca & Brusca, 2002)

Rijk Animalia (dieren)

Phylum Arthropoda

Subphylum Hexapoda

Klasse Insecta

Subklasse Pterygota

Superorde Endopterygota (holometabole insecten)

Orde Hymenoptera

Onderorde Apocrita

Infraorde Aculeata

Superfamilie Apoidea

Familie Apidae

Onderfamilie Apinae

Genus *Apis*

Soort *Apis mellifera*

Ondersoort *Apis mellifera carnica*

Referenties

Brusca, R. C. & Brusca, G. J. 2002. Invertebrates. 880 pp. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Winston, M. L. 1987. The biology of the honey bee. 281 pp. Cambridge, USA, Harvard University Press.

II.2 Het bijengenoem

Momenteel zijn er insecten van zes genera gesequeneerd, enkel de assemblage van het genoom van *Drosophila melanogaster* (fruitvlieg) is compleet. De andere insecten naast de honingbij (*Apis mellifera*) zijn, *Aedes aegypti* (vector voor gele koorts en knobbelkoorts virussen), de malariamug (*Anopheles gambiae*), de zijderups (*Bombyx mori*) en de kastanjebruine rijstmeeltor (*Tribolium castaneum*) waarvan de assemblage van het genoom nog niet 100% compleet is. Het genoom van de honingbij is wel het eerste van een sociaal insect dat gesequeneerd werd. Het project begon eind 2001 en de sequencerings werd aangevat begin 2003. De eerste versie van de sequenties van het genoom werd vrijgegeven begin 2004. De voorlopig laatste versie werd ter beschikking gesteld in maart 2006 (Amel_4.0–20061003). De honingbij is in vele opzichten een interessant insect. Dit organisme heeft een groot economisch belang als bestuiver en producent van honing. Het is ook een modelorganisme dat gebruikt wordt voor de studie van de humane gezondheid zoals immunologie en allergologie.

Zeer recent is de genoomsequentie van de honingbij *A. mellifera* effectief gepubliceerd (Weinstock *et al.*, 2006). Vergeleken met de sequenties van andere insectengenomen heeft het bijengenoom een hoge A+T en CpG inhoud en ontbreken er belangrijke transposon families. Consequent met het A+T-rijke genoom, liggen de genen meer in die A+T-rijke gebieden vergeleken met andere soorten. Het bijengenoom is verder nog ongewoon onder de insecten en tegengesteld aan de vertebratengenomen omdat het lange genen heeft in G+C-rijke regio's. Het bijengenoom is trager geëvolueerd, heeft hoge niveaus van recombinatie (Beye *et al.* 2006) en is het meer gelijkend op vertebraten wat betreft de biologische klok, RNA interferentie en DNA gemethyleerde genen. Verder heeft *A. mellifera* minder genen voor aangeboren immuniteit, ziekteresistentie en het anti-xenobisch verdedigingsmechanisme. Er zijn eveneens minder insect cuticula proteïnen en smaakreceptoren aanwezig, terwijl er meer genen zijn voor geurreceptoren en nieuwe genen voor nectar en pollen gebruik. De major royal jelly protein/yellow familie behoort bij de vijf meest geëxpandeerde proteïnenfamilies in *A. mellifera*. Vergeleken met *Drosophila* verschillen de genen in de vroege ontwikkelingspathways, terwijl er gelijkenissen bestaan voor functies die merkkelijk verschillen, zoals geslachtsbepaling, hersenfunctie en gedrag (Weinstock *et al.* 2006).

Het genoom werd gesequeneerd met een gecombineerde methode van de “whole genome shotgun” (WGS) en “bacterial artificial chromosome” (BAC) kloon benadering. In totaal werden 1,8 gigabases geassembleerd, dit komt overeen met 7,5 maal dekking van het 236 megabase honingbijgenoom. Versie 4.0 van de assemblage van het genoom heeft een dekkingsgraad van meer dan 96%: 65% is georiënteerd in kaart gebracht, 14% is niet-

georiënteerd “gemapt” en 21% is niet in kaart gebracht. De versie vertegenwoordigt 99% van de merkers en 98% van de EST's. Er wordt geschat dat 26 Mb van de sequentie nog niet geassembleerd of gekloneerd is. De 16 chromosomen zijn genummerd volgens de genetische map, waarin ze ruw geordend zijn volgens lengte. Het langste chromosoom (1) is 3,5 μm , het kortste (16) is 1,2 μm . Er zijn 5 genenlijsten gemaakt op basis van de assemblage versie 2. Deze lijsten werden gebruikt om een officiële genen set (OGS) lijst op te stellen. Deze wordt ook GLEAN genoemd, dit verwijst naar de gebruikte methode om een uniforme lijst samen te stellen. De OGS bestaat uit iets meer dan 10000 genen. Dit aantal is minstens 15% lager dan bij de andere gesequeneerde insectengenomen. Dit verschil is te verklaren door de beperkte EST en cDNA data en door de grote evolutionaire afstand in vergelijking met andere organismen. Het aantal genen zal in de toekomst nog toenemen. Het voorkomen van de gevonden genen gaat van genen die uniek zijn voor de soort tot genen die deel uitmaken van het metazoa kern proteoom (Weinstock *et al.*, 2006).

De nieuwe genom informatie brengt nieuwe inzichten met zich mee in de evolutie van *A. mellifera*. De orde van de Hymenoptera is vroeg gedivergeerd in de evolutie van de holometabole insecten. De afsplitsing van de apidae is eveneens vroeg gebeurd in de evolutie van de bijen. Dit versterkt de hypothese dat honingbijen en hun verwanten het oudste taxon zijn van eusociale bijen. Nieuwe data ondersteunen de hypothese dat *A. mellifera* een Afrikaanse oorsprong heeft en dat er twee gescheiden migraties naar Eurazië waren. De ene migratie gebeurde via het Iberische schiereiland wat tot de ondersoorten *A. m. mellifera* en *A. m. iberiensis* leidde. De andere migratieroute liep over Klein-Azië en leidde tot het ontstaan van *A. m. ligustica* en *A. m. carnica*. Op basis van deze gegevens blijkt dat *A. m. carnica*, de voor dit doctoraalonderzoek gebruikte ondersoort, zeer nauw verwant is met *A. m. ligustica* waarvan het genoom gesequeneerd werd (Weinstock *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006). Alle genoombibliotheken zijn gemaakt van DNA geïsoleerd uit verschillende haploïde *Apis mellifera ligustica* darren afkomstig van één koningin (DH4 stam) van Bee Weaver Apiaries (VSA).

De beschikbaarheid van het genoom vergemakkelijkt het onderzoek zowel op het gebied van “genomics” als van “proteomics”. Het laat ook toe te onderzoeken hoe bepaalde variaties in proteïnen veroorzaakt worden. Zijn het veranderingen op proteoom of op genoom niveau? Zijn de genomische veranderingen te wijten aan mutaties, zijn er meerdere allelen in het spel, zijn er meerdere genen aanwezig?

Referenties

- Beye, M., Gattermeier, I., Hasselmann, M., Gempe, T., Schioett, M., Baines, J. F., Schlupalius, D., Mougél, F., Emore, C., Rueppell, O., Sirvio, A., Guzman-Novoa, E., Hunt, G., Solignac, M. & Page, R. E. 2006. Exceptionally High Levels of Recombination Across the Honey Bee Genome. *Genome Research* 16: 1339-1344.
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., Robertson, H. M., Weaver, D. B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C. G., Evans, J. D., Hartfelder, K., Hunt, G. J., Robertson, H. M., Robinson, G. E., Maleszka, R., Weinstock, G. M., Worley, K. C., Zdobnov, E. M., Hartfelder, K., Amdam, G. V., Bitondi, M. M. G., Collins, A. M., Cristino, A. S., Evans, J. D., Lattorff, H. M. G., Lobo, C. H., Moritz, R. F. A., Nunes, F. M. F., Page, R. E., Simoes, Z. L. P., Wheeler, D., Carninci, P., Fukuda, S., Hayashizaki, Y., Kai, C., Kawai, J., Sakazume, N., Sasaki, D., Tagami, M., Maleszka, R., Amdam, G. V., Albert, S., Baggerman, G., Beggs, K. T., Bloch, G., Cazzamali, G., Cohen, M., Drapeau, M. D., Eisenhardt, D., Emore, C., Ewing, M. A., Fahrbach, S. E., Foret, S., Grimmelikhuijzen, C. J. P., Hauser, F., Hummon, A. B., Hunt, G. J., Huybrechts, J., Jones, A. K., Kadowaki, T., Kaplan, N., Kucharski, R., Lebouille, G., Linial, M., Littleton, J. T., Mercer, A. R., Page, R. E., Robertson, H. M., Robinson, G. E., Richmond, T. A., Rodriguez-Zas, S. L., Rubin, E. B., Sattelle, D. B., Schlupalius, D., Schoofs, L., Shemesh, Y., Sweedler, J. V., Velarde, R., Verleyen, P., Vierstraete, E., Williamson, M. R., Beye, M., Ament, S. A., Brown, S. J., Corona, M., Dearden, P. K., Dunn, W. A., Elekonich, M. M., Elsik, C. G., Foret, S., Fujiyuki, T., Gattermeier, I., Gempe, T., Hasselmann, M., Kadowaki, T., Kage, E., Kamikouchi, A., Kubo, T., Kucharski, R., Kunieda, T., Lorenzen, M., Maleszka, R., Milshina, N. V., Morioka, M., Ohashi, K., Overbeek, R., Page, R. E., Robertson, H. M., Robinson, G. E., Ross, C. A., Schioett, M., Shippy, T., Takeuchi, H., Toth, A. L., Willis, J. H., Wilson, M. J., Robertson, H. M., Zdobnov, E. M., Bork, P., Elsik, C. G., Gordon, K. H. J., Letunic, I., Hackett, K., Peterson, J., Felsenfeld, A., Guyer, M., Solignac, M., Agarwala, R., Cornuet, J. M., Elsik, C. G., Emore, C., Hunt, G. J., Monnerot, M., Mougél, F., Reese, J. T., Schlupalius, D., Vautrin, D., Weaver, D. B., Gillespie, J. J., Cannone, J. J., Gutell, R. R., Johnston, J. S., Elsik, C. G., Cazzamali, G., Eisen, M. B., Grimmelikhuijzen, C. J. P., Hauser, F., Hummon, A. B., Iyer, V. N., Iyer, V., Kosarev, P., Mackey, A. J., Maleszka, R., Reese, J. T., Richmond, T. A., Robertson, H. M., Solovyev, V., Souvorov, A., Sweedler, J. V., Weinstock, G. M., Williamson, M. R., Zdobnov, E. M., Evans, J. D., Aronstein, K. A., Bilikova, K., Chen, Y. P., Clark, A. G., Decanini, L. I., Gelbart, W. M., Hetru, C., Hultmark, D., Imler, J. L., Jiang, H. B., Kanost, M., Kimura, K., Lazzaro, B. P., Lopez, D. L., Simuth, J., Thompson, G. J., Zou, Z., De Jong, P., Sodergren, E., Csuros, M., Milosavljevic, A., Johnston, J. S., Osoegawa, K., Richards, S., Shu, C. L., Weinstock, G. M., Elsik, C. G., Duret, L., Elhaik, E., Graur, D., Reese, J. T., Robertson, H. M., Robertson, H. M., Elsik, C. G., Maleszka, R., Weaver, D. B., Amdam, G. V., Anzola, J. M., Campbell, K. S., Childs, K. L., Collinge, D., Crosby, M. A., Dickens, C. M., Elsik, C. G., Gordon, K. H. J., Grametes, L. S., Grozinger, C. M., Jones, P. L., Jorda, M., Ling, X., Matthews, B. B., Miller, J., Milshina, N. V., Mizzen, C., Peinado, M. A., Reese, J. T., Reid, J. G., Robertson, H. M., Robinson, G. E., Russo, S. M., Schroeder, A. J., St Pierre, S. E., Wang, Y., Zhou, P. L., Robertson, H. M., Agarwala, R., Elsik, C. G., Milshina, N. V., Reese, J. T., Weaver, D. B., Worley, K. C., Childs, K. L., Dickens, C. M., Elsik, C. G., Gelbart, W. M., Jiang, H. Y., Kitts, P., Milshina, N. V., Reese, J. T., Ruef, B., Russo, S. M., Venkatraman, A., Weinstock, G. M., Zhang, L., Zhou, P. L., Johnston, J. S., Aquino-Perez, G., Cornuet, J. M., Monnerot, M., Solignac, M., Vautrin, D., Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Gibbs, R. A., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., Smith, D. R., Suarez, A. V., Tsutsui, N. D., Weaver, D. B., Wei, X. H., Wheeler, D., Weinstock, G. M., Worley, K. C., Havlak, P., Li, B. S., Liu, Y., Sodergren, E., Zhang, L., Beye, M., Hasselmann, M., Jolivet, A., Lee, S., Nazareth, L. V., Pu, L. L., Thorn, R., Weinstock, G. M., Stolz, V., Robinson, G. E., Maleszka, R., Newman, T., Samanta, M., Tongprasit, W. A., Aronstein, K. A., Claudianos, C., Berenbaum, M. R., Biswas, S., De Graaf, D. C., Feyereisen, R., Johnson, R. M., Oakeshott, J. G., Ranson, H., Schuler, M. A., Muzny, D., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Chacko, J., Davis, C., Dinh, H., Gill, R., Hernandez, J., Hines, S., Hume, J., Jackson, L., Kovar, C., Lewis, L., Miner, G., Morgan, M., Nazareth, L. V., Nguyen, N., Okwuonu, G., Paul, H., Richards, S., Santibanez, J., Savery, G., Sodergren, E., Svatek, A., Villasana, D. & Wright, R. 2006. Insights Into Social Insects From the Genome of the Honeybee *Apis Mellifera*. *Nature* 443: 931-949.
- Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., Smith, D. R., Suarez, A. V., Weaver, D. & Tsutsui, N. D. 2006. Thrive Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis Mellifera*. *Science* 314: 642-645.

II.3 Het angelapparaat, de gifklieren en het gifreservoir

A. Inleiding

Honingbijen ondervinden een hoge predatiedruk van andere dieren (zowel vertebraten als invertebraten) doordat hun nest of kast een rijke voedselbron vormt (Winston, 1987). Daarom hebben bijen een verdedigingsmechanisme ontwikkeld om zich tegen predatie te wapenen. Individuele bijen vertonen een ganse reeks van verdedigingsgedragingen, zoals het afscheiden van alarmferomonen om andere bijen te waarschuwen of aan te trekken, wat ook kan leiden tot steekgedrag. Bijen steken niet onmiddellijk, ze vertonen eerst een alarmerend gedrag. Wanneer een predator zich in de omgeving van de kastingang bevindt, nemen de bijen een typische houding aan: de kop omhoog en het abdomen neerwaarts gericht en de vleugels en de kaken open (Collins *et al.*, 1980). Doordat de angel gedeeltelijk uitgestoken wordt, kunnen tijdens dit gedrag alarmferomonen afgescheiden worden, alsook feromonen van de mandibels. Op deze manier kunnen andere werksters gealarmeerd en gerekruteerd worden. Deze gerekruteerde bijen kunnen op hun beurt het signaal in de kast verspreiden door met uitgestoken angel en wapperende vleugel hun eigen feromonen te verspreiden.

Verskillende stimuli kunnen hun waakzaamheid verhogen, gaande van een bewegend object, over mechanische stimulatie tot koolstofdioxide uitgewasemd door een zoogdier. Gealarmeerde bijen verlaten de kast en gaan op zoek naar de predator. Ze oriënteren zich daarbij op de beweging, het kleurcontrast en de geur. Eenmaal de predator gedetecteerd is, wordt die nog niet onmiddellijk gestoken. Het gedrag dat aan het steken vooraf gaat is afhankelijk van het soort indringer: dit kan gaan van er rond zoemen, er tegenaan vliegen, tot bijten. Wordt er toch gestoken dan komen de alarmferomonen uit het angelapparaat vrij en worden andere bijen naar de steekplaats aangetrokken. De steekkans verhoogt als het object snel beweegt, donker gekleurd is, een ruw oppervlak heeft en dierlijk ruikt (Collins *et al.*, 1980). Andere insecten kunnen enkel tussen twee segmenten gestoken worden. De bijen kunnen hun angel daaruit terugtrekken zonder zelf schade op te lopen.

B. Het angelapparaat

Het angelapparaat is evolutief ontstaan uit het eilegapparaat (ovipositor) van de ancestrale Hymenoptera (fig. II.2). Dit verklaart waarom enkel vrouwelijke exemplaren kunnen steken. Het angelapparaat ligt ingetrokken in een ruimte, de angelkamer, die begrensd is door het tergiet en het sterniet van het zevende abdominaal segment. De angel zelf is opgebouwd uit drie delen: 2 lancetten en 1 stylet die een kanaal vormen waarlangs het gif in

het tegument van het doelwit kan geïnjecteerd worden. De lancetten, die bij de werksters weerhaakjes bezitten, hebben een groeve die perfect past op de richel van het stylet (fig. II.2). Aangedreven door een motorisch apparaat, kunnen deze lancetten zich relatief bewegen ten opzichte van het stylet en zo het tegument dieper binnendringen (Snodgrass, 1956).

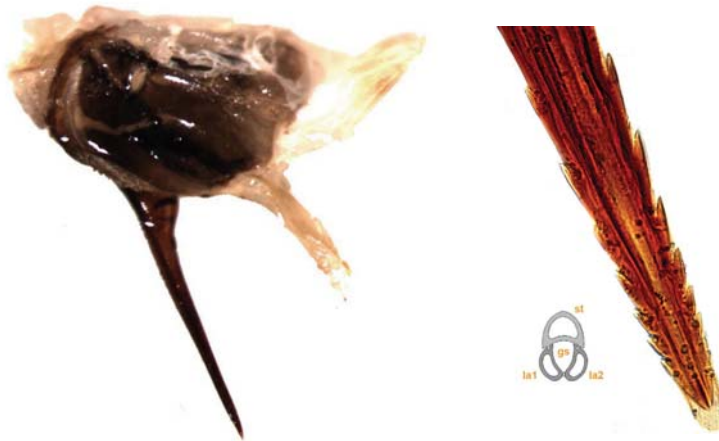


Fig. II.2: Angelapparaat van een werkster zoals het in het abdomen georiënteerd is tijdens de steekreflex. Dit is tevens het deel dat achterblijft in de huid van het slachtoffer. De angel bestaat uit 1 stylet (st) en 2 lancetten (la). Deze elementen vormen samen een buis, de gifschacht (gs).

Het angelapparaat van de werksters heeft een membraneuze connectie met de wand van de angelkamer. Wanneer de angel verankerd is in een dikke huid, zoals menselijke huid, worden de membranen en de spieren, die de platen van het basale motorisch apparaat verbinden met de spiraculaire platen aan elke zijde verscheurd wanneer de bij wegvliegt. Het gehele angelapparaat: de angelschacht, de gifklieren, de spieren en platen van het basale apparaat, de innerverende zenuwen en gans het terminaal abdominale ganglion, blijven vastgehecht in het slachtoffer. De terminale delen van het spijsverteringskanaal worden eveneens uit het abdomen gerukt. Het geïsoleerde angelapparaat blijft functioneren terwijl het basale apparaat de lancetten verder in de huid drijft en het gif injecteert. De werkster sterft na het uiteenrukken van het abdominale uiteinde.

C. De steekrespons

Bij de steekrespons van de bij zijn verschillende bewegingen betrokken: buiging van het abdomen; strekken van de angelschacht uit de angelkamer, begeleid door de rotatie van het basaal motorisch apparaat; insertie van de angelschacht; diepere penetratie en injectie van het gif (Rietschel, 1937).

D. De gifklier en het gifreservoir

Het gif dat in de wonde gepompt wordt door de actie van de lancetten, komt uit de gifklier. De gifklier is een lange, gekronkelde, distaal gevorkte structuur die in het achterste deel van het abdomen gelegen is (fig. II.3) (Robertson, 1968). Ze mondt uit in het gifreservoir (fig. II.3 & II.4). De gifklier en de apex van het gifreservoir worden afgeboord door secretorische units. Elke unit omvat een secretorische cel, een kanaalcel, een eindapparaat en een kanaal dat een verbinding maakt met het lumen van de gifklier of het gifreservoir. De bescherming van de secretorische cellen tegen hun secreet is een cuticulaire afboording van de gifklier en het gifreservoir. In het gifreservoir en de proximale regio van de gifklier is er nog een bijkomend beschermingsmechanisme, namelijk een trechtervormige klep die gelegen is tussen het eindapparaat en het kanaal (Bridges & Owen, 1984). Het gifreservoir is omringd met een fijn reticulum van spierweefsel (Bridges, 1977). De gifblaas mondt uit in de holte van de styletbol aan de basis van de angel. Die holte is onderaan open en strekt zich voorwaarts uit als een ventrale groef die overgaat in het gifkanaal. De spierbanden die vastgehecht zijn aan de gifklier, duwen het secreet in de gifblaas (Winston, 1987). Het secreet van de gifklieren accumuleert in de gifblaas en het gif wordt eruit gedreven door de werking van de aan de lancetten verbonden kleppen. Elk lancet heeft een parapluvormige klep aan zijn basis, gelegen in de styletbol (fig. II.3). Wanneer het lancet gestrekt wordt, openen de kleppen en wordt de vloeistof naar voor gedreven. Op die manier wordt meer gif vanuit de gifblaas aangezogen. Aan het einde van de strekfase klappt de klep in zodat het gif er voorbij kan. Deze cyclus wordt herhaald zolang de lancetten actief zijn. Het gif baant zich een weg door het kanaal, gevormd door het stylet en de beide lancetten, en dringt in de wonde via een smalle ventrale opening tussen de twee lancetten dichtbij de tip van de angel. Binnen de 20 seconden wordt minstens 90% van het gifreservoir leeggemaakt (Schumacher *et al.*, 1994).

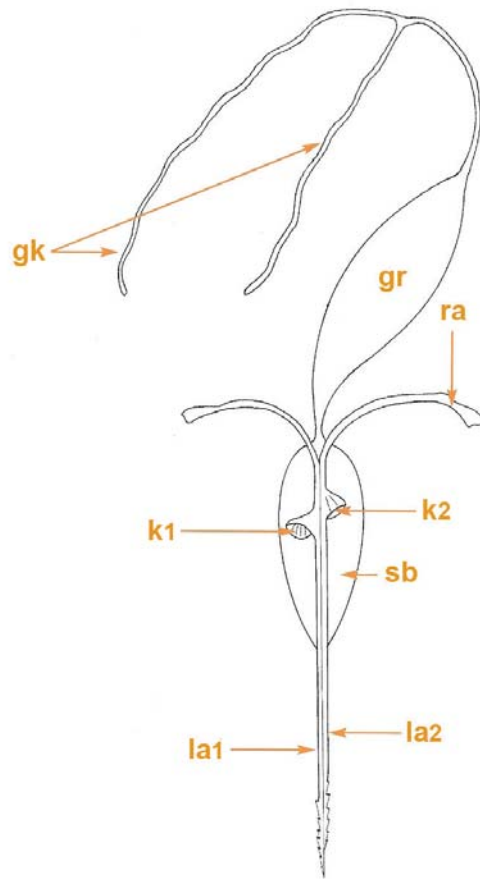


Fig. II.3: Het gifstelsel: het gif wordt aangemaakt in de gevorkte gifklier (gk), het wordt opgevangen in het gifreservoir (gr). Van daaruit komt het gif in de styletbol (sb) terecht. De beweging van de platen wordt overgedragen op de rami (ra). Deze beweging drijft ook de kleppen (k) aan, die zorgen ervoor dat het gif in de schacht gepompt wordt. De gifschacht wordt vooraan afgelijnd door de 2 lancetten (la).



Fig. II.4: Foto van het angelapparaat met een vol gifreservoir en het proximaal deel van de gifklieren. Op het uiteinde van de angel is een gifdruppel gevormd.

Referenties

- Bridges, A. R. & Owen, M. D. 1984. The Morphology of the Honey Bee (*Apis-Mellifera* L) Venom Gland and Reservoir. *Journal of Morphology* 181: 69-86.
- Bridges, A. 1977. Fine structure of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir-a system for the secretion and storage of a naturally produced toxin. *Proc. Microsc. Soc. Can.* 4: 50-51.
- Collins, A. M., Rinderer, T. E., Tucker, K. W., Sylvester, H. A. & Lockett, J. J. 1980. A Model of Honeybee Defensive Behavior. *Journal of Apicultural Research* 19: 224-231.
- Rietschel, F. 1937. Bau und Funktion des Wehrstachels der staatendbilden Bienen und Wespen. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 33: 313-357.
- Robertson, P. 1968. A morphological and functional study of the venom apparatus in representatives of some major groups of hymenoptera. *Aust. J. Zool.* 16: 133-166.
- Schumacher, M. J., Tveten, M. S. & Egen, N. B. 1994. Rate and Quantity of Delivery of Venom From Honeybee Stings. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93: 831-835.
- Snodgrass, RE. 1956. Anatomy of the honey bee. 334 pp. Ithaca, NY, USA, Comstock Publishing Associates and Cornell University Press.
- Winston, M. L. 1987. The biology of the honey bee. 281 pp. Cambridge, USA: Harvard University Press.

II.4 De bijengifcomponenten

A. Inleiding

Bijengif is een complex mengsel van verschillende componenten. Het bestaat voor 88% uit water. De andere bestanddelen zijn gesecreteerde proteïnen, farmacologische actieve peptiden, farmacologische actieve amines, histamine, acetylcholine en catecholamines.

Vers uitgescheiden gif is een heldere kleurloze vloeistof met een scherpe bittere smaak, een aromatische geur en een pH van 5,0-5,5. Het is goed mengbaar met water of verdund zuur en bevat ongeveer 12% vast materiaal. De hoeveelheid gif die een werkster bezit, wordt geschat op 1 tot 2 mg vloeistof (O'Connor *et al.*, 1967). Het drooggewicht bedraagt gemiddeld 134 µg met uitersten tussen de 38 en 330 µg (Schumacher *et al.*, 1992). Het volume van het gifreservoir van de koninginnen wordt drie maal hoger geschat dan dat van werksters (Owen *et al.*, 1977).

Gedroogd gif heeft een grofkorrelig, poederig uitzicht en is licht geelgrijs gekleurd. Een donkerder, zelfs bruine kleur kan ontstaan door (foto)oxidatie van biogene aminen, histidine en tryptofaan residuen van fosfolipase A2 en melittine. Foto-oxidatie kan voorkomen wanneer gif gedroogd wordt in het zonlicht en resulteert in een kennelijke heterogeniteit van de geïsoleerde producten.

Langer (1897) was de eerste die een wetenschappelijke interesse in de samenstelling van bijengif aan de dag legde, maar hij kon enkel aantonen dat bijengif complex was. Het duurde tot de jaren '50 van de vorige eeuw tot Neumann en Habermann (Neumann *et al.*, 1952; Neumann & Haberman, 1954) konden aantonen dat de biologische activiteit in bijengif veroorzaakt wordt door proteïnen en peptiden. In 1963 introduceerde Benton en collega's (Benton *et al.*, 1963) een elektrisch melksysteem waardoor bijengif in hogere en relatief zuivere hoeveelheden beschikbaar kwam. Deze methode levert wel gif op dat niet vrij is van contaminatie met pollen en andere plantproducten of met bijenproducten die niet *stricto sensu* met het bijengif geassocieerd zijn.

Bij een bijensteek wordt een kleine hoeveelheid gif geïnjecteerd die een pijnlijk gevoel veroorzaakt bij vertebraten, maar dodelijk is voor veel invertebraten. Hoewel het een onaangename ervaring is, vertonen niet-geïmmuniseerde personen geen complicaties bij 10-20 steken. De graad van ongemak is gedeeltelijk afhankelijk van de plaats van de steek. Na een groot aantal steken voelt de persoon in kwestie zich ernstig ziek door de histamine vrijstelling. De LD₅₀ dosis van bijengif ligt op 19 steken per kilogram. Een persoon van 70 kg zou dus 1330 steken moeten krijgen.

In wat volgt zullen we ons beperken tot de proteïnen en peptiden omdat die de meeste impact hebben op een persoon die gestoken wordt door een bij, zowel op toxisch als op allergisch vlak.

B. Proteïnen

B.1 Fosfolipase A2 (PLA2) (EC 3.1.1.4)

Functie

De superfamilie van PLA2 wordt tot nu toe in 11 groepen ingedeeld. Deze groepen worden in twee categorieën ingedeeld: de eerder kleine gesecreteerde PLA2s die calciumafhankelijk zijn, veel disulfide bruggen bevatten en katalytisch histidine en aspartaat residuen bezitten; en de langere cytoplasmatische PLA2s die katalytisch serine bevatten, maar geen disulfidebruggen. PLA2 van bijengif behoort tot de eerste categorie bij groep III (P00630) waar het de referentie vormt (Six & Dennis, 2000).

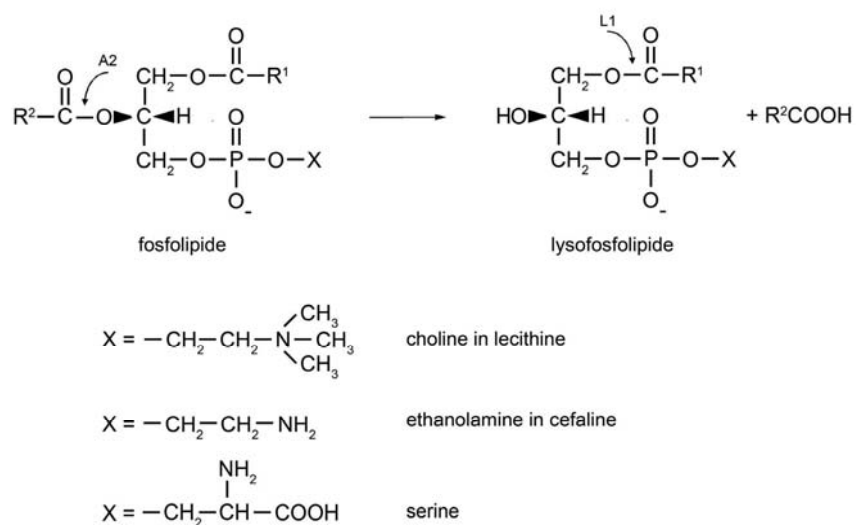


Fig. II.5: Fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylserine zijn goede substraten voor het fosfolipase A2 (A2 in de tekening). De reactieproducten kunnen nadien nog aangevallen worden door lysofosfolipasen (L1 in de tekening) (naar Banks & Shipoloni, 1986)

Fosfolipase A2 (fosfatidylcholine 2-acylhydrolase) is een enzym dat behoort tot de groep van de carboxylester hydrolasen. PLA2 katalyseert de hydrolyse van de esterbinding op de C2 positie van 1,2-diacyl-3sn-glycerofosfolipiden (Kuchler *et al.*, 1989). Zo ontstaan lysofosfoglyceriden en lange keten vetzuren uit membraanfosfolipiden.

De vetzuren die door PLA2 vrijgesteld worden, zoals oliezuur en arachidonzuur, zijn niet alleen belangrijk als energieaccumulatoren, maar nog belangrijker functioneren ze als signaalmolecule en precursor in de biosynthese van eicosanoiden, die onder andere de prostaglandinen en de leukotrienen behelzen. Dit zijn potente mediators van ontsteking en signaaltransductie.

De lysofosfolipiden komen tussen in celsignalisatie, hermodellering van de fosfolipiden en membraanverstoring. De activiteit van PLA2 op de cel leidt tot het verlies van een deel van de integriteit van de celmembraan. Een vereiste bij deze reactie is dat het vetzuur zich bevindt naast een estergebonden, negatief geladen anorganische component: fosfaat, fosfonaat of sulfaat (fig. II.5).

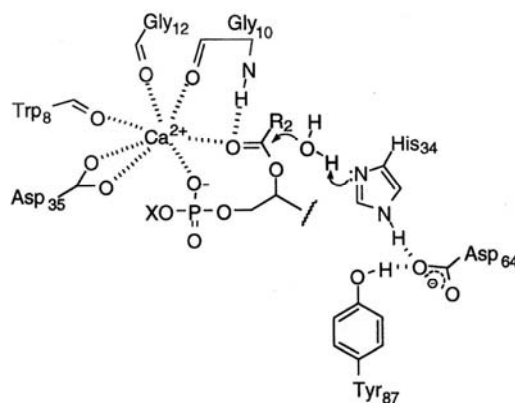


Fig. II.6: Structuur van de actieve site van matuur bijengif PLA2 en het vooropgestelde katalytische mechanisme. Het His34 functioneert waarschijnlijk als Brønsted base om het aanvallende water te deprotoneren. Asp64 en Tyr87 vormen een waterstof bindend netwerk met het histidine aminozuur (Annand *et al.*, 1996)

De hydrolyse begint door de activering en oriëntatie van een watermolecule door een waterstofbinding aan de actieve histidine site. Verder is er een naburig geconserveerd aspartaat, dat samen met het katalytisch histidine een verband vormt. Dit aspartaat is een ligand van het cruciale calcium, welke de positief geladen zuurstofanion opening van de tetrahedrale structuur van het substraat vormt, die de negatief geladen overgangstoestand van

de PLA2 reactie stabiliseert (fig. II.6). Dit is de oorsprong van de calcium afhankelijkheid van de histidine PLA2s. Andere bivalente kationen zoals magnesium kunnen het enzym ook mobiliseren, maar dan in mindere mate (Banks & Shipoloni, 1986). Verder zou calcium ook zorgen voor de correcte binding van het fosfolipase en zijn substraat (Annand *et al.*, 1996).

Met kinetische studies werd aangetoond dat ook vetzuren, één van zijn twee reactieproducten, in staat zijn om het PLA2 te activeren. Het bewijs dat PLA2 fosfolipoproteïnen als substraat nodig heeft, is aangetoond met testen op erythrocyten. Het gezuiverde enzym op zich is immers praktisch inactief tegen rode bloedcellen. Voegt men echter serum-fosfolipoproteïnen toe als mogelijk substraat, dan zullen de cellen wel aangevallen worden. Dit komt omdat de reactieproducten, namelijk de lysolecithines en de lange keten vetzuren, sterke membraanactieve componenten zijn die de dubbellagige celmembraanstructuur van omringende cellen beïnvloeden. De functionele integriteit van de cel gaat verloren doordat de lysolecithines en de vetzuren in de membranen dringen. Zo worden openingen gemaakt voor het fosfolipase, dat nu kan reageren met de lipiden van de celmembraan (Banks & Shipoloni, 1986).

PLA2s uit groep III werden naast bijengif ook geïsoleerd uit het gif van hagedissen, kwallen en schorpioenen. Deze groep bevat ook twee niet-gif homologen: één bij de mens en één bij de fruitvlieg. Neumann *et al.* (1952) heeft de activiteit van PLA2 voor de eerste keer beschreven in bijen. PLA2 maakt gemiddeld 12% uit van het drooggewicht van het bijengif. Hierdoor vormt het de belangrijkste enzymatische component in bijengif.

Structuur

De PLA2 precursor is opgebouwd uit 167 aminozuren en heeft een signaalpeptide van 18 aminozuren en een propeptide deel van 15 aminozuren. Het mature PLA2 bestaat uit 134 aminozuren (34-167) met een carbohydraatketen op Asn46 (Kuchler *et al.*, 1989) en twee katalytisch actieve sites namelijk op His67 en op Asp97 (fig. II.6). Het bevat ook vijf intramoleculaire disulfidebruggen (42-64, 63-103, 70-96, 94-128, 138-146) en vier bindplaatsen voor calcium (41, 43, 45, 68). De geconserveerde domeinen die gedefinieerd worden in PLA2 van *Apis mellifera* verschillen, afhankelijk van het gebruikte domein klassificatiesysteem, in lengte. Pfam definieert een Phospholip A2 2 domein (PF05826) van 101 AA (35-135) en SMART een PA2c domein (SM00085) van 131 AA (17-147). Het ligt op chromosoom 13. De structuur werd via X-straal kristallografie ontrafeld door Scott *et al.* (1990).

In een SDS-PAGE gel wordt PLA2 gescheiden in drie isovormen met een moleculair gewicht van 16, 18 en 20 kDa, welke verschillen in hun carbohydraat inhoud. De kleinste isovorm (PLA-16) is niet geglycosyleerd. De hoofdvariant (PLA-18) bevat enkel mannose, fucose en N-acetylglucosamine, waar PLA-20 bijkomend nog N-acetylgalactosamine draagt (Altmann *et al.*, 1991). PLA-18 heeft 10 glycovormen en PLA-20 heeft 4 glycovormen (Kubelka *et al.*, 1993). PLA-16 vertegenwoordigt 15-20% van het totale PLA2, PLA-18 70-80% en PLA-20 2-8% (Altmann *et al.*, 1991; Kubelka *et al.*, 1993; Lai & Her, 2002).

Allergeen karakter

PLA2 afkomstig van honingbijen lokt, zowel via injectie als via inhalatie, allergische reacties uit bij sommige personen (Banks & Shipoloni, 1986). PLA2 vormt naast hyaluronidase de belangrijkste allergeencomponent in bijengif (Soldatova *et al.*, 1998). Het allergeen kreeg de naam Api m 1. Het nomenclatuursysteem is gebaseerd op de eerste drie letters van het genus, een spatie, de eerste letter van de speciesnaam, een spatie en een Arabisch cijfer. PLA2 is dus het eerste beschreven allergeen van de honingbij (King *et al.*, 1994).

PLA2 heeft drie peptide T-cel epitopen (78-95, 114-125, 144-157) en een glycopeptide (46) T-cel epitoom, die zowel herkend worden door allergische als niet-allergische bijengif gesensibiliseerde individuen (Carballido *et al.*, 1993; Dudler *et al.*, 1995). De oligosaccharide zijketen van PLA2 vertoont occasioneel B-cel epitoom activiteit voor IgE en IgG (Tretter *et al.*, 1993; King & Spangfort, 2000) en kan een specifieke T-cel respons induceren (Dudler *et al.*, 1995). Op basis van deze zijketen is er soms kruisreactiviteit met sommige plantenallergenen (Aalberse *et al.*, 1998).

Akdis *et al.* (Akdis *et al.*, 1996) hebben aangetoond dat epitoomspecifieke perifere tolerantie tegen PLA2 geïnduceerd wordt in T-cellen maar niet in B-cellen tijdens immunotherapie. Via een enzymatisch niet-actieve recombinant van PLA2 is aangetoond dat de enzymatische activiteit van PLA2 geen invloed heeft op de specifieke IgE, IgG4 en cytokine responsen (Wymann *et al.*, 1998).

Recombinant

PLA2 was de eerste bijengifproteïne die recombinant beschikbaar kwam. Dit werd verwezenlijkt in een prokaryoot systeem met *Escherichia coli* (Dudler *et al.*, 1992). Dudler *et al.* (1992) stelden vast dat de enzymatische activiteit van het affiniteitgezuiverde en

hervouwen recombinant (rPLA2) gelijkend was aan deze van het natuurlijk gezuiverde PLA2. Ook is er een vergelijkbare allergeenactiviteit vastgesteld van de recombinant en het natuurlijk opgezuiverd proteïne in huidtesten (Muller *et al.*, 1995), bindend op gifspecifieke IgE antilichamen (Muller *et al.*, 1997) en inductie van histamine vrijstelling uit perifere bloed leukocyten (Forster *et al.*, 1995). Puntmutaties in het centrum van de enzymatische activiteit hadden tot gevolg dat deze activiteit verdween, terwijl deze geen invloed hadden op het allergeen karakter in huidtesten (Suter *et al.*, 1994). Dit wijst op het feit dat B-cel epitopen niet gerelateerd zijn met de enzymactiviteit. Dit sluit echter niet uit dat deze activiteit niet van betekenis kan zijn tijdens het sensibilisatieproces. In een intracutane huidtest eindpunt titratie was de activiteit van rPLA2 10x hoger dan deze van bijengif, wat overeenkomt met de relatieve hoeveelheid in bijengif van de proteïne (Muller *et al.*, 1995). Niet opgevouwen rPLA2 heeft geen allergeen karakter.

B.2 Hyaluronidase (Hya) (EC 3.2.1.35)

Functie

Er zijn minstens drie types hyaluronidases die hyaluronzuur hydrolyseren via verschillende mechanismen (Kreil, 1995). Hyaluronoglucosaminidase (EC 3.2.1.35) hydrolyseert 1,4-glucoside bindingen tussen N-acetyl- β -D-glucosamine en D-glucuronzuur, hyaluronoglucuronidase (EC 3.2.1.36) hydrolyseert 1,3-bindingen tussen β -D-glucuronzuur en N-acetyl-D-glucosamine en hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) knipt de 1,4-bindingen tussen N-acetyl- β -D-galactosamine en β -D-glucuronzuur en breekt finaal het polysaccharide af tot 3-(4-deoxy-b-D-gluc-4-enuronosyl)-N-acetyl-D-glucosamine (fig. II.7).

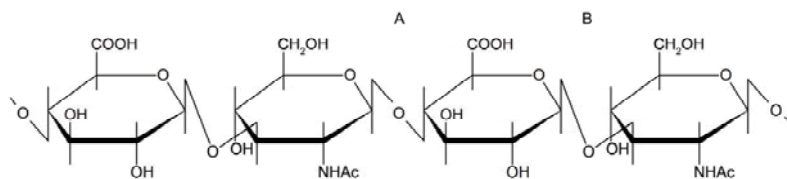


Fig. II.7: Hydrolyse op positie A gebeurt door het testiculaire type en geeft het tetrasaccharide {glucuronzuur N-acetylglucosamine glucuronzuur N-acetylglucosamine}, en wordt dan ook hyaluronoglucosaminidase genoemd. Hydrolyse op positie B genereert predominant het tetrasaccharide {N acetylglucosamine glucuronzuur N acetylglucosamine glucuronzuur}, en wordt dan ook hyaluronoglucuronidase genoemd (naar Banks & Shipoloni, 1986)

Bijengif hyaluronidase behoort tot de eerste groep. De verdere beschouwing handelt enkel over deze groep en hyaluronidase is vanaf hier een synoniem voor hyaluronoglucosaminidase, de systematische naam is hyaluronaat 4-glycanohydrolase. Hyaluronidase behoort tot de groep van glycosidases, die op hun beurt tot de glycosylases behoren.

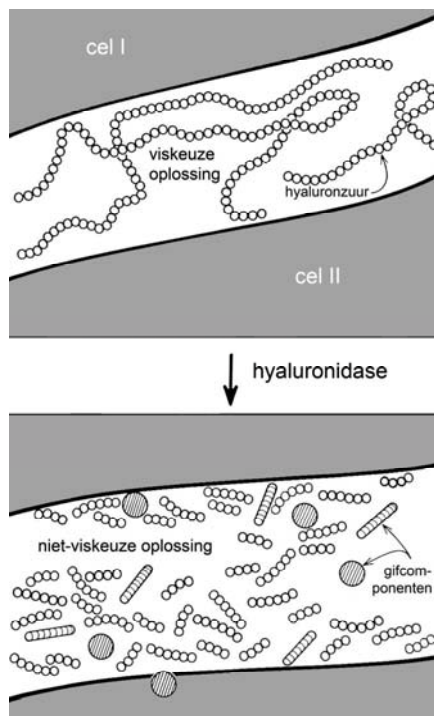


Fig. II.8: Hyaluronzuur is een polysaccharide dat een hoge viskeuze oplossing genereert tussen de cellen. Hyaluronidase breekt dit zuur af, met als gevolg dat gifcomponenten de intracellulaire ruimte kunnen binnendringen en de celmembranen aanvallen (Dotimas & Hider, 1987)

Het enzym katalyseert de hydrolyse van het viskeuze mucopolysaccharide hyaluronzuur tot niet viskeuze tetrasacchariden {glucuronzuur N-acetylglucosamine glucuronzuur N-acetylglucosamine}. Het hyaluronzuur is in de extracellulaire matrix een component van de grondsubstantie die de proteïne filamenten, collageenvezels en het bindende weefsel verbindt. Het treedt op als glijmiddel en het heeft een stabiliserende en schokabsorberende functie. Hydrolyse van hyaluronzuur zal dus de integriteit van de weefsels aantasten, waardoor de diffusie van andere componenten van bijengif vergemakkelijkt wordt. Hyaluronidase wordt om deze reden ook “spreidingsfactor” genoemd (fig. II.8) (Habermann & Hardt, 1972). Het heeft een optimale activiteit in het pH bereik 4-5. Hyaluronidase van de bij heeft een homologie van 50% met deze van andere hymenopteren (Lu *et al.*, 1995) en tot

30% met de verschillende zoogdier hyaluronidases (Markovic-Housley *et al.*, 2000), waarvan PH-20, een membraanproteïne uit sperma, het eerst ontdekte en bekendste is (Gmachl & Kreil, 1993).

Het enzym hydrolyseert ook chondrine sulfaten. Chondrine is een molecule, gelijkaardig aan hyaluronzuur, maar met N-acetylgalactosamine in plaats van N-acetylglucosamine. Chondrine is vooral aanwezig in de huid, waardoor hydrolyse hiervan de structuur van de dermis ondermijnt.

Structuur

Hyaluronidase telt 382 aminozuren. De eerste 28 aminozuren vertegenwoordigen het signaalpeptide en de volgende 5 (29-33) het propeptide. Het mature hyaluronidase bestaat uit de laatste 349 aminozuren (34-382) (Gmachl & Kreil, 1993). Natief bijengif hyaluronidase is een enkelvoudig glycoproteïne van 41 kDa met een carbohydraat deel van 7,5% van de proteïne massa (Kemeny *et al.*, 1984). Het bezit twee disulfide-bruggen (54-345, 221-233) en vier potentiële glycosylatie plaatsen (Markovic-Housley *et al.*, 2000) waarvan deze op Asn263 bewezen is (Hemmer *et al.*, 2004) en waarschijnlijk op positie Asn115. De katalytisch actieve site bevindt zich op Glu145. Het geconserveerde domein (Glyco hydro 56, PF01630) van hyaluronidase behelst 333 AA (36-368). Het gen is gesitueerd op chromosoom 14. In tegenstelling tot eerdere waarnemingen is hyaluronidase zeer stabiel (Kemeny *et al.*, 1984). De driedimensionale structuur werd bepaald door Markovic-Housley *et al.* (2000) via X-straal kristallografie (fig. II.9).

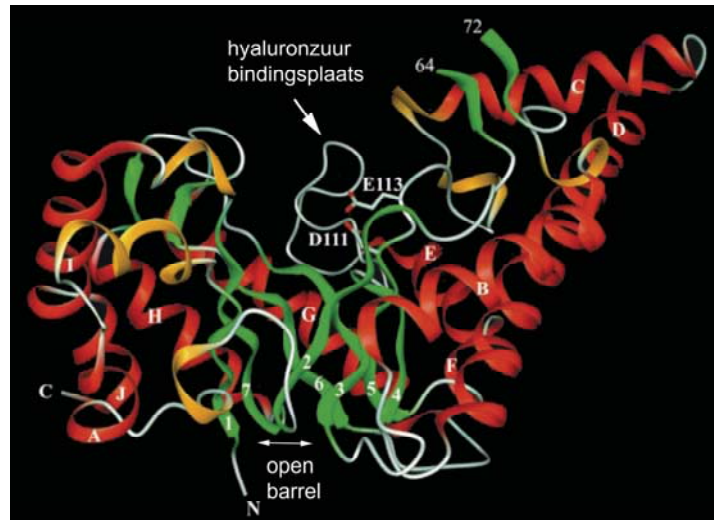


Fig. II.9: Kristalstructuur van hyaluronidase (Markovic-Housley *et al.*, 2000)

Allergeen karakter

Aan het allergeen is de typebenaming Api m 2 toegekend. Hyaluronidase in bijengif is kruisreactief met hyaluronidase aanwezig in gif van andere Hymenoptera. Met kruisreactief bedoelt men dat, wanneer men allergisch reageert op het enzym in bijengif, men ook allergisch zal zijn voor hyaluronidase aanwezig in het gif van andere Hymenoptera (Markovic-Housley *et al.*, 2000). De experimenten verricht door Hemmer *et al.* (2004) veronderstellen IgE bindingen op carbohydraten en op gewone peptide epitopen. De meeste N-gelinkte glycanen van hyaluronidase bestaan uit kleine oligosacchariden (Man(1-3)GlcNAc(2)), de meeste daarvan zijn ofwel α -1,3-monogefucosyleerd of α -1,3-(α -1,6-) digefucosyleerd op de binnenste GlcNAc residuen (Kubelka *et al.*, 1995).

Recombinant

De groep van Kreil (Gmachl & Kreil, 1993) was de eerste om hyaluronidase recombinant te maken in een *E. coli* expressiesysteem. Deze recombinant tot expressie gebracht in een prokaryoot systeem had duidelijk een verminderde allergeenactiviteit vergeleken met de natuurlijk gezuiverd proteïne. Een 10x hogere concentratie van rHya ten opzichte van nHya, in een RAST inhibitietest, is nodig om een vergelijkbare inhibitie van IgE te bereiken. Een ander expressie systeem, het Baculovirus geïnfecteerde insectencellen

systeem (Soldatova *et al.*, 1998) zorgt voor posttranslatorische modificaties zoals heropvouwing en glycosylatie. Het hieruit voortvloeiend proteïne had dezelfde allergische activiteit als het natuurlijke proteïne. Dit wijst erop dat de posttranslatorische modificaties noodzakelijk zijn voor de correcte presentatie van de IgE-bindende epitopen. De enzymatische activiteit kan teniet gedaan worden door puntmutaties op de actieve plaatsen. De IgE en IgG bindingscapaciteit lijkt behouden, maar in RAST inhibitietesten was de activiteit toch significant lager vergeleken met nHya en rHya. Inhibitie proeven bewijzen dat in hoge mate opgezuiverde natuurlijke proteïnen nog sporen van andere gifallergenen bevatten, zoals hyaluronidase in het geval van PLA2 (Muller, 2001). Dit kan verklaren waarom 15% van de individuen zonder voorgeschiedenis van allergische reacties tegen bijensteken toch reageert op bijengif, terwijl niemand reageert op een mix van rPLA2, rHya en sMel (Muller, 1998).

B.3 Zure fosfatase (EC 3.1.3.2)

Functie

Zure fosfatase behoort tot de fosfomonoester hydrolasen. Het enzym wordt ook zure fosfomonoesterase genoemd omdat het de hydrolyse katalyseert van een fosfaat monoester met water tot een alcohol en een fosfaat en optimaal werkt bij een lage pH. Zijn voorkomen in bijengif werd de eerste keer opgemerkt in 1967 (Benton, 1967), het duurde nog tot 1979 voor het een eerste keer geïsoleerd werd (Shkenderov *et al.*, 1979). Deze molecule maakt slechts 1% uit van het drooggewicht van bijengif. Het heeft een moleculair gewicht van 45 kDa. Het komt door disulfidebrug vorming ook voor als dimeer van 90 kDa. Het is een glycoproteïne met minder dan 3% carbohydraten. Het substraat van deze molecule is p-nitrofenylfosfaat (Banks & Shipoloni, 1986).

Structuur

De precursor van zure fosfatase is 388 aminozuren lang. De mature proteïne bezit 373 aminozuren (16-388) met 4 potentiële N-gebonden carbohydraten. Er zijn 2 disulfide bruggen. Het signaalpeptide is 15 aminozuren lang. Het moleculair gewicht van het proteïnedeel is 43,9 kDa met een iso-elektrisch punt van 5,64 (Hoffman *et al.*, 2005). Het vertoont homologie met andere insecten zure fosfatasen, evenals zoogdier prostaat en lysosomale zure fosfatasen (Hoffman, 2006). Ter verduidelijking introduceerde Hoffman nog histidine in de naam zodat we spreken van histidine zure fosfatase. Het enzym is hitte labiel

(Hoffman, 2006). De sequentie van de mature proteïne werd bevestigd door Grunwald *et al.* (2006). Volgens Marz *et al.* (1983) bestaat het carbohydraat deel mogelijks uit mannose, fucose en N-acetylglucosamine, maar geen galactose en N-acetylgalactosamine, dus enkel N-gebonden carbohydraten. Het geconserveerde domein verschilt volgens de bron. In het Pfam systeem heet het Acid_phosphat_A (PF00328) en telt 300 AA (16-315). De andere domeinsystemen noemen HIS_ACID_PHOSPHAT_1 (17-31) op prosite of HisAc_phsphtse (interpro). Doordat het gen van zure fosfatase zich in een sequentie bevindt die nog niet in het genoom kon ingepast worden, kon het nog niet op een bepaald chromosoom geplaatst worden.

Van Etten *et al.* (1991) heeft aangetoond dat een aantal zure fosfasen, van zowel eukaryoten als prokaryoten, twee regio's vertonen met sequentie similariteit rond een geconserveerd histidine. De twee histidines lijken betrokken te zijn in het katalytische mechanisme van de enzymen. His26 is gelokaliseerd in het N-terminale stuk en vormt een fosfohistidine intermediair terwijl His272 gelokaliseerd is in het C-terminale deel en mogelijks een proton donor is. Daardoor wordt deze groep histidine zure fosfasen genoemd. De regio's worden respectievelijk his acid phosphat 1 & 2 genoemd. Wat bij histidine zure fosfatase betreft stemt de eerste regio perfect overeen, de tweede regio van 17 AA verschilt 1 aminozuur (D→E) tengevolge van 1 puntmutatie.

Allergeen karakter

Het enzym staat gecatalogeerd als Api m 3 in de allergeen lijst. Het bezit zowel proteïne als carbohydraat bindende epitopen (Hemmer *et al.*, 2004). De carbohydraat epitopen bevinden zich op fucose (Hemmer *et al.*, 2004). Kemeny *et al.* (1983) bereikte een herkenninggraad van 60% bij personen allergisch aan bijengif. Er moet er echter op gewezen worden dat er soms sporenelementen van andere allergenen aanwezig zijn in opgezuiverde componenten, zoals vroeger aangetoond.

Recombinant

Hoewel zure fosfatase reeds lang gekend is, is de nucleotidensequentie nog maar recentelijk vervolledigd (Hoffman *et al.*, 2005; Grunwald *et al.*, 2006). De door de twee onderzoeksgroepen verkregen sequenties verschillen op 4 basenparen, maar dit heeft geen gevolgen voor de aminozuursequentie. Ze slaagden er ook in de proteïne tot expressie te brengen. Grunwald *et al.* (2006) deden dit in een insectcel expressie systeem (pIB/Mel vector in High Five cellen). Het enzym vertoont de normale enzymactiviteit. Een screening met 40

bijengif sIgE positieve sera leverde een herkenning op in één derde van de gevallen. Ze voerden geen testen uit met natuurlijk opgezuiverd zure fosfatase.

B.4 CUB serine protease (EC 3.4.21.4)

Functie

Bijengif protease heeft een moleculair gewichtsband van 39 kDa op een SDS-PAGE gel. Dit protease behoort tot de groep van de serine endopeptidases. Het gifprotease is een serine protease van het trypsine type met een CUB-domein. Dit domein medeert proteïne-proteïne interacties tijdens de ontwikkeling en in proteïnecascades. De enzymactiviteit van de proteïne is nog onbekend (Winningham *et al.*, 2004).

Structuur

De precursorproteïne is opgebouwd uit 405 aminozuren. Het signaalpeptide bestaat uit 12 aminozuren. Het mature proteïne bezit 393 residuen (13-405). Er zijn drie katalytisch actieve sites, His203, Asp257 en Ser305. Het mechanisme berust op de nucleofiele aanval van een serine aminozuur op zijn peptide substraat. Deze nucleofiele eigenschap wordt veelal versterkt door een histidine, dat in een protonacceptor staat wordt gehouden door een aspartaat. Deze drie aminozuurresiduen vormen dan samen de katalytische triade. Er zijn vier potentiële N-geglycosyleerde sites, waarvan zeker 1 geglycosyleerd is. Er zijn twee onafhankelijke domeinen, een CUB domein (47-130) en een trypsine-achtig serine protease domein (161-392). Het protease domein is een lid van de S1A subfamilie. Deze domeinen variëren licht afhankelijk van de bron. Het enzym heeft ook een eerder uitzonderlijk Met347 aan het begin van de substraat bindingsplaats.

Allergeen karakter

Het enzym werd erkend als allergeen Api m 7, met een IgE bindende reactiviteit van 80%. De 39 kDa allergeenband is ook door Jeep *et al.* (1996) en Kettner *et al.* (1999) terug gevonden. Het schijnt een allergeen te zijn met zowel carbohydraat als proteïne epitopen (Winningham *et al.*, 2004). Een eigenaardigheid is dat het mature proteïne reeds een theoretisch moleculair gewicht van 44 kDa heeft zonder glycosylatie.

Recombinant

CUB serine protease is tot expressie gebracht in een Baculovirus systeem (pMelBac vector) (Schmidt *et al.*, 2006). Het kon echter niet gesecreteerd worden, mogelijks door proteïne-proteïne interacties van het CUB domein.

B.5 α -D-glucosidase (EC 3.2.1.20)

Shkenderov *et al.* (1979) hebben in 1979 α -D-glucosidase geïsoleerd uit commercieel beschikbaar bijengif. Er zijn momenteel drie types α -D-glucosidase beschreven bij bijen (Kubota *et al.*, 2004): type I in de ventriculus, type II in de ventriculus en de haemolymfe en type III in de hypofaryngaalklieren. α -D-glucosidase III lijkt zeer sterk op deze waargenomen in honing. In sommige fracties van bijengif stelden Winningham *et al.* (2004) α -D-glucosidase activiteit vast. Het voorkomen in bijengif is waarschijnlijk te wijten aan contaminatie met andere bijensecreten ten gevolge van elektrische melking.

B.6 Lysofosfolipase (EC 3.1.1.5)

In 1964 werd voor het eerst een lage fosfolipase B (PLB) activiteit gedetecteerd in bijengif door Doery & Pearson (1964). Lysolectine (2-lysofosfatidylcholine), het gewone substraat, wordt door PLB gehydrolyseert tot glycerofosfocholine, met vrijstelling van het overblijvende vetzuuranion op positie C3 (fig. II.5). Deze observatie werd bevestigd door Ivanova & Shkenderov in 1982 (1982). Het moleculaire gewicht bedraagt 22 ± 2 kDa en het iso-elektrisch punt ligt rond 8,8. Het enzym zou 2,6% carbohydraten bevatten en thermolabiel zijn. Doordat PLA2 geïnhibeerd wordt door lysolectine bij concentraties boven 0,2 μ g/ml, kan de aanwezigheid van PLB de efficiëntie van PLA2 verhogen. Dit gebeurt door de verwijdering van het lysolecithine product uit de reactie gekatalyseerd door de PLA2 (fig. II.5) (Drainas *et al.*, 1981). Daarenboven verwacht men dat het extra vetzuuranion gegenereerd door PLB de activering van PLA2 verhoogt (Drainas & Lawrence, 1978). De enige gepubliceerde aminozuursequentie van PLB bij Hymenoptera is deze van *Vespa orientalis*.

B.7 Carboxylesterase (acetylcholinesterase; EC 3.1.1.7)

Bijengif carboxylesterase is een enzym van 68 kDa met IgE bindingscapaciteit. Een hypothetische sequentie is geconstrueerd met een moleculair gewicht van 60 kDa, deze heeft vier potentiële N-bindende carbohydraten (Hoffman, 2006). Het gen ligt op chromosoom 3 maar de volledige sequentie is nog niet gekend aangezien er nog onzekerheid is over het C-terminaal deel. Eerder werd er reeds een IgE bandje van 69 kDa gedetecteerd door Kettner *et al.* (1999) dat met de huidige kennis hetzelfde proteïne blijkt te zijn.

B.8 Hexamerin 2-like

Dit proteïne van 78 kDa, waarvan de eerste 51 aminozuren gekend zijn, is verwant met hexamerine 2 (Hoffman, 2006). Hexamerines zijn een familie van hemocyanine gerelateerde insect haemolymfe proteïnen. Ze bevatten hoge concentraties aromatische aminozuren (arylfurinen). De biosynthese is beperkt tot het vetlichaam. Ze accumuleren in cytoplasmatische proteïne granulen en zijn dus opslagproteïnen die als aminozuur reserve dienen (Danty *et al.*, 1998). Deze proteïnen vertonen differentiële splitsing waardoor er een aantal isovormen (Hoffman, 2006).

B.9 Dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5)

Kolarich & Altmann melden in Hoffman 2006 (Hoffman, 2006) de aminozuursequentie (763 AA) van dipeptidyl peptidase IV op basis van massa spectrometrische data. Dit proteïne, dat membraan gebonden is, staat in voor de afsplitsing van het propeptide van melittine (zie verder) (Kreil *et al.*, 1980). De voorgestelde proteïne heeft een theoretisch moleculair gewicht van 87 kDa en een pI van 5,74.

C. Peptide componenten

C.1 Melittine

Melittine is de hoofdcomponent in bijengif. Het maakt ongeveer 50% uit van het drooggewicht. Het moleculaire gewicht bedraagt 2840 Da. LD₅₀ is 4 mg/kg bij intraveneuze injectie in muizen (Habermann, 1972). Het werd voor het eerst beschreven in 1954 door Neumann & Haberman (1954). Het bevindt zich op chromosoom 4.

Structuur

Het precursorpeptide is opgebouwd uit 70 aminozuren. Het signaalpeptide bestaat uit 21 aminozuren. Het mature peptide met een lengte van 26 aminozuren (44-69) ontstaat door de afsplitsing van een propeptide (22-43) door een dipeptidylpeptidase (Kreil *et al.*, 1980). Dit propeptide is negatief geladen zodat het niet kan associëren met de fosfolipiden. De mature proteïne is voornamelijk opgebouwd uit hydrofobe of tenminste ongeladen aminozuren. Aan het C-terminale uiteinde komt er echter een sequentie voor van 6 hydrofiële residuen (fig. II.10). Er is gedeeltelijke α -N-formyl op positie 44. In de mature proteïne wordt het laatste C-terminaal, Gly70, oxidatief afgesplitst, waardoor er een terminaal glutamine amide ontstaat.

Melittine is een klein kationisch detergensachtig membraanactief cytotoxisch peptide met anti-inflammatoire werking. Het wordt dan ook niet in actieve vorm gesecreteerd omdat het waarschijnlijk het gifapparaat zou beschadigen. Dit mechanisme werd voornamelijk ontrafeld door de groep van Kreil. Promelittine wordt niet terug gevonden in volwassen bijen, wel bij onvolwassen bijen. Het bevat veel zure aminozuren en proline residuen (Kreil, 1973).

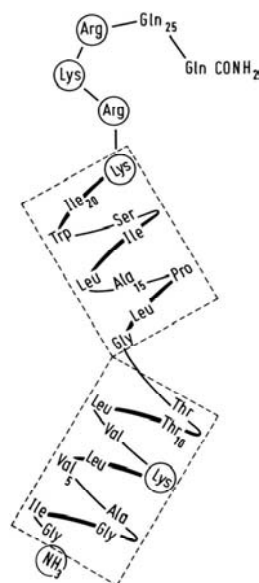


Fig. II.10: Schematisch model van de structuur van in water opgelost en membraan gebonden melittine. De twee α -helix segmenten van residuen 1-11 en 2-21 zijn 60° gebogen ten opzichte van elkaar. Het COOH-terminaal segment van residuen 22-26 zijn nonhelicaal. De convexe zijde van de gebogen helix is hydrofiel, de concave zijde hydrofoob. De cirkels wijzen op positief geladen residuen. (Vogel & Jahnig, 1986)

Ondanks zijn hoge hydrofobiciteit is melittine zeer goed oplosbaar in water (> 250 mg/ml). In een waterige oplossing neemt melittine verschillende conformaties en aggregatietoestanden aan, afhankelijk van verschillende factoren zoals de peptide concentratie, pH, ionensterkte, hoge zoutconcentratie en de aard van het negatieve overeenkomstige ion. Afhankelijk van deze factoren komt melittine voor als een monomeer in

water of als een tetrameer. Het waterige monomeer heeft in 90% van de gevallen, met Trp62 totaal blootgesteld aan het waterige solvent, geen detecteerbare secundaire structuur, terwijl de overblijvende 10% een α -helix vertoont (Talbot *et al.*, 1979). Het tetrameer overwegend bestaat uit monomeren in een helix conformatie. De globale vorm van het monomeer is een gebogen staaf. In een kristallijn tetrameer zijn de α -helix monomeren 120° gebogen en in een ruitvorm geschikt zodat de hydrofobe regio's maximaal afgeschermd worden door een hydrofiele jas (fig. II.11) (Dempsey, 1990). In deze conformatie wordt melittine in de gifblaas teruggevonden.

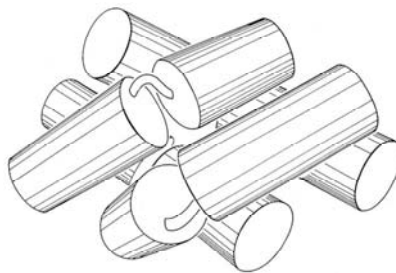


Fig. II.11: De tetramere structuur van het melittine komt voor in een waterig milieu bij een hoge ionensterkte. (Dotimas & Hider, 1987)

De monomeer conformatie lijkt aangenomen te worden vanaf het moment dat melittine geïnjecteerd wordt en in contact komt met het celmembraan. Het bindt snel op de erythrocyten, waar het de vrijstelling van haemoglobine in het extracellulaire medium veroorzaakt. Aangezien er 1.8×10^7 bindingsplaatsen voor melittine per erythrocyt zijn, lijkt het erop dat de plaats van interactie eerder de lipidenmembraan dan specifieke receptoren is. De lysis ontstaat wanneer de organisatie van de dubbele lipidenlaag verstoord wordt. De haemolyse wordt veroorzaakt door een colloïd osmotisch mechanisme wat resulteert in de vorming van melittine geïnduceerde letsels of poriën. Melittine kan op verschillende manieren in wisselwerking treden met de membranen afhankelijk van de lipiden samenstelling van de dubbele laag. In de kanaalvorming lijkt de tetramere conformatie van melittine vereist te zijn. Vogel & Jahnig (1986) hebben de driedimensionale vorm van melittine in het lipidenmembraan bepaald (fig. II.12). Ze vonden een α -helix van 21 aminozuren (44-69). De eerste 11 residuen van de helix zijn gebogen onder een hoek van 60° ten opzichte van de volgende 10 residuen. De convexe zijde van de helix is hydrofiel en de concave zijde is hydrofoob. De laatste C-terminale residuen vormen een hydrofiel domein. Daarom ziet de globale structuur van melittine eruit als een gebogen staaf. Melittine vormt tetramere poriën in

membranen. Met hun hydrofiele kant vormen ze de binnenkant van de porie terwijl hun hydrofobe regio met het lipidenmembraan interageert. De oriëntatie is zo dat het C-terminale deel van melittine gelokaliseerd is aan de buitenzijde van de cel. De tetrameervorming wordt door fosfaat gestabiliseerd. Eens melittine in het lichaam komt, wordt het verdund en komt het in contact met de dubbele fosfolipidenmembranen van de cellen. Melittine heeft een hoge affiniteit voor het lipide-water grensvlak zoals lipide monolayers op waterige oplossing (Sessa *et al.*, 1969). Monomeer melittine bindt vrij snel en met hoge affiniteit op micellulaire structuren van detergents of fosfolipiden. Wanneer melittine gebonden is op lipiden neemt het voornamelijk een α -helix vorm aan.

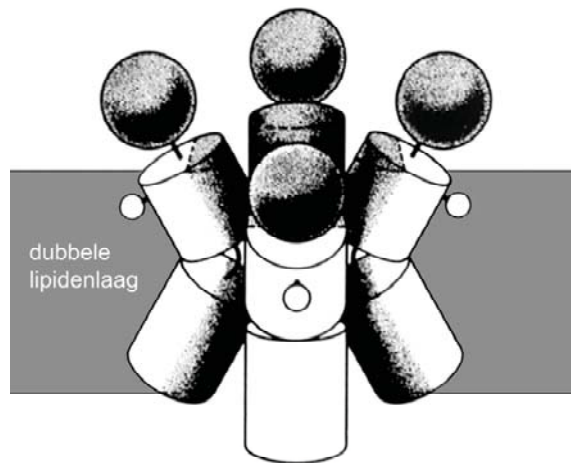


Fig. II.12: Schematisch model van tetrameer melittine in membranen. De bollen stellen de nonhelicale COOH-terminale segmenten van melittine voor; de cylinders, de membraangebonden α -helix segmenten met de hydrofobe zijden (wit) naar de dubbele lipidenmembraan gericht en de hydrofiele zijden (zwart) naar binnen gericht. Op die manier wordt er een polaire kern in de dubbele lipidenmembraan gevormd. De tryptofaan residuen (kleine cirkels) tonen de positie van de fluorescente donoren en acceptoren. (Vogel & Jahnig, 1986)

Zoals lipiden de structuur van melittine uitgesproken beïnvloeden, zo verandert melittine de structuur en derhalve de functie van enkele en dubbele lipidenlagen, in het bijzonder door de elektrostatistische interactie tussen het C-terminale deel van het peptide en de polaire kop van de lipiden of fosfolipiden. Als lytisch agens is melittine extreem efficiënt. Bij peptide tot lipide verhoudingen van $1:10^4$ veroorzaakt melittine de vrijstelling van ingesloten substanties uit fosfolipiden vesikels.

Melittine werkt synergetisch met PLA2, in aanwezigheid van melittine zal PLA2 een betere toegang krijgen tot zijn fosfolipiden substraten. De toxiciteit van het bijengif is dus vooral een gevolg van de samenwerking van melittine en fosfolipase A2.

Calcium beïnvloedt de werking van het allergeen. Dit werd aangetoond door een complex tussen het calcium regulatorisch calmoduline en het melittine (Banks & Shipoloni, 1986). Het integreert zich in de celmembranen en heeft diverse effecten, waarschijnlijk als een resultaat van zijn interactie met negatief geladen fosfolipiden. Het inhibeert transportpompen zoals Na^+/K^+ -ATPase en H^+/K^+ -ATPase. Het verhoogt de permeabiliteit van de celmembranen tegen ionen, in het bijzonder Na^+ en indirect Ca^{2+} , vanwege de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisseling (Dempsey, 1990).

Allergeen karakter

Melittine (Api m 4) is een minder belangrijk allergeen dan PLA2 en Hya, hoewel het procentueel in drooggewicht de belangrijkste component van bijengif is (King *et al.*, 1976; Sobotka *et al.*, 1976; Paull *et al.*, 1977). Api m 4 heeft één T-cel epitoom en één B-cel epitoom (King *et al.*, 1998).

Vanuit een ander medisch standpunt is melittine zeer interessant omdat het de opname van sommige geneesmiddelen kan verhogen indien deze gekoppeld worden met melittine.

Recombinant

Melittine van *Apis mellifera* is, als relatief kort peptide, synthetisch beschikbaar, het werd nog niet recombinant bereid. Recombinant bioactief melittine van *Apis cerana* werd tot expressie gebracht in *E. coli* expressie systeem (Shi, 2004).

C.2 Protease inhibitor/Api m 6

Api m 6 is een trypsine inhibitor. Het moleculaire gewicht schommelt tussen 7.2 en 7,8 kDa en de pI bedraagt ~10. Het maakt 1-2% uit van het drooggewicht in bijengif. Van Api m 6 zijn er vier mature isovormen gekend van respectievelijk 67, 69, 71 & 73 aminozuren lang. Isovormen 1 & 2 missen de eerste 4 aminozuren en isovormen 1 & 3 de twee voorlaatste aminozuren (Kettner *et al.*, 2001). Er zijn 5 disulfide bruggen aanwezig, wat specifiek is voor het aanwezige TIL domein (PF01826). Api m 6 is gelegen op chromosoom 16.

De groep van Shkenderov rapporteerde als eerste dat bijengif een inhibitor bezit die de proteolytische activiteit van trypsine inhibeert (Shkenderov, 1973). Deze inhibitor zou ongeveer 0,8% van het gif uitmaken en bezit een moleculaire massa van ongeveer 9000 Da. Het bevat 63-65 aminozuren, is thermostabiel en stabiel bij een zure pH, heeft geen vrije SH-groepen en bezit geen threonine, methionine en histidine en lysine als N-terminaal residu.

Inhiberende activiteit werd bereikt tegen een breed spectrum van proteolytische enzymen behalve tegen kallikreïne en urokinase (Shkenderov, 1976). Op basis van deze gegevens kon niet uitgemaakt worden of deze protease inhibitor Api m 6 is.

Twee componenten met gelijkaardige aminozuursamenstelling werden geïsoleerd in Vernom's laboratoria maar ze zijn niet geïdentificeerd als Shkenderov's protease inhibitor in termen van activiteit (Banks & Shipoloni, 1986). De twee componenten verschillen van elkaar doordat bij H1 de eerste 4 aminozuren aan het N-terminaal uiteinde ontbreken ten opzichte van H3. De sequentie van de langste component is enkel bepaald voor de eerste 35 residuen. De sequentie vertoonde geen homologie met de proteolytische enzym inhibitoren van ander dierlijk weefsel of slangengif. De sequentie kon niet teruggevonden worden in Kreil's cDNA bibliotheken van zijn bijengif klonen (Banks & Shipoloni, 1986). Deze peptiden blijken fragmenten te zijn van Api m 6. Zoals de naam doet vermoeden is Api m 6 een allergeen, dat bij 42% van de personen met een bijengif allergie gedetecteerd wordt (Kettner *et al.*, 2001).

C.3 Apamine

Apamine is een neurotoxine. Het blokkeert een klasse van voltage onafhankelijke calcium geactiveerde kalium kanalen (Banks *et al.*, 1979). Het maakt ongeveer 2% uit van het drooggewicht van bijengif en het moleculaire gewicht bedraagt 2032 Da. Het gen is gesitueerd op chromosoom 12.

Het precursorpeptide bestaat uit 46 aminozuren. De eerste 19 aminozuren (1-19) vormen het signaalpeptide. Daarna volgt een propeptide stuk van 8 aminozuren (20-27). Het eigenlijke peptide is 18 aminozuren (28-45) lang. Arg40 en Arg41 zijn essentieel voor de toxische activiteit (Vincent *et al.*, 1975). Er worden twee disulfide bruggen gevormd (28-38 & 30-42) (Callewaert *et al.*, 1968). Ook hier gebeurt er een C-terminale posttranslatorische modificatie, door de oxidatieve afsplitsing van Gly46 ontstaat er een histidine amide. Leu37 is het enige hydrofobe residu in apamine. Via NMR en afstand geometrie werd de structuur bepaald door Pease & Wemmer (1988). Apamine en MCD bezitten hetzelfde terminale exon in de 3' UTR ("untranslated region") (Gmachl & Kreil, 1995).

Van alle gekarakteriseerde componenten in bijengif is apamine het meest toxische voor zoogdieren (Habermann & Reiz, 1965). Apamine doorbreekt de bloed/hersenbarrière waar zijn actieterrein het centrale zenuwstelsel is (Habermann & Chengraude, 1975). Dit wil niet zeggen dat er geen apamine receptoren in het perifere systeem gelokaliseerd zijn

(Vladimirova & Shuba, 1978). Stuiptrekkingen bij muizen worden veroorzaakt vanaf concentraties van 0,5 mg/kg. Apamine concentreert zich in de nieren van muizen (Just *et al.*, 1977). De LD₅₀ bij muizen bedraagt 4 mg/kg en bedraagt de helft bij ratten (Habermann & Chengraude, 1975). De dood is gewoonlijk te wijten aan respiratoir falen.

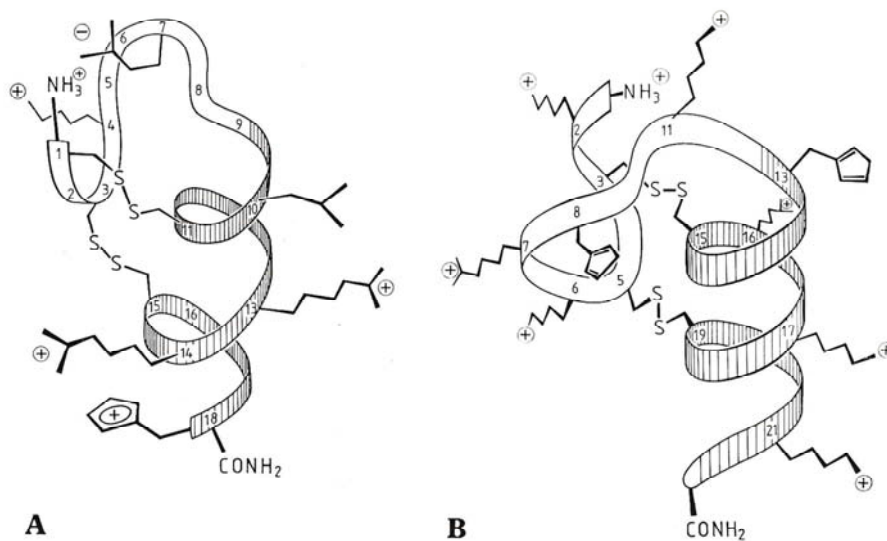


Fig. II.13: Schematische drie dimensionale structuur van apamine (A) en MCD (B). (Dotimas & Hider, 1987)

Apamine vertoont, in tegenstelling tot melittine, een hoge graad van stabiliteit over een breed pH bereik en bij verandering van solvent polariteit (Walde *et al.*, 1981). Er wordt wel gedeeltelijk een α -helix structuur gevormd. De stabiliteit is te danken aan de twee disulfide bruggen en minstens zeven waterstof bindingen (fig. II.13 A). Het breken van de waterstofbruggen leidt tot een sterk verminderde toxiciteit. Het lijkt dat het toedienen van apamine in zeer lage dosissen de normale hyperpolariserende respons tot adrenaline kan converteren naar een calciumafhankelijke polymerisatie (den Hertog, 1981).

De hoge affiniteit van apamine voor zijn receptor kan niet enkel verklaard worden door de aanwezigheid van guanidinium groepen van arginines. Histamine amide is ook betrokken bij de bindingsactiviteit en in iets mindere mate met de toxiciteit. De impact van het laatste Gln44 is veel groter, want zonder dit element vermindert de toxiciteit 200x en is de bindingscapaciteit 10000x lager, wat erop wijst dat Gln ook nodig is voor een sterke affiniteit met de kaliumkanalen (Labbé-Jullié *et al.*, 1991).

Apamine is een zeer potente en hoogselectieve antagonist van kleine geleidende Ca^{2+} -geactiveerde K^{+} -kanalen: de SK_{Ca} -kanalen (Hugues *et al.*, 1982). Dit type kanalen is betrokken in het mediëren van trage na-hyperpolarisatie (AHP) wat gebeurt na een reeks van actiepotentialen die neurale prikkels reguleren (Dreyer, 1990). Deze SK_{Ca} -kanalen zijn voornamelijk gelokaliseerd in het centrale zenuwstelsel, waar ze in hoge densiteit aanwezig zijn in corticale en limbische structuren (Janicki, 1989). Op die manier kan apamine dienen om de perceptie te verhogen (Van Der Staay *et al.*, 1999). Ze konden dit beter aantonen bij muizen dan bij ratten, waarschijnlijk omdat de neveneffecten bij ratten belangrijker werden.

C.4 Mestcel degranulerend proteïne (MCD)

Mestcel degranulerend proteïne, ook soms peptide 401 genoemd, is een potent anti-inflammatoir agens. Bij lage concentraties medieert het echter de degranulatie van mestcellen, waardoor een inflammatoire respons uitgelokt wordt. Het gedraagt zich ook als een neurotoxine dat in staat is om een klasse van voltage afhankelijke kalium kanalen te blokkeren. MCD heeft een moleculair gewicht van 2592 Da en een pI van 9,96 (10,5). Zoals voor apamine vastgesteld, ligt het dus ook op chromosoom 12.

Het precursorpeptide is 50 aminozuren lang. Het signaal peptide bezit 19 aminozuren (1-19). Het propeptide deel bestaat uit 8 aminozuren (20-27). Het eigenlijke peptide is opgebouwd uit 22 aminozuren (28-49). Net zoals bij apamine worden er twee disulfide bruggen gevormd (30-42 & 32-46) en biedt Gly50 een amide aan aan het laatste mature aminozuur, Asn49, zodat er een asparagine amide gevormd wordt. Er zijn bijkomend nog drie gedeeltelijke N6-formyllysine posttranslatorische modificaties (29, 44 & 48).

De naam MCD werd gegeven door Habermann omdat het de mestcellen degranuleert met vrijstelling van histamine zonder lysis te veroorzaken (Fredholm, 1966; Jasani *et al.*, 1979). Het bindt ook specifiek aan hoge affiniteitssites in de hersenen bij ratten (Taylor *et al.*, 1984). De structuur van MCD lijkt sterk op deze van apamine: eerst een willekeurig gewonden deel met een paar β -bochten en daaropvolgend een α -helix structuur (41-49) (Dotimas *et al.*, 1987). In verschillende studies worden er verschillende vormen van MCD waargenomen (Gauldie *et al.*, 1976; Walde *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1984; Dotimas *et al.*, 1987). Die verschillen zijn momenteel nog niet eenduidig uitgeklaard. MCD heeft een grotere hydrofobe regio (35-40) en een hogere netto lading (8+ of 10+) dan apamine (4+) (fig. II.13) (Dotimas *et al.*, 1987). Zoals reeds eerder besproken zijn er grote structurele en genomische gelijkenissen tussen apamine en MCD, maar hun biologische effecten zijn tamelijk

verschillend. Apamine heeft geen effect op peritoneale mestcellen van de darm en MCD op zijn beurt heeft geen effect op non-cholinergische, non-adrenergische stimulering van intestinale gladde spieren en produceert geen neurotoxische symptomen.

De anti-inflammatoire activiteit van MCD werd voor het eerst vastgesteld in 1969 (Billingham *et al.*, 1969). Het probleem is echter dat deze activiteit tot nu toe niet eenduidig kon aangetoond worden. MCD heeft een zekere dualiteit in zich omdat het bij lage concentraties een inflammatoire activiteit heeft (Breithaupt & Habermann, 1968) en bij hoge concentraties een anti-inflammatoire activiteit vertoont (Billingham *et al.*, 1973; Hanson *et al.*, 1974; Banks *et al.*, 1976). Dit houdt ook in dat zowel de IgE als de niet-IgE acties op het mestceloppervlak bekeken moeten worden (Buku, 1999).

Voor de degranulatie van mestcellen, met vrijstelling van histamine, 5-hydroxytryptamine en heparine, is een intact cellulair metabolisme nodig (Lawson *et al.*, 1977). Veel van de stimuli voor histamine vrijstelling zijn afhankelijk van extracellulair calcium. In tegenstelling daarmee vereist MCD intracellulair calcium (Douglas & Ueda, 1973; Atkinson *et al.*, 1979). Door dit mechanisme wordt MCD verondersteld tussen te komen in allergische en inflammatoire processen (Buku, 1999).

MCD kan histamine vrijstellen uit mestcellen in afwezigheid van IgE. Er wordt aangenomen dat dit gebeurt omdat MCD basische en hydrofobe clusters van aminozuren bezit die gelijken op het deel van de IgE bindingsplaatsen op de FcεRI mestcel receptor en deze nabootsen (Buku, 1999). Het zijn enkel de basische aminozuren van de α-helix die hierbij een rol spelen. MCD stelt bij lage concentraties en in aanwezigheid van IgE ook histamine vrij. Er wordt verondersteld dat bij lage concentraties een enkel MCD zich gedraagt als een allergeen: door twee aangrenzende IgE's aan hun Fab deel te verbinden wordt de FcεRI receptor te geactiveerd en de cel aangezet tot degranulatie van histamine (Birr & Wengert-Müller, 1981).

Het wordt voorgesteld dat de anti-inflammatoire activiteit van MCD bij hogere concentraties (45-50 µg/ml) te wijten is aan de vorming van intermoleculaire disulfide complexen tussen MCD en IgE. Dit leidt tot de vorming van vier mercaptoïde bindingen (Birr & Wengert-Müller, 1981). Onder fysiologische omstandigheden kan dit resulteren in de disulfide uitwisseling met voorhanden zijnde gereduceerde disulfide bindingen in de scharnierregio van de IgE molecule (Dorrington & Benich, 1978). Zo ondergaat de IgE molecule structurele veranderingen in zijn scharnierregio en kan het, wanneer het een antigeen bindt, het histamine vrijstellende signaal niet naar de mestcel receptor bindingsplaats van IgE overbrengen (Buku, 1999).

C.5 Secapine

Secapine werd voor het eerst beschreven in 1976 door Gauldi *et al.* (1976). Het is niet toxisch en de functie of activiteit is ongekend. Het maakt 0,5% uit van het drooggewicht van bijengif. Het mature peptide heeft een moleculair gewicht van 2869 Da en een pI van 9,84. Het is net als melittine sterk hydrofoob. Het gen ligt op chromosoom 5 en kon nog niet geplaatst worden bij een proteïne familie.

Het precursor peptide van secapine heeft een lengte van 77 aminozuren. Het signaalpeptide telt 32 aminozuren (1-32), het propeptide deel is 20 aminozuren (33-52) lang en het eigenlijke secapine heeft een lengte van 25 aminozuren (53-77). Er wordt een disulfidebrug (61-72) gevormd. Dezelfde (mature) sequentie werd door Takahashi *et al.* (1995) beschreven als apisin, een peptide met myotropische activiteit.

C.6 Tertiapine

Tertiapine werd eveneens voor het eerst beschreven door Gauldi *et al.* (1976). Het is een neurotoxine dat in minieme hoeveelheden (< 0,1% drooggewicht) aanwezig is. Er zou ongeveer 70 ng per steek geïnjecteerd worden. Het moleculaire gewicht bedraagt 2640 Da en het heeft een pI van 9.5. Het tertiapine gen bevindt zich op chromosoom 12.

Enkel de mature sequentie van het peptide is gekend, het telt 21 aminozuren. Er zijn twee disulfidebruggen (3-14 & 5-18) aanwezig. Er treedt terminaal een posttranslatorische modificatie op waardoor een lysine-amide ontstaat. Het peptide heeft 6 positief geladen residuen per molecule, waarvan er vier in het C-terminale deel bevinden (Kitamura *et al.*, 2000). Ondanks zijn eerder gelijkende secundaire structuur met apamine en MCD is de tertiaire structuur duidelijk verschillend (Xu & Nelson, 1993).

Tertiapine is een hoge affiniteitsinhibitor van eukaryote inwendige rectificerende K⁺-kanalen doordat het bindt aan het einde van de buitenste iongeleidende porie (Ramu *et al.*, 2004). Deze kanalen verschillen zowel functioneel als structureel van de eerder aangehaalde voltage geactiveerde K⁺-kanalen (Jin & Lu, 1998).

C.7 Adolapine

Adolapine is een basisch polypeptide met een moleculair gewicht van 11500 Da. Het vertoont anti-inflammatoire en pijnstillende eigenschappen en inhibeert cyclo-oxygenase. Het zou ook de activiteit van PLA2 inhiberen doordat het inwerkt op de prostaglandine synthese. Adolapine zou ook koortswerend zijn. Het werd voor het eerst beschreven in 1982 door

Shkenderov & Koburova. Het telt 103 aminozuren, het eerste is een glycine, terwijl cysteine, methionine en tryptofaan er niet in voorkomen (Shkenderov & Koburova, 1982).

C.8 Minimine

Minimine is een basisch peptide van ongeveer 50 aminozuren en 6000 Da, waar alle gewone aminozuren in voorkomen. Het werd beschreven door Lowy *et al.* (1971). Zij toonden aan dat het een effect heeft op de ontwikkeling van instar III *Drosophila* larven die een LD₅₀ dosis overleven. De overlevende larven stoppen met eten waardoor de nochtans normaal functionerende volwassen exemplaren die zich daaruit ontwikkelen één vierde kleiner zijn dan de normaal behandelde exemplaren. Vandaar de naam van het peptide.

C.9 Procamines

De procamines zijn homologe peptiden met histamine als C-terminaal residu. Ze zijn in de jaren '60 en '70 beschreven door O'Connor en collega's in honingbijen afkomstig uit Canada. Ze kregen radioprotectieve eigenschappen toegekend (Nelson & O'Connor, 1968).

TABEL II.1: SAMENVATTING VAN DE BIJENGIF PROTEÏNEN EN PEPTIDEN DIE OOK IN BIJENGIF VASTGESTELD WERDEN

Component	Genbank nr. ^{a)}	Chromosoom ^{b)}	Allergeen ^{c)}	MW (Da) ^{d)}	pI ^{d)}	Signaal-peptide	Propeptide	Mature proteïne	Recombinant	Percentage in gif ^{e)}
fosfolipase A2	NP_001011614	13	Api m 1	19058 (15249)	7,05 (8,07)	18	15	134	x	10-12
hyaluronidase	NP_001011619	14	Api m 2	44260 (40747)	8,67 (8,72)	28	5	349	x	1-2
zure fosfatase	NP_001011377	UN	Api m 3	45389 (43905)	5,63 (5,63)	15		373	x	1
CUB serine protease	NP_001011584	UN	Api m 7	45517 (44000)	8,64	12	/	393	x	
α -D-glucosidase	NP_001035349 NP_001035326 NP_001011608									0,6
lysofosfolipase				(22000)	(8,80)					1
carboxylesterase	NP_001035320	3		70673 (68165)	5,41 (5,23)					
hexamerine 2	NP_001011600			79529	6,72					
dipeptidyl peptidase IV				(87000)	(5,74)					
melittine	NP_001011607	4	Api m 4	7585 (2847)	4,69 (12,02)	21		26	x	40-50
Api m 6	NP_001035358 NP_001035360 (variant)	16	Api m 6	7598	9,70					0,1-0,8
apamine	NP_001011612	12		5223 (2032)	8,77	19	8	18		1-3
mestcel degranulerend proteïne	NP_001011611	12		5781 (2592)	9,87 (10,05)	19	8	22		1-2

secapine	NP_001011618	5	8679 (2869)	9,51 (9,84)	32	20	25	0,5-2
tertiapine	P56587	12	(2640)	(9,50)			21	0.1
adolapine							103	1
minimine			(60000)				50	
procamines								1-2

- a) Genbanknummer van NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- b) Chromosoom van de honingbij waarop het gen van het proteïne gelegen is. UN duidt op het feit dat het gen momenteel nog niet op een chromosoom gelokaliseerd is.
- c) Allergenen die opgenomen zijn in de officiële allergenlijst van IUIS. De letter en cijfercode komen overeen met de eerste drie letters van het genus van het organisme, de volgende letter met het species. Het cijfer geeft het allergeen nummer van dit organisme.
- d) Theoretisch moleculair gewicht (MW) en pI zijn on-line berekend met Expasy's Compute pI/MW programma (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool); data tussen haakjes zijn van de mature proteïnen.
- e) percentage van het drooggewicht in bijengif

Referenties

- Aalberse, R. C., Schuurman, J., van Ree, R. & Stapel, S. 1998. IgG4 antibody assays in allergy diagnosis. *Res Immunol* 149: 263-266.
- Akdis, C. A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S. S., Muller, U. & Blaser, K. 1996. Epitope-Specific T Cell Tolerance to Phospholipase A2 in Bee Venom Immunotherapy and Recovery by Il-2 and Il-15 in Vitro. *Journal of Clinical Investigation* 98: 1676-1683.
- Altmann, F., Kubelka, V., Staudacher, E., Uhl, K. & Marz, L. 1991. Characterization of the Isoforms of Phospholipase-a(2) From Honeybee Venom. *Insect Biochemistry* 21: 467-472.
- Annand, R. R., Kontoyianni, M., Penzotti, J. E., Dudler, T., Lybrand, T. P. & Gelb, M. H. 1996. Active Site of Bee Venom Phospholipase a(2): the Role of Histidine-34, Aspartate-64 and Tyrosine-87. *Biochemistry* 35: 4591-4601.
- Atkinson, G., Ennis, M. & Pearce, F. L. 1979. Effect of Alkaline-Earth Cations on the Release of Histamine From Rat Peritoneal Mast-Cells Treated With Compound 48-80 and Peptide 401. *British Journal of Pharmacology* 65: 395-402.
- Banks, B. E., Brown, C., Burgess, G. M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T. M. & Jenkinson, D. H. 1979. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature* 282: 415-7.
- Banks, B. E. C., Hanson, J. M. & Sinclair, N. M. 1976. Isolation and Identification of Noradrenaline and Dopamine From Venom of Honey Bee, *Apis-Mellifica*. *Toxicon* 14: 117-125.
- Banks, B. E. C. & Shipoloni, R. A. 1986. Chapter 7: Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In Piek T. (Ed) *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects* (pp. 329-415). Academic Press.
- Benton A., Morse R. & Stewart J. 1963. Venom collection from honey bees. *Science* 142: 228-230.
- Benton, A. W. 1967. Esterases and phosphatases of honey bee venom. *Journal of Apicultural Research* 6: 91-94.
- Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, R. A. & Vernon, C. A. 1973. Antiinflammatory Peptide From Bee Venom. *Nature* 245: 163-164.
- Billingham, M., Robinson, B. & Robson, J. M. 1969. Partial purification of the anti-inflammatory factor(s) in inflammatory exudate. *British journal of pharmacology* 35: 543-57.
- Birr, C. & Wengert-Müller, M. 1981. Molecular perspectives of synthetic mast cell degranulating peptide. In Eberle A., Geiger R. & Wieland Th. (Eds) *Perspectives in peptide chemistry* (pp. 372-80). Basel: Karger S. Press.
- Breithaupt, H. & Habermann, E. 1968. Mast zell degranulierendes Peptide (MCD-Peptide) aus Bienegift: isolierung, biochemische und pharmakologische Eigenschaften. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie und experimentelle Pathologie* 261: 252-270.
- Buku, A. 1999. Mast Cell Degranulating (Mcd) Peptide: a Prototypic Peptide in Allergy and Inflammation. *Peptides* 20: 415-420.
- Callewaert, G. L., Shipolini, R. A. & Vernon, C. A. 1968. The disulphide bridges of apamin. *FEBS letters* 1: 111-113.
- Carballido, J. M., Carballidoperrig, N., Kagi, M. K., Meloen, R. H., Wuthrich, B., Heusser, C. H. & Blaser, K. 1993. T-Cell Epitope Specificity in Human Allergic and Nonallergic Subjects to Bee Venom Phospholipase-A2. *Journal of Immunology* 150: 3582-3591.
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J. C., Huet, D., Pernollet, J. C. & Masson, C. 1998. Identification

and Developmental Profiles of Hexamerins in Antenna and Hemolymph of the Honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 387-397.

Dempsey, C. E. 1990. The Actions of Melittin on Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1031: 143-161.

den Hertog, A. 1981. Calcium and the α -action of catecholamines on guinea-pig taenia coli. *The journal of physiology* 316: 109-125.

Doery, H. & Pearson, J. 1964. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. *The biochemical journal* 92: 599-602.

Dorrington, K. J. & Benich, H. H. 1978. Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunological reviews* 41: 3-25.

Dotimas, E. M., Hamid, K. R., Hider, R. C. & Ragnarsson, U. 1987. Isolation and Structure-Analysis of Bee Venom Mast-Cell Degranulating Peptide. *Biochimica Et Biophysica Acta* 911: 285-293.

Dotimas, E. M. & Hider, R. C. 1987. Honeybee Venom. *Bee World* 68: 51-70.

Douglas, W. W. & Ueda, Y. 1973. Mast-Cell Secretion (Histamine-Release) Induced by 48-80 - Calcium-Dependent Exocytosis Inhibited Strongly by Cytochalasin Only When Glycolysis Is Rate-Limiting. *Journal of Physiology-London* 234: P97-P98.

Drainas, D., Harvey, E., Lawrence, A. J. & Thomas, A. 1981. Mechanisms for Albumin-Mediated Membrane Damage. *European Journal of Biochemistry* 114: 239-245.

Drainas, D. & Lawrence, A. J. 1978. Activation of Bee Venom Phospholipase A2 by Oleoyl Imidazolid. *European Journal of Biochemistry* 91: 131-138.

Dreyer, F. 1990. Peptide Toxins and Potassium Channels. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 115: 93-136.

Dudler, T., Altmann, F., Carballido, J. M. & Blaser, K. 1995. Carbohydrate-dependent, HLA class II-restricted, human T cell response to the bee venom allergen phospholipase A2 in allergic patients. *Eur J Immunol* 25: 538-42.

Dudler, T., Chen, W. Q., Wang, S. S., Schneider, T., Annand, R. R., Dempcy, R. O., Cramer, R., Gmachl, M., Suter, M. & Gelb, M. H. 1992. High-Level Expression in Escherichia-Coli and Rapid Purification of Enzymatically Active Honey-Bee Venom Phospholipase-A2. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1165: 201-210.

Forster, E., Dudler, T., Gmachl, M., Aberer, W., Urbanek, R. & Suter, M. 1995. Natural and Recombinant Enzymatically Active or Inactive Bee Venom Phospholipase a(2) Has the Same Potency to Release Histamine From Basophils in Patients With Hymenoptera Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 95: 1229-1235.

Fredholm, B. 1966. Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom. *Biochemical pharmacology* 15: 2037-2042.

Gauldie, J., Hanson, J. M., Rumjanek, F. D., Shipolini, R. A. & Vernon, C. A. 1976. Peptide Components of Bee Venom. *European Journal of Biochemistry* 61: 369-376.

Gmachl, M. & Kreil, G. 1993. Bee Venom Hyaluronidase Is Homologous to a Membrane-Protein of Mammalian Sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3569-3573.

Gmachl, M. & Kreil, G. 1995. The precursors of the bee venom constituents apamin and MCD peptide are encoded by two genes in tandem which share the same 3'-exon. *J Biol Chem* 270: 12704-8.

Grunwald, T., Bockisch, B., Spillner, E., Ring, J., Bredehorst, R. & Ollert, M. W. 2006. Molecular Cloning and Expression in Insect Cells of Honeybee Venom Allergen Acid Phosphatase (Api M 3). *Journal of Allergy and*

Clinical Immunology 117: 848-854.

Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* 177: 314-22.

Habermann, E. & Chengraude, D. 1975. Central Neurotoxicity of Apamin, Crotamin, Phospholipase a and Alpha-Amanitin. *Toxicon* 13: 465-&.

Habermann, E. & Hardt, K. L. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal Biochem* 50: 163-73.

Habermann, E. & Reiz, K. G. 1965. [On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin]. *Biochem Z* 343: 192-203.

Hanson, J. M., Morley, J. & Soriaher.c 1974. Antiinflammatory Property of 401 (Mcd-Peptide), a Peptide From Venom of Bee Apis-Mellifera (L). *British Journal of Pharmacology* 50: 383-392.

Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Dalik, I., Gotz, M. & Jarisch, R. 2004. Identification by Immunoblot of Venom Glycoproteins Displaying Immunoglobulin E-Binding N-Glycans as Cross-Reactive Allergens in Honeybee and Yellow Jacket Venom. *Clinical and Experimental Allergy* 34: 460-469.

Hoffman, D. R. 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30: 109-128.

Hoffman, D., Weimer, E., Sakell, R. & Schmidt, M. 2005. Sequence and Characterization of Honeybee Venom Acid Phosphatase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: S107.

Hugues, M., Romey, G., Duval, D., Vincent, J. P. & Lazdunski, M. 1982. Apamin as a Selective Blocker of the Calcium-Dependent Potassium Channel in Neuro-Blastoma Cells - Voltage-Clamp and Biochemical-Characterization of the Toxin Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79: 1308-1312.

Ivanova, I. & Shkenderov, S. 1982. A Newly Isolated Enzyme With Lysophospholipase Activity From Bee Venom. *Toxicon* 20: 333.

Janicki, P. K. 1989. Specific binding properties of 125I-apamin in various structures of the rat central nervous system. *Acta physiologica Polonica* 40: 235-239.

Jasani, B., Kreil, G., Mackler, B. F. & Stanworth, D. R. 1979. Further-Studies on the Structural Requirements for Polypeptide-Mediated Histamine-Release From Rat Mast-Cells. *Biochemical Journal* 181: 623-632.

Jeep, S., Paul, M., Muller, U. & Kunkel, G. 1996. Honeybee Venom Allergy: Immunoblot Studies in Allergic Patients After Immunotherapy and Before Sting Challenge. *Allergy* 51: 540-546.

Jin, W. L. & Lu, Z. 1998. A Novel High-Affinity Inhibitor for Inward-Rectifier K⁺ Channels. *Biochemistry* 37: 13291-13299.

Just, M., Erdmann, G. & Habermann, E. 1977. Renal Handling of Polybasic Drugs .1. Gentamicin and Aprotinin in Intact Animals. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 300: 57-66.

Kemeny, D. M., Dalton, N., Lawrence, A. J., Pearce, F. L. & Vernon, C. A. 1984. The Purification and Characterization of Hyaluronidase From the Venom of the Honey Bee, Apis-Mellifera. *European Journal of Biochemistry* 139: 217-223.

Kemeny, D. M., Mackenziemills, M., Harries, M. G., Youlten, L. J. F. & Lessof, M. H. 1983. Antibodies to Purified Bee Venom Proteins and Peptides .2. A Detailed Study of Changes in Ige and Igg Antibodies to Individual Bee Venom Antigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 72: 376-385.

Kettner, A., Henry, H., Hughes, G. J., Corradin, G. & Spertini, F. 1999. IgE and T-Cell Responses to High-Molecular Weight Allergens From Bee Venom. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 394-401.

- Kettner, A., Hughes, G. J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F. & Corradin, G. 2001. Api M 6: a New Bee Venom Allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 914-920.
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Plattsmills, T. A. E. & Thomas, W. 1994. Allergen Nomenclature. *Bulletin of the World Health Organization* 72: 797-806.
- King, T. P., Lu, G. & Agosto, H. 1998. Antibody Responses to Bee Melittin (Api M 4) and Hornet Antigen 5 (Dol M 5) in Mice Treated With the Dominant T-Cell Epitope Peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 397-403.
- King, T. P., Sobotka, A. K., Kochoumian, L. & Lichtenstein, L. M. 1976. Allergens of Honey Bee Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 172: 661-671.
- King, T. P. & Spangfort, M. D. 2000. Structure and Biology of Stinging Insect Venom Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* 123: 99-106.
- Kitamura, H., Yokoyama, M., Akita, H., Matsushita, K., Kurachi, Y. & Yamada, M. 2000. Tertiapin Potently and Selectively Blocks Muscarinic K⁺ Channels in Rabbit Cardiac Myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293: 196-205.
- Kreil, G. 1973. Biosynthesis of Melittin, a Toxic Peptide Frombee Venom - Amino-Acid Sequence of Precursor. *European Journal of Biochemistry* 33: 558-566.
- Kreil, G. 1995. Hyaluronidases - a Group of Neglected Enzymes. *Protein Science* 4: 1666-1669.
- Kreil, G., Haiml, L. & Suchanek, G. 1980. Stepwise Cleavage of the Pro Part of Promelittin by Dipeptidylpeptidase-Iv - Evidence for a New Type of Precursor- Product Conversion. *European Journal of Biochemistry* 111: 49-58.
- Kubelka, V., Altmann, F. & Marz, L. 1995. The Asparagine-Linked Carbohydrate of Honeybee Venom Hyaluronidase. *Glycoconjugate Journal* 12: 77-83.
- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., Marz, L., Hard, K., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. G. 1993. Primary Structures of the N-Linked Carbohydrate Chains From Honeybee Venom Phospholipase-A2. *European Journal of Biochemistry* 213: 1193-1204.
- Kubota, M., Tsuji, M., Nishimoto, M., Wongchawalit, J., Okuyama, M., Mori, H., Matsui, H., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A. & Chiba, S. 2004. Localization of Alpha-Glucosidases I, II, and III in Organs of European Honeybees, *Apis mellifera* L., And the Origin of Alpha-Glucosidase in Honey. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68: 2346-2352.
- Kuchler, K., Gmachl, M., Sippl, M. J. & Kreil, G. 1989. Analysis of the cDNA for Phospholipase-A2 From Honeybee Venom Glands - the Deduced Amino-Acid Sequence Reveals Homology to the Corresponding Vertebrate Enzymes. *European Journal of Biochemistry* 184: 249-254.
- Labbé-Jullié, C., Granier, C., Albericio, F., Defendini, M. L., Ceard, B., Rochat, H. & Vanrietschoten, J. 1991. Binding and Toxicity of Apamin - Characterization of the Active-Site. *European Journal of Biochemistry* 196: 639-645.
- Lai, C. C. & Her, G. R. 2002. Analysis of N-Glycosylation of Phospholipase a(2) From Venom of Individual Bees by Microbore High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Using an Ion Trap Mass Spectrometer. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 766: 243-250.
- Langer, J. 1897. Über das Gift unserer Honigbiene. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 38.
- Lawson, D., Raff, M. C., Gomperts, B., Fewtrell, C. & Gilula, N. B. 1977. Molecular Events During Membrane-Fusion - Study of Exocytosis in Rat Peritoneal Mast-Cells. *Journal of Cell Biology* 72: 242-259.

- Lowy, P., Sarmiento, L. & Mitchell, H.K. 1971. Polypeptides minimine and melittin from bee venom: effects on *Drosophila*. *Archives of biochemistry and biophysics* 145: 338-43.
- Lu, G., Kochoumian, L. & King, T. P. 1995. Sequence Identity and Antigenic Cross-Reactivity of White Face Hornet Venom Allergen, Also a Hyaluronidase, With Other Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270: 4457-4465.
- Markovic-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P. J., Muller, U. & Schirmer, T. 2000. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure Fold Des* 8: 1025-35.
- Marz, L., Kuhne, C. & Michl, H. 1983. The Glycoprotein Nature of Phospholipase-A2, Hyaluronidase and Acid-Phosphatase From Honeybee Venom. *Toxicon* 21: 893-896.
- Muller, U., Fricker, M., Wymann, D., Blaser, K. & Crameri, R. 1997. Increased Specificity of Diagnostic Tests With Recombinant Major Bee Venom Allergen Phospholipase A2. *Clinical and Experimental Allergy* 27: 915-920.
- Muller, U. R. 1998. Hymenoptera venom hypersensitivity: an update. *Clin Exp Allergy* 28: 4-6.
- Muller, U. R. 2001. New Developments in the Diagnosis and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 124: 447-453.
- Muller, U. R., Dudler, T., Schneider, T., Crameri, R., Fischer, H., Skrbic, D., Maibach, R., Blaser, K. & Suter, M. 1995. Type-I Skin Reactivity to Native and Recombinant Phospholipase A2 From Honeybee Venom Is Similar. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96: 395-402.
- Nelson, D. A. & O'Connor, R. 1968. The venom of the honeybee (*Apis mellifera*): free amino acids and peptides. *Can J Biochem* 46: 1221-6.
- Neumann, W. & Haberman, E. 1954. Beiträge zur Charakterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie* 222: 367-387.
- Neumann, W., Haberman, E. & Amend, G. 1952. Zur papierelektrophoretischen Fraktionierung tierischer Gifte. *Naturwissenschaften* 39: 286-287.
- Owen, M. D., Braidwood, J. L. & Bridges, A. R. 1977. Age-Dependent Changes in Histamine Content of Venom of Queen and Worker Honey Bees. *Journal of Insect Physiology* 23: 1031-1035.
- O'Connor, R., Henderson, G., Nelson, D., Parker, R. & Peck, M. L. 1967. The venom of the honey bee (*Apis mellifera*). I. General character. In Russell, F. E. & Saunders, P. R. (Eds) *Animal Toxins* (pp. 17-22). Oxford: Pergamon.
- Paull, B. R., Yunginger, J. W. & Gleich, G. J. 1977. Melittin: Allergen of Honeybee Venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 59: 334-338.
- Pease, J. H. B. & Wemmer, D. E. 1988. Solution Structure of Apamin Determined by Nuclear Magnetic-Resonance and Distance Geometry. *Biochemistry* 27: 8491-8498.
- Ramu, Y., Klem, A. M. & Lu, Z. 2004. Short Variable Sequence Acquired in Evolution Enables Selective Inhibition of Various Inward-Rectifier K⁺ Channels. *Biochemistry* 43: 10701-10709.
- Schmidt, M., Trulli, N. M. & Hoffman, D. R. 2006. Expression of the Recombinant Honeybee Venom Cub Protease Allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117: S309.
- Schumacher, M. J., Schmidt, J. O., Egen, N. B. & Dillon, K. A. 1992. Biochemical Variability of Venoms From Individual European and Africanized Honeybees (*Apis-Mellifera*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90: 59-65.
- Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. & Sigler, P. B. 1990. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* 250: 1563-6.

- Sessa, G., Freer, J. H., Colacicco, G. & Weissmann, G. 1969. Interaction of a lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane systems. *Journal of biological chemistry* 244: 3575-3582.
- Shi, H. Z. 2004. Eosinophils Function as Antigen-Presenting Cells. *Journal of Leukocyte Biology* 76: 520-527.
- Shkenderov, S. 1973. A protease inhibitor in bee venom. Identification, partial purification and some properties. *FEBS letters* 33: 343-347.
- Shkenderov, S. 1976. Further purification, inhibitory spectrum and some kinetic properties of the protease inhibitor in bee venom. In Ohsaka, A., Hayashi, K. & Sawai, Y. (Eds) *Animal, Plant and Microbial Toxins* (pp. 263-272). New York: Plenum.
- Shkenderov, S., Ivanova, I. & Grigorova, K. 1979. An acid monophosphatase and α -glucosidase enzymes newly isolated from bee venom. *Toxicon Suppl. I* 17: 169-170.
- Shkenderov, S. & Koburova, K. 1982. Adolapin - a Newly Isolated Analgetic and Anti-Inflammatory Polypeptide From Bee Venom. *Toxicon* 20: 317-321.
- Six, D. A. & Dennis, E. A. 2000. The Expanding Superfamily of Phospholipase a(2) Enzymes: Classification and Characterization. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488: 1-19.
- Sobotka, A. K., Franklin, R. M., Adkinson, N. F. Jr, Valentine, M., Baer, H. & Lichtenstein, L. M. 1976. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 57: 29-40.
- Soldatova, L. N., Crameri, R., Gmachl, M., Kemeny, D. M., Schmidt, M., Weber, M. & Mueller, U. R. 1998. Superior Biologic Activity of the Recombinant Bee Venom Allergen Hyaluronidase Expressed in Baculovirus-Infected Insect Cells as Compared With Escherichia Coli. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 691-698.
- Suter, M., Dudler, T., Schneider, T., Gelb, M., Moser, M., Crameri, R., Menz, G. & Muller, U. 1994. Bee Venom Phospholipase-A2 - a Model for the Standardization of Recombinant Allergens. *Allergologie* 17: 414-418.
- Takahashi, T., Muneoka, Y., Iwasaki, M., Itoh, T., Tominaga, Y., Ikeda, T., Minakata, H. & Nomoto, K. 1995. Myotropic actions of apisin, a novel peptide isolated from the honey bee *Apis mellifera*. *Peptide chemistry 1994* 32: 257-260.
- Talbot, J. C., Dufourcq, J., Bony, J. D., Faucon, J. F. & Lussan, C. 1979. Conformational Change and Self Association of Monomeric Melittin. *Febs Letters* 102: 191-193.
- Taylor, J. W., Bidard, J. N. & Lazdunski, M. 1984. The Characterization of High-Affinity Binding-Sites in Rat-Brain for the Mast Cell-Degranulating Peptide From Bee Venom Using the Purified Monoiodinated Peptide. *Journal of Biological Chemistry* 259: 3957-3967.
- Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., Marz, L. & Becker, W. M. 1993. Fucose Alpha-1,3-Linked to the Core Region of Glycoprotein N-Glycans Creates an Important Epitope for IgE From Honeybee Venom Allergic Individuals. *International Archives of Allergy and Immunology* 102: 259-266.
- Van Der Staay, F. J., Fanelli, R. J., Blokland, A. & Schmidt, B. H. 1999. Behavioral Effects of Apamin, a Selective Inhibitor of the Skca-Channel, in Mice and Rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 1087-1110.
- Van Etten, R. L., Davidson, R., Stevis, P. E., Macarthur, H. & Moore, D. L. 1991. Covalent Structure, Disulfide Bonding, and Identification of Reactive Surface and Active-Site Residues of Human Prostatic Acid-Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2313-2319.
- Vincent, J. P., Schweitz, H. & Lazdunski, M. 1975. Structure-Function-Relationships and Site of Action of Apamin, a Neurotoxic Polypeptide of Bee Venom With an Action on Central Nervous-System. *Biochemistry* 14: 2521-2525.

- Vladimirova, I. A. & Shuba, M. F. 1978. The effect of strychnine, hydrastin and apamin on synaptic transmission in smooth muscle cells. *Neirofiziologia* 10: 295-299.
- Vogel, H. & Jahnig, F. 1986. The Structure of Melittin in Membranes. *Biophysical Journal* 50: 573-582.
- Walde, P., Jackle, H., Luisi, P. L., Dempsey, C. J. & Banks, B. E. C. 1981. Spectroscopic Investigations of Peptide 401 From Bee Venom. *Biopolymers* 20: 373-385.
- Winningham, K. M., Fitch, C. D., Schmidt, M. & Hoffman, D. R. 2004. Hymenoptera Venom Protease Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 928-933.
- Wymann, D., Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Crameri, R. & Blaser, K. 1998. Enzymatic Activity of Soluble Phospholipase a(2) Does Not Affect the Specific Ige, Igg4 and Cytokine Responses in Bee Sting Allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 28: 839-849.
- Xu, X. B. & Nelson, J. W. 1993. Solution Structure of Tertiapin Determined Using Nuclear-Magnetic-Resonance and Distance Geometry. *Proteins-Structure Function and Genetics* 17: 124-137.

II.5 Allergie veroorzaakt door bijensteken

A. De bijensteek en de symptomen

De gewone of normale reactie op een bijensteek is een korte, hevige scherpe pijn die vervloeit naar een zachtere, gloeiende pijn. De steekplaats is zichtbaar als een rood puntje dat snel omringd wordt door een gezwollen witte zone omgeven met een rode rand. De prik zelf is pijnloos, de pijn wordt veroorzaakt door onder andere melittine, dat de zenuwuiteinden in de huid stimuleert. Het omliggende weefsel blijft langere tijd gevoelig. De zwelling en erytheem ontstaan doordat vocht onttrokken wordt aan de bloedbaan voor het verwijderen van de antigenen. Losse weefsels zijn gevoeliger voor zwelling. Deze reactie slinkt normaal binnen enkele uren. Er is weinig andere verzorging nodig dan eventueel een pijnstillend middel en een koud kompres (Reisman, 1994). De klinische verschijnselen tengevolge van een bijensteek kunnen zeer verscheiden zijn, gaande van milde, lokale symptomen tot veralgemeende reacties en zelfs de dood. Er zijn zowel toxische symptomen als allergische reacties mogelijk. Tenslotte zijn er de niet-indeelbare reacties zoals neurologische symptomen.



Fig. II.14: Foto van een veralgemeende allergische reactie tengevolge van een bijensteek (Quinckes syndroom).

B. Situering bijengifallergie in de allergie

Bijengifallergie is een overgevoeligheidsreactie die geïnduceerd wordt door bijengifcomponenten die bij normale personen geen problemen opleveren. Bijengif is zelfs in

staat anafylaxie te veroorzaken, een ernstige levensbedreigende veralgemeende overgevoeligheidsreactie. De allergenen bij de honingbij die met IgE- en IgG-antistoffen reageren zijn eiwitten, vaak met koolhydraat zijketens. De gevoeligheid voor insectensteken en meer specifiek bijengif wordt meestal gecatalogeerd bij de IgE-gemedieerde allergische reacties van niet-atopische oorsprong, wat niet wil zeggen dat bij de hypersensibiliteit voor bijengif de niet-allergische en niet-IgE gemedieerde parameters geen rol van betekenis spelen (Johansson *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2004). De niet-IgE gemedieerde reacties worden veroorzaakt door laagmoleculair gewicht substanties die direct reageren op vasculaire structuren en door peptiden die onmiddellijk mestcellen degranuleren.

C. Antigeen penetratie, detectie, interceptie en verwerking

Voor de cascade aan verdedigingsmechanismen kan starten en eventueel kan leiden tot een allergische reactie moet er een antigeen/allergeen in het lichaam binnen dringen. Dit gebeurt normaal gezien ter hoogte van de huid of de slijmvliezen. Bijen doorbreken de huidbarrière zoals eerder beschreven met hun angel en injecteren de antigenen die leiden tot een directe (toxische) reactie. De persoon kan anergisch reageren of sensibel worden voor de geïnjecteerde antigenen. Dit kan in het laatste geval zelfs leiden tot een anafylactische shock. Eenmaal het antigeen binnengedrongen is en het gedetecteerd wordt, komt het mechanisme op gang.

De antigeen presenterende cellen (APC) vormen de eerste verdedigingslinie van de immuunreactie, doordat ze hun micro-omgeving continu bemonsteren (Kapsenberg *et al.*, 1999). Tot de professionele APC behoren de eosinofielen, B-cellen, de macrofagen en de dendritische cellen (DC). Ze staan in eerste instantie in voor de toegangscontrole en interceptie van antigenen (Lambrecht & Hammad, 2002). De interceptie van de antigenen gebeurt door specifieke (Ig Fc receptoren) en niet-specifieke (lectine receptoren) interacties tussen het antigeen en het oppervlak van de onrijpe DC (Holt & Stumbles, 2000). Het proces wordt patroonherkenning genoemd en gebeurt door patroon herkennende receptoren ("pattern recognition receptors", PRR) (Janeway & Medzhitov, 2002).

Een volgende stap in het proces is de endocytose, waarbij de antigenen opgenomen worden. Dit kan gebeuren in drie vormen: fagocytose om de partikels en micro-organismen op te nemen, macropinocytose die leidt tot de vorming van pinocytotische vesikels om extracellulaire vloeistoffen op te nemen en receptorgemedieerde endocytose via de eerder

genoemde receptoren. Op deze manier worden zelfs antigenen gedetecteerd in nanomolaire en picomolaire concentraties (Sallusto *et al.*, 1995).

Naast een efficiënt opnamemechanisme, bezitten de immature DC ook hoog efficiënte mechanismen om het antigeen in kleinere epitop bevattende stukken te verwerken, de antigeenpeptiden te verwerken en te laden op MHC moleculen (major histocompatibility complex) voor de uiteindelijke T-cel presentatie (Holt & Stumbles, 2000).

De verworven immuniteit tegen antigenen start meestal met de initiatie van de DC rijping na ligatie met Toll-like receptoren (TLR) die daardoor de cruciale proteïnen zijn die de aangeboren en de verworven immuniteit aaneenschakelen (Kapsenberg, 2003).

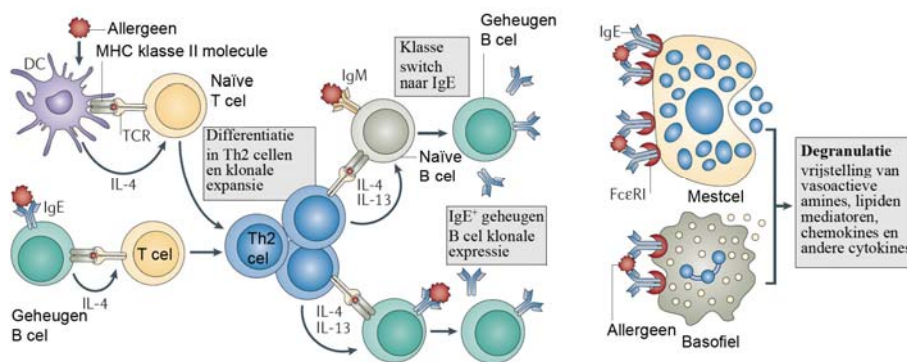


Fig. II.15: Weergave van de pathways en cellen die tot allergie leiden. (Larche *et al.* 2006)

D. Antigeen presentatie en T-cel activering

Na antigeen opname en blootstelling migreren de geactiveerde DC chemotactisch via de lymfevaten naar de paracorticale zone van de dichtstbijzijnde lymfeknopen voor T-cel activering. Tijdens deze migratie verliezen de DC het grootste deel van hun capaciteit om antigenen op te nemen, en ontwikkelen ze een verhoogde capaciteit om met T-cellen te communiceren (Kapsenberg, 2003). DC zijn verantwoordelijk voor het instrueren van naïeve T-cellen of het activeren van effector/geheugen T-cellen, met andere woorden het starten van de gebeurtenissen die leiden tot gevoeligheid of tolerantie.

De finale type respons wordt beïnvloed door het type weefsel waaruit de DC migreren (Lambrecht & Hammad, 2002; Novak *et al.*, 2004) en het type en de dosis van het betreffende antigeen (allergeen). Een Th2 respons wordt ontwikkeld bij een lage antigeendosis, terwijl hoge antigeendosis Th1 responsen bevoordelen (Kapsenberg *et al.*, 1999). Verschillende

mediatoren geproduceerd door de DC en andere celtypen vormen een cytokine milieu die de ontwikkeling van specifieke DC subsets beïnvloeden (DC1, DC2, DC3). Het effect van de cytokines is veel meer uitgesproken dan het dosiseffect (Kapsenberg *et al.*, 1999). Neutrale condities (IL-1 β , TNF- α) bevoordelen de ontwikkeling van DC1, die IL-12 produceren en leiden tot een Th1 respons (Bellinghausen *et al.*, 2001; Holikova *et al.*, 2001). IL-12 wordt geproduceerd tijdens de antigeen presentatie na de ligatie van CD40 met de CD40 ligand tot expressie gebracht door de Th cellen. Prostaglandine E2 (PGE2) helpt DC2 polarisatie met lage IL-12 productie en leidt tot een Th2 respons. IL-10, een cytokine dat de inflammatoire respons vermindert, induceert de ontwikkeling van DC3 met verzwakte immunostimulerende capaciteit, resulterend in ongeschikte T-cel stimulatie wat leidt tot anergie (Holikova *et al.*, 2001). Ook monocytten als APC beïnvloeden sterk de Th celpolarisatie door hun niveaus van IL-12 en PGE2. IL-12 productie wordt gestimuleerd door IFN- γ (Kapsenberg *et al.*, 1999; Bellinghausen *et al.*, 2001).

Het lot van de naïeve Th-cellen wordt bepaald door drie signalen die door de rijpe DC aangebracht worden. Signaal 1 komt van de ligatie van de T-cel receptoren (TCR) met antigeen afgeleide peptiden, aangeboden door de MHC II moleculen op het oppervlak van de DC. Dit bepaalt de antigeenspecificiteit van de respons. De initiatie van de beschermende immuniteit vereist ook co-stimulatie van de T-cellen (Suciu-Foca *et al.*, 2005). Het costimulerende signaal wordt voornamelijk gemedieerd door initiatie van CD28 door CD80 en CD86, die tot expressie gebracht worden door DC na ligatie van PRR, zoals Toll-like receptoren (TLR). Deze receptoren zijn gespecialiseerd om infecties op te sporen door herkenning van antigeen/pathogeen geassocieerde moleculaire patronen (PAMP) of weefsel factoren ("tissue factor", TF). Zonder dit co-stimulerend signaal 2 worden Th-cellen anergisch, wat kan leiden tot tolerantie. Signaal 3 is het polariserende signaal dat gemedieerd wordt door verscheidende oplosbare en membraangebonden factoren die de ontwikkeling van Th1, Th2 of Treg (T regulerende) cellen promoten. De interleukine 12 familie, type 1 interferonen en celoppervlakte geëxprimeerde intercellulaire adhesie molecule 1 (ICAM1) zijn Th1-cel polariserende factoren. Th2-cel polariserende factoren zijn monocyten chemotactisch proteïne (MCP1=CCL2) en OX40 ligand. Voor Treg cellen zijn dit IL-10 en TGF- β (Kapsenberg, 2003).

E. De rol van de T-helpercellen (Th) en T-regulerende cellen (Treg)

Th1 en Th2 cellen vertegenwoordigen gepolariseerde vormen van $CD4^+$ Th cel gemedieerde immuunreactie. Th1 cellen produceren IL-2, IFN- γ en TNF- β . Ze werken samen met de B-cellen voor productie van de immunoglobuline G1 (IgG1) en IgG3 antilichamen (Romagnani, 1994; Abbas *et al.*, 1996). Th2-cellen produceren IL-4, IL-5, IL-9 en IL-13. Cytokines, vrijgegeven door Th2 cellen, induceren B-cellen tot de aanmaak van hoge hoeveelheden van IgG4 en IgE antilichamen, bevorderen de differentiatie en de groei van mestcellen en eosinofielen en inhiberen verscheidene fagocytotische functies (Romagnani, 1994; Abbas *et al.*, 1996). Th1 en Th2 effectorcellen zijn moeilijk te (re)polariseren, door het verlies van relevante receptoren. Naïeve en rustende Th cellen daarentegen zijn extreem gevoelig voor T-cel polariserende factoren (Kapsenberg *et al.*, 1999). In sommige omstandigheden kan de T-cel effectorreactie (Th1 of Th2 gepolariseerd) gevaarlijk zijn voor de gastheer en moet daarom worden gecontroleerd. Naast het wederzijds antagonisme, wordt de regulatie ook uitgevoerd door de activiteit van Treg cellen (Suri-Payer *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2004; Romagnani, 2004b).

De Treg cellen zijn een hoogst heterogene familie (Kapsenberg *et al.*, 1999; Romagnani, 2004a; Taylor *et al.*, 2004). In het licht van de heterogeniteit van de Treg celfamilie is er onlangs een opdeling voorgesteld: de 'natuurlijke' en 'adaptieve' Treg cellen (Bluestone & Abbas, 2003). De natuurlijke Treg cellen verhinderen normaal de activering van andere zelf-reactieve T-cellen die het potentieel hebben om zich tot effectorcellen te ontwikkelen. Deze natuurlijke Treg-cellen handelen hoofdzakelijk via hun contact met T-cellen of APC op een cytokine onafhankelijke manier. Deze groep bevat de $CD4^+ CD25^+$ T cellen. De adaptieve Treg cellen differentiëren onder bepaalde condities van antigeenstimulatie, verder in de periferie en verwerven daar hun onderdrukkende activiteit. Deze groep bevat de type 3 Th cellen (Th3) en de T regulerende 1 cellen (Tr1). Hun mechanisme van onderdrukking wordt gemedieerd door de productie van inhiberende cytokines, zoals IL-10 en TGF- β (Bluestone & Abbas, 2003).

Hoewel de hygiëne hypothese de meest waarschijnlijke verklaring is voor de allergie-epidemieën, is zijn immunologische basis nog controversieel. Deze hypothese komt erop neer dat de toename van allergie zou kunnen verklaard worden doordat kinderen in de Westerse wereld niet genoeg blootgesteld worden aan micro-organismen. Voor het verkeerd lopen van de T-cel balans werden twee hypothesen naar voor geschoven: de ontbrekende immuun afwijking ("missing immune deviation") en de verminderde immuunonderdrukking ("reduced

immune suppression”). De aanvankelijke interpretatie was het gebrek aan verschuiving van de allergeenspecifieke reacties van het Th2 naar het Th1 fenotype als een gevolg van de verminderde productie van IL-12 en IFNs door de cellen van de natuurlijke immuniteit bevorderd door microbiële producten via hun TLR (ontbrekende immune afwijking). Meer recent is de rol van de verminderde activiteit van de Treg-cellen meer benadrukt geworden (verminderde immuunonderdrukking). De epidemiologische bevindingen en de experimentele bewijzen die tot nu toe beschikbaar zijn suggereren dat beide mechanismen betrokken kunnen zijn bij de allergische reactie (Romagnani, 2004a).

F. De rol van de B-cellen en germinale centra in de allergie

In het verdere sensibilisatie proces wordt de rol van de B-cellen en de germinale centra vaak over het hoofd gezien omdat alle aandacht gaat naar de T-cellen. De B-cellen maken enerzijds contact met de folliculaire DC, die een "antigeenreservoir" vormen en anderzijds met de CD4⁺ T-cellen en de dendritische cellen van het germinale centrum (Dessaint, 2004). De synthese van IgE door B-cellen gebeurt aan een laag tempo en is relatief beperkt, zelfs bij allergische personen. Ze vertegenwoordigen minder dan 0,01% van de serumimmunoglobulines. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van twee controle mechanismen. Een eerste cruciale snelheidsbeperkende stap is de klasse switch op het membraan van de B-cellen die de proliferatie hebben beëindigd in de germinale centra. Dit is een complexe regeling van gebeurtenissen die leiden tot herschikkingen van het DNA, wat vereist is voor de synthese van een zware immunoglobulineketen verschillend van de μ zware keten (Aalberse & Platts-Mills, 2004). Twee signalen zijn voor de isotype switch vereist: één voornamelijk geleverd door de CD40 receptor, de andere door cytokine receptoren (Geha *et al.*, 2003). Het binden van de B-cel CD40 receptoren met hun liganden (CD154 of CD40L, afgeleid van de actieve T-cellen), brengt de machinerie van herschikking op gang en draagt bij tot de transcriptie van constante genen. Nochtans heeft het CD40 signaal geen (of weinig) richtinggevende actie: het zijn de cytokines die de specificatie van de klasse switch bepalen (Dessaint, 2004). In het geval van IgE antilichamen moet de zware ketenproductie in de B-cel switchen, ofwel direct ofwel opeenvolgend, van μ naar ϵ . De cytokines die hier tussenkomen zijn de Th2-afgeleiden IL-4 en IL-13. De beschikbaarheid van voldoende geactiveerde Th2 cellen is essentieel om de B-cel aan te zetten tot het switchen. De tweede controle is de overleving van de B-lymfocyt na de switch IgE. IgE productie is inefficiënt omdat ϵ -geswitchte B-cellen worden geëlimineerd tijdens de normale germinale centrumreactie (Aalberse & Platts-Mills, 2004). Minstens 2 mechanismen kunnen de overleving van ϵ -

geswitchte cellen selectief beperken. Ten eerste vertoont het membraan van de ϵ keten een defect (Saxon *et al.*, 1992; Anand *et al.*, 1997; Karnowski *et al.*, 2000; Achatz *et al.*, 2001). Ten tweede is er een interactie vereist tussen membraanverankerde IgE op de B-cellen en de lage affiniteitsreceptor voor IgE, CD23 (Payet-Jamroz *et al.*, 2001). In de germinale centra prolifereren en differentiëren de B-cellen zich. Dit vereist een strikte kwaliteitscontrole door negatieve en positieve selecties. B-cellen die geen overlevingssignalen ontvangen ondergaan apoptose. Studies (Aki *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 1997) wijzen erop dat in tegenstelling tot IgG, de IgE productie niet afhangt van rijpe germinale centra. Nochtans vereist de inductie van B-cel geheugen functionele germinale centra. Dit past in de veronderstelling dat condities die geheugen bevorderen, ongunstig zijn voor de productie van IgE. De IgE antilichamen die zouden kunnen gevonden worden, komen voort uit 2 onconventionele routes: (1) directe μ naar ϵ switch (Sudowe *et al.*, 1997) tijdens de vroege fase van de germinale centrumreactie, waarbij de B-cellen ontsnappen van de lymfefollikel en worden gevestigd als langlevende plasmacellen in het beenmerg, of (2) indirect isotype omschakeling, waarin IgE-producerende plasmacellen zijn voortgekomen uit $\gamma 4$ -geswitchte geheugen B cellen (Vercelli, 2002). Het eerste proces wijst op klassieke atopische allergie (d.w.z., IgE vorming na blootstelling aan een lage dosis allergenen uit de lucht afkomstig van stuifmeel en mijten). In dit allergische type van immuunreactie is er slechts een kleiner B-cel geheugen compartiment maar een blijvende IgE antilichamenreactie die door langlevende plasmacellen veroorzaakt wordt. Het alternatieve proces wordt veroorzaakt bij blootstelling aan de hoge dosis allergenen (bijengif). Dit resulteert in een Th2 repons met een sterk geheugencompartiment (hoofdzakelijk IgG4). De keuze tussen de 2 routes hangt af van de omvang en de snelheid van de oprichting van een goed georganiseerd germinaal centrum dat de meerderheid van ϵ -geswitchte B-cellen zal elimineren (Aalberse & Platts-Mills, 2004).

Dit model versterkt de hygiëne hypothese, die stelt dat de verhoging van de prevalentie van IgE-gemedieerde allergie gekoppeld is met een gebrek aan besmettingen, in het bijzonder tijdens de vroege kinderjaren. Dit wordt gestipuleerd om op een gebrek te wijzen van een microbieel veroorzaakte shift in Th1/Th2 balans (Holt *et al.*, 1992). Microben zouden allergische sensibilisatie op 2 extra manieren kunnen verhinderen: (1) door de rijping van germinale centra te induceren en (2) door het aantal overlevingsniches voor plasmacellen te verminderen (Manz *et al.*, 2002). Vroege B-cellen schijnen te concurreren met de plasmacellen voor dezelfde overlevingsniches in het beenmerg. Een verhoging van het aantal

B-cellen geproduceerd in de perinatale periode zou kunnen resulteren in een daling van het aantal beenmergplasmacellen (Sandel *et al.*, 2001).

G. IgE en zijn rol in de mestcelactivatie

IgE zal dan vervolgens binden op de hoge-affiniteitsreceptor aanwezig op mestcellen, basofielen en geactiveerde eosinofielen (Janeway *et al.*, 2001). Eenmaal IgE als antwoord op een allergeen aangemaakt is, zal bij een volgend contact met het allergeen normaal een allergische reactie plaatsgrijpen. Deze allergische reactie start met de interactie van het allergeen met de α keten van de hoge affiniteit IgE receptor (Fc ϵ RI- α) (Kay, 2001).

De kritieke rol van IgE, zowel in de vroege als in de late fasen van allergische reactie, is goed gevestigd (Huang, 1998; Leung, 1998). IgE beïnvloedt de allergische ontstekingsreactie op twee manieren: door de interactie met de hoge affiniteit IgE receptor (Fc ϵ RI) op de mestcellen, basofielen en geactiveerde eosinofielen (Janeway *et al.*, 2001) en door binding aan de lage affiniteit IgE receptor (CD23 of Fc ϵ RII) om cellulaire en humorale immune reacties te verhogen (Broide, 2001).

Aanvankelijk bindt IgE aan de hoge affiniteit IgE receptor (Fc ϵ RI) op de weefselmestcellen. De kruisbinding van IgE aan Fc ϵ RI door het allergeen brengt dan mestcel degranulatie teweeg (Turner & Kinet, 1999). Op dezelfde manier gebeurt de binding van IgE aan Fc ϵ RI op de basofielen, gevolgd door een kruisbinding door het allergeen. Dit resulteert in basofiele degranulatie, met de vrijstelling van gevormde ontstekingsmediatoren, en in de synthese van lipiden mediators en cytokines (Grant & Huamin, 1998). Naast zijn capaciteit om mestcellen en basofielen te activeren, kan IgE binden aan de lage affiniteit IgE receptor CD23 (of Fc ϵ RII) op de B-cellen, waarbij de functie van deze cellen wordt beïnvloed (Delespesse *et al.*, 1992; Waldschmidt & Tygrett, 1992). De interactie van IgE met de CD23 receptor biedt een belangrijk mechanisme waarbij de allergeen-specifieke IgE de cellulaire en humorale immuunreacties in de allergische reactie kunnen vergroten (Broide, 2001). Bijvoorbeeld, de passieve sensibilisatie van de B-cellen met IgE verbetert substantieel de B-cel immuunreacties, zoals de presentatie van een antigeen. Bovendien heeft de aanwezigheid van antigeenspecifiek IgE aangetoond de productie *in vitro* van IgE op een CD23-afhankelijke manier te verhogen. De *in vitro* waargenomen verhoging van de IgE-gemedieerde immuunreacties door interactie tussen IgE en de CD23 receptor, zijn ook gevonden in *in vivo* uitgevoerde studies (Heyman *et al.*, 1993; Gustavsson *et al.*, 1994;

Oettgen & Geha, 2001). De titers van serum IgE stijgen nadat een immunogeen en een dosis antigeenspecifieke IgE intraveneus worden ingespoten. Dit effect kan volledig worden vernietigd door de in vivo voorbehandeling met anti-CD23 antilichamen. Deze observaties suggereren dat de aanwezigheid van voorgevormd allergeen-specifiek IgE de actieve immuunreacties op een volgend allergeencontact zou kunnen verbeteren (Broide, 2001).

IgE is in staat om het niveau van expressie van zijn eigen hoge en lage affiniteit IgE receptoren te moduleren (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kisselgof & Oettgen, 1998; Saini *et al.*, 1999; Oettgen & Geha, 2001). Bijvoorbeeld, de hogere niveaus IgE worden geassocieerd met verhoogde aantallen IgE receptoren die op mestcellen en op basofielen tot expressie worden gebracht. Aldus beïnvloedt IgE positieve terugkoppelingsmechanismen die de densiteit van de FcεRI receptoren en de prikkelbaarheid van mestcellen verhogen. IgE-gemedieerde opwaartse regulatie van FcεRI verbetert aanzienlijk de degranulatiecapaciteit van mestcellen of/en basofielen, die door IgE gevoelig gemaakt werden in reactie op allergeen uitdaging, en de verhoogde vrijstelling van mestcel of basofiel cytokines zoals IL-4 leidt tot verhoogde IgE niveaus en IgE receptordichtheid. De neerwaartse regulatie van IgE niveaus en IgE receptorniveaus van de mestcellen vermindert het potentieel van de mestcellen om de ontstekingsmediatoren vrij te stellen. Studies leveren een sterk bewijs dat door de IgE niveaus te verminderen, het mogelijk is om IgE receptorniveaus op mestcellen te verminderen, waardoor de prikkelbaarheid van mestcellen in aanwezigheid van een allergeen verminderd wordt (Yamaguchi *et al.*, 1997; Macglashan *et al.*, 1997; Macglashan *et al.*, 1998). Naast zijn effect op de FcεRI receptor, is IgE in staat CD23 opwaarts te reguleren. De opwaartse regulatie van de CD23 receptor wordt verondersteld allergische reacties te verhogen door de verhoging van antigeen opname en presentatie (Oettgen & Geha, 2001).

De vrijstelling van de ontstekingsmediatoren door de mestcellen is een gefaseerd proces. Enkele seconden na IgE-gemedieerde mestcel activatie grijpt een onmiddellijke ontstekingsreactie plaats, deze resulteert in de vrijstelling van de voorgevormde mestcel ontstekingsmediatoren, zoals histamine, heparine, chymase en tryptase. De late-fase respons bereikt zijn piek zes tot negen uur na blootstelling aan het allergeen (Kay, 2001). De late-fase reactie wordt veroorzaakt door de geïnduceerde synthese en vrijstelling van lipidenmediatoren, zoals leukotriene C4 en prostaglandine D2, en in de transcriptie van talrijke cytokines, zoals TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6 en IL-13 (Williams & Galli, 2000). Deze juist vernoemde mediators zullen dan op hun beurt leukocyten, inclusief eosinofielen en Th2-lymfocyten rekruteren. Na hun vrijstelling door de mestcellen veroorzaken deze

mediatoren van de directe overgevoelighedsreacties snel bronchiaal mucosa oedeem, slijmafscheiding, en gladde spier samentrekking. Daaropvolgend nemen ze deel aan het ontlokken van ontstekingscel infiltratie van het betreffende weefsel. De effecten van histamine en andere reactieve stoffen zijn verantwoordelijk voor een groot aantal klachten die kunnen optreden bij allergische reacties. Deze symptomen kunnen binnen enkele minuten na contact met het allergeen optreden.

Een allergische reactie tegen bijengif met vrijstelling van de ontstekingsmediatoren in de neus leidt tot de verwijding van de bloedvaten en zorgt voor vochtuitsijpeling. De resultaten zijn gekend: een loopneus, niezen en tranende ogen. In de luchtwegen veroorzaken ze een verhoogde slijmafscheiding en zwelling van de slijmvliezen waardoor de luchtwegen vernauwen. Het effect van deze mediators op de huid bestaat uit onder andere jeukende zwellingen en rode vlekken.

Bijengif kan naast anafylactische reacties ook anafylactoïde reacties uitlokken, in dit proces worden de mastcellen rechtstreeks gestimuleerd door componenten in het bijengif, zoals MCD, en aanzet tot de vrijstelling van ontstekingsmediatoren. Dit mechanisme is reeds mogelijk bij een eerste steek van een bij.

Referenties

- Aalberse, R. C. & Platts-Mills, T. A. E. 2004. How Do We Avoid Developing Allergy: Modifications of the T(H)2 Response From a B-Cell Perspective. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 983-986.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. 1996. Functional Diversity of Helper T Lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Achatz, G., Luger, E., Geisberger, R., Achatz-Straussberger, G., Breitenbach, M. & Lamers, M. 2001. The Ige Antigen Receptor: a Key Regulator for the Production of Ige Antibodies. *International Archives of Allergy and Immunology* 124: 31-34.
- Aki, T., Fujikawa, A., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., Oka, S. & Ono, K. 1994. Cloning and Expression of Cdna Coding for a New Allergen From the House-Dust Mite, *Dermatophagoides Farinae* - Homology With Human Heat-Shock Cognate Proteins in the Heat-Shock Protein-70 Family. *Journal of Biochemistry* 115: 435-440.
- Anand, S., Batista, F. D., Tkach, T., Efremov, D. G. & Burrone, O. R. 1997. Multiple Transcripts of the Murine Immunoglobulin Epsilon Membrane Locus Are Generated by Alternative Splicing and Differential Usage of Two Polyadenylation Sites. *Molecular Immunology* 34: 175-183.
- Bellinghausen, I., Knop, J. & Saloga, J. 2001. The Role of Interleukin 10 in the Regulation of Allergic Immune Responses. *International Archives of Allergy and Immunology* 126: 97-101.
- Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. 2003. Natural Versus Adaptive Regulatory T Cells. *Nature Reviews Immunology* 3: 253-257.
- Broide, D. H. 2001. Molecular and Cellular Mechanisms of Allergic Disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108: S65-S71.
- Delespesse, G., Sarfati, M., Wu, C. Y., Fournier, S. & Letellier, M. 1992. The Low-Affinity Receptor for Ige. *Immunological Reviews* 125: 77-97.
- Dessaint, J. P. 2004. Regulation of Ige Synthesis. *Revue Francaise D Allergologie Et D Immunologie Clinique* 44: 236-244.
- Geha, R. S., Jabara, H. H. & Brodeur, S. R. 2003. The Regulation of Immunoglobulin E Class-Switch Recombination. *Nature Reviews Immunology* 3: 721-732.
- Grant, J. A. & Huamin, L. 1998. Biology of Basophils. In Middleton, E. jr., Reed, C. E., Ellis, E. F., Adkinson, N. F. jr., Yunginger, J. W. & Busse, W. W. (Eds) *Allergy: principles and practice* (pp. 277-84). St. Louis: Mosby-Year Book.
- Gustavsson, S., Hjulstrom, S., Tianmin, L. & Heyman, B. 1994. Cd23/Ige-Mediated Regulation of the Specific Antibody-Response in-Vivo. *Journal of Immunology* 152: 4793-4800.
- Heyman, B., Liu, T. M. & Gustavsson, S. 1993. In-Vivo Enhancement of the Specific Antibody-Response Via the Low-Affinity Receptor for Ige. *European Journal of Immunology* 23: 1739-1742.
- Holikova, Z., Hercogova, J., Plzak, J. & Smetana, K. 2001. Dendritic Cells and Their Role in Skin-Induced Immune Responses. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 15: 116-120.
- Holt, P. G., Clough, J. B., Holt, B. J., Baronhay, M. J., Rose, A. H., Robinson, B. W. S. & Thomas, W. R. 1992. Genetic Risk for Atopy Is Associated With Delayed Postnatal Maturation of T-Cell Competence. *Clinical and Experimental Allergy* 22: 1093-1099.
- Holt, P. G. & Stumbles, P. A. 2000. Regulation of Immunologic Homeostasis in Peripheral Tissues by Dendritic Cells: the Respiratory Tract as a Paradigm. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 421-429.
- Huang, S. K. 1998. Molecular Modulation of Allergic Responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

102: 887-892.

Janeway, C. A. & Medzhitov, R. 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. 2001. Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Publishing.

Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Martell, J. A. O., Platts-Mills, T. A. E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P. & Williams, H. C. 2004. Revised Nomenclature for Allergy for Global Use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 832-836.

Johansson, S. G. O., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., Van Cauwenberge, P., Van Hage-Hamsten, M. & Wuthrich, B. 2001. A Revised Nomenclature for Allergy - an Eaaci Position Statement From the Eaaci Nomenclature Task Force. *Allergy* 56: 813-824.

Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-Cell Control of Pathogen-Driven T-Cell Polarization. *Nature Reviews Immunology* 3: 984-993.

Kapsenberg, M. L., Hilkens, C. M. U., Wierenga, E. A. & Kalinski, P. 1999. The Paradigm of Type 1 and Type 2 Antigen-Presenting Cells. Implications for Atopic Allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 33-36.

Karnowski, A., Yu, P., Achatz, G. & Lamers, M. C. 2000. The Road to the Production of IgE Is Long and Winding. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162: S71-S75.

Kay, A. B. 2001. Advances in Immunology - Allergy and Allergic Diseases - First of Two Parts. *New England Journal of Medicine* 344: 30-37.

Kisselgof, A. B. & Oettgen, H. C. 1998. The Expression of Murine B Cell Cd23, in Vivo, Is Regulated by Its Ligand, IgE. *International Immunology* 10: 1377-1384.

Lambrecht, B. N. & Hammad, H. 2002. Myeloid Dendritic Cells Make It to the Top. *Clinical and Experimental Allergy* 32: 805-810.

Larche, M., Akdis, C. A. & Valenta, R. 2006. Immunological Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6: 761-771.

Leung, D. Y. M. 1998. Molecular Basis of Allergic Diseases. *Molecular Genetics and Metabolism* 63: 157-167.

Macglashan, D., Mckenzie-White, J., Chichester, K., Bochner, B. S., Davis, F. M., Schroeder, J. T. & Lichtenstein, L. M. 1998. In Vitro Regulation of Fc Epsilon R1 Alpha Expression on Human Basophils by IgE Antibody. *Blood* 91: 1633-1643.

Macglashan, D. W., Bochner, B. S., Adelman, D. C., Jardieu, P. M., Togias, A., Mckenziewhite, J., Sterbinsky, S. A., Hamilton, R. G. & Lichtenstein, L. M. 1997. Down-Regulation of Fc Epsilon R1 Expression on Human Basophils During in Vivo Treatment of Atopic Patients With Anti-IgE Antibody. *Journal of Immunology* 158: 1438-1445.

Manz, R. A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A. E., Hiepe, F. & Radbruch, A. 2002. Humoral Immunity and Long-Lived Plasma Cells. *Current Opinion in Immunology* 14: 517-521.

Novak, N., Allam, J. P., Betten, H., Haberstok, J. & Bieber, T. 2004. The Role of Antigen Presenting Cells at Distinct Anatomic Sites: They Accelerate and They Slow Down Allergies. *Allergy* 59: 5-14.

Oettgen, H. C. & Geha, R. S. 2001. IgE Regulation and Roles in Asthma Pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 429-440.

Payet-Jamroz, M., Helm, S. L. T., Wu, J. H., Kilmon, M., Fakher, M., Basalp, A., Tew, J. G., Szakal, A. K.,

- Noben-Trauth, N. & Conrad, D. H. 2001. Suppression of IgE Responses in Cd23-Transgenic Animals Is Due to Expression of Cd23 on Nonlymphoid Cells. *Journal of Immunology* 166: 4863-4869.
- Reisman, R. E. 1994. Insect stings. *N Engl J Med* 331: 523-7.
- Romagnani, S. 1994. Lymphokine Production by Human T-Cells in Disease States. *Annual Review of Immunology* 12: 227-257.
- Romagnani, S. 2004a. Immunologic Influences on Allergy and T(H)1/T(H)2 Balance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 395-400.
- Romagnani, S. 2004b. The Increased Prevalence of Allergy and the Hygiene Hypothesis: Missing Immune Deviation, Reduced Immune Suppression, or Both? *Immunology* 112: 352-363.
- Saini, S. S., Macglashan, D. W., Sterbinsky, S. A., Togias, A., Adelman, D. C., Lichtenstein, L. M. & Bochner, B. S. 1999. Down-Regulation of Human Basophil IgE and Fc Epsilon R1 Alpha Surface Densities and Mediator Release by Anti-IgE-Infusions Is Reversible in Vitro and in Vivo. *Journal of Immunology* 162: 5624-5630.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class-II Compartment - Down-Regulation by Cytokines and Bacterial Products. *Journal of Experimental Medicine* 182: 389-400.
- Sandel, P. C., Gendelman, M., Kelsoe, G. & Monroe, J. G. 2001. Definition of a Novel Cellular Constituent of the Bone Marrow That Regulates the Response of Immature B Cells to B Cell Antigen Receptor Engagement. *Journal of Immunology* 166: 5935-5944.
- Saxon, A., Zhang, K. & Max, E. E. 1992. Human Epsilon Messenger-Rnas Code for a Single Novel Membrane IgE and a 2nd Secreted IgE. *Clinical Research* 40: A342.
- Suciu-Foca, N., Manavalan, J. S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A. J., Fan, J. S., Vlad, G. & Cortesini, R. 2005. Molecular Characterization of Allospecific T Suppressor and Tolerogenic Dendritic Cells: Review. *International Immunopharmacology* 5: 7-11.
- Sudowe, S., Rademackers, A. & Kolsch, E. 1997. Antigen Dose-Dependent Predominance of Either Direct or Sequential Switch in IgE Antibody Responses. *Immunology* 91: 464-472.
- Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M. & Shevach, E. M. 1998. Cd4(+)Cd25(+) T Cells Inhibit Both the Induction and Effector Function of Autoreactive T Cells and Represent a Unique Lineage of Immunoregulatory Cells. *Journal of Immunology* 160: 1212-1218.
- Taylor, A., Verhagen, J., Akdis, C. A. & Akdis, M. 2004. T Regulatory Cells in Allergy and Health: a Question of Allergen Specificity and Balance. *International Archives of Allergy and Immunology* 135: 73-82.
- Turner, H. & Kinet, J. P. 1999. Signalling Through the High-Affinity IgE Receptor Fc Epsilon R1. *Nature* 402: B24-B30.
- Vercelli, D. 2002. Novel insights into class switch recombination. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2: 147-51.
- Waldschmidt, T. J. & Tygrett, L. T. 1992. The Low Affinity IgE Fc Receptor (CD23) Participates in B-Cell Activation. *Adv Exp Med Biol.* 323: 149-56.
- Williams, C. M. M. & Galli, S. J. 2000. The Diverse Potential Effector and Immunoregulatory Roles of Mast Cells in Allergic Disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 847-859.
- Yamaguchi, M., Lantz, C. S., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J. P. & Galli, S. J. 1997. IgE Enhances Mouse Mast Cell Fc Epsilon R1 Expression in Vitro and in Vivo: Evidence for a Novel Amplification Mechanism in IgE-Dependent Reactions. *Journal of Experimental Medicine* 185: 663-672.

Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q. O., Zhang, J. D., Hawe, N., Dewaard, R., Leung, C., Nourishirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S. K., Rothman, P., Stall, A. M., Pandolfi, P. P. & Dallafavera, R. 1997. The Bcl-6 Proto-Oncogene Controls Germinal-Centre Formation and Th2-Type Inflammation. *Nature Genetics* 16: 161-170.

Hoofdstuk III: Analyse van de proteïnesamenstelling van bijengif via een proteomische benadering.

The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach.
Peiren N., Vanrobaeys F., de Graaf D.C., Devreese B., Van Beeumen J., Jacobs F.J.
Biochimica et Biophysica Acta: 1752 (1) 1-5 (2005)

A. Samenvatting

Zuivere honingbij gifstalen werden onderworpen aan tweedimensionale gelelektroforese. Een totaal van 49 uitgesneden spots werden geanalyseerd aan de hand van massaspectrometrie; 39 ervan resulteerden in de identificatie van 6 verschillende, bekende bijengifproteïnen en van 3 proteïnen die niet eerder in dergelijke stalen zijn beschreven. De eerste nieuwe gifproteïne heeft een “platelet-derived” en vasculair endotheliaal groeifactor familie domein, de tweede proteïne vertoont geen homologie met om het even welke bekende proteïne en de derde komt overeen met een hypothetische proteïne dat gelijkenissen vertoont met “major royal jelly proteïne 8”.

B. Abstract

Pure honeybee venom samples were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. A total of 49 excised spots were analyzed by mass spectrometry; 39 of them resulted in the identification of 6 different known bee venom proteins and of 3 proteins that have not been described in such samples before. The first new venom protein has a platelet-derived and vascular endothelial growth factor family domain, the second protein shows no homologies with any known protein and the third matches a hypothetical protein similar to major royal jelly protein 8.

C. Introduction

Due to vasoactive and neurotoxic components of the venom, most people that are stung by a honeybee experience a local reaction consisting of redness, swelling, tenderness and pain at the site of the sting. A large percentage of the general population (20,7%) develops a hypersensitivity reaction of type 1 (Nittner-Marszalska *et al.*, 2004), and sensitization may result in a broad range of clinical signs, going from a local oedematic swelling of the skin up to a life threatening systemic anaphylactic shock. The allergens responsible for these hypersensitivity reactions are listed by the Allergen Nomenclature Subcommittee of the International Union of Immunology Societies (IUIS) (<http://www.allergen.org/List.htm>). At present, five bee venom allergens can be found on this list: Api m 1 (phospholipase A2; PLA2), Api m 2 (hyaluronidase), Api m 4 (melittin), Api m 6 and Api m 7 (CUB serine protease).

Modern biotechnology has provided several of these allergens in a recombinant form (reviewed in (Muller, 2002)). The implementation of recombinant allergens in immunotherapy is already at the phase I stage of clinical trials and was proven to be more specific and safe than the use of bee-derived venom (Fellrath *et al.*, 2003). Also in the diagnostic field promising results were obtained using single recombinant/synthetic allergens or mixtures of them (Schmid-Grendelmeier & Cramer, 2001; Muller, 2002) and it was suggested that further progress lies in the completion of the repertoire of recombinant allergens (Muller, 2002). In fact, the development of an artificial recombinant/synthetic bee venom preparation for clinical practice necessitates a good knowledge of the allergic components that occur in natural venom in order to refine the composition of the recombinant cocktail.

In order to identify new venom components with allergic potential, the protein composition of honeybee venom was reconsidered by a proteomic approach. The combination of two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification has been proven to be a powerful tool for proteome mapping and was retained for the present study. In addition, the honeybee *Apis mellifera* is now one of the few insects of which man can benefit to have its entire genome sequence available, being a considerable surplus value for the protein spot identification. No such information is presently available of any other stinging Hymenoptera.

D. Material and methods

Venom was collected from Carniolan honeybees (*Apis mellifera carnica*) by dissecting the whole sting apparatus and emptying the reservoir by softly compressing. The droplet of venom that appeared at the tip of the sting was immediately collected in 250 µl of sample buffer (40 mM Tris-base, 8 M urea, 4% (w/v) CHAPS and 5 mM dithiothreitol). Three samples of pure venom, pooled from 35 bees each, were collected and were submitted to two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), as previously described (Vanrobaeys *et al.*, 2003). Briefly, approximately 1 mg of protein was applied on 18 cm immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10L) and isoelectric focusing (IEF) was carried out on a Multiphor II system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). After completion of the IEF and reduction and alkylation steps, the IPG strips were placed on home casted SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) gels. The second dimension electrophoresis was performed in a Protean Plus Dodeca Cell system (Bio-Rad, Hercules,

USA). Gels were stained overnight with Coomassie Brilliant Blue G-250, and digitized by a densitometer (PDQuest, Bio-Rad, Hercules, USA). The three gels showed a high degree of identity, reflected by the high scatter plot correlation coefficient (> 85%) between those 2D-gels.

The protocol for in-gel digestion has been published elsewhere (Vanrobaeys *et al.*, 2003). Briefly, the excised spots were washed, air-dried and then digested with 0.02 µg modified trypsin (Promega, Madison, USA) per spot in 50 mM ammonium bicarbonate at 37°C overnight. Peptides were extracted with 60% (v/v) acetonitrile/0.1% (v/v) formic acid in water, thereafter dried in a SpeedVac (Thermo Savant, Holbrook, USA) and dissolved in 10 µl of 0.1% (v/v) formic acid.

For further analysis of the samples, two mass spectrometric strategies were used. In a first attempt, we tried to identify the protein spots by MALDI TOF/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/time of flight-mass spectrometry) performed on a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, USA). One microliter of the digest sample was added to an equal volume of matrix solution (100 mM α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile (v/v) /0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water) and one microliter of the resultant mix was applied on the MALDI target.

Samples that could not be identified by MALDI analysis were loaded on an automated nano-HPLC system (Dionex Corporation, Hercules, USA) coupled to a hybrid triple quadrupole/linear ion trap (Q-TRAP LC-MS/MS system, Applied Biosystems, Framingham, USA). In this hyphenated set-up, an automated MS to MS/MS switching protocol was used. For more detailed technical information about the mass spectrometric analysis, we refer to a previously published paper (Sule *et al.*, 2004).

A nucleotide sequence database (72243 sequences) and a protein sequence database (6681 sequences) for *Apis mellifera* was downloaded from the World Wide Web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and adapted to the right format for the database searching program MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). The acquired MS and MS/MS data from both strategies were submitted to our local MASCOT server v1.9 (<http://www.matrixscience.com>). If mass spectral data fitted a translated expressed sequence tag (EST), this sequence was loaded into a BLAST query for annotation.

E. Results and discussion

The spot pattern obtained after 2-DE and Coomassie Brilliant Blue G-250 staining from one of the samples is depicted in Figure III.1. The result of the mass spectrometric identification is summarized in Table III.1. A total of 49 different spots were analyzed, 39 of them resulted in the identification of 6 different known bee venom proteins and of 3 proteins that have not been described in such samples before. Although mass spectrometric data is present for the ten unidentified protein spots, the data did not allow characterizing the proteins unambiguously.

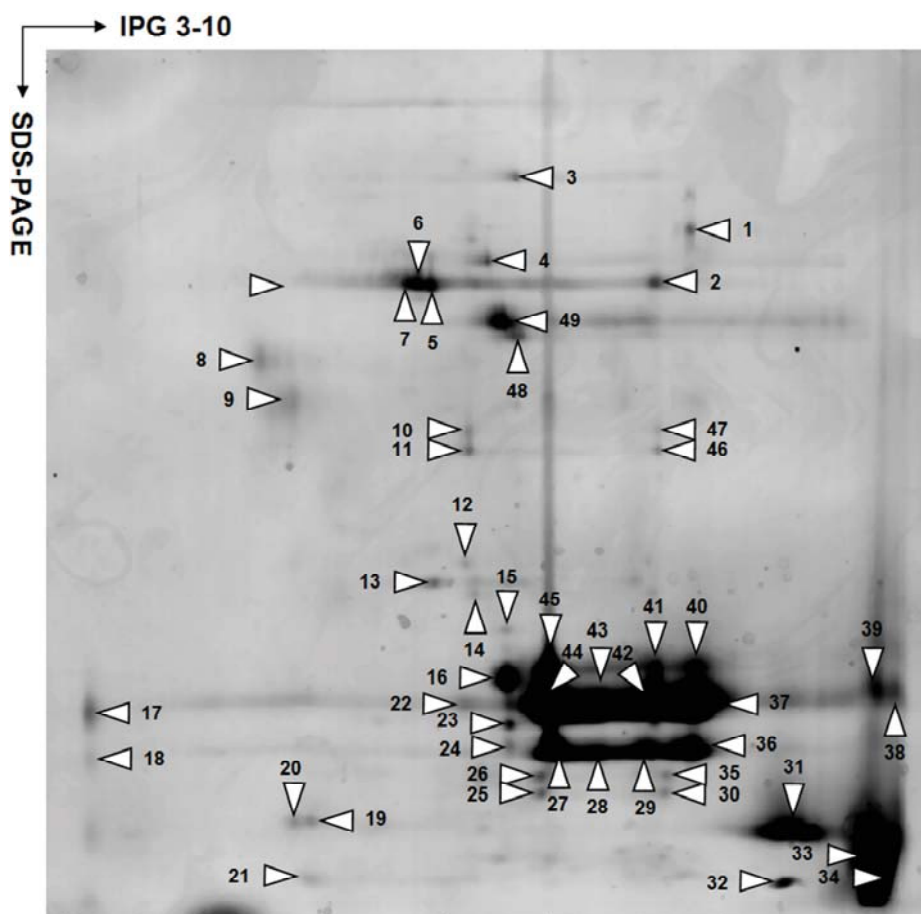


Fig. III.1: Representative 2D-gel of the honeybee venom, out of three, stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. More information about the different spots can be found in Table III.1.

Melittin and PLA2 are the two most predominant proteins in bee venom, representing respectively 50 and 10-12% of its dry weight (Hider, 1988). Therefore, we loaded approximately 1 mg total protein on the IPG strips in order to detect the less abundant proteins. PLA2 was identified in no less than 24 spots. The heterogeneity of PLA2 on gel electrophoresis has already been reported and was assigned to either photooxidation of the histidine imidazoles or to variations in the carbohydrate content (Banks & Shipoloni, 1986). However, in present study no distinction could be made between the different spots on the basis of the MALDI MS and ESI MS (electrospray ionization mass spectrometry) data.

Three other bee venom allergens were identified: Api m 6, hyaluronidase and melittin. The latter, a peptide of 26 residues, was found at the edge of the 2-D gel, just above the front marker dye. This was also the case for secapin, a peptide of 25 residues with no clear biological activity. Both peptides are expressed as a prepro-polypeptide that is processed extracellularly by endopeptidase cleavage. In Table III.1 the accession numbers of both peptides refer to the unprocessed form, although the peptide sequences gained by LC-MS/MS match the mature chain. Other known bee venom peptides like mast cell degranulating peptide, apamin and tertiapin could not be identified in this study because their molecular weight drops below the lower limit of the technique. The recently detected CUB serine protease, an allergic protein of approximately 39 kDa noted in bee venom by two other laboratories (Winningham *et al.*, 2004), could also not be found. It is not unlikely that this allergen corresponds to one of the minor unidentified spots.

The present study provided 8 internal peptide sequences originating from 4 different spots that match a recently found cDNA sequence of honeybee venom acid phosphatase (Hoffman *et al.*, 2005). A few decades ago this protein was considered to be an important bee venom allergen (Hoffman, 1977). However, because of incomplete IgE binding and sequence data it was removed from the IUIS list of allergens.

This proteome analysis revealed also 3 new honeybee venom proteins, representing a substantial relative increment in number of proteins. For two of them a partial nucleotide sequence was already known as an EST of the honeybee brain (Whitfield *et al.*, 2002). The deduced amino acid sequence of the first sequence corresponds to a 15.78 kDa protein with a platelet-derived and vascular endothelial growth factor (PDGF/VEGF) family domain (gnl|CDD|16535; E-value: 1e-06). The second shows no homologies with any known protein. The third protein matches a hypothetical protein similar to major royal jelly protein (MRJP) 8, derived from an annotated genomic sequence using a gene prediction method. MRJPs occur in the hypopharyngeal and mandibular glands as the major component of the larval bee queen

food, also known as royal jelly. The exact function of MRJP 8 is still unsure (Albert & Klaudiny, 2004). In the near future, the physiological function and potential allergic characteristics of these 3 new venom proteins will receive our full attention.

Thanks to Elke Lecocq for technical assistance. F.V. is a grantee from the ‘Bijzonder Onderzoekfonds’ of Ghent University. J.V.B. and B.D. are indebted to the Fund for Scientific Research-Flanders for project G.0312.02, providing the mass spectrometers.

Table III.1: Protein identification on the 2-D gels of honeybee venom

Protein name	Acc. no. ^{a)}	AA-sequence	MW (Da) ^{d)}	pI ^{d)}	Ident. method ^{e)}	Peptide mass ^{b)}	Peptide sequences ^{b)}	Mascot score ^{b)}	Sequence coverage (%) ^{b)}	Spot no. ^{b)}
		Origin ^{b)}								
		Full ^{e)}								
Api m 6	34921475	PS	I	7598	9.70	L	FGFGFGGLGGRGK ICAPGCVCR CPSNEIFSR GKCPSEIFSR FCPNVVPKPLCIK	242	80	31
acid phosphatase	60652325	RS	C	45389 (43905)	5.63 (5.63)	M & L	EYQLGQFLR (2) IVYYLGIPSEAR (2) MREYQLGQFLR (2) DPYLYDFYPLER (2) LQWNEDLNWQPIATK (2) FVDESANLSIEELDFVK (2) YGDFLGDIYTESVSALSSFYDR (2) ELQLPGCEVLCPLYK • YLQLIENVIPSNEELICDKR •	357	38 (40)	2, 5-7
hyaluronidase	155680	RS	C	44260 (40747)	8.67 (8.72)	M & L	ADLEATLRK QNWASLQPYK YQQLFMEETLK EYLNELGPVAVKR SFPGVGVDFESWRPIFR DHLNQIPDK EHPEWDDQR EFNVYVNVPTFMCHK ITDLGADGHIWGSSDDINTK KVLPPYWK • DTDLRADLEATLR •	387	36 (40)	49
new venom protein 1, PDGF/VEGF-like	15365820	RS	I	15793	6.91	L	NFEILTVLESSGK MWHPDLCSCFR RIVPIEHTQCTCDCK ETQECSTGFYFDQNSCR RCGGCTHSLSCQPTATEIR QSYVPEECTACNNVDEQKK	265	72	13

new venom protein 2	15353106	RS	I	24387	4.71	M & L	1581.59 1258.68	VREQMAGILSR (8) KNVDTVLVLPISER (8)	165	12	8, 9, 19, 20
new venom protein 3, similar to major royal jelly protein 8	48137209	GS	C	26323	6.81	M & L	2438.18 1998.00 2273.24 1040.53 1370.65 1539.47	YTINDESFSLQDGLGMALSHK IGNGGPLLEYPNWSWAK TFVTILRNLDGVPSLNVISNK NNVPIDVDK * QAAIQSGEYNYK * YFDYNFGSDEKR *	152	26	4
phospholipase A2	16904372	RS	C	19058 (15249)	7.05 (8.07)	M & L	1125.56 1143.56 1704.77 1387.66	VYQWFDLR (44) MYFNLDITK (44) CYKLEHPVTGCGER (44) NSADTISYFYGK (44)	156	26 (33)	15-18, 22-30, 35-45
prepromelittin	5622	RS	C	7585 (2847)	4.69 (12.02)	M & L	1667.01	VLTTGLPALISWIKR (34)	128	21 (58)	32, 33, 34
Preprosecapin	72280	RS	C	8689 (2869)	9.51 (9.84)	L	1597.83	YIIDVPPRCPPGSK (32)	75	18 (56)	32, 33
not identified											1, 3, 10, 11, 12, 14, 21, 46-48

a) Entry code of NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

b) PS = protein sequencing; RS = deduced sequence from mRNA/cDNA sequencing; GS = hypothetical sequence from genome sequencing.

c) C = complete; I = incomplete.

d) Theoretical molecular weight (MW) and pI are calculated using the on-line ExPASy's Compute pI/MW program (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool); data between brackets are of the mature protein/peptide.

e) M = MALDI TOF/TOF; L = LC MS/MS.

f) Theoretical molecular mass of peptide.

g) Deduced peptide sequences obtained after LC-MS/MS analysis of the indicated spot (number between brackets). • Unique peptide sequences obtained in other spots, containing the same protein or in replicate runs of the same spot picked from another gel. * Peptide sequence found in the vicinity of the in silico predicted gene on Amel_2.0|GroupUn.1029.

h) Total Mascot score of the indicated spot in g)

i) Data between brackets are of the mature protein/peptide.

j) Numbers refer to the spot numbers given in Fig. 1. Spot numbers are in italic when more than one protein was identified in the corresponding spot.

§ A peptide mass fingerprint search of spot 44 matched 18 of the experimental peptides to the protein predicted peptides with a Mascot score of 117 and a sequence coverage of 88%. The peptide mass fingerprint search of the other 23 protein spots resulted in similar results.

References

- Albert, T. & Klaudiny, J. 2004. The Mrjp/Yellow Protein Family of *Apis mellifera*: Identification of New Members in the Est Library. *Journal of Insect Physiology* 50: 51-59.
- Banks, B. E. C. & Shipoloni, R. A. 1986. Chapter 7: Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In Piek T. (Ed) *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects* (pp. 329-415). Academic Press.
- Fellrath, J. M., Kettner, A., Dufour, N., Frigerio, C., Schneeberger, D., Leimgruber, A., Corradin, G. & Spertini, F. 2003. Allergen-Specific T-Cell Tolerance Induction With Allergen-Derived Long Synthetic Peptides: Results of a Phase I Trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 854-861.
- Hider, R. C. 1988. Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour* 12: 60-5.
- Hoffman, D. R. 1977. Allergens in bee venom. III. Identification of allergen B of bee venom as an acid phosphatase. *J Allergy Clin Immunol* 59: 364-6.
- Hoffman, D., Weimer, E., Sakell, R. & Schmidt, M. 2005. Sequence and Characterization of Honeybee Venom Acid Phosphatase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: S107.
- Muller, U. R. 2002. Recombinant Hymenoptera Venom Allergens. *Allergy* 57: 570-576.
- Nittner-Marszalska, M., Liebhart, J., Liebhart, E., Dor, A., Dobek, R., Obojski, A. & Medralla, W. 2004. Prevalence of Hymenoptera Venom Allergy and Its Immunological Markers Current in Adults in Poland. *Medical Science Monitor* 10: CR324-CR329.
- Schmid-Grendelmeier, P. & Crameri, R. 2001. Recombinant Allergens for Skin Testing. *International Archives of Allergy and Immunology* 125: 96-111.
- Sule, A., Vanrobaeys, F., Hajos, G., Van Beeumen, J. & Devreese, B. 2004. Proteomic Analysis of Small Heat Shock Protein Isoforms in Barley Shoots. *Phytochemistry* 65: 1853-1863.
- Vanrobaeys, F., Devreese, B., Lecocq, E., Rychlewski, L., De Smet, L. & Van Beeumen, J. 2003. Proteomics of the Dissimilatory Iron-Reducing Bacterium *Shewanella Oneidensis* Mr-1, Using a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Tandem-Time of Flight Mass Spectrometer. *Proteomics* 3: 2249-2257.
- Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J. R., Robertson, H. M., Soares, M. B. & Robinson, G. E. 2002. Annotated Expressed Sequence Tags and Cdna Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. *Genome Research* 12: 555-566.
- Winningham, K. M., Fitch, C. D., Schmidt, M. & Hoffman, D. R. 2004. Hymenoptera Venom Protease Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 928-933.

Hoofdstuk IV: Moleculaire klonering en expressie van icarapine, een nieuw IgE-bindend bijengifproteïne

Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein.
Peiren N, de Graaf D.C., Brunain M., Bridts C.H., Ebo D.G., Stevens W.J., Jacobs F.J.
FEBS Letters: 580 (20) 4895-9 (2006)

A. Samenvatting

De 1045 bp “full-length” cDNA-sequentie van een nieuwe component van het bijengif werd verkregen door snelle vermeerdering van cDNA-einden. De 672 bp coderingssequentie beantwoordt aan een proteïne met een signaalpeptide en veelvoudige koolhydraat bindingsplaatsen. Dit proteïne hebben we icarapine genoemd. Het bezit de nieuwe consensussequentie N-[TS]-T-S-[TV]-x-K-[VI](2)-[DN]-G-H-x-V-x-I-N-[ED]-T-x-Y-x-[DHK]-x(2,6)-[STA]-[VLFI]-x-[KR]-V-R-[VLI]-[IV]-[DN]-V-x-P. Minstens twee transcriptvarianten werden gevonden. Recombinant icarapine werd getest voor herkenning door IgE antilichamen en gaf een positieve “dot blot” met sera van 4 van de 5 patiënten allergisch aan bijengif. De patiënten met een positieve dot blot waren imkers. Het indirecte immunofluorescent kleuring lokaliseerde de proteïne in het lumen van het gifkanaal.

B. Abstract

The 1045 bp full-length cDNA sequence of a new bee venom component was obtained by rapid amplification of cDNA ends. The 672 bp coding sequence corresponds to a protein with a signal peptide and multiple carbohydrate binding sites, and it was named icarapin. It has the new consensus sequence N-[TS]-T-S-[TV]-x-K-[VI](2)-[DN]-G-H-x-V-x-I-N-[ED]-T-x-Y-x-[DHK]-x(2,6)-[STA]-[VLFI]-x-[KR]-V-R-[VLI]-[IV]-[DN]-V-x-P. At least two transcript variants were found. Recombinant icarapin was tested for recognition by IgE antibodies and gave a positive dot blot with sera from 4 out of 5 bee venom allergic patients, all beekeepers. Indirect immunofluorescent staining localized the protein in the cuticular lining of the venom duct.

C. Introduction

When honeybees sting they deliver the venom sac contents into their victims. Most bee stings cause transient localized non IgE-mediated reactions in man requiring only local symptomatic treatment. In contrast, large local reactions, that affect approximately 15-20% of general population, expand from the site of the sting, consist of extensive erythematous swelling surrounding the sting site, and represent late-phase IgE-mediated hypersensitivity. More serious systemic reactions occur in 0.4-0.8% of the children and 3% of adults, particularly beekeepers. They can be mild, manifesting as a generalized cutaneous response,

but generalized anaphylaxis may also occur and can be life-threatening (Ebo *et al.*, 2004; Ellis & Day, 2005). Six bee venom components are known to cause allergic reactions in man: Api m 1 (phospholipase A₂), Api m 2 (hyaluronidase), Api m 3 (acid phosphatase), Api m 4 (melittin), Api m 6 and Api m 7 (CUB serine protease) (Hoffman, 2006). With the recent finding of new bee venom components (Peiren *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005) the question raised whether these proteins could also contribute to the adverse immunological reactions evoked by bee venom.

Here we tested the IgE reactivity against “new venom protein 2”, found on 2-DE gels of bee venom and identified by mass spectrometry (Peiren *et al.*, 2005). Because of its low abundance in bee venom we have chosen to provide sufficient amounts of the protein for immunological testing by the recombinant technology. As Mascot searching of the mass spectrometric data of venom protein 2 matched only a partial nucleotide sequence (expressed sequence tag, EST) of the honeybee brain (Whitfield *et al.*, 2002), its coding sequence needed to be completed by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The authors proposed to name this new venom protein “icarapin”.

D. Material and methods

D.1 Patient sera

Sera of five patients from the University Hospital of Antwerp (Antwerp, Belgium) with a compelling history of bee venom allergy (urticaria, angio-edema, bronchospasm, hypotension and/or shock) documented by positive quantification of bee venom specific IgE by ImmunoCAP FEIA (Phadia AB) (respective values: 100, 12.7, 2.57, 1.17, 7.23 kUa/L for patients 1 to 5), skin test (ALK-Abellö) and/or basophil activation test (Ebo *et al.*, 2004), were analyzed. All patients were beekeepers, except patient 4. Negative control sera were from non-responsive stung control persons (IgE values < 0.35 kUa/L and negative basophil activation test).

D.2 Bee venom gland preparation

The venom glands of 320 Carniolan honeybees (*Apis mellifera carnica*) were dissected under anesthesia by chilling. Firstly, the whole sting apparatus was removed from the abdomen and submerged in RNALater® (Ambion). Subsequently, the glands were

separated from the reservoir and collected all together in 100 µl new solution. Homogenization and mRNA isolation was done using the Micro-FastTrack™ 2.0 Kit (Invitrogen) following the protocol for fresh and frozen tissue. After the yield was determined, the mRNA was stored in elution buffer at –80°C until further use.

D.3 cDNA preparation and primer development

Venom gland cDNA was prepared using AMV reverse transcriptase and the oligo dT primer from the cDNA Cycle® Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Icarapin gene specific primers (GSP) for rapid amplification of cDNA ends (RACE; see further) were developed inside the gene fragments encoding the two tryptic peptides found in previous work (Peiren *et al.*, 2005): GSP forward primer (GSP-fw) 5'-TGGACACTGTTCTCGTCCTACCGTCCA-3' and GSP reverse primer (GSP-rv) 5'-ACGTGACAAAATGCCAGCCATCTGC-3'.

D.4 5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) and 3'-RACE

RACE ready cDNA was prepared following the protocol described in the GeneRacer™ Kit (Invitrogen). Briefly, 100 ng of bee venom gland mRNA was treated with calf intestinal phosphatase and tobacco acid pyrophosphatase, to be ligated at its 5'-end with the GeneRacer™ RNA oligo. This ligated mRNA was reverse transcribed using the SuperScript™ III RT and the GeneRacer™ oligo dT primer to create RACE-ready first-strand cDNA with known priming sites at the 5'- and 3'-ends. Generation of 5'-RACE fragment was done by PCR, using a combination of GeneRacer™ 5'-primer and GSP-rv, whereas the 3'-amplification needed a combination of GSP-fw and GeneRacer™ 3' primer. Both reactions were done in an Eppendorf Mastercycler using a touchdown protocol.

D.5 Expression of icarapin in bacteria

The complete coding sequence (stop codon excluded) of icarapin was amplified using the following primer set: 5'-ATGAAGACCCTTGGCGTTCT-3' and 5'-AGCAGTTAATACATCTCCTTGGTTC-3'. The resulting amplicon had the expected length and was subsequently cloned in pBAD-TOPO-TA (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The retained clone was sequenced for confirmation.

Recombinant His-tagged icarapin was purified from L-arabinose stimulated cells on the ProBond Purification System (Invitrogen) under denaturing conditions as described in the manufacturer's instruction manual. The purified protein was dialysed overnight at 4°C with Tris-buffer (pH 8.0) supplemented with 0.1% Triton X-100 and concentrated on Vivaspin 2 ml microconcentrators (cut-off: 10 kDa; Vivascience Ltd). An irrelevant recombinant *Cryptosporidium parvum* surface protein CP15/60 expressed in the same pBAD-TOPO-TA vector (de Graaf *et al.*, 2002) served as negative control.

D.6 Dot blot

Two µg recombinant icarapin was spotted on nitrocellulose membrane, air-dried and was washed twice with deionized water before incubating in milk diluent (Sigma) for 1 hour at room temperature. Subsequently, the membrane was immersed with diluted human serum (1:4 in milk diluent) overnight at 4°C. Indirect staining of specifically bound human IgE was performed in three steps: first with a monoclonal anti-human IgE antibody (1:1000, Sigma) for three hours at room temperature, thereafter with a peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:8000, Sigma) for one hour and finally by incubating in the chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura Extended Duration, Pierce) for 10 min. Blots were washed with Tris-buffered saline after each treatment. The chemiluminescent reaction was visualized and analyzed with a Chemi Doc system (Bio-Rad).

D.7 Western blot

A purified recombinant icarapin sample was separated on a 12% SDS-PA gel and blotted to polyvinylidene difluoride membrane. Icarapin-specific IgE staining was done as described above (dot blot). Anti-His (C-terminal) HRP antibodies (1:5000, Invitrogen) were used to localize the His-tagged recombinant proteins after chemiluminescent reaction. The same antibodies were also used in an immunostaining with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, permitting to localize the His-tagged bands on adjacent Coomassie Brilliant Blue G-250 stained strips. These Coomassie stained strips were used for N-terminal sequencing of individually cut out bands.

D.8 Nucleotide and amino acid sequencing

DNA sequencing was performed using an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin Elmer), using the ABI Prism BigDye V 3.1 Terminator Cycle Sequencing kit. N-terminal amino acid sequencing of blotted Coomassie stained protein bands was carried out on a 476A pulsed liquid sequenator with on-line detection of the PTH-amino acids (Applied Biosystems).

D.9 Immunolocalization

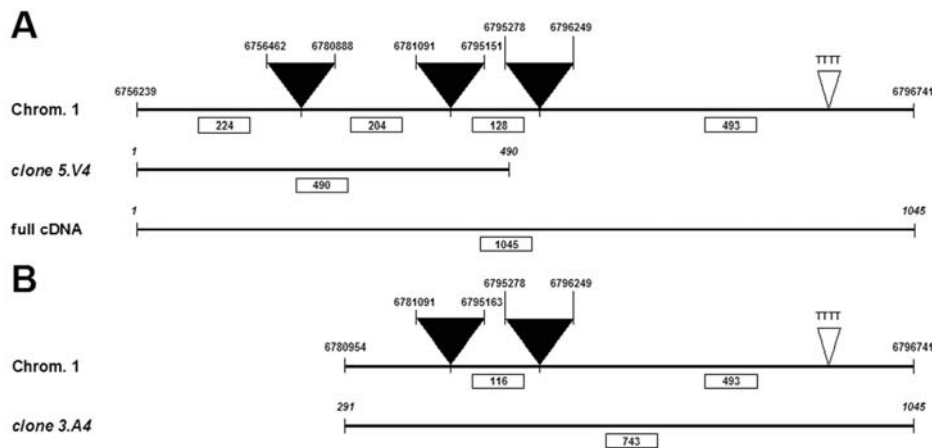
A hyperimmune rabbit serum (HIRS) was developed against recombinant icarapin by repeated immunizations (Ethics Committee file 041126-10). Disturbing anti-*E. coli* antibodies were absorbed with bacterial lysates. Ten μm paraffin sections of pooled honeybee venom glands were made using a Microm HM360 microtome. Immunostaining was done in a humidified chamber by incubating gland sections first in primary antibodies (1:25 in Tris-buffered saline with 0.05 % Tween-20 and 3% bovine serum albumin) overnight at 4°C, thereafter in FITC-conjugated anti-rabbit Ig (1:150, Sigma) for 30 min at room temperature. Images were taken with a confocal laser-scanning microscope (MRC1024 UV, Bio-Rad). Excitation was done with a Kr/Ar laser at 488 nm (dichroic filter UBHS, emission filter: OG515). The specificity of the staining was evaluated by depleting the anti-icarapin antibodies in a 4-hour incubation step with affinity purified recombinant icarapin, prior to the overnight incubation.

E. Results

E.1 Nucleotide sequence

5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) using gene-specific primers resulted in an amplicon of approximately 500 bp in size that was cloned in the pCR®4 vector. Transformation to chemically competent TOP-10 *E. coli* yielded a large number of transformants, 9 of which were retained for further analysis. The DNA sequences found were identical and represented by the insert of *clone 5.V4*. 3'-RACE resulted in a fragment of approximately 850 bp and some minor rapidly migrating bands. The 850 bp band was cut out and selectively amplified again by PCR, and thereafter cloned and sequenced as described above. These sequencing data were represented by the insert of *clone 3.A4*. Subsequently,

we amplified the complete icarapin transcript from a venom gland cDNA preparation using primers designed respectively at the extreme 5'- and 3'-ends of *clone 5.V4* and *clone 3.A4*. This full-length cDNA of icarapin is 1045 bp long and consists of a 5' untranslated region (UTR) of 160 bp, a 672 bp coding sequence and a 3' UTR of 213 bp. Some remarkable sequence differences were found when compared to the previously cloned 3'RACE ends (see further). We named this full-length cDNA transcript variant 1 and deposited its nucleotide sequence to GenBank (accession number DQ485318). It was demonstrated that the icarapin gene has 3 introns located at the genome positions 6756463-6780887 (or in between transcript positions 224/225), 6781092-6795150 (428/429), and 6795279-6796248 (556/557) of chromosome 1 in the honeybee genome assembly 3.08 (Supplementary Fig. IV.1). Beside, the insert of *clone 3.A4* was considered to be a part of another transcript variant (variant 2; GenBank accession number DQ485319) of icarapin, characterized by an alternative splicing at the intron 2 end (genome positions 6781092-6795162) resulting in a transcript that is 12 bp shorter. Both transcript variants showed to have one single deletion mutation of 4 Ts in a 16-mer poly-T repeat when compared to the honeybee genome assembly 3.08. As the deletion mutation was situated in the 3' UTR there were no consequences for the expressed gene products.



Supplementary Fig. IV.1: Alignment of an *in silico* spliced honeybee genome sequence with different cDNA fragments of the bee venom component icarapin. The icarapin-gene is present on chromosome 1 (positions marked above the bar, along with coordinates of the chromosome) and characterized by three introns (depicted by black triangles; splicing sites given on top). Two transcript variants were found. (A) The first transcript variant is represented by the cloned 5'- RACE fragment (*clone 5.V4*) and full-size cDNA. (B) The second transcript variant is represented by the cloned 3'- RACE fragment (*clone 3.A4*) and is incomplete. It is characterized by an alternative splicing at intron 2, resulting in a transcript that is 12 base pairs shorter (here the relative positions with respect to transcript variant 1 are given). Both transcript variants have a TTTT-deletion


```

251 GAAAGGAAGAATGTGGACACTGTTCTCGTCCTACCGTCCATTGAAAGAGA
   E R K N V D T V L V L P S I E R D
301 TCAAATGATGGCTGCAACTTTCGATTTCCTGAGTTTTCGAGCTTCGAGGACA
   Q M M A A T F D F P S L S F E D
351 GCGACGAGGGCTCCAACCTGGAACGACGCTGCTCAGACCTAACTTT
   S D E G S N W N W N T L L R P N F
401 TTGGATGGCTGGTACCAGACGTTACAAAGTGAATTCAGCTCACATGAA
   L D G W Y Q T L Q S A I S A H M K
451 GAAAGTGAGGGAGCAGATGGCTGGCATTTTGTACGATATCCCGAGCAAG
   K V R E Q M A G I L S R I P E Q
501 GTGTTGTGAATTGGAACAAGATTCTGAAGGAGCGAACACTACCTCTACC
   G V V N W N K I P E G A N T T S T
                                     η
551 ACCAAGATCATCGATGGACACGTGGTAACCATTAATGAAACGACTTATAC
   T K I I D G H V V T I N E T T Y T
601 CGATGGTAGCGACGACTACAGTACACTGATCCGCGTCCGTGTGATCGACG
   D G S D D Y S T L I R V R V I D
651 TGAGACCCCGAATGAAACAATCTTGACAACGGTGAGCAGCGAAGCGGAC
   V R P Q N E T I L T T V S S E A D
                                     θ θ
701 AGCGATGTGACCACTTTGCCTACACTTATCGGAAAGAATGAGACCAGCAC
   S D V T T T L P T L I G K N E T S T
                                     θ θ η θ
751 CCAATCTTCAAGGAGTGTGGAAGCGTCGAGGATTTTCGACAACGAGATAC
   Q S S R S V E S V E D F D N E I
801 CGAAGAACCAAGGAGATGATTAACTGCTTGAAGCAGTGAAGAAATAATT
   P K N Q G D V L T A
851 TAAAAGGCAATGTCAGATTAATTGAATCCGAAAGATCCATTTTTTCCTTA
901 ATTTTCTATCTGAAAATTTAATGATTTTTTTTTTCTGTATATTATATC
951 GTATATCTATGTAAAAAAATTTTGAAGTTATTACATTACATAGTTATA
1001 AAGATATTTCTATAAATCCGTTTTTCGAATAAAATTTATCCATCT

```

Supplementary Fig. IV.2: Nucleotide and deduced amino acid sequences of icarapin transcript variant 1. The numbers on the left denote the nucleotide numbers. The start and stop codon are underlined. Residues -1 to -19 are from the signal peptide. Residue +1 denotes the first amino acid of the mature protein. “η” and “θ” are respectively putative N- and O-linked glycosylation sites.

E.3 Expression of recombinant icarapin and testing of its IgE reactivity

Expression of icarapin in the pBAD-TOPO prokaryotic vector gave a major His-tagged protein of 32.2 kDa on a PA-gel. After purification on a nickel-chelating affinity column a number of thin, rapidly migrating His-tagged bands (between 17.7 and 25.7 kDa) accompanied this major band.

Four out of 5 patients with varying venom specific IgE titers gave a positive dot blot against icarapin (Fig. IV.2; patient 1, 2, 3 and 5). Serum from non-responsive stung control persons tested negative. Whole (native) bee venom (ALK-Abellö) gave the same ratio of IgE reactivity as icarapin (4 out of 5), but the one patient that did not react was different (here patient 5). Dots with the irrelevant apicomplexan protein CP15/60 remained uncolored (not shown). Westernblot analysis revealed that the IgE recognition of the preparation was not only caused by the major 32.2 kDa His-tagged band, but also by its accompanying His-tagged

breakdown products (Fig. IV.3). N-terminal amino acid sequencing of a Coomassie blue stained band cut from the PVDF blot at the same height as the 32.2 kDa IgE reactive band (position determined by the anti-His staining) revealed 7 consecutive residues of the enterokinase recognition site that precedes icarapine in the (recombinant) fusion protein.

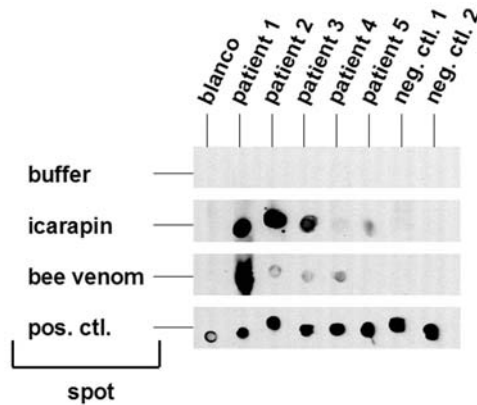


Fig. IV.2: IgE-specific staining of dot blots using sera from bee venom allergic patients (all were beekeepers except patient 4) and non-responsive stung control persons (neg.ctl.). In the blanco nitrocellulose strips no serum was added. Protein spots were made with recombinant icarapine, natural bee venom, a peroxidase conjugated immunoglobulin (pos.ctl.) or with buffer only.

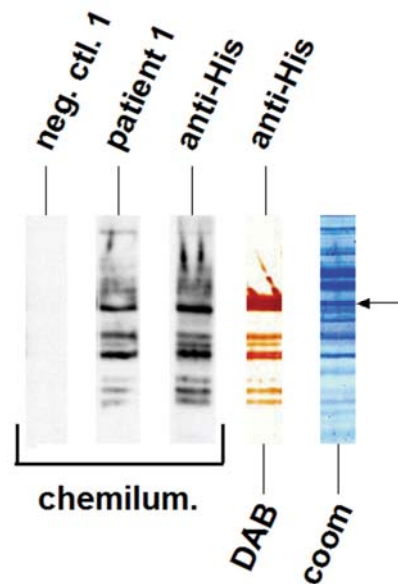


Fig. IV.3: Westernblots and Coomassie stained blots of affinity chromatography purified recombinant icarapine. IgE-specific staining was done with chemiluminescent substrate using sera from a bee venom allergic beekeeper (patient 1) and a non-responsive stung control person (neg.ctl.). The recombinant icarapine was localized using an anti-His monoclonal that was peroxidase conjugated and stained with the

chemiluminescent substrate and with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), permitting to localize the His-tagged bands on the adjacent Coomassie Brilliant Blue G-250 stained strips. The arrow indicates the protein band that was cut out the blot and identified as icarapin by sequencing.

E.4 Immunolocalization in the venom glands

Staining of bee venom gland sections with anti-icarapin HIRS revealed strong fluorescent area at the cuticular lining of venom duct, with some minor staining inside the secretory cells (Fig. IV.4). When the HIRS was depleted with affinity purified recombinant icarapin the signal disappeared completely.

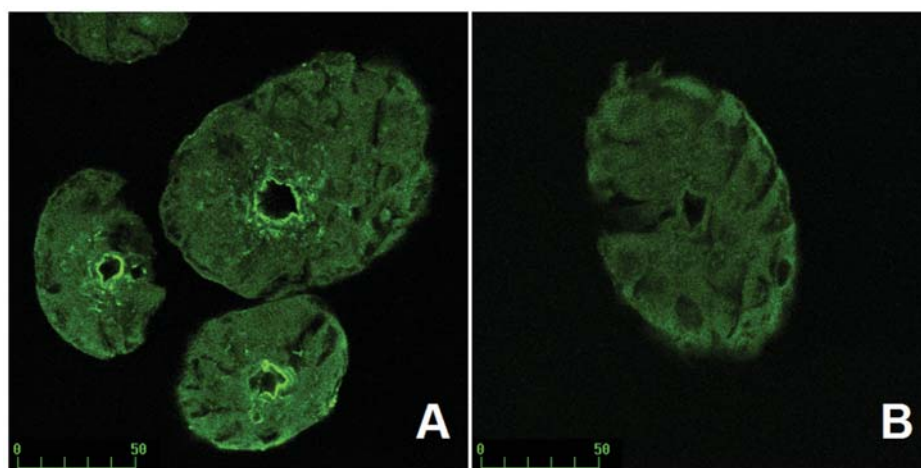


Fig. IV.4: Immunolocalization of icarapin using a hyperimmune rabbit serum. (A) A strong fluorescent area at the cuticular lining of venom duct was seen, with some minor staining inside the secretory cells. (B) When the serum was depleted with affinity purified recombinant icarapin the signal disappeared completely. Scale is give in μm .

F. Discussion

Icarapin was first identified in a proteomic study of bee venom that was obtained from manually stimulated bees (Peiren *et al.*, 2005), leaving a trace of uncertainty about its origin: had this component leaked from gland tissue by squeezing out the venom sac? The finding in the present paper that it has a signal peptide, typical for secreted proteins, and that it evokes an immune response in some subjects after a bee sting, provides the required confirmation of its release during the normal sting action. In addition, this new bee venom component was independently found by another research group in reversed phase chromatography fractionated bee venom (Schmidt *et al.*, 2005). However, its occurrence in the cuticular lining

of the venom duct is at the moment difficult to interpret: or icarapin penetrates from the venom into the cuticular lining that surrounds the duct and the sac, or icarapin is a component of this cuticular lining and leaks into the venom lumen. The latter seems unlikely as icarapin lacks the consensus sequences that are typical for cuticular proteins (Willis, 1999).

Sequencing data demonstrated that icarapin displays a protein heterogeneity that is at least partially due to alternative splicing of a single transcript, an observation also made for tropomyosins from the lobster *Homarus americanus* striated muscles (Mykles *et al.*, 1998). Tropomyosin is an important food allergen from many other crustacean species (see the International Union of Immunology Societies' list of allergens at <http://www.allergen.org/List.htm>). It was remarkable to find homology with a set of mostly unknown insect proteins, all sharing the same consensus sequence of 37-41 residues. One of these homologues is a putative salivary secreted mucin 3 from *Aedes aegypti*, but as icarapin has no regions rich in proline, threonine and serine residues occurring in clusters (in spite of its high Pro, Thr, Ser content of 21%) and cysteine residues are absent, it lacks some common features of mucins or mucin-like proteins (Rayms-Keller *et al.*, 2000).

Because of the failure to assign to this new venom protein a biological function, we proposed to name it icarapin, a junction of Icarus (Greek mythology) and *Apis* (genus of the honeybee) and referring to one of its most striking characteristics so far: its unstable nature. Indeed, it was previously described that on a 2-DE gel of pure venom, the full-size protein is accompanied by low molecular weight degraded forms (Peiren *et al.*, 2005). A similar picture was seen in the affinity purified recombinant samples of the present paper, although here the degradation occurred in a more stepwise way.

The finding that 4 out of 5 patients with a compelling case history of bee venom allergy developed an icarapin-specific IgE-response suggests that it might concern a new bee venom allergen. This IgE recognition should now be further validated.

Acknowledgements

Technical assistance of Mrs. Christel Mertens" was very much appreciated.

References

- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G. & Brunak, S. 2004. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340: 783-795.
- de Graaf, D. C., De Coninck, H., De Clercq, C. & Peeters, J. E. 2002. Screening of the T- and B-Cell Antigenicity in Neonatal Calves of the His-Tagged *Cryptosporidium Parvum* Antigens Cp15, Cp15/60, P23 and Trap-C1. *Folia Parasitologica* 49: 319-322.
- Ebo, D. G., Hagendorens, M. M., Bridts, C. H., Schuerwegh, A. J., De Clerck, L. S. & Stevens, W. J. 2004. In Vitro Allergy Diagnosis: Should We Follow the Flow? *Clinical and Experimental Allergy* 34: 332-339.
- Ellis, A. K. & Day, J. H. 2005. Clinical Reactivity to Insect Stings. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5: 349-354.
- Hoffman, D. R. 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30: 109-128.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. 2005. Prediction, Conservation Analysis, and Structural Characterization of Mammalian Mucin-Type O-Glycosylation Sites. *Glycobiology* 15: 153-164.
- Mykles, D. L., Cotton, J. L. S., Taniguchi, H., Sano, K. I. & Maeda, Y. 1998. Cloning of Tropomyosins From Lobster (*Homarus Americanus*) Striated Muscles: Fast and Slow Isoforms May Be Generated From the Same Transcript. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 19: 105-115.
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., De Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J. & Jacobs, F. J. 2005. The Protein Composition of Honeybee Venom Reconsidered by a Proteomic Approach. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1752: 1-5.
- Rayms-Keller, A., McGaw, M., Oray, C., Carlson, J. O. & Beaty, B. J. 2000. Molecular Cloning and Characterization of a Metal Responsive *Aedes Aegypti* Intestinal Mucin Cdna. *Insect Molecular Biology* 9: 419-426.
- Schmidt, M., Weimer, E., Sakell, R. & Hoffman, D. 2005. Proteins in the high molecular weight fraction of honeybee venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: S107.
- Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J. R., Robertson, H. M., Soares, M. B. & Robinson, G. E. 2002. Annotated Expressed Sequence Tags and Cdna Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. *Genome Research* 12: 555-566.
- Willis, J. H. 1999. Cuticular Proteins in Insects and Crustaceans. *American Zoologist* 39: 600-609.

**Hoofdstuk V: MRJP9 en PVF1:
twee nieuwe componenten van bijengif**

A. Inleiding

Bijengif is een complex mengsel van verschillende componenten. In dit mengsel vervullen de proteïnen belangrijke functies. Recent hebben we tijdens een proteoom studie drie nieuwe componenten aangetroffen in bijengif (Peiren *et al.*, 2005). Eén van deze componenten hebben we beschreven als icarapine (Peiren *et al.*, 2006). Een tweede proteïne konden we identificeren als MRJP8-like en de derde component bleek verwant met de PDGF en VEGF familie. Ze kregen in Peiren *et al.* (2005) respectievelijk de namen “new venom protein 2, 3 & 1”. In dit hoofdstuk wordt gepoogd de volledige coderende sequentie van deze twee laatste proteïnen te bepalen door ze te kloneren in een vectorsysteem. Hier bevestigen we dat het gaat om “major royal jelly protein 9” (MRJP9) en PDGF/VEGF factor 1 (PVF1), dat het homoloog is van PVF1 van *Drosophila melanogaster*.

B. Materiaal en methoden

B.1 Bereiding van cDNA uit bijengifklieren

De gifklieren van 320 Carnica honingbijen (*Apis mellifera carnica*) werden gedissecteed onder anesthesie door afkoeling. Eerst werd het ganse gifapparaat verwijderd uit het abdomen en ondergedompeld in RNALater® (Ambion). In deze oplossing werden de klieren van het gifreservoir gescheiden en in 100µl verse RNALater® gebracht. Homogenisering en mRNA isolatie werden uitgevoerd met de Micro-FastTrack™ 2.0 Kit (Invitrogen) volgens het protocol voor vers en bevroren weefsel. Nadat de opbrengst bepaald was via spectrofotometrie, werd het mRNA opgelost in de elutiebuffer en bewaard bij -80°C. cDNA van de gifklieren werd bereid door gebruik te maken van AMV reverse transcriptase en oligo dT primers uit de cDNA Cycle® Kit (Invitrogen) volgens de instructies van de fabrikant.

B.2 Primer ontwikkeling, klonering en nucleotide sequencer

De primers voor de coderende sequentie werden ontwikkeld met Primer3 software (Rozen & Skaletsky, 2000). De MRJP9 voorste primer 5'-ATGTCTTTCAATATCTGGTGG TTG-3' en MRJP9 achterste primer 5'-AAGGAAAATTGAGAAAAAATTTG-3' werden afgeleid van NM_001024697. De PVF1 voorste primer 5'-ATGCCGTACTCTAAGTGTAG

AAC-3' en PVF1 achterste primer 5'-TTCTGGATCTGGTTTAGGTTTTC-3' uit XM_392204.

De PCR condities waren 1 min bij 93 °C, 30 sec bij 55 °C en 2 min 45 sec bij 72 °C gedurende 35 cycli. De finale elongatie duurde 10 min bij 72°C. Dit protocol werd uitgevoerd in een Eppendorf Mastercycler®.

De PCR producten werden gekloneerd in de pCR®4-TOPO® vector. Individuele transformanten werden opgepikt en geanalyseerd via PCR om de inserten te screenen. De corresponderende amplicons werden gebruikt voor sequentieanalyse.

DNA sequencer werd uitgevoerd met een ABI Prism 377 geautomatiseerde DNA sequencer (Perkin Elmer), door gebruik te maken van de ABI Prism BigDye V 3.1 Terminator Cycle Sequencing kit. Het PCR product werd eerst behandeld met garnaal alkaline fosfatase (1 U/μl, Amersham E70092Y) en exonuclease I (20 U/μl, Epicentre Technologies X40505K) gedurende 15 min bij 37 °C, gevolgd door 15 min bij 80 °C om de enzymen te inactiveren. Dit materiaal werd gebruikt voor cyclus sequencer zonder verdere opzuivering door gebruik te maken van de bovenvermelde kit. De sequencercondities waren 30 sec bij 96 °C, 15 sec bij 50 °C en 4 min bij 60 °C gedurende 27 cycli. De gebruikte primers zijn T3 en T7 die bij de pCR®4-TOPO® TA cloning kit (Invitrogen) geleverd werden. De cyclus sequentie producten werden geprecipiteerd door toevoeging van 25 μl 95 % ethanol en 1 μl 3 M natriumacetaat (pH 4,6) aan 10 μl cyclus sequentie reactie. De stalen werden gedurende 15 min bij -20 °C geplaatst en daarna 15 min gecentrifugeerd aan 14.000 rpm. Na precipitatie werd een additionele wasstap toegevoegd met 125 μl 70 % ethanol en daarna 5 min gecentrifugeerd aan 14.000 rpm. De pellet werd gedroogd in een Speedvac concentrator, opgelost in een ladingsbuffer en gelopen op een 48 cm 4.25 % acrylamide:bisacrylamide (29:1) gel.

B.3 Analyse van de sequentiedata

De verschillende complete gegenereerde cDNA sequenties werden met de honingbij assemblage 4.0 (Amel_4.0_20061003) gealigneerd met BLASTN (Altschul *et al.*, 1997), zonder filters.

De flankerende DNA basenparen van MRJP9 werden gebruikt om te bevestigen dat Group 11.12 en de niet-geassembleerde GroupUn.2586 afgeleid werden van dezelfde locatie, ondanks het feit dat ze substantiële genoomsequentie variatie vertonen op en in de buurt van MRJP9.

C Resultaten

C.1 Klonering en sequencerings van cDNA fragmenten die coderen voor MRJP9 en PVF1

Een poging om via de RACE techniek het volledige gen te amplificeren, zoals uitgevoerd in Peiren *et al.* (2006), mislukte. Daarom werd op basis van predicties en NCBI genbank data de coderende sequentie (CDS) geconstrueerd. De resulterende PCR producten hadden de verwachte grootte en werden gekloneerd in een prokaryoot sequenceringsysteem (pCR[®] 4-TOPO[®] TA cloning kit). De transformatie naar chemisch competente TOP-10 *E. coli* leverde een groot aantal transformanten op. Er werden 10 transformanten per gen gekozen voor verdere analyse. De 10 klonen van MRJP9 vertoonden telkens één bandje dat overeenkwam met de verwachte grootte. MRJP9 wordt vanaf hier verder vertegenwoordigd door kloon 2. De PVF1 klonen vertoonden twee varianten op basis van lengte. De eerste variant wordt vertegenwoordigd door kloon 8 (PC 8) en de tweede door kloon 9 (PC 9).

Bij MRJP9 hadden alle verkregen klonen na PCR analyse dezelfde lengte. Bij PVF1 hadden 9 klonen de verwachte grootte (PC 8) en één kloon was ongeveer 80 basenparen hoger gelegen (PC 9).

Sequencerings van MRJP9 leidde tot een coderende sequentie met de verwachte lengte van 1269 basenparen. Een BLASTN tegen het genoom leidde tot een plaatsing van het gen op chromosoom 11 (Amel_4.0|Group11.12) en gedeeltelijk op Amel_4.0|GroupUn.2596 (eerste 3 exonen). De CDS werd onderbroken door 5 intronen. De complete sequentie (NM_001024697) is opgebouwd uit 6 exonen (fig. V.1).

Sequencerings van PC 8 leidde tot een CDS van de verwachte lengte van 954 basenparen en PC 9 leidde tot 1036 basenparen. Een BLASTN tegen het genoom leidde tot een plaatsing van het gen op chromosoom 2 (Amel_4.0|Group2.38). In de fragmenten werden 5 intronen gedetecteerd. De sequentie similariteit tussen PC 8 (variant 1) en PC 9 (variant 2) is identiek met uitzondering van 82 bijkomende nucleotiden in PC 9, deze insertie bevindt zich aan het uiteinde van exon 5 van PC 8. In deze insertie is een stopcodon gelegen zodat dit leidt tot een afgeleide aminozuursequentie die korter dan is deze van PC 8 (fig. V.2).

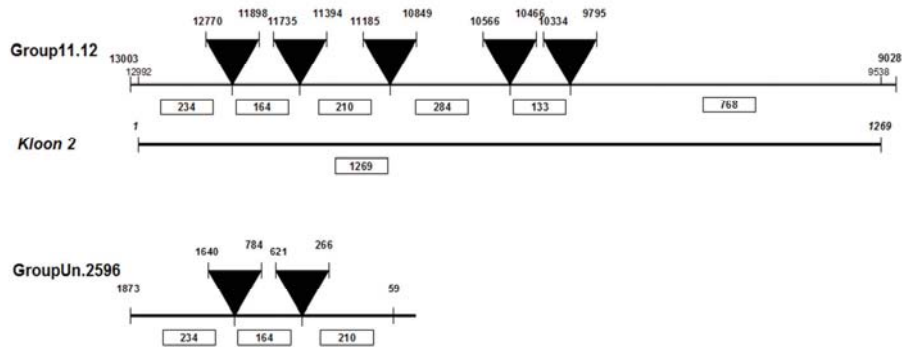


Fig. V.1: Alignatie van een *in silico* gesplitte honingbijgenoom sequentie met een cDNA fragment van MRJP9. MRJP9 was aanwezig in Group11.12 van de genoom assembly 4.0. MRJP9 is gekarakteriseerd door 5 intronen (afgebeeld door zwarte driehoeken; splitsingsplaatsen worden er boven gegeven) en dit haplotype of het genoom toont een bijna perfecte sequentie gelijkenis met kloon 2. Een tweede waarschijnlijk gedeeltelijke genoom sequentie werd gevonden (GroupUn.2596) waarmee het voorste deel MRJP9 grotendeels mee overeen komt. De fragmentlengtes (in bp) worden gegeven onder de staaf.

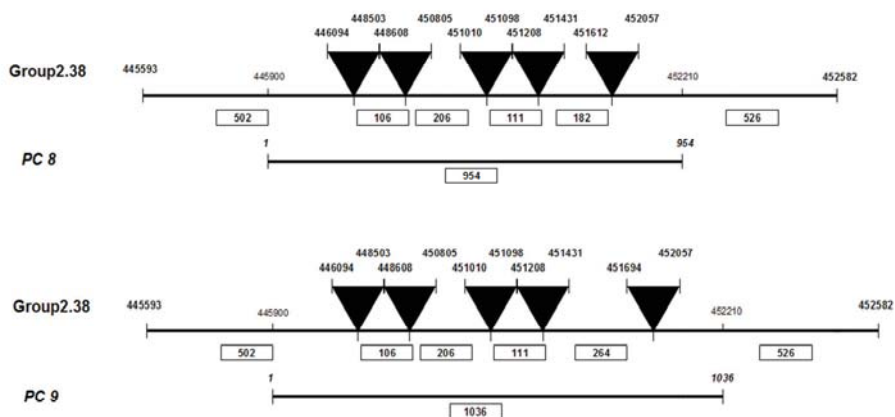


Fig. V.2: Alignatie van een *in silico* gesplitte honingbijgenoom sequentie met verschillende cDNA fragmenten van PVF1. PVF1 was aanwezig in Group2.38 van de genoom assembly 4.0. PVF1 is gekarakteriseerd door 5 intronen (afgebeeld door zwarte driehoeken; splitsingsplaatsen worden er boven gegeven). Een eerste transcript variant (PC 8), deze sequentie komt overeen met een voorspelde nucleotidensequentie. Een tweede variant (PC 9) heeft een identieke sequentie die 82 bp langer is. De fragmentlengtes (in bp) worden gegeven onder de staaf.

C.2 Afgeleide aminozuursequentie en proteïne heterogeniteit

De verkregen aminozuursequentie van MRJP 9 heeft een lengte van 423 AA (fig. V.3). 5 nucleotiden waren moeilijk te interpreteren, wat zich uit in de daaruit afgeleide aminozuren. Bij twee (3 & 5) van de vijf AA heeft dit geen consequenties in vergelijking met

NP_001019868. Aminozuur (4) werd voorspeld als Phe terwijl het referentieproteïne het houdt op Tyr. Dit laatste is in overeenstemming met wat we vastgesteld hebben via MS/MS tijdens de identificatie van dit nieuwe bijengifproteïne (Peiren *et al.*, 2005). De twee andere AA (1 & 2) komen voor in het voorspeld signaalpeptide en indien deze AA effectief zouden afwijken, heeft dit geen gevolgen voor de mature proteïne (fig. V.4). Een verdere analyse dringt zich op zodat we deze onzekerheden kunnen uitsluiten. Het totaal moleculaire gewicht van de proteïne bedraagt 48,7 kDa en het heeft een pI van 8,7. Bij de mature proteïne is dit respectievelijk 46,3 kDa en 8,6.

```

1  ATGTCTTTCA ATATCTGGTG GTTGATACTG NATTTTAGTA TAGTTNGTCA
   M S F N I W W L I L (1) F S I V (2) Q
51  AGCAAAAGCC CATTATTCTT TGAGAGATTN CAAGGCAAAT ATCTTCCAAG
   A K A H Y S L R D (3) K A N I F Q V
101 TTAATATCA ATGGAATAC TTCGATTATA ATTTTGGTAG TGATGAAAAG
   K Y Q W K Y F D Y N F G S D E K
151 AGACAAGCTG CAATTCAATC TGGCGAATAC AATTATAAGA ATAATGTTCC
   R Q A A I Q S G E Y N Y K N N V P
201 AATAGACGTC GATCGATGGA ATGGTAAAC TTTTGTACAC ATATTAAGAA
   I D V D R W N G K T F V T I L R N
251 ATGATGGTGT GCCTTCGTCT TTGAACGTGA TATCTAACAA AATTGGCAAT
   D G V P S S L N V I S N K I G N
301 GGTGGACCAC TTTTGGAACC ATATCCAAAT TGGTCGTGGG CAAAAAATCA
   G G P L L E P Y P N W S W A K N Q
351 AAATGTTCT GGTATTACGA GTGTTTACAG AATTGCGATT GACGAATGGG
   N C S G I T S V Y R I A I D E W D
401 ATAGATTATG GGTTTTAGAC AATGGTATTA GCGGTGAGAC ATCTGTATGC
   R L W V L D N G I S G E T S V C
451 CCTTCGCAGA TTGTCGTCTT TGATCTAAAA AATTCAAAAT TGTTAAAAACA
   P S Q I V V F D L K N S K L L K Q
501 AGTTAAAATA CCGCACGATA TTGCGATAAA CTCTACTACT GGAAAAAGAA
   V K I P H D I A I N S T T G K R N
551 ATGTAGTAAC TCCAATCGTT CAAAGTTTGT ATTATAATAA TACCTGGGTG
   V V T P I V Q S F D Y N N T W V
601 TATATAGCAG ACGTCGAAGG TTATGCATTG ATTATTTATA ACAATGCCGA
   Y I A D V E G Y A L I I Y N N A D
651 CGATTCTTTC CAACGATTGA CTTGAGCAC TTTCGTATAC GATCCCAGAT
   D S F Q R L T S S T F V Y D P R Y
701 ACACCAAATN CACTATCAAT GACGAAAGTT TCTCGTTGCA AGATGGAATT
   T K (4) T I N D E S F S L Q D G I

```

```

751 TTGGGTATGG CGCTAAGTCA TAAACGCAA AATCTTTATT ACAGTGCTAT
    L G M A L S H K T Q N L Y Y S A M

801 GTCCTCTCAT AATTTGAATT ATGTCAACAC AAAACAATTT ACACAAGGGA
    S S H N L N Y V N T K Q F T Q G K

851 AATTCAGGC TAATGATATA CAATATCAAG GAGCCTCAGA TATCTTATGG
    F Q A N D I Q Y Q G A S D I L W

901 ACTCAAGCGA GCGCTAAAGC AATATCGGAA ACTGGTGCTC TCTTCTTTGG
    T Q A S A K A I S E T G A L F F G

951 ACTCGTGAGT GACACAGCAC TTGGCTGCTG GAACGAGAAT CGGCCACTAA
    L V S D T A L G C W N E N R P L K

1001 AAAGAAGGAA TATTGAAATA GTCGCCAAA ATAACGACAC TCTTCAATTC
    R R N I E I V A K N N D T L Q F

1051 ATCAGTGGNA TAAAAATTAT CAAGCAAATA TCTTCAAATA TTTATGAACG
    I S (5) I K I I K Q I S S N I Y E R

1101 TCAAAATAAC GAGTATATAT GGATTGTAAG TAACAAATAT CAAAAAATAG
    Q N N E Y I W I V S N K Y Q K I A

1151 CAAATGGAGA TTTAAATTTT AATGAAGTGA ATTTTCGAAT TTTGAATGCG
    N G D L N F N E V N F R I L N A

1201 CCTGTAATC AATTAATAAG GTACACTCGT TGCGAAAATC CTAAACAAA
    P V N Q L I R Y T R C E N P K T N

1251 TTTTTTCTCA ATTTTCCTT
    F F S I F L

```

Fig. V.3: De coderende nucleotidensequentie van kloon 2 van MRJP9 met de afgeleide aminozuursequentie. De aminozuurletter staat aan het begin van de vertalende nucleotidensequentie. N in de nucleotidensequentie duidt op moeilijk te interpreteren nucleotiden. Cijfers (tussen haakjes) bij AA duiden de 5 plaatsen waar er problemen zijn bij de nucleotide interpretatie

MSFNIWLLILY/HFSIVC/RQAKAHYSLRDFKANIFQVKYQWKYFDYNFGSDEKRQAAIQSGEYNYKNNVPIDVD
RWNGKTFVTILRNDGVPSSLNVISNKIGNGGPLLEYPNWSWAKNQNCSGITSVYRIAIDEDWDLWVLDNGISGE
TSVCPSQIVVFDLKNKLLKQVKIPHDIAINSTTGKRNVTPIVQSFQDYNNTWVYIADVEGYALIIYNNADDSFQ
RLTSSTFVYDPRYTKY/FTINDESFSLDGILGMALSHKTQNLVYSAMSSHNLYVNTKQFTQGKFQANDIQYQG
ASDILWTQASAKAISETGALFFGLVSDTALGCWNNRPLKRRNIEIVAKNNDTLQFISGIKIIKQISSNIYERQN
NEYIWIWVSNKYQKIANGDLNFNEVNFRLNAPVNLIRYTRCENPKTNFFSIFL

Fig. V.4: De afgeleide aminozuursequentie van kloon 2 van MRJP9. Het voorspelde signaalpeptide is *cursief* weergegeven, de peptiden die met MS/MS teruggevonden werden zijn onderlijnd en de grijze AA duiden op de mogelijke AA die voortvloeien uit de onzekere nucleotiden interpretatie.

Op het nucleotide niveau komt de coderende sequentie van PC 8 overeen met de voorspelde nucleotidensequentie (XM_392204), maar op het proteïne niveau heeft het voorspelde proteïne 294 AA, terwijl wij denken dat de afgeleide aminozuursequentie 318 AA telt (fig. V.5). Hiervoor zijn verschillende redenen: door de AA sequentie te laten beginnen met het eerste methionine in plaats van met het tweede kan er volgens SignalP een

signaalpeptide aanwezig zijn, dit is niet het geval als er met het 2^e Met begonnen wordt. Dit eerste lijkt meer waarschijnlijk aangezien PVF1 gesecreteerd wordt. De langere versie is in overeenstemming met de reeds gekende PVF's bij andere insecten. PC 9 heeft een voorspelde proteïne van 275 AA. Dit is te wijten aan alternatieve splitsing (fig. V.5). Exon 5 wordt met 82 basenparen verlengd. In deze verlenging ligt een stopcodon terwijl het stopcodon van PC 8 op exon 6 gelegen is (fig. V.6). Alternatieve splitsing is vrij kenmerkend voor zowel VEGF als PDGF in organismen met een gesloten bloedsomloop. In insecten was er nog geen alternatieve splitsing beschreven. PC 8 heeft een moleculair gewicht van 35,9 kDa en een pI van 7,3. Bij de mature proteïne is dit respectievelijk 32,9 en 6,1. PC 9 heeft een moleculair gewicht van 31,0 kDa en een pI van 6,8. Bij de mature proteïne is dit respectievelijk 28,1 en 5,8.

```

1  ATGCCGTACT CTAAGTGTAG AACGTTTCTC CGTTTCTTCG CGATTGTGTC
   M P Y S K C R T F L R F F A I C S

51  GTTCTCGACT TGTGGACTGG TGATGGCTCA ACTCGAGGAT ACCAGATACC
   F S T C G L V M A Q L E D T R Y P

101 CCGACCAAAG GATAGTGTTT CCCGATCGGG GGAGAGAAAC GGCGAATCCT
   D Q R I V F P D R G R E T A N P

151 GCGTTGGAGG GCGGGCCGAG TGGAGGAGGA ATTGGCGAAT TGGCGAAATC
   A L E G G P S G G G I G E L A K S

201 GATACAATTA GCCAAGAAAA TCAGTTCCAT TAATTCGAGA GACGATTTTC
   I Q L A K K I S S I N S R D D F L

251 TTAAATTAGT CAAAGATGTG CCGAAGGATA TATCTTTCTT CTCCTCGAGC
   K L V K D V P K D I S F F S S S

301 AGTAGAATGG GAGAACTGA ACGTTCGAAT GCCGAGCGAC CAAATCAAAGC
   S R M G E T E R S N A E R P N Q A

351 TTTGTGTATG CCTGAATTGC AAACAGTTCC TCTATTAGAA AATGAGCCAT
   L C M P E L Q T V P L L E N E P S

401 CTGTTATTTA TTATCCAAC TGCACACGGA TCAAAAGATG CGGAGGTTGT
   V I Y Y P T C T R I K R C G G C

451 TGTACACACT CACTCCTCTC TTGTCAACCA ACGGCTACGG AAATTCGAAA
   C T H S L L S C Q P T A T E I R N

501 TTTCGAGATT CTTGTGACAA TTCTTGAATC CAGTGGTAAA TTAAATATC
   F E I L V T I L E S S G K L K Y Q

551 AAGGCAAACG TATCGTACCG ATAGAGGAGC ACACGCAATG CACGTGTGAC
   G K R I V P I E E H T Q C T C D

601 TGCAAAATAA AGGAGACGGA CTGTAACAAG AAACAGTCTT ATGTACCAGA
   C K I K E T D C N K K Q S Y V P E

```

```

651 GGAATGTACA TGTGCGTGCA ACAACGTCGA TGAACAGAAA AAGTGTAATG
    E C T C A C N N V D E Q K K C N E

701 AAAGCAACAT AAAAATGTGG CACCCAGATC TTTGTAGCTG TTTTGCAGA
    S N I K M W H P D L C S C F C R

751 GAAACACAGG AATGTTCAAC TGGTTTTTAT TTCGACCAAA ATTCATGCAG
    E T Q E C S T G F Y F D Q N S C R

801 GTGTGAACGG AACAAACAGG ATTTGTAATA CGGGAATAAC ATCTTTCCTT
    C E R N N K D L *

851 CTTTGCTGCA TTTCTATTAT CTTGTATATC TTATGCCTGC AAGTACCGCT
                                C L Q V P L

901 ATCTAGAACA TGGTTTACAT CCACAAAAGG TTCTGATTAT AGATTCGGAC
    S R T W F T S T K G S D Y R F G Q

951 AAACACAAAG ACCAGATAAT GTACCACCGG TAATAATTGC CCTAGATTCA
    T Q R P D N V P P V I I A L D S

1001 GATGATCCTA GAAGAAAACC TAAACCAGAT CCAGAA
    D D P R R K P K P D P E

```

Fig. V.5: De (coderende) nucleotidensequentie van kloon 8 (PC 8) en 9 (PC 9) van PVF1 met de afgeleide aminozuursequentie. De aminozuurletter staat aan het begin van de vertalende nucleotidensequentie. De onderlijnde sequentie komt overeen met de 82 bijkomende basenparen die in PC 9 voorkomen ten gevolge van alternatieve splitsing in vergelijking met PC 8.

```

PC 8  MPYSKCRTFLRFFAICSFSTCGLVMAQLEDTRYPDQRIVFPDRGRETANPALEGGPSGGG
      .....
PC 9  MPYSKCRTFLRFFAICSFSTCGLVMAQLEDTRYPDQRIVFPDRGRETANPALEGGPSGGG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
PC 8  IGELAKSIQLAKKISSINSRDDFLKLVKDVPKDISFFSSSSRMGETERSNAERPNQALCM
      .....
PC 9  IGELAKSIQLAKKISSINSRDDFLKLVKDVPKDISFFSSSSRMGETERSNAERPNQALCM
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
PC 8  PELQTVPLLENEPSVIYYPTCTRIKRCGGCCTHSLSCOPTATEIRNFEILVTILESSGK
      .....
PC 9  PELQTVPLLENEPSVIYYPTCTRIKRCGGCCTHSLSCOPTATEIRNFEILVTILESSGK
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
PC 8  LKYQGKRIVPIEEHTQCTCDCKIKETDCNKKQSYVPEECTCACNNVDEQKKCNESNIKMW
      .....
PC 9  LKYQGKRIVPIEEHTQCTCDCKIKETDCNKKQSYVPEECTCACNNVDEQKKCNESNIKMW
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
PC 8  HPDLCSCFCRETQECSTGFYFDQNSCRCLQVPLSRTWFTSTKGSDYRFGQTQRPDNVPPV
      .....
PC 9  HPDLCSCFCRETQECSTGFYFDQNSCRERNNKDL
      250     260     270

```

310
PC 8 IIALDSDDPERRKPKPDPE

Fig. V.6: De afgeleide aminozuursequentie van PC 8 en PC 9 van PVF1. Het voorspelde signaal peptide is *cursief*, de peptiden die met MS/MS teruggevonden werden zijn onderlijnd.

C.3 Sequentie homologie en geconserveerde domeinen

Een geconserveerde domein zoekopdracht (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) van de afgeleide aminozuur sequentie van MRJP9 onthult een major royal jelly protein (MRJP) domein van residuen 123-411 (E-value: $8e-74$). Het sterk geconserveerde domein met 4 geconserveerde cysteïnen beslaat 68% van de totale proteïne. De alignatie met ClustalW van alle MRJPs, de yellow-e3-like en yellow-f-like proteïnen van *Apis mellifera* en de yellow, yellow-f en yellow-h van *Drosophila melanogaster* leverde een geconserveerde regio zonder gaps op van 345 AA. Deze aminozuren werden gebruikt om de fylogenie te construeren van de MRJP/yellow familie van *Apis mellifera*. Het gebruikte programma was Treecom for windows (Van de Peer & Dewachter, 1994) en de gebruikte methode was Neighbor-joining. We slaagden erin, net zoals Albert & Klaudiny (2004), de MRJPs te scheiden van de yellow proteïnen, ook zij gebruikten de geconserveerde regio's zonder gaps. De resultaten wijzen er verder op dat MRJP9 het meest verwant is met MRJP8 (fig. V.7). Deze kluster is duidelijk gescheiden van de andere MRJPs.

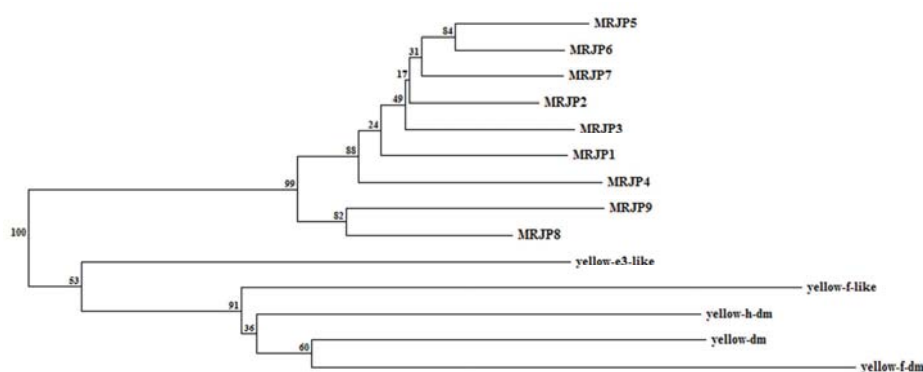


Fig. V.7: Fylogenie van de MRJP/yellow proteïnen van *Apis mellifera* en *Drosophila melanogaster* (dm). De boom is geconstrueerd met Treecon for windows version 1.3b (Van de Peer & Dewachter, 1994), de gebruikte methode is neighbor-joining, de bootstrap waarden worden voor iedere knoop aangegeven in percent, de totale lengte zonder indels is 345AA.

Geconserveerde domein zoekopdracht (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) van de afgeleide aminozuursequentie van transcript variant PC 8 onthult een “Platelet-derived and vascular endothelial growth factors” (PDGF) domein van residuen 117-202 (E-value: 1e-09). Het PDGF domein is gekenmerkt door een patroon van 8 sterk geconserveerde cysteïne residuen. 6 cysteïnen vormen intramoleculaire disulfide bindingen (1-6, 3-7, 5-8). De twee andere cysteïne residuen genereren intermoleculaire kruisgebonden S-S bindingen (2-2, 4-4), wat leidt tot dimeervorming (Muller *et al.*, 1997). Na dit domein volgt een cysteïne-rijke regio met drie CXXC domeinen. Variant PC 9 heeft dezelfde domeinen als deze die voorkomen in variant PC 8.

C.4 Niet-coderende sequentie variatie en de genoomassemblage

Een BLASTN zoekopdracht (Altschul *et al.*, 1997) van het complete cDNA van MRJP9 tegen de honingbij genoomassemblage 4.0 (Amel_4.0_20061003) onthulde 2 hits met zeer hoge scores/E-values: een niet-georiënteerde Group11.12, score 704; E-value: 0.0 met een lengte van 17349 bp en een niet-geplaatste GroupUn.2586, score 458; E-value: e-127 met een lengte van 2304 bp. Deze twee sequenties hebben een sequentie identiteit van 99% en 1 gap in het vertaalde gedeelte. Indien we de volledige 2304 bp aligneren (Pearson *et al.*, 1997) is er een sequentie identiteit van 95% en 14 groepen gaps. Op basis van deze gegevens kunnen we besluiten dat de groepen homologen zijn. We hebben niet kunnen achterhalen of de variabele regio langer is dan de hier vergeleken basenparen.

De coderende sequentie van GroupUn.2586 leidt in de NCBI genbank tot de voorspelling XP_624765 van 198 AA. De eerste 195 AA zijn identiek aan de eerste van MRJP9, de drie laatste zijn IYL. De naam van de voorspelling is echter ongelukkig gekozen, “similar to yellow-h CG1629-PA” (gedeeltelijk), verwijzend naar de homologie met *Drosophila melanogaster*. Drapeau *et al.* (2006) toonde echter aan dat de MRJPs het meest verwant zijn met het yellow-e3-like proteïne (DQ257631) waar ze via genduplicatie uit zouden ontstaan zijn. Dit komt ook gedeeltelijk naar voor uit ons fylogram. Het is trouwens ook één van de twee direct flankerende genen van de MRJP gencluster (Drapeau *et al.*, 2006).

C.5 Beschrijving van MRJP9 en PVF1

MRJP9 behoort tot de MRJP/yellow familie. MRJPs werden initieel geïdentificeerd als de voornaamste proteïnen in koninginnebrij, waar ze 80-90% uitmaken van de totale

proteïneninhoud (Schmitzova *et al.*, 1998). Er zijn bij de honingbij nog 8 andere MRJPs (1-8) en 10 yellow proteïnen gekend (Drapeau *et al.*, 2006).

Een BLASTP zoekopdracht leidde inderdaad tot een tiental voorspelde yellow proteïnen uit het bijengenoom. Deze behelzen de meeste beschreven subfamilie yellow proteïnen (-h) van *Drosophila melanogaster* (Drapeau, 2001). Drapeau vond 14 yellow proteïnen (Drapeau, 2001). Acht yellow proteïnen werden recent aangetoond bij *Bombyx mori* (Xia *et al.*, 2006). Ze werden daar teruggevonden in EST databanken van de middendarm, vleugels, ovaria, vetlichaam, feromoonklieren, embryo's, hersenen en facetogen. Ze werden naast insecten ook terug gevonden bij een aantal bacteriën zoals *Deinococcus radiodurans* (Maleszka & Kucharski, 2000).

De MRJPs delen een N-terminale hydrofobe sequentie die functioneert als kliefbaar signaalpeptide en vermeende N-gebonden glycosylatie sites bevat. Dit veronderstelt dat de proteïnen gesecreteerd worden uit de cel (Albert *et al.*, 1999). Deze glycoproteïnen bezitten 4 geconserveerde cysteïnen. De fysiologische functies van MRJPs van honingbijen blijven voor het grootste deel ongekend. Doordat MRJPs niet alleen in koninginnebrij voorkomen en ze fysicochemische eigenschappen vertonen van ovalbuminen en serum-albuminen, werd door de groep van Simuth voorgesteld de term apalbumin te gebruiken (Majtan *et al.*, 2006). Het is intussen duidelijk geworden dat deze proteïnen nog meer functies hebben die nog niet geheel uitgeklaard zijn. Naast zijn voedselfunctie in de honingbij spelen sommige MRJPs ook een bijkomende rol in de hersenen (Albert & Klaudiny, 2004). MRJP3 moduleert immuunresponsen en vertoont anti-allergische activiteiten (Okamoto *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2004), dit is ook vastgesteld bij MRJP1/apalbumin1 (Majtan *et al.*, 2006). Op basis van een fylogram lijken MRJP8 en 9 nauwst verwant te zijn met de yellow proteïnen (fig. V.7). Albert & Klaudiny (2004) hebben aangetoond dat de yellow proteïnen van de honingbij en *Drosophila* een monofyletische groep vormen ver van de MRJPs, met MRJP 8 als de vroegste divergentie.

De eerste sequentie van MRJP9 (AAY21180) is gedeponereerd in 2005 door Albert & Albertova zonder publicatie. Een andere vermelding van MRJP9 kwam van Souza Santos *et al.* (2005) maar ze beschreven het verkeerdelijk als MRJP8. Ze vonden het terug in de hypofaryngaalklieren.

In 1999 toonden Kettnner *et al.* (1999) aan dat er een proteïne van 50 kDa met de N-terminale AA sequentie XYSLRDFKANIF als hoog moleculair gewicht allergeen kon bestempeld worden. Deze sequentie komt exact overeen met de N-terminale sequentie van het mature MRJP9. Het moleculaire gewicht komt eveneens overeen en er is geen enkel andere AA

sequentie in GLEAN_3 die in de buurt komt. Dus hun beschreven allergeen moet dus MRJP9 zijn.

PVF1 behoort tot de PDGF/VEGF familie. Deze familie werd voor het eerst beschreven bij dieren met een gesloten bloedsomloop zoals de mens. Deze organismen hebben twee systemen: een PDGF/PDGFR en VEGF/VEGFR systeem. PDGF staat voor “platelet-derived growth factor” en VEGF voor “vascular endothelial growth factor”. Ze zijn geëvolueerd uit een gemeenschappelijke voorouder (Hoch & Soriano, 2003). Bij invertebraten is er nog steeds één systeem: PVF/PVR.

Van de VEGF-familie zijn er momenteel 7 subfamilies gekend: VEGF-A, PIGF (placenta groei factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E en svVEGF (snake venom VEGF) (Takahashi & Shibuya, 2005). svVEGF is bij verschillende adders waargenomen. Ze verhogen de capillaire permeabiliteit en kunnen zo bijdragen tot de verhoging van intoxicatie. De sVEGFs lijken individuele biologische karakteristieken te hebben die de divergentie van de slangen weerspiegelen (Takahashi & Shibuya, 2005). Deze gifspecifieke sVEGF bestaat naast VEGF-A (Takahashi *et al.*, 2004). Verschillende leden van deze familie hebben isovormen die ontstaan zijn door alternatieve mRNA splitsing.

PDGF werd voor het eerst geïdentificeerd in een zoektocht naar serumfactoren die de verbreiding van arteriële gladde spiercellen stimuleren (Ross *et al.*, 1974). PDGFs reguleren de cellulaire responsen, inclusief verspreiding, overleving, migratie en de afzetting van de cellulaire matrix en weefsel remodulerende factoren. Er zijn vier PDGFs: A, B, C en D. Alle PDGFs functioneren als gesecreteerde disulfide verbonden homodimeren. Enkel PDGF-A en B kunnen functionele heterodimeren vormen. PDGF-A heeft twee isovormen. Zowel PDGF-A als PDGF-B hebben een signaalpeptide en een propeptide (Fredriksson *et al.*, 2004).

Aangezien de primaire structuur van de PDGF domeinen van PDGF en VEGF grote gelijkenissen vertonen, wordt verondersteld dat de globale structuur niet veel verschilt. Dit blijkt uit kristalstructuuranalyse van VEGF en PDGF-BB (Muller *et al.*, 1997).

In *Drosophila melanogaster* werden drie PVFs (1-3) gevonden en één receptor PVR (Cho *et al.*, 2002). Alternatieve splitsing van PVR genereert isovormen die verschillen in hun expressiepatroon en ligand bindingsaffiniteit (Cho *et al.*, 2002). Het door ons gevonden proteïne komt best overeen met PVF1 van *Drosophila* en het is de enige predictie van een PVF (XP_392204) van *Apis mellifera* die in de NCBI genbank ingebracht is. Een TBLASTN met de reeds gekende PVFs van *Drosophila* tegen de assemblage van het honingbij genoom versie 4.0 (Amel_4.0_20061003) levert drie homologen op. PVF1 heeft een homologie op

chromosoom 2 (amel_4.0 group 2.38, E-Value 1e-11) wat overeenkomt met het door ons gevonden PVF1 in bijengif. PVF 3 heeft de beste match met een sequentie gelegen op chromosoom 4 (amel_4.0 group 4.27, E-Value 1e-11). Met dezelfde sequentie wordt ook de beste match bereikt als PVF2 geblast wordt (E Value 2^e-06). Hier is dus geen sprake van een genduplicatie op het zelfde chromosoom, maar op chromosoom 10 (amel_4.0 group 10.31) is er wel een PDGF domein met 7 van de 8 geconserveerde cysteïnen met een substitutie van het tweede cysteïne. Deze substitutie komt ook voor in PVF2 van *Drosophila melanogaster*. Er is mogelijks nog een vierde proteïne met een PDGF domein op chromosoom 2 (amel_4.0 group 2.35). De van dit proteïne sequentie werd gevonden door het PDGF domein te blasten tegen het gekende genoom. Momenteel kunnen we hier echter geen verdere uitspraken over doen omdat we niet beschikken over voldoende informatie.

Bij insecten, voornamelijk *Drosophila*, zijn enkele functies van PVFs gekend. Ze spelen een rol in neurale netwerken (Kraut *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002), embryonale hematopoëtische celmigratie (Hoch & Soriano, 2003) en gonaden ontwikkeling (McDonald *et al.*, 2003).

Ketnner *et al.* (1999) stelde een ongekend allergeen vast met een moleculair gewicht van 54 kDa en de volgende N-terminale AA sequentie: XXAERPQNQAS. Deze AA sequentie komt niet in GLEAN_3 voor, maar de sequentie AERPQNQAL komt er wel in voor. Deze sequentie vinden we enkel terug in PVF1, maar deze is niet N-terminaal gelegen. Met deze gegevens bestaat toch de mogelijkheid dat het allergeen PVF1 is, die in dimeer vorm werd waargenomen, wat voor dit proteïne een normaal voorkomen is.

D. Besluit

De transcripten van de in een vorig onderzoek geïdentificeerde nieuwe bijengifcomponenten 1 & 3 (Peiren *et al.*, 2005) konden geïsoleerd worden uit het weefsel van de gifklieren. Op basis van sequentiedata en -analyses konden we besluiten dat het respectievelijk PVF1 en MRJP9 betreft. Het is de eerste keer dat er een PVF in de honingbij beschreven werd, tot nu toe bestond er enkel een predictie. MRJP9 werd tot nu toe enkel in koninginnebrij en in een EST hersenendatabank terug gevonden. Uit wat vooraf gaat kunnen we besluiten dat het effectief om gifcomponenten gaat die niet alleen kunnen toegewezen worden aan celbeschadiging of contaminatie. De kans is ook relatief groot dat het hier zelfs gaat over proteïnen met een allergeen karakter, zeker als we het hebben over MRJP9.

Referenties

- Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzova, J. & Simuth, J. 1999. The Family of Major Royal Jelly Proteins and Its Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 49: 290-297.
- Albert, T. & Klaudiny, J. 2004. The Mrjp/Yellow Protein Family of *Apis mellifera*: Identification of New Members in the Est Library. *Journal of Insect Physiology* 50: 51-59.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped Blast and Psi-Blast: a New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F. & Krasnow, M. A. 2002. Developmental Control of Blood Cell Migration by the Drosophila Vegf Pathway. *Cell* 108: 865-876.
- Drapeau, M. D. 2001. The Family of Yellow-Related Drosophila Melanogaster Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 611-613.
- Drapeau, M. D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C. & Maleszka, R. 2006. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein Family and the Emergence of Social Behavior in Honey Bees. *Genome Research* 16: 1385-1394.
- Fredriksson, L., Li, H. & Eriksson, U. 2004. The Pdgf Family: Four Gene Products Form Five Dimeric Isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15: 197-204.
- Hoch, R. V. & Soriano, P. 2003. Roles of Pdgf in Animal Development. *Development* 130: 4769-4784.
- Kettner, A., Henry, H., Hughes, G. J., Corradin, G. & Spertini, F. 1999. IgE and T-Cell Responses to High-Molecular Weight Allergens From Bee Venom. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 394-401.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. 2004. Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68: 138-145.
- Kraut, R., Menon, K. & Zinn, K. 2001. A Gain-of-Function Screen for Genes Controlling Motor Axon Guidance and Synaptogenesis in Drosophila. *Current Biology* 11: 417-430.
- Majtan, J., Kovacova, E., Bilikova, K. & Simuth, J. 2006. The Immunostimulatory Effect of the Recombinant Apalbumin 1-Major Honeybee Royal Jelly Protein-on Tnf Alpha Release. *International Immunopharmacology* 6: 269-278.
- Maleszka, R. & Kucharski, R. 2000. Analysis of Drosophila Yellow-B Cdna Reveals a New Family of Proteins Related to the Royal Jelly Proteins in the Honeybee and to an Orphan Protein in an Unusual Bacterium *Deinococcus Radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 773-776.
- Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. 2004. Cd-Search: Protein Domain Annotations on the Fly. *Nucleic Acids Research* 32: W327-W331.
- Mcdonald, J. A., Pinheiro, E. M. & Montell, D. J. 2003. Pvfl, a Pdgf/Vegf Homolog, Is Sufficient to Guide Border Cells and Interacts Genetically With Taiman. *Development* 130: 3469-3478.
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C. & Devos, A. M. 1997. Vascular Endothelial Growth Factor: Crystal Structure and Functional Mapping of the Kinase Domain Receptor Binding Site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7192-7197.
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. 2003. Major Royal Jelly Protein 3 Modulates Immune Responses in Vitro and in Vivo. *Life Sciences* 73: 2029-2045.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z. & Miller, W. 1997. Comparison of Dna Sequences With Protein Sequences. *Genomics* 46: 24-36.

- Peiren, N., de Graaf, D. C., Brunain, M., Bridts, C. H., Ebo, D. G., Stevens, W. J. & Jacobs, F. J. 2006. Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *FEBS Letters* 580: 4895-9.
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., De Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J. & Jacobs, F. J. 2005. The Protein Composition of Honeybee Venom Reconsidered by a Proteomic Approach. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1752: 1-5.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. & Harker, L. 1974. Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates Proliferation of Arterial Smooth-Muscle Cells Invitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1207-1210.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz, S. & Misener, S. (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (pp. pp 365-386). Totowa, NJ: Humana Press.
- Santos, K. S., Dos Santos, L. D., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Malaspina, O. & Palma, M. S. 2005. Profiling the Proteome Complement of the Secretion From Hypopharyngeal Gland of Africanized Nurse-Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 85-91.
- Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J. & Simuth, J. 1998. A Family of Major Royal Jelly Proteins of the Honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 1020-1030.
- Takahashi, H., Hattori, S., Iwamatsu, A., Takizawa, H. & Shibuya, M. 2004. A Novel Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Predominantly Induces Vascular Permeability Through Preferential Signaling Via Vegf Receptor-1. *Journal of Biological Chemistry* 279: 46304-46314.
- Takahashi, H. & Shibuya, M. 2005. The Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf)/Vegf Receptor System and Its Role Under Physiological and Pathological Conditions. *Clinical Science* 109: 227-241.
- Van de Peer, Y. & Dewachter, R. 1994. Treecon for Windows - a Software Package for the Construction and Drawing of Evolutionary Trees for the Microsoft Windows Environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10: 569-570.
- Xia, A. H., Zhou, Q. X., Yu, L. L., Li, W. G., Yi, Y. Z., Zhang, Y. Z. & Zhang, Z. F. 2006. Identification and Analysis of Yellow Protein Family Genes in the Silkworm, *Bombyx Mori*. *Bmc Genomics* 7.

Hoofdstuk VI: Genomische en transcriptie analyse van de proteïne heterogeniteit van het bijengifallergeen Api m 6

Genomic and transcriptional analysis of protein heterogeneity of the honeybee venom allergen
Api m 6
Peiren N., de Graaf D. C., Evans J. D. and Jacobs F. J.
Insect Molecular Biology: 15 (5) 577-581 (2006)

A. Samenvatting

Van verschillende gifcomponenten van de honingbij is geweten dat ze een allergische reactie veroorzaken bij mensen en andere gewervelde dieren. Eén van deze componenten, het minder belangrijke allergeen Api m 6, is gekend om zijn aminozuurvariatie. Het genetische mechanisme voor deze variatie is echter onbekend. Hier tonen wij aan dat Api m 6 wordt bekomen uit één enkel locus, en dat de wezenlijke variatie op proteïne-niveau een eenvoudige genoom-niveau oorzaak heeft, zonder beroep te moeten doen op veelvoudige loci of alternatief gesplitste exonen. Api m 6 bevindt zich dichtbij een verkeerd geassembleerde sectie van de honingbij genoom sequentie, en wij stellen voor dat heel wat indels in en dichtbij Api m 6 de hoofdoorzaak zouden kunnen zijn van deze verkeerde assemblage. Wij stellen eveneens voor dat genen zoals Api m 6 met coderende regio's of niet vertaalde indels een sterk effect zouden kunnen gehad hebben op de samenstelling van dit ontwerp van het honingbij genoom.

B. Abstract

Several components of honeybee venom are known to cause allergenic responses in humans and other vertebrates. One such component, the minor allergen Api m 6, has been known to show amino-acid variation but the genetic mechanism for this variation is unknown. Here we show that Api m 6 is derived from a single locus, and that substantial protein-level variation has a simple genome-level cause, without the need to invoke multiple loci or alternatively spliced exons. Api m 6 sits near a misassembled section of the honeybee genome sequence, and we propose that a substantial number of indels at and near Api m 6 might be the root cause of this misassembly. We suggest that genes such as Api m 6 with coding-region or UTR indels might have had a strong effect on the assembly of this draft of the honeybee genome.

C. Introduction

Dangerous allergenic responses can be caused in humans by components of the venom of stinging social insects (Hoffman, 2003). A major research goal remains to predict which fraction of the human population will be likely to react adversely to specific venom components received through incidental or occupation-related stinging. Further, an

understanding of the components of venoms that induce allergic responses can be used to better tune therapeutic treatments of allergic responses. Allergens from insects and other sources are designated with the terms "major" or "minor" depending on whether more or less than 50% of the hypersensitive patients develops a specific IgE response against a given allergen (Larsen & Lowenstein, 1996). Honeybee venom contains the major allergens Api m 1 (phospholipase A2), Api m 2 (hyaluronidase), Api m 3 (acid phosphatase), Api m 4 (melittin) and Api m 7 (CUB serine protease), along with at least one minor allergen, Api m 6, which shows 42% IgE responsiveness (Hoffman, 2006).

Here we describe the genomic basis for observed protein-level heterogeneity found for Api m 6. Api m 6 migrates as an 8-kDa band in SDS-PAGE and its amino acid sequence was determined on HPLC-purified preparations (Kettner *et al.*, 2001). It exists as four isoforms of 7190, 7400, 7598 and 7808 Da respectively, differing in their primary structure at the amino and carboxy terminus by a maximum of 6 amino acids (Kettner *et al.*, 2001). Allergen heterogeneity can be due to allelic variation at a single allergen gene (Gao *et al.*, 2005), the occurrence of multiple genes of allergens encoding highly homologous proteins (Piersma *et al.*, 2005), or by alternative splicing of a single transcript (Mykles *et al.*, 1998). Some bee venom components are already known to have a rather peculiar gene organisation. Indeed, the precursors of bee venom apamin and MCD peptide are encoded by two genes in tandem which share the same 3'-exon (Gmachl & Kreil, 1995). Here we use new genome-level data for honeybees to determine the cause behind multiple isoforms of Api m 6. We present the complete cDNA sequences for two Api m 6 variants. We then use the latest honeybee assembly to show that these variants arise from a single polymorphic locus. Interestingly, high sequence-level variation at and around this locus appears to be responsible for a break in the honeybee genome assembly.

D. Results and discussion

D.1 Cloning and sequencing of cDNA fragments encoding Api m 6

5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) using gene-specific primers resulted in an amplicon of approximately 350 bp in size that was cloned in the pCR®4 vector. Transformation to chemically competent TOP-10 *E. coli* yielded a large number of transformants, 10 of which were retained for further analysis. DNA sequences were found to be identical (represented by clones 5.1) and consisted of a putative 5' UTR and a coding

region for which the predicted protein was identical to that known for Api m 6. 3'-RACE resulted in a fragment of approximately the same size, which was again cloned and sequenced. Here the sequenced clones showed two transcript variants, represented by the inserts of clone 3.3 and clone 3.9. Subsequently we amplified the complete Api m 6 transcript from a venom gland cDNA preparation using primers designed respectively at the extreme 5'- and 3'-ends of clone 5.1 and clone 3.9. Sequencing of the corresponding 528 bp fragment revealed two additional minor transcript differences, this time at the 5'-end, 38 and 117 bp upstream of the forward primer, when compared to the insert of clone 5.1. This cDNA sequence was deposited to GenBank (accession number DQ384991), as was a sequence assembly of the inserts of clones 5.1 and 3.9 (accession number DQ384990). Because the latter matched perfectly well the latest honeybee genome assembly (see further), it was named variant 1, whereas DQ384991 became variant 2.

D.2 Deduced amino acid sequence and protein heterogeneity

The deduced amino acid sequences of both transcripts are given in Figure VI.1. At the protein level differences were noticed at position 14 (Val against Ile) and at the carboxy terminal region, with two additional residues Leu and Pro. This corresponds with the differences found at the C-terminal ends of the four Api m 6 variants described by Kettner *et al.* (2001): Api m 6.01 and Api m 6.03 having the same two additional residues, in contrast to the variants Api m 6.02 and Api m 6.04. Further we noticed that the deduced amino acid sequences were 21 residues longer at the N-terminus when compared to the earlier described variants Api m 6.03 and Api m 6.04 (Kettner *et al.*, 2001). However, based on an *in silico* SigP-NN prediction (Bendtsen *et al.*, 2004), a signal peptide cleavage site was identified between position 21 and 22, resulting in a mature protein that starts at exactly the same residue. Depending on the cDNA variant that was translated this mature protein will correspond to Api m 6.03 or Api m 6.04. The other two variants described by Kettner *et al.* (2001) lack the first 4 N-terminal amino acids Phe-Gly-Gly-Phe of the mature protein. We have found no indication that this was the result of a new transcript or alternative splicing variant. Nor could we evidence that the mature proteins of these variants are shortened by enzymatic activity similar to stepwise cleavage of the pro part from promelittin by dipeptidylpeptidase IV (Kreil *et al.*, 1980). Further we notice that amino acid replacement at position 14 in the deduced amino acid sequence is located in the signal peptide and has no consequences for the mature allergen.

(A)

```

1 attcacagtgaacgtaagttcttttcttcttttttttcgaaaaacaac
51 tttgtttgagaagaacaagacatgtctcgtctggttcttgccctccttct
      M S R L V L A S F L
      -21
101 tcttttggcaattttctccatgcttgttggaggatttggaggatttggag
      L L A I F S M L V G G F G G F G
      -1 +1
151 gatttggaggacttggaggacgtggttaaattgtccaagcaatgagatcttc
      G F G G L G G R G K C P S N E I F
201 agtagatgcatggacggtgccaaacgttttgcaccaatgttgttcctaa
      S R C D G R C Q R F C P N V V P K
251 acctttatgcataagatatgtgcaccaggatgtgtatgtagacttgggtt
      P L C I K I C A P G C V C R L G
301 atttaaggaataaaaagaaggatgcgttccgcgatctaaatgcggatga
      Y L R N K K K V C V P R S K C G
351 cttttataattatttcatgattattttatgattgtttaacaattattgta
401 ttgtattttatcattcataaaaattgttatgttattattttatcagtaaa
451 tatatatattatttttatttatttatttataaaaagatgaatggaata
501 atgtcaagt

```

(B)

```

1 attcacagtgaacgtaagttcttttcttcttttttttttttttcgaaaa
51 aacaactttgtttgagaagaacaagacatgtctcgtctggttcttgccctc
      M S R L V L A S
      -21
101 cttccttcttttggcagttttctccatgcttgttggaggatttggaggat
      F L L L A V F S M L V G G F G G
      -1 +1
151 ttggaggatttggaggacttggaggacgtggttaaattgtccaagcaatgag
      F G G F G G L G G R G K C P S N E
201 atcttcagtagatgcatggacggtgccaaacgttttgcaccaatgttgt
      I F S R C D G R C Q R F C P N V V
251 tcctaaacctttatgcataagatatgtgcaccaggatgtgtatgtagac
      P K P L C I K I C A P G C V C R
301 ttggttatttaaggaataaaaagaaggatgcgttccgcgatctaaatgc
      L G Y L R N K K K V C V P R S K C
351 ctcccaggatgagttttataattatttcatgattattttatgattgttca
      L P G
401 actcaattattgtattgtattttatcattcataaaaattgttatgttatt
451 attttatcagaggtaaatatatatatattattttcattattcatttta
501 ataaaagatgaatggaataatatcaagt

```

(C)

```

          10      20      30      40      50
var1 MSRLVLASFLLLAIFSMVLVGGFGGFGGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
var2 MSRLVLASFLLLAVFSMVLVGGFGGFGGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRC
          10      20      30      40      50

          60      70      80      90
var1 QRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCLGYLRNKKKVCVPRSKC--G
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
var2 QRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCLGYLRNKKKVCVPRSKCLPG
          60      70      80      90

```

Fig. VI.1: Nucleotide and deduced amino acid sequences of Api m 6 transcript variant 1 (A) and 2 (B). The numbers on the left denote the nucleotide numbers. The start and stop codon are underlined. Residues -1 to -21 are from the signal peptide. Residue +1 denotes the first amino acid of the mature protein. In (C) the alignment of the deduced amino acid sequences of the two Api m 6 transcript variants is given.

D.3 Sequence homology and conserved domains

Conserved domain search (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) of the deduced amino acid sequence from transcript variant 1 revealed a Trypsin Inhibitor like cysteine rich (TIL) domain from residue 37-91 (score: 37.3; E-value: 5e-04). This family contains trypsin inhibitors as well as a domain found in many extracellular proteins. The domain typically contains ten cysteine residues that form five disulphide bonds in the combination 1-7, 2-6, 3-5, 4-10 and 8-9. The assumption that Api m 6 represents a trypsin inhibitor was already made by Banks and Shipolini (1986), although the protein was at that time hardly characterized and certainly not yet named as such. In fact, they described two peptides H1 (17 residues) and H3 (35 residues) which later were found to correspond with the N-terminal ends of Kettner's isoforms of Api m 6, differing from each other only in that one lacks the first four residues. The amino acid compositions were similar to a protease inhibitor that was earlier purified from bee venom by Shkenderov (1973). Although no proteolytic activity could be assigned to the peptides H1 and H3, it appears now that Api m 6 has a molecular weight quite near that of Shkenderov's protease inhibitor, i.e. 9000 Da.

D.4 Non-coding sequence variation and the genome assembly

A BLASTN search (Altschul *et al.*, 1997) of the complete cDNA against honeybee genome assembly 4.0 (Amel_4.0_20061003) revealed 2 hits with very high scores/E-values: scaffold 16.18 (Contig5539), score: 486; E-value: e-136 and unmapped scaffold GroupUn.6096 (Contig14926), score: 371; E-value: e-101. DNA sequence comparison demonstrated a 100% match between Contig5539 (between position 37212 and 36406, introns excluded) and an assembly of the RACE fragments from *clone 5.1* and *clone 3.9* (Api m 6 variant 1, Fig. VI.2A). On the other hand, Contig14926 (between position 16221 and 17048, introns excluded) was identical to the coding region of the full size Api m 6 transcript and the insert of *clone 3.3* (Api m 6 variant 2, Fig. VI.2B). However, the untranslated region (UTR) of the full size cDNA shows an indel of 2 consecutive thymines, found upstream from

position 41 in DQ384991. There are also eight indels (at four locations) and one G to A transition in the 3' UTR of variant 1 when aligned with variant 2. These results demonstrate the existence of several different transcript variants of the bee venom allergen Api m 6, originating from genome-level variation at a single locus.

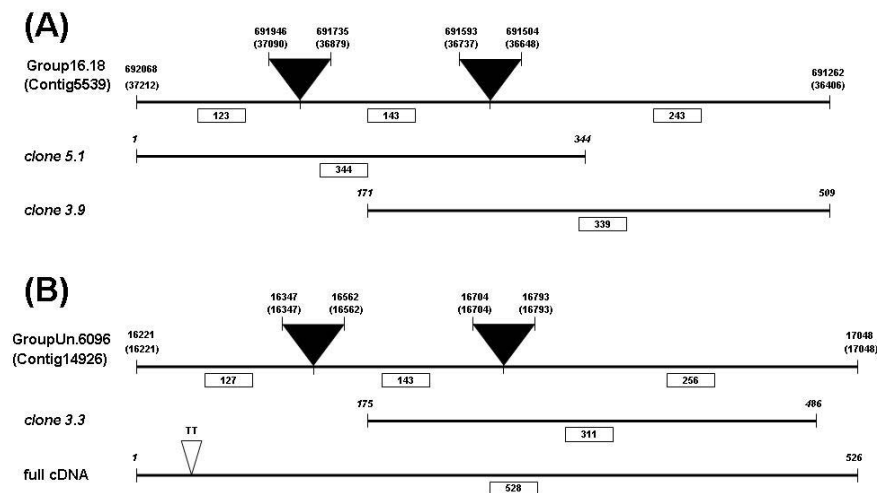


Fig. VI.2: Alignment of two *in silico* spliced honeybee genome sequences with different cDNA fragments of the bee venom allergen Api m 6. (A) Api m 6 was present in mapped scaffold 16.18 from genome assembly 4.0 (positions marked above the bar, along with coordinates for the corresponding Contig5339). Api m 6 is characterized by two introns (depicted by black triangles; splicing sites given on top) and this haplotype of the genome assembly showed a perfect sequence-level match with cloned 5'- (clone 5.1) and 3'-RACE fragments (clone 3.9). The predicted protein from this sequence is identical to the described Api m 6 variant 1. (B) A second transcript variant was found by cDNA sequencing (full cDNA). This transcript has a nearly identical match to unmapped scaffold GroupUn.6097 (Contig14926), the only difference being a TT-insertion mutation (depicted by a white triangle) in the 5'-UTR. The 3'-end of transcript variant 2 corresponds also to another cloned 3'-RACE fragment (clone 3.3). Fragment lengths (in bp) are given below the bar and in boxes.

Api m 6 shows a substantial amount of sequence variation (nearly all haplotypes sequenced to date differ in at least one place) as well as sections of repetitive simple sequences (monobasic A or T runs, as well as an AT dinucleotide repeat; Fig. VI. 1). It is conceivable that this variation was the root cause for misassembly at this section of the draft honeybee genome sequence. First, it is evident that assembly scaffolds 16.18 and GroupUn.6095 are homologous, and that GroupUn.6095 spans the gap between assembly scaffolds 16.18 and 16.19. These genome sections apparently assembled separately because

of sequence variation found in the two haplotypes sequenced for the Honeybee Genome Project. This effect is probably widespread in assemblies of this and other draft genome sequences. In fact, this effect is seen further down chromosome 16 (scaffolds 16.11 and 16.12), where the hypervariable immune effector apidaecin (Casteels *et al.*, 1994) has apparently disrupted the genome assembly. An understanding of allelic variation at specific genes might help unite unassembled parts of the bee genome. As a corollary, misassembled sections of the bee genome might indicate biologically important variation in genes adjacent to these gaps.

E. Material and methods

E.1 Bee venom glands

Honeybees (*Apis mellifera carnica*) were all taken at the hive entrance of a single colony from the apiary of the Ghent University (Belgium). The venom glands of 320 bees were dissected under anaesthesia by chilling. Firstly, the whole sting apparatus was removed from the abdomen and submerged in RNALater® (Ambion). Subsequently, the glands were separated from the reservoir and collected all together in 100 µl fresh solution. Homogenization and mRNA isolation was done using the Micro-FastTrack™ 2.0 Kit (Invitrogen) following the protocol for fresh and frozen tissue. After spectrophotometric yield determination, mRNA was stored in elution buffer at –80°C until ready for use.

E.2 cDNA preparation and primer development

Venom gland cDNA was prepared using AMV reverse transcriptase and the oligo dT primer from the cDNA Cycle® Kit (Invitrogen) according to the manufacturers instructions. To find the corresponding genome sequence for primer development, the Api m 6 amino acid sequence (P83563) was BLAST-searched against an early release of the honeybee genome (Amel_1.2) at <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>. The target domain was located on group 16.4 and extended from position 258118 to 258415 (total length of the group: 806 207 bp). Subsequently Api m 6 gene specific primers (GSP) for rapid amplification of cDNA ends (RACE; see further) were developed using the Primer3 software on the world wide web (Rozen & Skaletsky, 2000). This gave the following result: GSP forward primer (GSP-fw) 5'-TTGGAGGATTGGAGGCTTGAGGA-3' and GSP reverse

primer (GSP-rv) 5'-GCATTAGATCGCGGAACGCATACCT-3'. Their suitability for further analysis was tested by a simple PCR reaction using the venom gland cDNA preparation (see above) as template. The resulting amplicon was sequenced for confirmation.

E.3 5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) and 3'-RACE

RACE ready cDNA was prepared by following the protocol described in the GeneRacer™ Kit (Invitrogen). Briefly, 100 ng of bee venom gland mRNA was subsequently treated with calf intestinal phosphatase and tobacco acid pyrophosphatase, to be ligated at its 5'-end with the GeneRacer™ RNA oligo. This ligated mRNA was reverse transcribed using the SuperScript™ III RT and the GeneRacer™ oligo dT primer to create RACE-ready first-strand cDNA with known priming sites at the 5'- and 3'-ends. Generation of 5'-RACE fragment was done by PCR, using a combination of GeneRacer™ 5'-primer and GSP-rv, whereas the 3'-amplification needed a combination of GSP-fw and GeneRacer™ 3' primer. Both reactions were done in an Eppendorf Mastercycler using a touchdown protocol.

E.4 Cloning and DNA sequencing

PCR products were cloned in the pCR®4-TOPO® vector. Individual transformants were picked and analyzed for the presence of insert by PCR. The corresponding amplicons were used for sequence analysis.

DNA sequencing was performed using a Perkin Elmer ABI Prism 377 automated DNA sequencer. PCR product was treated with shrimp alkaline phosphatase (1 U/μl, Amersham E70092Y) and exonuclease I (20 U/μl, Epicentre Technologies X40505K) for 15 minutes at 37 °C, followed by 15 minutes at 80 °C to inactivate the enzymes. This material was then used for cycle sequencing without any further purification, using the ABI Prism BigDye V 3.1 Terminator Cycle Sequencing kit. The sequencing conditions were 30 sec at 96 °C, 15 sec at 50 °C and 4 min at 60 °C for 27 cycles. Primers used for sequencing were GSP-fw, GSP-rv or GeneRacer™ 5'-primer. Cycle sequence products were precipitated by adding 25 μl of 95 % ethanol and 1 μl 3 M sodium acetate, pH 4.6 to each cycle sequencing reaction (10 μl). The samples were placed at -20 °C for 15 minutes and centrifuged at 14.000 rpm for 15 minutes. After precipitation, an additional wash of the pellet was performed with 125 μl of 70 % ethanol and centrifuged at 14.000 rpm for 5 minutes. The pellet was dried in a

Speedvac concentrator, redissolved in loading buffer and run on a 48 cm 4.25 % acrylamide:bisacrylamide (29:1) gel.

E.5 Analysis of sequence data

Partial cDNA clones and the complete cDNA sequence generated above were aligned with honeybee genome assembly 4.0 (Amel_4.0_20061003) using BLASTN (Altschul *et al.*, 1997), without filters. Sequences were also compared by BLASTN to unscaffolded contigs. Several thousand basepairs of flanking DNA on either side of Api m 6 (e.g., on Contig5539) was used to confirm that this contig and unassembled Contig14926 were in fact derived from the same genome location, despite showing substantial genome sequence variation at and near Api m 6. Unscaffolded Contig14926 was used, via BLASTN, to span the gap between assembled scaffolds 16.18 and 16.19. Sequence variation 2 5' and 3' UTR regions of Api m 6 was characterized by alignment of DQ384991 and Contigs14926 and 5539.

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped Blast and Psi-Blast: a New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Banks, B. E. C. & Shipoloni, R. A. 1986. Chapter 7: Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In Piek T. (Ed) *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects* (pp. 329-415). Academic Press.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G. & Brunak, S. 2004. Improved Prediction of Signal Peptides: Signalp 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340: 783-795.
- Casteels, P., Romagnolo, J., Castle, M., Casteelsjossion, K., Erdjumentbromage, H. & Tempst, P. 1994. Biodiversity of Apidaecin-Type Peptide Antibiotics - Prospects of Manipulating the Antibacterial Spectrum and Combating Acquired-Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26107-26115.
- Gao, Z. S., Van De Weg, W. E., Schaart, J. G., Van Der Meer, I. M., Kodde, L., Laimer, M., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K. & Gilissen Ljwj. 2005. Linkage Map Positions and Allelic Diversity of Two Mal D 3 (Non-Specific Lipid Transfer Protein) Genes in the Cultivated Apple (*Malus Domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* 110: 479-491.
- Gmachl, M. & Kreil, G. 1995. The precursors of the bee venom constituents apamin and MCD peptide are encoded by two genes in tandem which share the same 3'-exon. *J Biol Chem* 270: 12704-8.
- Hoffman, D. R. 2003. Fatal Reactions to Hymenoptera Stings. *Allergy and Asthma Proceedings* 24: 123-127.
- Hoffman, D. R. 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30: 109-128.
- Kettner, A., Hughes, G. J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F. & Corradin, G. 2001. Api M 6: a New Bee Venom Allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 914-920.
- Kreil, G., Haiml, L. & Suchanek, G. 1980. Stepwise Cleavage of the Pro Part of Promelittin by Dipeptidylpeptidase-Iv - Evidence for a New Type of Precursor- Product Conversion. *European Journal of Biochemistry* 111: 49-58.
- Larsen, J. N. & Lowenstein, H. 1996. Allergen Nomenclature. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 97: 577-578.
- Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. 2004. Cd-Search: Protein Domain Annotations on the Fly. *Nucleic Acids Research* 32: W327-W331.
- Mykles, D. L., Cotton, J. L. S., Taniguchi, H., Sano, K. I. & Maeda, Y. 1998. Cloning of Tropomyosins From Lobster (*Homarus Americanus*) Striated Muscles: Fast and Slow Isoforms May Be Generated From the Same Transcript. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 19: 105-115.
- Piersma, S. R., Gaspari, M., Hefle, S. L. & Koppelman, S. J. 2005. Proteolytic Processing of the Peanut Allergen Ara H 3. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 744-755.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz, S. & Misener, S. (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (pp. pp 365-386). Totowa, NJ: Humana Press.
- Shkenderov, S. 1973. A protease inhibitor in bee venom. Identification, partial purification and some properties. *FEBS letters* 33: 343-347.

**Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat
bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de
honingbij (*Apis mellifera* L.).**

A. Inleiding

De gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.) scheiden een mengsel van componenten uit in de gifblaas. Een aantal van deze componenten hebben een toxisch effect op insecten en vertebraten en sommige lokken allergische reacties uit wanneer ze in het organisme geïnjecteerd worden.

In een vorige studie hebben we de beschikbaarheid van het genoom van de honingbij gecombineerd met een hoog performante identificatie methode, namelijk massaspectrometrie, om de proteïensamenstelling van gif te herbekijken (Peiren *et al.*, 2005). We vonden drie nieuwe componenten die nog niet eerder in bijengif beschreven werden waarvan minstens één, icarapine, een IgE bindend proteïne is (Peiren *et al.*, 2006).

In het allergologisch onderzoek ontstaat de trend om met recombinant proteïnen of met constructen ervan (Fellrath *et al.*, 2003; Kussebi *et al.*, 2005; Karamloo *et al.*, 2005) te werken. Deze aanpak biedt het voordeel dat in de diagnostiek de individuele allergenen kunnen gedetecteerd worden zodat men weet op welke component(en) men allergisch reageert. Op het therapeutisch vlak ontstaat er een grote efficiëntie, er zijn minder neveneffecten en men kan tijdens de therapie niet sensibel worden voor andere componenten. Deze persoonlijke aanpak heeft echter zijn consequenties. Er is de noodzaak om de complete gifsamenstelling en het allergeen karakter van alle gifcomponenten te kennen. Dit wil zeggen dat de sporenelementen niet over het hoofd mogen gezien worden. Deze sporenelementen kunnen gesecreteerde proteïnen zijn alsook proteïnen die vrijgesteld worden door beschadiging van de cellen die het gifkanaal en de gifblaas aflijnen (Hoffman, 2006).

Op onze zoektocht naar potentiële gifcomponenten hebben we ervoor gekozen te werken met aangerijkt gif. Dit aangerijkt gif verkrijgen we door de volle gifblaas en de gifklieren te lyseren, te centrifugeren en met het supernatans verder te werken. Om deze techniek te kunnen evalueren, worden ook de reeds gekende bijengif spots opnieuw geanalyseerd. Het is enkel de bedoeling de meest abundante proteïnen tussen 10 en 80 kDa te bekijken omdat in dit gebied tot dusver de meeste allergenen gedetecteerd zijn, zowel bij de honingbij als andere organismen.

De 62 meest dominante spots worden gebruikt voor massaspectrometrische analyse. 22 spots kwamen overeen met de door ons vroeger beschreven gifspots (Peiren *et al.*, 2005). 7 spots konden niet geïdentificeerd worden. 33 konden geïdentificeerd worden en leverden 22 verschillende proteïnen. Veel van de geïdentificeerde proteïnen zijn betrokken bij de

onderdrukking van oxidatieve stress. Er zijn ook veel componenten die een hoge homologie vertonen met proteïnen van andere organismen die allergische reacties uitlokken bij de mens.

B. Materiaal en methoden

B.1 Staal bereiding

Het ganse angelapparaat werd uit de carnica honingbij (*Apis mellifera carnica*) getrokken na verdoving door afkoeling. De gifklieren en hun volle reservoir werden uitgeprepareerd en ondergedompeld in 250 µl buffer (40 mM Tris-base, 8 M ureum, 4% CHAPS en 5 mM DTT). In 250 µl worden er 25 gifblazen gebracht. Het geheel werd gecentrifugeerd en het supernatans werd in een nieuw recipiënt gebracht. De proteïne concentratie werd bepaald met de Bradford methode.

B.2 Tweedimensionale gel elektroforese

Ongeveer 1 mg proteïne werd op een 17 cm IPG strip (pH 3-10) gebracht, tijdens een zeven uur durende passieve in-gel rehydratatie (Sanchez *et al.*, 1997). Iso-elektrofocusering werd uitgevoerd op een Multiphor II (Amersham Biosciences) volgens een standaardprogramma opgegeven door de fabrikant. Daaropvolgend werden de strips gedurende 10 min geëquilibreerd in een 50 mM Tris-HCl oplossing, pH 8,8, die 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS en 1% DTT bevat. Daarna werd de oplossing vervangen door dezelfde oplossing, waarin DDT werd vervangen door 2.5% iodoacetamide. De strips werden dan geplaatst op een zelf gegoten acrylamide gel (15% T en 2.6% C). De tweede dimensie van de elektroforese, de verticale SDS-PAGE, werd uitgevoerd in een Proteom Plus systeem (Bio-Rad) aan 10 mA/gel gedurende 15 min, gevolgd door een ongeveer 5 uur durende elektroforese aan 20 mA/gel, tot het bromofenolblauw front de bodem van de gel bereikt had. De gels werden overnacht gekleurd met Coomassie Brilliant Blue G-250. Dit stemt overeen met de vroeger beschreven procedure (Vanrobaeys *et al.*, 2003).

B.3 In-gel digestie

Proteïnen werden in-gel gedigereerd voornamelijk volgens Rosenfeld *et al.* (1992). Samengevat, de uitgesneden spots werden gewassen, gedroogd aan de lucht en dan overnacht

geknipt met 150 ng gemodificeerd trypsine (Promega) in 50 mM ammoniumbicarbonaat bij 37°C. Peptiden werden geëxtraheerd met 60% acetonitril/0,1% mierenzuur in dubbel gedestilleerd water, vervolgens werden ze gedroogd in een Speedvac vacuümcentrifuge en heropgelost in 10 µl 0,1% mierenzuur.

B.4 Proteïne identificatie – massaspectrometrie

Twee massaspectrometrische methoden voor proteïne identificatie werden gebruikt: MALDI TOF/TOF-MS en LC MS/MS. MALDI TOF/TOF-MS werd uitgevoerd op een 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). 1 µl van het digest, gemengd met eenzelfde volume van 100 mM α -cyano-4-hydroxycinnamisch zuur in 50% acetonitril/40% ethanol en 0,1% trifluorazijnzuur in water, werd aangebracht op een MALDI plaat en geanalyseerd. De massaspectrometer werd voor elke groep van analyses extern gekalibreerd. Eerst werd de “peptide mass fingerprinting” strategie gedaan, in welke de geobserveerde peptide massa’s (m/z) werden vergeleken met voorspelde massa’s van gedigereerde proteïnen uit een databank. Voor ondubbelzinnige identificatie gebruikten we een meer accurate methode, “peptide fragment fingerprint”. Deze methode combineert de massawaarden met de gedeeltelijk afgeleide aminozuurwaarden. Proteïnen spots die nog niet geïdentificeerd waren of die verdere verificatie vereisten werden onderworpen aan LC MS/MS. De stalen werden geladen op een geautomatiseerd nano-HPLC systeem (Dionex Corporation) en de gescheiden peptiden werden online gedetecteerd door een hybride triple quadrupole/linear ion trap (Q-TRAP LC-MS/MS system, Applied Biosystems). Daartoe gebruikten we een geautomatiseerd MS naar MS/MS geschakeld protocol. Meer gedetailleerde technische informatie over de massa spectrometrie analyses is te vinden in Vanrobaeys *et al.* (2003).

Het genoom van de honingbij (*Apis mellifera*) is recent volledig gesequeneerd, maar niet alle informatie is momenteel geschikt voor databank zoeksoftware. Daarom werd er naast de online proteïne NCBI data ook gezocht tegen de GLEAN_3 databank en 2 beschikbare EST databanken van de honingbij die allen geformatteerd werden voor MASCOT zoekopdrachten. Eén gemiste splitsing werd toegestaan en carbamidomethyl en methionine oxidatie werd geselecteerd voor variabele modificaties. De zoekopdracht werd uitgevoerd met een tolerantie van 100 ppm in de MS modus en 0.4 Da in de MS/MS modus voor data verkregen door MALDI MS, terwijl de tolerantie van 0.4 Da (MS modus) en 0.8 Da (MS/MS modus) werd toegestaan voor data verkregen door LC-MS/MS. Indien dit leidde tot ondubbelzinnige identificatie van een gekend proteïne werd dit aanvaard en werd het

genbanknummer overgenomen, met de voorkeur voor het genbank referentienummer (NP_). Als de spectrale data overeenkwamen met een vertaalde EST sequentie, een predictie of een GLEAN_3 sequentie werd deze sequentie geladen in een BLAST zoekrobot voor annotatie. Indien deze sequenties volledig overeenkwamen werd dit genbanknummer toegekend, met voorkeur voor geverifieerde sequenties. Kwam een predictie voor 100% overeen met predictie genbanknummer (XP_) en een GLEAN_3 (GB) nummer dan werd voor het eerste gekozen. EST databank nummers zijn te herkennen aan het prefix BI. Indien er geen 100% match was werd het oorspronkelijk identificatienummer behouden.

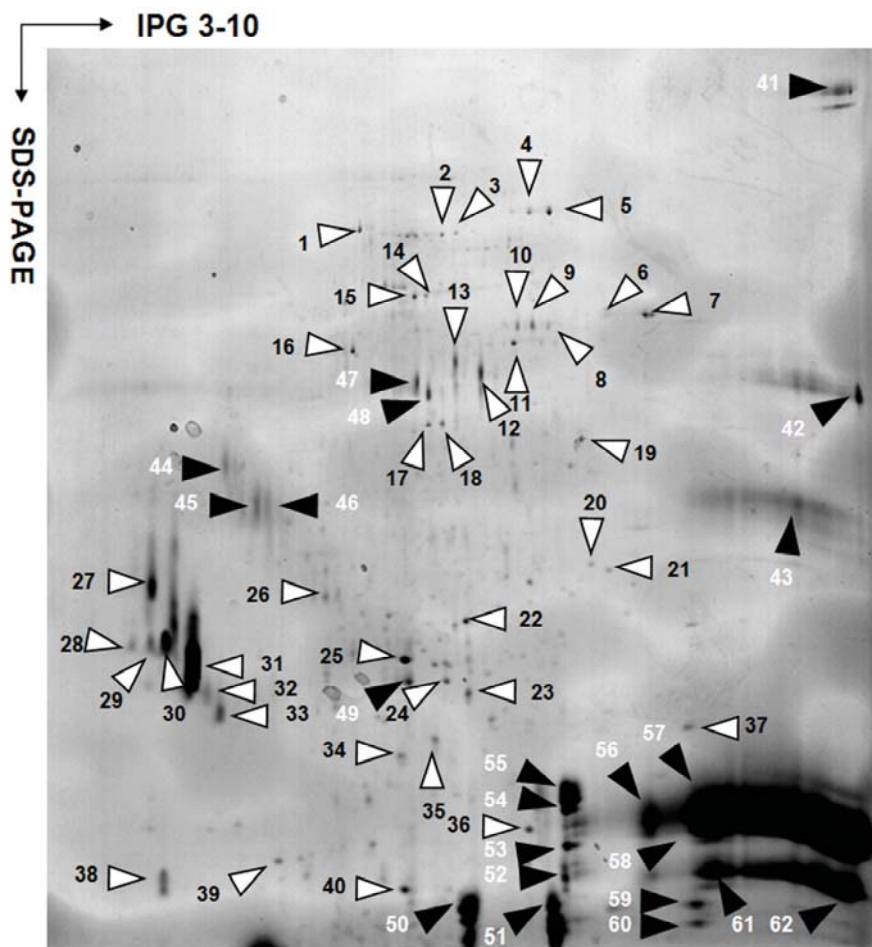


Fig. VII.1.: 2D-gel van een aangerijkt bijengif preparaat, gekleurd met Coomassie Brilliant Blue G-250. De witte pijlen duiden op spots waar componenten inzitten die nog nooit in bijengif teruggevonden werden. De zwarte pijlen duiden op spots waar enkel bijengifproteïnen in gevonden werden. Meer informatie over de verschillende spots kunnen gevonden worden in Tabel VII.1 en VII.2.

C. Resultaten en discussie

De 2D-gel van de gifklieren en het gifreservoir onthulde ongeveer 350 spots. Omdat dit onderzoek niet de volledige identificatie van het proteoom tot doel had, werden enkel de 62 meest dominante spots die in een gebied lagen tussen de 10 en 80 kDa (fig. VII.1) gebruikt voor massaspectrometrische analyse.

C.1 Structurele proteïnen

Endocuticulair structurele glycoproteïnen

Spots 27, 31 en 33 werden op basis van de GLEAN_3 databank met één MS/MS sequentie van MALDI en LC geïdentificeerd als GB16211-PA. Een andere spot (32) is op basis van synergieën daaruit afgeleid. Spot 30 werd op dezelfde manier geïdentificeerd op basis van 3 peptidensequenties als GB18929-PA. Twee andere spots (28, 29) zijn uit deze spot afgeleid. In beide gevallen leidde een BLASTP tot homologie met endocuticulaire structurele proteïnen. Van deze proteïnen zijn de mascot scores laag ondanks het feit dat het relatief abundante spots zijn. Dit is te verklaren doordat er weinig pieken terug te vinden zijn van de theoretisch verwachte peptiden. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de glycosylering en zou meteen ook een verklaring kunnen bieden voor de multiële spots. Het is ook typisch dat het waargenomen moleculaire gewicht op een SDS-gel ongeveer 20-40% hoger ligt dan het berekende moleculair gewicht van de proteïnen (Andersen *et al.*, 1995) en dat de spots zoals bij GB16211-PA een raketvorm hebben (Andersen, 1998). De glycosylaties in cuticulaire proteïnen zijn vaak N-acetylhexosamines (Andersen, 1998).

De cuticulaire proteïnen vormen samen met chitine de cuticula, dat een extracellulair secreet is van de epidermis. De proteïnen vormen een matrix waarin de chitinevezels verankerd worden. Hoewel chitine een eenvoudig polymeer is van N-acetylglucosamine, is het tweede bestanddeel, de cuticulaire proteïne, zeer divers. Ze hebben wel een aantal gemeenschappelijke kenmerken: ze zijn klein (100-300 AA), er is geen cysteïne aanwezig en ze delen verschillende karakteristieke motieven. Het aantal niet verwante cuticulaire proteïnen binnen eenzelfde insect is talrijk. Veel insect cuticulaire proteïnen bevatten 35-36 lange Rebers-Riddiford (RR) motieven. De uitgebreidere vorm (68 AA, PF00379) van deze geconserveerde regio's staan in voor de binding met chitine (Rebers & Willis, 2001). Er is geen sequentie homologie met de beter gekende cysteïne bevattende chitine bindingsdomeinen zoals aangetroffen in lectines, chitinases en sommige peritrofe

membraanproteïnen. Dit betekent dat naast de cysteïne bevattende chitine-bindende proteïnen hebben arthropoden nog een tweede klasse van chitine-bindende proteïnen die geen cysteïne bevatten (Rebers & Willis, 2001).

De twee voornaamste motieven van de cuticulaire proteïnen zijn RR1 en RR2. Het eerste motief komt voor bij proteïnen die leiden tot een zachte, flexibele, gehydrateerde, weinig verharde cuticula. Het RR2 motief komt voor bij proteïnen in een harde cuticula. De twee geïdentificeerde proteïnen uit de gifblaas behoren tot het zachte type, wat logisch is als we de structuur van de gifblaas bekijken. Ze zijn hydrofiel en hebben zure iso-elektrische punten (Andersen *et al.*, 1995). In tegenstelling tot de meeste van deze proteïnen hebben de hier geïdentificeerde proteïnen niet één maar twee RR1 motieven. De dubbele motieven zijn tot nu toe aangetoond bij de fruitvlieg (*Drosophila melanogaster*) en de malariamug (*Anopheles gambiae*). Het AAP(A/V) motief komt twee keer voor in de GB18929-PA proteïne. Dit motief komt meestal voor in harde cuticula's, maar is in 12% van de gevallen ook aanwezig in de zachte cuticula's (Magkrioti *et al.*, 2004).

Volgens Andersen *et al.* (1995) kunnen bepaalde cuticulaire proteïnen vrijgesteld worden door gebruik te maken van ureum. Doordat er in onze lysisbuffer ureum aanwezig is, leidt dit tot de identificatie van deze proteïnen. Indien deze proteïnen voorkomen in het gif wijst dit erop dat het gif niet zuiver is, omdat deze groep niet gemakkelijk uit het complex vrijgesteld wordt. De meeste cuticulaire structurele proteïnen zijn terug te vinden in de cuticleDB database (Magkrioti *et al.*, 2004).

C.2 Stress

C.2.1 Antioxidante enzymen

Alle aërobe organismen genereren reactieve zuurstof intermediären (RZI). RZI omvatten het superoxide anion, hydroperoxyl radicalen, waterstofperoxide en het hydroxyl radicaal. Het zijn allen intermediären in de reductie van zuurstof naar water en afgeleid van enzymatische reacties en auto-oxidatie van redoxactieve chemische stoffen voorkomend in de levende cellen. De RZI kunnen oxidatie van proteïnen, RNA en DNA veroorzaken en peroxidatie van lipidenmembranen. Om zich te beschermen tegen de effecten van oxidatieve stress, hebben organismen een verscheidenheid aan ontgiftingsenzymen tot hun beschikking, zoals glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) en peroxidasen. Superoxide (O_2^-) wordt verder gereduceerd door superoxide dismutase tot waterstofperoxide

(H₂O₂) en zuurstof. De Fenton reactie kan dan de productie van het nog meer reactieve hydroxyl radicaal (OH) veroorzaken. Catalase en peroxidase enzymen transformeren waterstofperoxide tot water en andere niet reactieve intermediären.

Het concept dat aërobe cellen een uitgebreid netwerk van enzymatische en niet-enzymatische antioxidante afweermiddelen bezitten om de potentiële macromoleculaire schade, aangebracht door reactieve zuurstof intermediären (RZI), te minimaliseren is algemeen aanvaard. Recente studies tonen aan dat er unieke variaties zijn tussen de fylogenetische groepen. Zo is er aangetoond dat zowel glutathione peroxidase als glutathione reductase (GR) ontbreken bij Diptera (Radyuk *et al.*, 2001). Dit is waarschijnlijk ook zo voor andere insecten. Dit heeft tot gevolg dat het redox metabolisme van insecten significant verschilt van de meeste andere levensvormen (Bauer *et al.*, 2002). Een goede kandidaat om GR te vervangen is het thioredoxine systeem (Bauer *et al.*, 2002), aangezien er thioredoxine peroxidasen aanwezig zijn.

RZI beschadigen de vier klassen van macromoleculen (lipiden, nucleïne-zuren, carbohydraten en proteïnen). Deze oxidatief beschadigde producten accumuleren zich tijdens de veroudering (Landis & Tower, 2005). RZI wordt beschouwd een belangrijke directe oorzaak te zijn van veroudering, hieruit volgt dat antioxidante enzymen verondersteld worden betrokken te zijn bij leeftijdsverlenging (Choi *et al.*, 2006). Waar nodig kan de expressie van antioxidantia verhoogd worden om de redoxstaat van de cel te behouden.

Tijdens ons onderzoek vonden we de voornaamste antioxidantia terug met uitzondering van catalase. De gevonden enzymen zullen hieronder verder besproken worden.

Glutathione-S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18)

Spot 25 werd via LC data zowel uit de online databank als uit de bijenhersenen EST databank geïdentificeerd. De online identificatie (XP_624662) kwam overeen met 6 peptidensequenties, terwijl BI513885 overeenkwam met 7 peptidensequenties. In beide gevallen ging het over gedeeltelijke sequenties, de EST gegevens bleken het meest volledig. De volledige sequentie kon niet automatisch voorspeld worden omdat dit gen gesitueerd is in Amel 4.0|GroupUn.1421. Deze sequentiegroep is nog niet in het genoom geassembleerd. Een BLASTP leverde in beide gevallen een zuur glutathione-S-transferase (GST) op. Deze sequentie heeft echter geen gelijkenis met een eerder beschreven gedeeltelijke sequentie (AAT39512) van zuur GST. Andere GST predicties (XP_394518 en XP_624682) resulteren

in de alkalische varianten en hebben een sequentie identiteit van respectievelijk 41 en 45% met de gevonden proteïne.

GSTs vertegenwoordigen een multigenen familie van multifunctionele proteïnen wijd verspreid in het planten- en dierenrijk. Het betreft voornamelijk cytoplasmatische enzymen. GST is betrokken bij de detoxificatie van een brede waaier van giftige componenten door deze te conjugeren met glutathione en zo hun verwijdering te vergemakkelijken uit het organisme. Sommige GSTs hebben ook glutathione peroxidase activiteit, waardoor ze een zuurstofontgiftigingsfunctie hebben. Ze behoren tot het fase II detoxificatie systeem betrokken bij conjugatie reacties en kunnen ook een aantal toxische liganden ontgiften door te zich te gedragen als een niet-katalytisch intracellulair bindingsproteïne. Deze enzymen spelen een essentiële rol in de overleving van insecten blootgesteld aan endogene en exogene xenobiotica.

In tegenstelling tot een aantal andere insecten vertonen honingbijen maximale GST activiteit in het adult stadium. De hoogste GST activiteit werd tot nu toe waargenomen in de ventriculus van de honingbij (Weirich *et al.*, 2002). Terwijl bij volwassen bijen het dominante iso-enzym type alkalisch is, stellen we in de gifblaas het zure iso-enzym type vast. Dit type is wel dominant bij de vroege ontwikkelingsstadia (Papadopoulos *et al.*, 2004a). Dit kan erop wijzen dat de GST iso-enzymen onafhankelijk gereguleerd worden en geactiveerd kunnen worden als een gevolg van stress veroorzaakt door verschillende factoren (Kostaropoulos *et al.*, 2001). De aanmaak van zure iso-enzymen werd gestimuleerd door de bijen gedurende 12 uur bij 6 °C te plaatsen of te hongeren gedurende 24 uur. Insecticiden hadden hetzelfde effect (Papadopoulos *et al.*, 2004b). De geïdentificeerde proteïne bevat zowel het GST_N (PF02798) als het GST_C (PF00043) domein. Het C-terminaal domein is van de sigma klasse die de klasse II insect GSTs bevatten. Andere niet homologe GST bezitten een GST theta klasse domein.

Een aantal GSTs zijn gekend als allergenen. GST van de kakkerlak (*Blattella germanica*) is een majeur allergeen bij de mens (Arruda *et al.*, 1997). Het heeft een sequentie identiteit van 56% met het bijengif homoloog. De huisstofmijt (*Dermatophagoides pteronyssinus*) heeft ook een allergeen van het GST type (Der p 8). Tussen de twee allergenen is er IgE kruisreactiviteit aangetoond, terwijl de sequentie homologie slechts 27% is (Huang *et al.*, 2006). Ook in fungi is een GST allergeen (Alt a 13) waargenomen. Doordat dit allergeen IgE kruisreactieve homologen in verschillende organismen heeft, kunnen we spreken van een panallergeen.

1-cys peroxiredoxine (EC 1.11.1.15)

Spot 22 kon via de verschillende methoden in de verschillende gebruikte databanken geïdentificeerd worden. De voorspelling kwam overeen met een 1-cys peroxiredoxin (XP_624361). Het enzym heeft een grote homologie met DPx-2540 van *D. melanogaster* (75% identieke sequenties), dat in het cytoplasma gevonden wordt en tot de 1-cys subgroep behoort. Het fysiologisch reducerende agens van deze groep is nog niet geïdentificeerd. Het is echter wel aangetoond dat ze de oxidatieve stress verlichten door de eliminatie van waterstofperoxide (Radyuk *et al.*, 2001). Dezelfde hoge sequentie homologie werd aangetroffen in de oosterse veenmol (*Gryllotalpa orientalis*) (Kim *et al.*, 2005). Kim *et al.* (2005) toonden een verhoogde expressie aan van het proteïne bij extreme temperaturen en stelden dat het peroxiredoxine zich kan gedragen als een huishoudtype van een antioxidant enzym. Het geïdentificeerde proteïne bezit de volledige typische consensus sequentie (PVCT) voor 1-cys subgroepen in het N-terminaal deel. Het enzym op zich is relatief goed geconserveerd bij insecten, want er is nog een sequentie identiteit van meer dan 70% met de enzymen van de tseetseevlieg (*Glossina morsitans*) (Munks *et al.*, 2005) en de muggen *Anopheles gambiae* en *Aedes aegypti*.

De peroxiredoxinen (PXR) die een thiol afhankelijke peroxidase activiteit vertonen, zijn beschreven in zowel pro- als eukaryoten. Deze proteïnen functioneren enkel als peroxidases als ze gekoppeld worden met een “sulfhydryl”-reducerend systeem zoals thioredoxine of glutathione. Deze proteïnefamilie kan afhankelijk van het aantal geconserveerde cysteïne residuen in 3 subgroepen ingedeeld worden: de 1-cys (cd03016), de typische 2-cys (cd03015) en de atypische 2-cys (cd03014). De 1-cys subgroep heeft enkel thiol afhankelijke peroxidase activiteit terwijl de 2-cys subgroepen ook thioredoxine peroxidase activiteit vertonen in *Drosophila melanogaster* (Radyuk *et al.*, 2001). Het eerste cysteïne is de primaire site van oxidatie bij waterstofperoxide. Deze geoxideerde cysteïne reageert snel met het tweede cysteïne van de andere subunit om een intermoleculair disulfide te vormen (Chae *et al.*, 1994a; Chae *et al.*, 1994b; Chae *et al.*, 1994c).

De meer uitgebreide AhpC/TSA familie (PF00578) die alkyl waterstofperoxide reductases en thiol specifieke antioxidantia omvat, bevat eveneens een aantal allergenen (Asp f 3, Mal f 2 en Mal f 3).

2-cys peroxiredoxine (thioredoxine peroxidase) (EC 1.11.1.15)

Spot 24 werd geïdentificeerd op basis van MALDI data. Twee voorspellingen kwamen naar voor: XP_393445 en XP_623098. Op basis van de gevonden fragmenten en op basis van pI kon niet uitgemaakt worden welke voorspelling de correcte is. XP_393445 lijkt echter het meest waarschijnlijk op basis van moleculair gewicht, aminozuursequenties van verwante homologen bij andere insecten en de eerste geconserveerde cysteïne consensussequentie (FYPLDFTFVCPTEI). De tweede geconserveerde cysteïne (GEVCPA) sequentie is bij beiden geconserveerd. Deze proteïne behoort tot de typische 2-cys groep (cd03015), in tegenstelling tot 1-cys heeft het thioredoxine peroxidase activiteit. Om die reden worden ze meestal thioredoxine peroxidasen genoemd. De sequentie identiteit is groot: bij de zijderups, (*Bombyx mori*) (Lee *et al.*, 2005) is deze 79% en bij Dpx-4783 (Radyuk *et al.*, 2001) van *Drosophila melanogaster* 80%. Van Dpx-4783 is aangetoond dat het in cytoplasma voorkomt en dat het thioredoxine peroxidase activiteit heeft maar geen glutathione peroxidase activiteit (Radyuk *et al.*, 2001; Radyuk *et al.*, 2003). De sequentie identiteit met het uit de bijenhersenen EST databank (Whitfield *et al.*, 2002) afgeleide thioredoxin peroxidase is 65%. Dit bevestigt dat er zoals bij *Drosophila* verschillende 1-cys en 2-cys typen aanwezig zijn in de bij (Radyuk *et al.*, 2001). Dit type proteïne wordt niet in de hemolymfe terug gevonden en er is een verhoogde expressie bij stress veroorzaakt door zowel koude als warmte en door virale infecties (Lee *et al.*, 2005). Overexpressie werd eveneens uitgelokt door waterstofperoxide, paraquat en cadmium (Radyuk *et al.*, 2003).

CuZn superoxide dismutase (SOD1) (EC 1.15.1.1)

De identificatie van spot 34 leidde tot een CuZn superoxide dismutase (AAP93581) op basis van MALDI data. Deze sequentie werd beschreven door Whitfield *et al.* (2002) tijdens de annotatie van de bijenhersenen EST databank. Het enzym bezit een CuZnSOD domein (PF00080) dat gans de proteïne omvat. Het enzym heeft een sequentie identiteit van 85% met dat van een Aziatische hommelmel (*Bombus ignitus*), met een 100% conservatie van essentiële residuen (Choi *et al.*, 2006). SOD1 kan een belangrijke rol spelen als antioxidant proteïne door het hoge gehalte aan intracellulaire superoxide radicalen, geïnduceerd door extracellulaire stimuli, te verminderen (Choi *et al.*, 2006).

Superoxide dismutases zijn alomtegenwoordige metalloproteïnen die de omzetting van superoxide radicalen naar waterstof peroxide en moleculair zuurstof katalyseren. De productie wordt verhoogd bij oxidatieve stress (Zelko *et al.*, 2002). Alle eukaryoten hebben minstens

drie vormen van SOD: de in het cytoplasma voorkomende CuZnSODs (SOD1), MnSODs (SOD2) die in de mitochondriën aangetroffen worden en de extracellulaire CuZnSOD (SOD3) (Zelko *et al.*, 2002; Landis & Tower, 2005). SODs activiteitsverschillen zijn niet zeer uitgesproken tussen de verschillende weefsels (Weirich *et al.*, 2002).

De SOD2 vormen een panallergeen familie. Het enige tot nu toe beschreven CuZnSOD allergeen is dit van de olijfbom (Ole e5) (Boluda *et al.*, 1998).

Disulfide isomerase (ERp60) (EC 1.8.4.2)

De identificatie van spot 11 leidde tot de voorspelling van een disulfide isomerase gerelateerd proteïne (ERp57 of ERp60) (XP_623282). De sequentie identiteit met de andere insecten ERp57 of ERp60 is ongeveer 60%, met dit van de mens is het 50% met behoud van de consensus sequenties.

De proteïne disulfide isomerase (PDI) familie is samengesteld uit eukaryote proteïnen die optreden als katalysator en opvouwassistent bij oxidatieve proteïnevouwing in het endoplasmatisch reticulum (ER) van diverse secretorische en celoppervlakte proteïnen. Ze katalyseren de uitwisseling van thiol-disulfide. Dit leidt tot netto proteïne disulfidevorming, reductie of isomerisatie, afhankelijk van de reactievoorwaarden (Noiva & Lennarz, 1992). De leden van deze familie omvatten PDI en PDI-achtige proteïnen zoals ERp72, ERp57 (of ERp60), ERp44, P5, PDIR, ERp46 en transmembraan PDIs. ERp57s zijn oxidasen, die de vorming van disulfide bindingen van nieuw gesynthetiseerde polypeptiden in het ER katalyseren. Ze vertonen ook reductase activiteit, door zich te gedragen als isomerasen die alle niet-natieve disulfide bindingen corrigeren, en chaperone activiteit om proteïne aggregatie te verhinderen en vouwen van nieuwe gesynthetiseerde proteïnen te vergemakkelijken. Deze proteïnen bezitten vier domeinen (abb'a'): 2 redox actieve thioredoxine (a) domeinen met een CGHC motief en twee inactieve domeinen (Vuori *et al.*, 1992). Slechts één a domein is vereist voor de oxidase functie maar twee zijn noodzakelijk voor de isomerase functie. Ze delen dezelfde domeinregeling van abb'a' zoals PDIs, maar ze hebben geen zuurrijk C-terminaal gebied (c domein) zoals de PDI's. ERp57 interageert met lectine chaperonnes, calnexin en calreticulin en promoot in het bijzonder het oxidatieve vouwen van glycoproteïnen (Oliver *et al.*, 1997). Gelijkaardig aan PDI is het b domein van ERp57 waarschijnlijk betrokken bij het binden aan substraten. Het domein b' van ERp57 is de primaire bindingsplaats en is aangepast voor ER lectin associatie. De verschillende soorten

PDI's kunnen verschillende substraatspecificiteit en weefsel-specifieke expressie vertonen, of kunnen door stress geïnduceerd worden.

C.2.2 Algemene stress

Heat shock proteïnen (HSP)

Spots 1 en 2 konden geïdentificeerd worden als verwant met de heat shock proteïnen (HSC, de c staat voor “cognate” wat verwant betekent), respectievelijk XP_393090 en XP_392147. Een BLASTP leverde twee verschillende HSPs70 op. XP_393090, dat sterk gelijkend is met HSC3 van *Drosophila* (sequentie identiteit 90%) en waar op basis van SignalP een signaalpeptide voorspeld werd. De andere proteïne (XP_392147) vertoont geen signaal peptide en heeft een sequentie identiteit van 83% met HSC5 van *Drosophila*. In bijen zijn er enkele studies die heat shock proteïnen 70 aantonen. Gregorc & Bowen (1999) konden met immunohistochemie met anti-HSP70 van runderhersenen expressie van HSP70 aantonen in bijenlarven die geïnfecteerd waren met *Paenibacillus larvae*, daar waar gezonde larven geen activiteit vertoonden. Dit komt voor een stuk overeen met een sterke onderdrukking van HSP70 in afwezigheid van een hitteshock en eenmaal hersteld van een hitteshock (Lindquist, 1993). HSC70 werd in het vetlichaam waargenomen door het gebruik van antilichamen (Chacon-Almeida *et al.*, 2000).

Heat shock proteïnen zijn een familie van cellulaire proteïnen die gekarakteriseerd worden door hun verhoogde productie in de respons op stress (Pirkkala *et al.*, 2001), de aanwezigheid van een zwakke ATPase activiteit en een hoge graad van sequentie homologie. Heat shock proteïnen werden initieel beschreven als chaperonnes die het opvouwen van andere proteïnen vergemakkelijken. Recente studies bewijzen dat HSPs ook een rol spelen in de celbescherming, anti-apoptosis, ontwikkelingsregulatie en signaaltransductie. De heat shock respons kan resulteren in stress tolerantie en de bescherming tegen stress geïnduceerde moleculaire beschadiging (Morimoto *et al.*, 1997). In de meeste soorten zijn er meerdere proteïnen die behoren tot de HSP70 familie (PF00012). Ze bevatten een sterk geconserveerd N-terminaal deel dat correspondeert met een ATP bindingsdomein en een sterk geconserveerde C-terminus die correspondeert met het substraat bindingsdomein (Karouna-Renier *et al.*, 2003). Sommige worden enkel tot expressie gebracht onder stress condities (HSP). De productie van deze HSP70s wordt meerdere malen verhoogd tijdens de veroudering (Wheeler *et al.*, 1999). Nulmutaties bij SOD of catalases veroorzaken een verhoogde expressie van HSP70 in *Drosophila* (Wheeler *et al.*, 1999). De andere groep is niet

induceerbaar door hitte en is aanwezig in cellen onder normale groeiomstandigheden (HSC) (Snutch *et al.*, 1988). Eukaryote cellen bevatten 8 tot 10 verschillende proteïnen van de HSP70 familie. De diverse functies worden geïllustreerd door hun activiteit in zowel de nucleus, de celorganellen en het cytoplasma. Zonder grondige expressiestudies is het bijna onmogelijk een onderscheid te maken tussen HSP en HSC. Mahroof *et al.* (2005) beschreef bij de kastanjebruine rijstmeeltor (*Tribolium castaneum*) twee voor 99% identieke proteïnen, waarbij de ene een HSP was terwijl de andere een HSC was.

In 1991 voorspelde Leung & Gershwin (1991) dat er een relatie tussen HSPs en allergie zou aangetoond worden. Dit werd bewezen door Aki *et al.* (1994) die een allergeen vonden in de stofmijt *Dermatophagoides farinae* dat homologie vertoonde met een HSC van de HSP70 familie. Ondertussen werden nog allergenen van die familie aangetoond bij schimmels.

C.3 Proteïne metabolisme

Arginine kinase (EC 2.7.3.3)

Arginine kinase (NP_001011603) werd in spots 16 en 17 aangetroffen op basis van LC data. Het werd reeds in de honingbij beschreven door Kucharski & Maleszka (1998). Ze vonden hoge niveaus van expressie in de hersenen en de thorax, maar het hoogste niveau werd vastgesteld in de facetogen. Er is een hoge identiteit van ongeveer 85% met andere arginine kinasen. Dezelfde hoge identiteit werd gevonden met het arginine kinase allergeen van *Plodia interpunctella* (Indische meelmot) (Plo i 1) (Binder *et al.*, 2001). Dit allergeen heeft IgE kruisreactieve homologen in verschillende invertebraten. Om die reden spreken ze van een panallergeen. Dit lijkt te kloppen, want recent is dit allergeen teruggevonden in de Amerikaanse kakkerlak (*Periplaneta americana*) (Sookrung *et al.*, 2006), alsook bij de huisstofmijt (*Dermatophagoides pteronyssinus*).

Arginine kinase (AK) katalyseert de omkeerbare transfer van een hoog energetisch fosfaat van ATP naar arginine, wat ADP en fosfoarginine oplevert. Ze behoren tot ATP:guanido fosfotransferases (fosfogeen kinasen), dat een familie is van structurele en functionele enzymen die reversibel de transfer van fosfaat tussen ATP en verscheidene fosfogenen katalyseren. Deze familie heeft twee domeinen: het N-terminaal deel (PF02807) en het katalytisch C-terminus (PF00217). In de gleuf tussen deze domeinen ligt de substraatbindingsplaats. De AKs worden teruggevonden bij de arthropoden. Vertebraten

hebben dit enzym niet, ze bezitten creatine kinases omdat de rol van arginine in het energie metabolisme overgenomen is door creatine (Ellington, 2001). In levende organismen wordt ATP gebruikt als een geschikte energieopslagplaats om de vele chemische celreacties te sturen. De metabolische halfwaardetijd van een ATP molecule varieert van seconden tot minuten. Weefsels met een hoog ATP verbruik hebben maar enkele seconden om van ATP voorzien te worden en rekenen op een vrij energiereservoir dat functioneert om ATP vlug te genereren. In arthropoden vervult fosfoarginine deze bufferende functie. Dit mechanisme is vooral nodig in cellen die alterneren tussen hoog en laag energieverbruik.

C.4 Carbohydraat metabolisme

Enolase (2-fosfoglyceraat dehydratase) (EC 4.2.1.11)

Spot 11 werd zowel op basis van MALDI en LC gegevens geïdentificeerd als enolase. Dit gebeurde zowel in de online NCBI databank, GLEAN_3 als de bijenhersenen EST databank, maar leidde telkens tot een gedeeltelijke predictie. Op basis van de gedeeltelijke GB15039-PA predictie van het bijengenoom en EST genbank nummer BI504105 hebben we geprobeerd de sequentie te vervolledigen (fig. VII.2). Dit zorgde nog altijd voor een gedeeltelijke predictie. Op basis van volledig gesequeneerde enolases van insecten en het bijengenoom (begin Amel 4.0|Group13.3 en GroupUn.6751) kon een volledige predictie gemaakt worden. Dit leidde tot een enzym van 435 AA dat aan het C-terminaal uiteinde 36 residuen meer bezit dan een assemblage van GB15039-PA en BI504105. Het samengestelde proteïne leidde tot een sequentie identiteit van 74-78% met de gekende insecten enolases. Er was zelfs een sequentie identiteit van 70% met de vertebraten enolases.

MSSIKSIKARQIFDSRGNPTVEVDLVTDDGLFRSEVPSGASTGIHEALELRDNDKSKYHGKSVFKAISNINNTIG
PELIKSNLDVTSQSDIDNFKLDGTPNKSNLGNAILGVSLAVCKAGAAKKKKPLYRYIADLAGNTNIILPVP
AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFSDAMKMGTEIYHHLKNGIKSRFGLDATSVGDEGGFAPNILDNKEAL
NLIIDSIKTAGYDGKVKIGMDVAASEFYKNGKYDLNFKNEKSDPSTYLDSDSLKNLYLQFIKEFP
IVSIEDPFDQ
DDWSSWTTLTSSTDIQIVGDDVTVTNPNRIKMAIDKKACNCLLLKVNQIGTVTESINAHKLAKSAGWGT
MTVMVSHRS
GETEDTFIADLVVGLSTGQIKTGAPCRSERLAKYNQILRIEELGSSAKYAGNKVRNPQA

Fig. VII.2: Predictie van bijen enolase op basis van GB15039-PA en BI504105. De onderlijnde peptiden komen overeen met MS/MS data. De laatste 36 aminozuren (*cursief*) zijn door ons toegevoegd.

Enolase is een essentieel homodimeer glycolytisch enzym dat de onderlinge omzetting van 2-fosfoglyceraat en fosfo-enolpyruvaat katalyseert (Tracy & Hedges, 2000). Het werd voor het eerst in insecten bij *Drosophila* gevonden (Bishop & Corces, 1990). Het komt in alle organismen voor. Enolase bevat een N-terminaal (PF03952) en een C-terminaal (PF00113)

domein. De actieve site is aanwezig in het C-terminaal deel. Het kleine of N-terminaal domein omringt het grote domein. De meeste van de intersubunit contacten gebeuren tussen het kleine domein van het ene monomeer en het grote domein van het andere (Hannaert *et al.*, 2003). Het is een sterk geconserveerde familie. Het komt voor in het cytoplasma.

Verschillende schimmels hebben enolases met allergische activiteit die onderling kruisreactiviteit vertonen (Verma *et al.*, 2003). Recent is er ook een latex allergeen (Hev b 9) beschreven met enolase activiteit (Wagner *et al.*, 2000) dat op bepaalde schimmel enolase epitopen kruisreactiviteit vertoont.

Fosfoglyceraat mutase (EC 5.4.2.1)

Spot 21 leidde op basis van MALDI gegevens in de online NCBI databank tot de identificatie van XP_625114. Deze sequentie is 58 AA langer dan de sequentie die uit GLEAN_3 afgeleid is (GB15052-PA). GB15052-PA komt best overeen met fosfoglyceraat mutase van *Apis cerana* (98%) en *Drosophila melanogaster* (80%) (Currie & Sullivan, 1994). Dit werd bevestigd door het geschatte moleculair gewicht en pI op de gel. Het geïdentificeerde proteïne stemt overeen met het 2,3-difosfoglyceraat afhankelijke monofosfoglyceraat mutase, dat in twee richtingen 2-fosfoglyceraat en 3-fosfoglyceraat kan katalyseren. Het monofosfoglyceraat mutase kan als monomeer, dimeer of tetrameer voorkomen (Jedrzejewski, 2000).

Fosfoglyceraat mutases katalyseren reacties die betrokken zijn bij de transfer van de fosfogroepen tussen de drie koolstofatomen van fosfoglyceraat (White & Fothergill-Gilmore, 1988). De enzymen kunnen drie verschillende reacties katalyseren met verschillende specificaties: de isomerisatie van 2-fosfoglyceraat tot 3-fosfoglyceraat met 2,3-difosfoglyceraat als initiator, de synthese van 2,3-difosfoglyceraat uit 1,3-difosfoglyceraat met 3-fosfoglyceraat als initiator en de degradatie van 2,3-difosfoglyceraat naar 3-fosfoglyceraat. Het katalysemechanisme impliceert de vorming van een fosfohistidine intermediair (Rose, 1982). Currie & Sullivan (1994) vonden een pseudogen dat zeer gelijkelijk is en ontstaan was door retrotranscriptie (Luque *et al.*, 1997).

C.5 Lipide metabolisme

Apolipophorine III

Spot 34 werd geïdentificeerd als een predictie van apolipophorine III (XP_624767) op basis van sequentie homologie. Het vertoont de hoogste sequentie identiteit (52%) met de vuurmier (*Solenopsis invicta*). De andere insect ApoLp-IIIs hebben een sequentie identiteit van ongeveer 20%. Guntur *et al.* (2004) nam ApoLp-III in alle delen van het lichaam van de vuurmier waar. Een pfam zoekopdracht met het geïdentificeerde proteïne leverde een Apo-III domein (PF07464) op met een relatief lage, maar significante score.

Apolipophorine III (ApoLp-III) is een belangrijke component van insectenhemolymfe lipide transport processen. Het opmerkelijke structurele aanpassingsvermogen van ApoLp-III kan toegeschreven worden aan zijn bolvormige amfipathische α -helix bundel structuur waarin hydrofobe lipidenbindende gebieden gestabiliseerd worden in afwezigheid van lipide door helix-helix interacties. Na blootstelling aan potentiële lipide oppervlaktebindende sites opent de bolvormige helix bundel zijn hydrofobe binnenkant om de substitutie van helix-helix interacties naar helix-lipide interacties toe te laten (Wang *et al.*, 2002). Hoewel dit voor de meeste ApoLp-III de hoofdfunctie is zijn er aanwijzingen dat ze ook een rol spelen in immuniteit, patroonherkenning, geprogrammeerde celdood en detoxificatie van lipopolysacharide endotoxinen (Whitten *et al.*, 2004). Guntur *et al.* (2004) nam ApoLp-III in alle delen van het lichaam van de vuurmier waar.

Niemann-Pick type C2 (Npc2) lysosomaal proteïne/DerP2-like

Spot 35 werd op basis van MALDI MS/MS data geïdentificeerd als een Npc2-type proteïne (XP_001120140). Het heeft de hoogste sequentie identiteit (50%) met de muggen *Aedes aegypti* en *Anopheles gambiae*.

De proteïne behoort tot de E1_DerP2_DerF2 familie (PF02221). Deze familie omvat onder andere de majeur groep 2 mijtallergenen (Olsson & Van Hage-Hamsten, 2000). Het zijn lysosoom proteïnen die behoren tot het Npc2-type. Deze naam verwijst naar een ziekte die veroorzaakt wordt door genmutatie. Bij deze personen accumuleert LDL (laag dichtheid lipoproteïne) in de lysosomen. Lep d 2 van de voorraadmijt (*Lepidoglyphus destructor*) heeft een sequentie identiteit van 28% met de bijenproteïne en wordt teruggevonden in gans het mijtenlichaam (Olsson & Van Hage-Hamsten, 2000). Dezelfde homologie wordt bereikt met de andere mijtenallergenen. Tussen de mijtenallergenen is er kruisreactiviteit (Olsson & Van

Hage-Hamsten, 2000). De functie van deze proteïnen is nog niet juist gekend (Nuttall *et al.*, 2006).

Saposine-achtig

De identificatie van spot 23 is eerder speciaal omdat deze overeenkomt met een proteïne van 99 kDa (XP_392338). Het is echter een proteïne dat zoals hieronder zal aangetoond worden, gesplitst wordt in verschillende subeenheden. Een aantal kleine proteïnen worden afgeleid van één groot gesecreteerd precursor proteïne. Bij de honingbij zijn er 7 SAPB en 2 SAPA (PF02199) domeinen, deze laatste bevinden zich N- en C-terminaal. Dit is ook zo bij *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000) waarbij het een sequentie identiteit heeft van 40%, dit is zo voor de meeste insecten. Het SAPB domein bestaat uit SAPB1 (PF05184) en SAPB2 (PF03489). Het bij de bij gevonden peptidefragment is gelegen in het laatste SAPB2 domein. Op basis van de massaspectrometrie data kan niet opgemaakt worden wat het volledige fragment is.

Saposine-achtige proteïnen zijn een diverse familie van lipide interagerende proteïnen die verschillende cellulaire functies hebben die nog niet volledig gekend zijn. Hun bestaan is geconserveerd in fylogenetisch ver van elkaar verwijderde organismen (Bruhn, 2005). De eigenlijke saposines zijn kleine lysosoomproteïnen die dienen als activatoren van verschillende lysosoom lipide degraderende enzymen (Munford *et al.*, 1995). Het klievingsmechanisme van de saposines, dat proteolytisch gebeurt, is beter gekend bij zoogdieren. In tegenstelling tot insecten zijn er vier SAPB domeinen waaruit er vier mature saponines (A, B, C, D) ontstaan. De twee SAPA domeinen worden verwijderd in de activeringsreactie. De proteolytische splitsing verloopt via verschillende pathways (Leonova *et al.*, 1996). Het mature saposine B is ongeveer 80 aminozuren lang (Ahn *et al.*, 2003).

C.6 Transport mechanisme

Transferrine (EC 1.16.1.2)

De identificatie van spots 4 en 5 leidde tot een transferrine (NP_001011572). De hoogste sequentie identiteit (86%) is gevonden met transferrine van de vuurmier (*Solenopsis invicta*). Een recente screening van het bijengenoem leverde nog minstens 2 nieuwe transferrines op (Dunkov & Georgieva, 2006).

Zoals alle andere organismen hebben insecten te maken met de toxische effecten van zuurstof in aanwezigheid van ijzer, wat zelf een vitaal nutriënt is. Om daar mee om te gaan zijn er proteïnen zoals transferrines en ferrines, die een hoge affiniteit hebben voor ijzer en ijzerhoudende ionen (Law, 2002). Er wordt gesteld dat bij insecten transferrine zijn transportfunctie van ijzer heeft ingeruild om andere opdrachten te vervullen. Deze eerste functie wordt volledig overgenomen door de ferrines. Op die manier vormt transferrine, naast vitellogenine, een tweede kandidaat voor leeftijdsmodulatie in sociale insecten (Do Nascimento *et al.*, 2004). In insecten vervullen transferrines verschillende functies: ijzerionbindend proteïne, antibiotisch agens, vitellogeen proteïne en een proteïne dat onderdrukbaar is door juveniele hormonen (Nichol *et al.*, 2002). Transferrine in de honingbij reageert op een bredere range aan fysiologische en ontwikkelingscondities. Dit laat veronderstellen dat de functionele rollen van transferrine contextafhankelijk zijn en enkel kunnen bekeken worden als een deel van een complex genetisch netwerk dat andere verwante moleculen en signaalfactoren bevat (Kucharski & Maleszka, 2003). Insect transferrines zijn glycoproteïnen met twee transferrine domeinen (PF00405). Net zoals andere transferrines lijkt dit een gevolg te zijn van intragen duplicatie en ze bevatten een relatief groot aantal geconserveerde cysteïne residuen. De N- en C-terminale helften hebben een positionele aminozuur identiteit van 22%. De residuen die betrokken zijn bij het binden van ionen zijn enkel in het N-terminale deel geconserveerd (Kucharski & Maleszka, 2003). Zoals de meeste insect transferrines is er maar één ijzerion bindingsplaats omdat hun C-terminale helft geen ijzerbindende capaciteit meer heeft.

Cyclophilin type peptidyl-prolyl isomerase (EC 5.2.1.8)

Spot 37 werd geïdentificeerd als cyclophilin (XP_624416). Deze sequentie is recent uit de genbank verwijderd, ondanks het feit dat er een sequentie identiteit was met een *Drosophila* referentie proteïne (NP_611695) van 69%. De identiteit met andere insecten homologen schommelde tussen de 60 en 70%. Er was wel telkens eenzelfde gap aanwezig van 22 aminozuren. Dit zou kunnen te wijten zijn aan een verkeerde assemblage of een deletie. Een BLASTP zoekopdracht in het bijengenoem heeft meerdere vermoedelijke cyclophilines opgeleverd. Dit is ook het geval bij *Drosophila* (Galat, 2003). Het gevonden enzym behoort tot de CypB subgroep wat erop wijst dat het gesecreteerd wordt. Het bezit ook de typische sterk geconserveerde DENF sequentie.

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIase), ook gekend als rotamase of cyclophilines (Cyp), worden in alle organismen waargenomen. Cyclophilines worden zo genoemd omdat ze de voornaamste hoge affiniteit bindingsproteïnen zijn van cyclosporin A (CSA), een geneesmiddel dat het immuunsysteem van vertebraten onderdrukt. PPIases katalyseren proteïnen die proline bezitten. Ze zetten de energetisch en sterisch gunstige trans-vorm snel om naar de ongunstige cis-vorm. Dit proces is niet alleen belangrijk in het opvouwen van proteïnen, maar ook tijdens de vorming van multidomein proteïnen (Foor *et al.*, 1992). Daarnaast spelen Cyps een rol in celsignalisatie (Wang & Heitman, 2005), regulatie van de celgroei (Caroni *et al.*, 1991) en de inflammatoire responsen. PPIases hebben divergente sequenties zowel over de geanalyseerde genomen als over de genomen van de diverse phyla, maar hun secundaire structuur blijft grotendeels geconserveerd (Galat, 2003). Het specifieke domein (PF00160) is 109 AA lang. De gesecreteerde Cyps werden voor het eerst aangetoond in de kip (Caroni *et al.*, 1991). De synthese van Cyps in planten wordt verhoogd als ze onder stress komen te staan (Marivet *et al.*, 1994). Hetzelfde is aangetoond bij de vasculaire gladde spiercellen (Liao *et al.*, 2000).

De cyclophilines vormen een panallergeen familie (Glaser *et al.*, 2006). Glaser *et al.* (2006) toonde aan dat Cyps van verschillende herkomst onderlinge kruisreactiviteit vertonen. Mala s 6 heeft een sequentie identiteit van 58% met het geïdentificeerde Cyp. Het aantal allergenen binnen de familie wordt nog groter: Ortona *et al.* (2002), toonde aan dat cyclophiline van de hondenlintworm (*Echinococcus granulosus*) eveneens een allergeen is.

C.7 Energie metabolisme

ATP synthase bèta subunit

Spot 15 werd geïdentificeerd als een bèta subunit van ATP synthase (XP_624156). De bèta subunit is bij invertebraten voor het eerst beschreven bij *Drosophila* (Pena & Garesse, 1993), waarmee de bijen ATP synthase bèta subunit een sequentie identiteit heeft van 95%. De bijen ATP synthase bèta subunit is een deel van een mitochondriaal F1F0-ATPase. Het zijn de voornaamste producenten van ATP die gebruik maken van de protongradiënt die gegenereerd wordt door oxidatieve fosforylering (Talamillo *et al.*, 2004).

ATP synthases (EC 3.6.3.14) of ATPases zijn membraangebonden multisubunit enzymencomplexen/iontransporters die de ATP synthese en/of hydrolyse met het transport van protonen over het membraan combineren. ATPases kunnen de energie van een

protongradiënt aanwenden, gebruikmakend van de flux van ionen over het membraan via het ATPase protonkanaal om de synthese van ATP te sturen. Sommige ATPases werken omgekeerd: ze gebruiken de energie van de hydrolyse van ATP om een protongradiënt te creëren. Er zijn verschillende types van ATPases, welke kunnen verschillen in functie, structuur en in het type van ionen dat ze transporteren (Cross & Muller, 2004). De F-ATPases zijn opgebouwd uit twee samengestelde complexen: het F1 complex bevat de katalytische kern die ATP synthetiseert/hydrolyseert en het F0 complex vormt een membraanporie. In F-ATPases zijn er drie kopieën van elk van de alfa en bèta subunits die de katalytische kern van het F1 complex vormen, terwijl de overblijvende subunits (gamma, delta, epsilon) de stelen vormen (Abrahams *et al.*, 1994). Er is een substraat bindingssite op elk van de alfa en bèta subunits: deze op de bèta subunit zijn katalytisch, terwijl deze op de alfa subunits regulerend zijn. De alfa en bèta subunits vormen een cilinder die vastgehecht is aan de centrale steel. De alfa/bèta subunits ondergaan een opeenvolging van conformatie veranderingen die leiden tot de vorming van ATP uit ADP, die geïnduceerd worden door de draaiing van de gamma subunit, dat zelf gestuurd is door de beweging van de protonen door het F0 complex gamma subunit (Leyva *et al.*, 2003).

C.8 Groeifactoren

Imaginal disc growth factor 4

Spots 6 en 7 werden op basis van MALDI en LC data als imaginal disc growth factor (IDGF) geïdentificeerd, meer bepaald IDGF4 (XP_396769). Dit verwijst naar de homologie met IDGF4 van *Drosophila* (47% sequentie identiteit). De beste sequentie identiteit (52%) wordt bereikt met IDGF van *Aedes aegypti* dat ook bacterie suppressief proteïne genoemd wordt. Zhang *et al.* (2006) maakte een fylogenetische boom op van de IDGF familie en ontwaarde twee klusters: één van Diptera en Lepidoptera en één van Coleoptera, Hymenoptera en Hemiptera, waar de honingbij eerder een uitgroep is. De proteïne wordt geplaatst op chromosoom 8 en voor 87% op Amel4.0|groupUn.5677, wat mogelijks wijst op het voorkomen van isovormen.

De naam “imaginal disc growth factor” werd gegeven door Kawamura *et al.* (1999), omdat deze proteïnen voor het eerst werden geïsoleerd uit *Drosophila* imaginal disc celculturen. Het waren de eerste oplosbare polypeptide groeifactoren die uit invertebraten geïsoleerd werden. Ze behoren tot de glycosyl hydrolases familie 18 (PF00704). O-glycosyl

hydrolases zijn een wijdverbreide groep van enzymen die de glycoside binding tussen twee of meer carbohydraten, of tussen een carbohydraat en niet-carbohydraat hydrolyseren. De IDGFs zijn eerder verwant met de chitinasen van groep II dan met de meeste andere groeifactoren (Kawamura *et al.*, 1999). Ze hebben geen chitinase activiteit omdat het glutamaat residu vervangen is door een glutamine residu (Watanabe *et al.*, 1993). De groep zou ook insuline activiteit vertonen en op verschillende plaatsen in het lichaam tot expressie gebracht worden (Kawamura *et al.*, 1999). IDGFs en andere chitine gerelateerde proteïnen zouden chitine specifieke lectinen kunnen zijn (Kawamura *et al.*, 1999). Deze eigenschap kan belangrijk zijn in de verklaring van de mitogenetische activiteit van IDGFs. IDGFs van Lepidoptera kunnen echter misschien op een andere manier celgroei stimuleren dan bij Diptera (Zhang *et al.*, 2006). Terwijl in *Anopheles* de IDGF homologen immuunresponsieve proteïnen tegen bacteriën zijn (Shi & Paskewitz, 2004).

C.9 Peptidasen

Serine carboxypeptidase (EC 3.4.16.?)

Spots 8, 9 en 10 verschillen enkel op basis van pI en werden geïdentificeerd als serine carboxypeptidase (XP_393931). Het enzym heeft een geconserveerd motief VTGESYGG rond serine dat deel uitmaakt van een triade. Dit motief is identiek aan deze van de oranjegele tarwegalmug (*Sitodiplosis mosellana*) (Mittapalli *et al.*, 2006). De beste sequentie identiteit (59%) wordt gevonden met het voorspelde serine carboxypeptidase van de kastanjebruine rijstmeeltor (*Tribolium castaneum*).

Proteolytische enzymen die serine benutten in hun katalytische activiteit, serine peptidasen, zijn alomtegenwoordig in virussen, prokaryoten en eukaryoten. Serine carboxypeptidasen behoren tot de “SC clan”, op basis van hun structuur en functionaliteit. De katalytische activiteit komt voort uit de triade van serine, aspartaat en histidine. Waarbij serine zich gedraagt als een nucleofiel, aspartaat als een elektrofiel en histidine als een base. De sequentie die de actieve site serine en histidine residuen omringt is sterk geconserveerd in alle serine carboxypeptidasen. Serine carboxypeptidasen komen tussen in verschillende fysiologische en cellulaire processen (Mittapalli *et al.*, 2006), waaronder posttranslatorische verwerking van andere enzymen (Galjart *et al.*, 1990). Deze enzymen zijn exopeptidasen en functioneren door de afsplitsing van één enkel aminozuur van de C-terminus van een proteïne of peptide. Alle gekende serine carboxypeptidasen worden gekarakteriseerd door de

aanwezigheid van een geconserveerde Ser-Asn-His triade gelijkend op de serine proteases (Lehfeldt *et al.*, 2000).

C.10 Olfactorische functie

Odorant binding proteïnen (OBP) 14 en 15

Spot 40 leidde tot de identificatie van OBP 14 (NP_001035313) in de online NCBI databank en in GLEAN_3 tot GB10536-PA, telkens met MALDI gegevens. Een BLASTP leerde dat er op basis van PMF in deze predictie zowel delen van OBP14 als OBP 15 zaten. Om die reden wordt ook OBP 15 (NP_001035298) toegelicht. Opvallend is dat OBP 14 & 15 nauwer verwant zijn met OBP 13, 16, 17, 18, 19, 20 & 21 dan met andere insecten “odorant binding” proteïnen. Een door ons uitgevoerde Clustal W analyse leidde tot een groepering van deze proteïnen ten opzichte van de andere bijen OBPs. In totaal zijn er momenteel 21 bijen-OBPs beschreven.

De insecten “odorant binding” proteïnen (OBPs) zijn een klasse van kleine oplosbare proteïnen die de chemische communicatie op perifeer niveau mediëren in insecten (Rubin *et al.*, 2000). Het mechanisme is nog niet volledig uitgeklaard en de mogelijkheid bestaat dat deze proteïnen nog andere functies vervullen. OBPs worden gesecreteerd in de lymfe van de chemosensilla. Het bindt kleine liganden, soms geassocieerd met conformatie veranderingen en wordt differentieel tot expressie gebracht in verschillende delen van het lichaam afhankelijk van soort, geslacht, kaste en leeftijd (Calvello *et al.*, 2005). De OBPs die in de gifblaas teruggevonden worden, behoren tot de PBP/GOBP subfamilie (PF01395). Deze familie bevat zowel feromoon bindende als algemene odorant bindende proteïnen. In tegenstelling tot wat vroeger gedacht werd, namelijk dat bijen-OBPs antenne-specifiek waren (Danty *et al.*, 1997), werden deze proteïnen recent in ook vleugels en poten aangetoond (Calvello *et al.*, 2005). Foret & Maleska (2006) hebben op basis van het bijengenoom de OBPs in kaart gebracht. Recent is hetzelfde onderzoek uitgevoerd bij *Drosophila melanogaster*, wat leidde tot 51 potentiële OBPs (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002). Bij *Drosophila* komen de OBPs in clusters voor (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002), wat ook zo lijkt te zijn bij de honingbij. Er is toenemend bewijs dat OBPs niet enkel in staan als pendelmoleculen, maar eveneens een actieve rol spelen in geur herkenning (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002). Een analyse van de cluster rond OBP 14 & 15 plaatst deze groep bij de PBP/GOBPs subfamilie, een

subfamilie die tot nu toe bijna het exclusieve terrein van de Lepidoptera was (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002).

C.11 Bijen specifieke proteïnen

Major royal jelly protein 8 (MRJP 8)

Spot 12 en 13 werden via zowel MALDI en LC geïdentificeerd als MRJP8 (NP_001011564). MRJP8 was tot nu toe enkel in de hersenen van werksters aangetoond met een EST databank (Albert & Klaudiny, 2004). Binnen de homologe MRJP tak is MRJP 8 het minst verwant met de andere MRJPs (Albert & Klaudiny, 2004).

“Major royal jelly” proteïnen (MRJP) van de honingbij, de “yellow” proteïnen van *Drosophila*, samen met een aantal proteïnen bij verschillende bacteriën, vormen de MRJP/yellow familie (PF03022). De leden van deze familie hebben verschillende fysiologische functies en lijken bij de eukaryoten enkel bij de insecten voor te komen. MRJPs maken 90% van de proteïnen uit in koninginnenbrij. Koninginnenbrij wordt gesynthetiseerd door zowel de mandibulaire als de hypofaryngaal klieren. Dit secreet van jonge werksterbijen wordt gebruikt om de larven en de koningin te voeden. Alle MRJPs worden teruggevonden in het kopweefsel. De meeste MRJPs zijn momenteel in de hypofaryngaal klieren teruggevonden met uitzondering van MRJP4 en MRJP8, want Souza Santos *et al.* (2005) beschreven MRJP9 verkeerdelijk als MRJP8. MRJP9 hebben we ook in het gif van de honingbij vastgesteld (Peiren *et al.*, 2005). De MRJPs delen een N-terminale hydrofobe sequentie die functioneert als kliefbaar signaalpeptide en dat vermeende N-gebonden glycosylatie sites bevat. Dit veronderstelt dat de proteïnen gesecreteerd worden (Albert *et al.*, 1999). Deze glycoproteïnen bezitten 4 geconserveerde cysteïnen. De fysiologische functies van MRJPs van honingbijen blijven voor het grootste deel ongekend. Naast zijn voedselfunctie in de honingbij spelen sommige MRJPs ook een bijkomende rol in de hersenen (Albert & Klaudiny, 2004). MRJP3 moduleert immuunresponsen en vertoont anti-allergische activiteiten (Okamoto *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2004). Albert & Klaudiny (2004) hebben aangetoond dat de yellow proteïnen van de honingbij en *Drosophila* een monofyletische groep vormen ver van de MRJPs, met MRJP 8 als de vroegste divergentie.

C.12 Bijengifcomponenten

Bijengifcomponenten werden in het gel in 23 spots (fig. VII.1 en tabel VII.2) van de 62 gedetecteerd. De bijengifproteïnen die teruggevonden werden zijn fosfolipase A2 (PLA2) (41, 43, 50-62), hyaluronidase (42), zure fosfatase (47-48), PDGF (25, 49) en icarapine (44-46). Deze zijn besproken in de proteoommap van het gif (Peiren *et al.*, 2005).

D. Besluit

Alle proteïnen (> 10 kDa) die in een vorig onderzoek (Peiren *et al.*, 2005) in het bijengif werden teruggevonden, konden in het lysaat van de gifklier en de gifblaas teruggevonden worden met uitzondering van MRJP9. Een mogelijke verklaring kan zijn dat het van de IPG strip gemigreerd is. MRJP9 heeft ongeveer dezelfde pI als hyaluronidase en deze spot (42) bevindt zich op de rand van de 2D gel. Dit zou meteen de verklaring zijn waarom we tot dusver CUB serine protease nog niet gevonden hebben. Dit enzym heeft immers een theoretische pI die in de buurt ligt. Een ander lid van de MRJP familie, MRJP 8 (spots 12 en 13) werd wel op deze gel geïdentificeerd. Het heeft ongeveer hetzelfde moleculair gewicht als MRJP9, maar de pI verschilt 3 eenheden en er is enkel een sequentie identiteit van 62%. Er kan dus geen verwarring bestaan tussen de twee proteïnen.

Als we de andere proteïnen bekijken behoort de meerderheid tot de enzymen (11). Dit is in overeenstemming met de meerderheid van de allergenen die in bijengif aangetroffen worden. Vijf van deze enzymen behoren tot de antioxidantia. Twee hiervan, GST en SOD1, hebben homologen die opgenomen zijn in de allergeenlijst van de International Union of Immunological Societies. Nog zes andere geïdentificeerde proteïnen zijn homologen van allergenen van deze lijst. De helft hiervan heeft een voorspeld signaalpeptide. Men zou kunnen verwachten dat de antioxidantia en de proteïnen zonder signaalpeptide niet bedoeld zijn om gesecreteerd te worden. Dit sluit evenwel niet uit dat ze via weefselbeschadiging in het gif kunnen terechtkomen zoals gesuggereerd door Hoffman (2006).

De drie enzymen met een signaalpeptide kunnen waarschijnlijk makkelijker in het gif terecht komen omdat ze gesecreteerd worden. Omdat deze componenten weinig abundant zijn, is de recombinant technologie vereist om eventuele interacties te kunnen aantonen.

Allergie gerelateerd met de honingbij wordt niet alleen uitgelokt door de steek. De gevonden componenten die homologen zijn van de IUIS-lijst allergenen kunnen mogelijks ook via een andere weg de mens bereiken. De mogelijkheid bestaat dat ze in het stof en de feces in en rond de kasten terechtkomen en zo via inhalatie een stofallergie kunnen veroorzaken zoals reeds vastgesteld bij imkers (Bousquet *et al.*, 1982). PLA2 is een voorbeeld

van een allergeen dat zowel via inhalatie als via injectie tot allergische reacties leidt (Banks & Shipoloni, 1986).

De oorzaak van de prominente aanwezigheid van antioxidantia is momenteel ongekend. Is dit te wijten aan de hoge metabolische activiteit van dit weefsel of bestaat de mogelijkheid dat ze aanwezig zijn om mogelijke celbeschadiging door de gifcomponenten te voorkomen? Bijen hebben echter een ingenieus beschermingssysteem dat de gesecreteerde gifcomponenten verhindert terug te vloeien naar het excretieweefsel (Bridges & Owen, 1984). Daarentegen zijn er enkel experimentele bewijzen waarin antioxidantia de effecten van gifcomponenten afzwakken. Severcan *et al.* (2000) beschreven dat Vit D2 de inwerking van melittine op de cel vermindert. Katalases verlagen de opname van O4AP-1 op het lichaam (Sun *et al.*, 2003). Dit zijn oxidantia die de toxiciteit van gifcomponenten verlagen.

Voor het eerst konden in deze studie cuticulaire proteïnen van de honingbij worden aangetoond. Gezien de gebruikte extractiemethode en aangezien het gifreservoir afgeboord is door een chitineuse cuticulaire laag was deze bevinding niet echt verrassend. De vraag stelt zich of deze componenten werkelijk deel uitmaken, al dan niet accidenteel, van het gif. Het lijkt ons aannemelijk dat dit een proteïne is dat mogelijks bij ruwe collectiemethoden in het gif kan terechtkomen.

De cuticulaire proteïnen zijn nog niet in hun geheel in het gif gevonden. Doordat ze continu in aanraking komen met het gif bestaat de mogelijkheid dat ze vroeg of laat, eventueel als kleine fragmenten, in de gifblaas terecht komen.

Op basis van het voorgaande blijkt dat er in dit aangerijkt bijengifpreparaat zeker een aantal potentiële bijengifcomponenten aanwezig zijn, waaronder ook mogelijks nieuwe allergenen.

Tabel VII.1: Proteïne identificatie van componenten op de 2-D gels van aangerijkt bijengif

Proteïne naam	Genbank nr. ^{a)}	Chromosoom ^{b)}	Homoloog gekend allergen ^{c)}	MW (Da) ^{d)}	pI ^{d)}	Ident. methode ^{e)}	Peptide massa ^{f)}	Peptidensequentie ^{g)}	Mascot score ^a	Sequentie dekking (%) ⁱ⁾	Spot nr. ^{j)}
<u>Structurele cellulaire functie</u>											
Gelijkend op endocuticulair structureel proteïne	GB16211-PA	2		29924 (27943)	4,47 (4,50)	M & L	2398.10	ALEWNAAHPEEDDGGQRPGR	50	8 (9)	27, 31-33
Gelijkend op endocuticulair structureel proteïne	GB18929-PA	2		26916 (25153)	4,19 (4,19)	M & L	1920.93 2313.11 1139.52	ALDWIAHPSKEDQNV (30) AEDVPIVAQSQEGPNPDGSYK (30) WSYESGNGIK (30)	85	19 (21)	28-30
<u>Stress respons</u>											
<i>Oxidatieve stress respons</i>											
Gelijkend op glutathione-S-transferase	BI513885	UN	Bla g 5 Der p 8 Alt a 13	20368	5,15	L	2038.15 943.55 2240.06 1591.75 1593.84 2120.12 1386.67	IKPTTFGQVPVLDVDGKK KIAQSVASIR DDWEALEIDSIVDTIHDVR LAAFHYEENEIK KIADEVVPYYLER IADEVVPYYLERLDAQ SWLDKRPHSDF	349	(49)	25
Gelijkend op l-cys peroxidoxin	XP_624361	UN		25134	5,88	M & L	1075.59 2344.22 2334.07 2203.07 1183.63 1610.90 1103.56	LAVHQPFFK LLAHSVDKLDHVDWVNDIK SYCQDIPGAFYPPIADHDR LDMIDEISKDDPEQALTVR ALYIISPDHR VMILPTVKDEELPK GVDKVSMPSGK	307	47	22
Gelijkend op Thiol peroxidoxin (2-cys)	XP_393445	12		21787	5,65	M	1581.73 1430.79 1224.68	DYGVLDDESGVPFR GLFIDDKONLR QITINDLPVGR	79	19	24
CuZn superoxide dismutase	AAP93581	8	Ole e 5	15634	6,21	M	1682.82 1404.78 2049.07	GTIFFEQPESTNSVK TIQLQPHSVIGR TLVVHADPDDLKGGVELSK	110	32	36

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

Gelijkend op Disulfide isomerase	XP_623282	1	55857 (53704)	5,57 (5,49)	M & L	1716,86 1626,87	AAEMLLDNPSITLAK NPLVVAYYAVDYIK	144	6	11
<i>Algemene stress respons</i>										
Gelijkend op heat shock protein cognate 70 3	XP_393090	3	72478 (70556)	5,21 (5,14)	M & L	1505,78 1886,96 1786,98 1358,70 1944,02 1338,78	VFAPEEISAMVLGK VTHAVVTPAYFNDAQR IINEPTAAAIAYGLDKK DVDEIVLYGGSTR DNHPLGKFDLTGPPAPR ELTDIVQPHIAK	243	14 (14)	1
Gelijkend op heat shock protein cognate 70 5	XP_392147	1	75404	6,38	L	1461,75	SDIGEVLVGGMTR	46	2	2
<u>Proteïne metabolisme</u>										
arginine kinase	NP_001011603	15	40008	5,66	L	1318,70 1146,61 1796,91	VSSTLSGLEGELK (17) LIDDHFLFK (17) LGFLTFCPTNLGTTVR (17)	210	11	17-18
<u>Carbohydraat metabolisme</u>										
Gelijkend op enolase (2-fosfoglyceraat dehydratase)	Eigen predictie	13	47138	6,42	M & L	1845,91 1851,93 1595,89 2322,06 2236,06 1227,71 1345,62 1426,65	GNPTVEVDLVTDGLFR SEVPSGASTGHEALELR AISNNNTIGPELIK LAMQEFMILPTGASSFS DAMK FGLDATSVGDEGGFAPNILDNK EALNLIIDSIK IGMDVAASEFYK SDPSTYLDSDSLK	384	42	11
Gelijkend op fosfoglyceraat mutase	GB15052-PA	15	28991	7,07	M			99		21
<u>Lipide metabolisme</u>										
Gelijkend op apolipophorin-III	XP_624767	1	21348 (19448)	5,48 (5,45)	M	1953,98 1160,66	QIOEQWNIPDQDTIVK FQGVQTLTK	50	13 (15)	34

Geïjkend op Niemann-Pick type C2 (Npc2) lysosomaal proteïne	XP_001120140	5	Lep d 2	16794 (15007)	6,10 (5,65)	M	1098,57	DIEIYVYKR	42	5 (6)	35
Geïjkend op saposin	XP_392338	4		99499 (97857)	5,29 (5,26)	M		CTILINSYGK	37	?	23
<u>Transport mechanisme</u>											
Transferrine	NP_001011572	15		78657 (75760)	6,77 (6,60)	M & L	1469,75 1044,54 2236,06 1532,79 1237,68 1131,67 1456,68 2477,27 1073,58 1773,75 1942,05 2388,12 2667,25 1747,77 1054,52 2217,15	IFTICVPEYSK (5) GIPVSCISGR (5) EADVAVDPEDMYLAVKDNK (5) LASNAGYVIEQVR (5) DLPNNVQGLR (5) NVGYKIPIK (5) CLAHNGGEIAWTK (5) RFFGLPVGVTAIPTSENADYR (5) NSGATDKIIR (5) YDCTLEKSQDDCLK (5) AIKENNADLTIVSGGSVLR (5) SCHSGYKDSFAGWTAPIYTLK (5) GLIKSENAADFTSGCAPGLDSK (5) LCQCVCNGLASNNDRIR (5) CNLGLPPR (5) SPTVLEELTHGTLAATLYSK (5)	1099	36 (37)	4-5
Geïjkend op cyclophilin type peptidylprolyl isomerase	XP_624416	11	Cat r 1 Bet v 7 Asp f 27 Psi c 2 Mala s 6	20104 (18055)	8,78 (8,60)	M			91		37
<u>Energie metabolisme</u>											
Geïjkend op ATP synthase beta subunit	XP_624156	14		55130	5,25	M & L	1277,63 2284,22 1366,75 2837,45 1087,63 974,55	TIAMDGTGLVR GQSVLDSGYPIRPVGAETLGR IINVIGEPIDER LAPIHADAPEFVDMSEVEILVTGIK VVDLLAPYAK IGLFGGAGVGK	723	38	16

2, 14, 19,
20, 26,
38, 39

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- a) Genbanknummer van NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- b) Chromosoom van de honingbij waarop het gen van het proteïne gelegen is. UN duidt op het feit dat het gen momenteel nog niet op een chromosoom gelokaliseerd is.
- c) Homologen van het geïdentificeerde proteïne die zijn opgenomen in de officiële allergeenlijst van IUIS. De letter en cijfercode komen overeen met de eerste drie letters van het genus van het organisme, de volgende letter met het species. Het cijfer geeft het allergeen nummer van dit organisme.
- d) Theoretisch moleculair gewicht (MW) en pI werden on-line berekend met ExPASy's Compute pI/MW programma (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool); data tussen haakjes zijn de mature proteïnen.
- e) M = MALDI TOF/TOF; L = LC MS/MS.
- f) Theoretische moleculaire massa van het peptide.
- g) Afgeleide peptide sequenties verkregen na MALDI TOF/TOF-MS/MS en/of LC-MS/MS analyse van de aangeduide spot (nummer tussen haakjes).
- h) Totale Mascot score van de aangeduide spot in g).
- i) Het percentage dekking van de afgeleide MS/MS peptiden ten opzichte van de totale proteïne sequentie, data tussen haakjes zijn deze van de mature proteïnen.
- j) Nummers verwijzen naar het spot nummer gegeven in fig. VII.1.

Tabel VII.2: Proteïne identificatie van gekende bijengifcomponenten op de 2-D gels van aangrijkt bijengif

Proteïne naam	Genbank nr. ^{a)}	Chromo- soom ^{b)}	Aller- geen ^{c)}	MW (Da) ^{d)}	pI ^{d)}	Ident. methode ^{e)}	Peptide massa ^{f)}	Peptidensequentie ^{g)}	Mascot score ^{h)}	Sequentie dekking (%) ⁱ⁾	Spot nr. ^{j)}
fosfolipase A2	NP_001011614	13	Api m 1	19058 (15249)	7,05 (8,07)	M & L	1837,73 1387,66 1143,56 1125,56	LSCDCDKFYDCLK (58) NSADITSSYFVGK (58) MYFNLDITK (58) VYQWFDLR (58)	244	25 (31)	41, 43, 50- 62
hyaluronidase	NP_001011619	14	Api m 2	44260 (40747)	8,67 (8,72)	M	1357,66 1501,79	YGQFMEETLK EYLNNELGPAVKR	124	6 (7)	42
zure fosfatase	NP_001011377	Un	Api m 3	45389 (43905)	5,63 (5,63)	M & L	1752,80 1439,73 2862,32 1656,93 1982,99 2670,30 1718,90 1817,90 2068,00	DPLYYDFYPLER (47) MREYQLGQFLR (47) YGDFLGDIYTESVSALSSFYDRTK (47) MSQLVLAALYPPNK (47) LQQWNEDLNWQPIATK (47) RYEDNIFLPEDCLLFTIELDR (47) IFTKHMLDVVSGTOK (47) ELQLPGCEVLCPLYK (47) FYDESANNLSIEELDFVK (47)	469	38 (40)	47-48
icarapine	NP_001012431	1		24789 (22697)	4,51 (4,40)	M & L	1581,91 1280,67	KNVDTVLVLPISIER (46) IPEQGVVNWNK (46)	205	11 (12)	44-46
PDGF/VEGF factor 1 (PVF1)	(XP_392204) Eigen nog niet gepubliceerde sequentie	3		35907 (32944)	7,30 (6,08)	M & L	2306,99 1548,84 2127,83	CGGCCTHSLSCQPTATEIR (25) NFEILVTVLESSGK (25) ETQECSTGFYFDQNSCR (25)	143	16 (17)	25, 49

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- a) Genbanknummer van NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- b) Chromosoom van de honingbij waarop het gen van het proteïne gelegen is. UN duidt op het feit dat het gen momenteel nog niet op een chromosoom gelokaliseerd is.
- c) Allergenen die opgenomen zijn in de officiële allergeenlijst van IUIS. De letter en cijfercode komen overeen met de eerste drie letters van het genus van het organisme, de volgende letter met het species. Het cijfer geeft het allergeen nummer van dit organisme.
- d) Theoretisch moleculair gewicht (MW) en pI zijn on-line berekend met ExPASy's Compute pI/MW programma (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool); data tussen haakjes zijn de mature proteïnen.
- e) M = MALDI TOF/TOF; L = LC MS/MS.
- f) Theoretische moleculaire massa van het peptide.
- g) Afgeleide peptide sequenties verkregen na MALDI TOF/TOF-MS/MS en/of LC-MS/MS analyse van de aangeduide spot (nummer tussen haakjes).
- h) Totale Mascot score van de aangeduide spot in g).
- i) Het percentage dekking van de afgeleide MS/MS peptiden ten opzichte van de totale proteïne sequentie, data tussen haakjes zijn deze van de mature proteïnen.
- j) Nummers verwijzen naar het spot nummer gegeven fig. VII.1.

Referenties

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. 1994. Structure at 2.8-Angstrom Resolution of F1-ATPase From Bovine Heart-Mitochondria. *Nature* 370: 621-628.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H. C., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Miklos, G. L. G., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, A., De Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z. M., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F. C., Gorrell, J. H., Gu, Z. P., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, D. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karp, B. C., Ke, Z. X., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z. W., Lasko, P., Lei, Y. D., Levitsky, A. A., Li, J. Y., Li, Z. Y., Liang, Y., Lin, X. Y., Liu, X. J., Mattei, B., McIntosh, T. C., Mcleod, M. P., Mcpherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacle, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D. C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G. G., Zhao, Q., Zheng, L. S., Zheng, X. Q. H., Zhong, F. N., Zhong, W. Y., Zhou, X. J., Zhu, S. P., Zhu, X. H., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. & Venter, J. C. 2000. The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Ahn, V. E., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., Fluharty, A. L. & Prive, G. G. 2003. Crystal Structure of Saposin B Reveals a Dimeric Shell for Lipid Binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 38-43.
- Aki, T., Fujikawa, A., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., Oka, S. & Ono, K. 1994. Cloning and Expression of Cdna Coding for a New Allergen From the House-Dust Mite, *Dermatophagoides-Farinae* - Homology With Human Heat-Shock Cognate Proteins in the Heat-Shock Protein-70 Family. *Journal of Biochemistry* 115: 435-440.
- Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzova, J. & Simuth, J. 1999. The Family of Major Royal Jelly Proteins and Its Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 49: 290-297.
- Albert, T. & Klaudiny, J. 2004. The Mrjp/Yellow Protein Family of *Apis mellifera*: Identification of New Members in the Est Library. *Journal of Insect Physiology* 50: 51-59.
- Andersen, S. O. 1998. Amino Acid Sequence Studies on Endocuticular Proteins From the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28 : 421-434.
- Andersen, S. O., Hojrup, P. & Roepstorff, P. 1995. Insect Cuticular Proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 153-176.
- Arruda, L. K., Vailes, L. D., Plattsmills, T. A. E., Hayden, M. L. & Chapman, M. D. 1997. Induction of Ige Antibody Responses by Glutathione S-Transferase From the German Cockroach (*Blattella Germanica*). *Journal of Biological Chemistry* 272: 20907-20912.

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- Banks, B. E. C. & Shipoloni, R. A. 1986. Chapter 7: Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In Piek T. (Ed) Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects (pp. 329-415). Academic Press.
- Bauer, H., Kanzok, S. M. & Schirmer, R. H. 2002. Thioredoxin-2 but Not Thioredoxin-1 Is a Substrate of Thioredoxin Peroxidase-1 From *Drosophila Melanogaster* - Isolation and Characterization of a Second Thioredoxin in *D-Melanogaster* and Evidence for Distinct Biological Functions of Trx-1 and Trx-2. *Journal of Biological Chemistry* 277: 17457-17463.
- Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W. R., Scholler, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R. & Duchene, M. 2001. Molecular and Immunological Characterization of Arginine Kinase From the Indianmeal Moth, *Plodia interpunctella*, a Novel Cross-Reactive Invertebrate Pan-Allergen. *Journal of Immunology* 167: 5470-5477.
- Bishop, J. G. & Corces, V. G. 1990. The Nucleotide-Sequence of a *Drosophila-Melanogaster* Enolase Gene. *Nucleic Acids Research* 18: 191.
- Boluda, L., Alonso, C. & Fernandez-Caldas, E. 1998. Purification, Characterization, and Partial Sequencing of Two New Allergens of *Olea Europaea*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 210-216.
- Bousquet, J., Menardo, J. L. & Michel, F. B. 1982. Allergy in Beekeepers. *Allergologia Et Immunopathologia* 10: 395-398.
- Bridges, A. R. & Owen, M. D. 1984. The Morphology of the Honey Bee (*Apis-Mellifera* L) Venom Gland and Reservoir. *Journal of Morphology* 181: 69-86.
- Bruhn, H. 2005. A Short Guided Tour Through Functional and Structural Features of Saposin-Like Proteins. *Biochemical Journal* 389: 249-257.
- Calvello, M., Brandazza, A., Navarrini, A., Dani, F. R., Turillazzi, S., Felicioli, A. & Pelosi, P. 2005. Expression of Odorant-Binding Proteins and Chemosensory Proteins in Some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 297-307.
- Caroni, P., Rothenfluh, A., McGlynn, E. & Schneider, C. 1991. S-Cyclophilin - New Member of the Cyclophilin Family Associated With the Secretory Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 266: 10739-10742.
- Chacon-Almeida, V. M. L., Simoes, Z. L. P. & Bitondi, M. M. G. 2000. Induction of Heat Shock Proteins in the Larval Fat Body of *Apis mellifera* L. Bees. *Apidologie* 31: 487-501.
- Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. 1994a. Thioredoxin-Dependent Peroxide Reductase From Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 269: 27670-27678.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G. & Rhee, S. G. 1994b. Cloning and Sequencing of Thiol-Specific Antioxidant From Mammalian Brain - Alkyl Hydroperoxide Reductase and Thiol-Specific Antioxidant Define a Large Family of Antioxidant Enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7017-7021.
- Chae, H. Z., Uhm, T. B. & Rhee, S. G. 1994c. Dimerization of Thiol-Specific Antioxidant and the Essential Role of Cysteine-47. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7022-7026.
- Choi, Y. S., Lee, K. S., Yoon, H. J., Kim, I., Sohn, H. D. & Jin, B. R. 2006. Bombus Ignitus Cu,Zn Superoxide Dismutase (Sod1): Cdna Cloning, Gene Structure, and up-Regulation in Response to Paraquat, Temperature Stress, or Lipopolysaccharide Stimulation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 144: 365-371.
- Cross, R. L. & Muller, V. 2004. The Evolution of a-, F-, and V-Type Atp Synthases and Atpases: Reversals in Function and Changes in the H+/Atp Coupling Ratio. *Febs Letters* 576: 1-4.

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- Currie, P. D. & Sullivan, D. T. 1994. Structure, Expression and Duplication of Genes Which Encode Phosphoglyceromutase of *Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* 138: 353-363.
- Danty, E., Michardvanhee, C., Huet, J. C., Genecque, E., Pernollet, J. C. & Masson, C. 1997. Biochemical Characterization, Molecular Cloning and Localization of a Putative Odorant-Binding Protein in the Honey Bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea). *Febs Letters* 414: 595-598.
- Do Nascimento, A. M., Cuvillier-Hot, V., Barchuk, A. R., Simoes, Z. L. P. & Hartfelder, K. 2004. Honey Bee (*Apis mellifera*) Transferrin-Gene Structure and the Role of Ecdysteroids in the Developmental Regulation of Its Expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 415-424.
- Dunkov, B. & Georgieva, T. 2006. Insect Iron Binding Proteins: Insights From the Genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 300-309.
- Ellington, W. R. 2001. Evolution and Physiological Roles of Phosphagen Systems. *Annual Review of Physiology* 63: 289-325.
- Fellrath, J. M., Kettner, A., Dufour, N., Frigerio, C., Schneeberger, D., Leimgruber, A., Corradin, G. & Spertini, F. 2003. Allergen-Specific T-Cell Tolerance Induction With Allergen- Derived Long Synthetic Peptides: Results of a Phase I Trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 854-861.
- Foor, F., Parent, S. A., Morin, N., Dahl, A. M., Ramadan, N., Chrebet, G., Bostian, K. A. & Nielsen, J. B. 1992. Calcineurin Mediates Inhibition by Fk506 and Cyclosporine of Recovery From Alpha-Factor Arrest in Yeast. *Nature* 360: 682-684.
- Foret, S. & Maleszka, R. 2006. Function and Evolution of a Gene Family Encoding Odorant Binding-Like Proteins in a Social Insect, the Honey Bee (*Apis Mellifera*). *Genome Research* 16: 1404-1413.
- Galat, A. 2003. Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerases (Immunophilins): Biological Diversity Targets - Functions. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 1315-1347.
- Galjart, N. J., Gillemans, N., Meijer, D. & Dazzo, A. 1990. Mouse Protective Protein - Cdna Cloning, Sequence Comparison, and Expression. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4678-4684.
- Glaser, A. G., Limacher, A., Fluckiger, S., Scheynius, A., Scapozza, L. & Crameri, R. 2006. Analysis of the Cross-Reactivity and of the 1.5 Angstrom Crystal Structure of the Malassezia Sympodialis Mala S 6 Allergen, a Member of the Cyclophilin Pan-Allergen Family. *Biochemical Journal* 396: 41-49.
- Gregorc, A. & Bowen, I. D. 1999. In Situ Localization of Heat-Shock and Histone Proteins in Honey-Bee (*Apis mellifera* L.) Larvae Infected With Paenibacillus Larvae. *Cell Biology International* 23: 211-218.
- Guntur, K. V. P., Velasquez, D., Chadwell, L., Carroll, C., Weintraub, S., Cassill, J. A. & Renthal, R. 2004. Apolipophorin-Iii-Like Protein Expressed in the Antenna of the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis Invicta* Buren (Hymenoptera : Formicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 57: 101-110.
- Hannaert, V., Albert, M. A., Rigden, D. J., Giotto, M. T. D., Thiemann, O., Garratt, R. C., Van Roy, J., Oppendoes, F. R. & Michels, P. A. M. 2003. Kinetic Characterization, Structure Modelling Studies and Crystallization of Trypanosoma Brucei Enolase. *European Journal of Biochemistry* 270: 3205-3213.
- Hekmat-Scafe, D. S., Scafe, C. R., Mckinney, A. J. & Tanouye, M. A. 2002. Genome-Wide Analysis of the Odorant-Binding Protein Gene Family in *Drosophila Melanogaster*. *Genome Research* 12: 1357-1369.
- Hoffman, D. R. 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 30: 109-128.

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- Huang, C. H., Liew, L. M., Mah, K. W., Kuo, I. C., Lee, B. W. & Chua, K. Y. 2006. Characterization of Glutathione S-Transferase From Dust Mite, Der P 8 and Its Immunoglobulin E Cross-Reactivity With Cockroach Glutathione S-Transferase. *Clinical and Experimental Allergy* 36: 369-376.
- Jedrzejewski, M. J. 2000. Structure, Function, and Evolution of Phosphoglycerate Mutases: Comparison With Fructose-2,6-Bisphosphatase, Acid Phosphatase, and Alkaline Phosphatase. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 73: 263-287.
- Karamloo, F., Schmid-Grendelmeier, P., Kussebi, F., Akdis, M., Salagianni, M., Von Beust, B. R., Reimers, A., Zumkehr, J., Soldatova, L., Housley-Markovic, Z., Muller, U., Kundig, T., Kemeny, D. M., Spangfort, M. D., Blaser, K. & Akdis, C. A. 2005. Prevention of Allergy by a Recombinant Multi-Allergen Vaccine With Reduced IgE Binding and Preserved T Cell Epitopes. *European Journal of Immunology* 35: 3268-3276.
- Karouna-Renier, N. K., Yang, W. J. & Rao, K. R. 2003. Cloning and Characterization of a 70 Kda Heat Shock Cognate Gene (Hsc70) From Two Species of Chironomus. *Insect Molecular Biology* 12: 19-26.
- Kawamura, K., Shibata, T., Saget, O., Peel, D. & Peter, J. 1999. A New Family of Growth Factors Produced by the Fat Body and Active on Drosophila Imaginal Disc Cells. *Development* 126: 211-219.
- Kim, I., Lee, K. S., Hwang, J. S., Ahn, M. Y., Li, J. H., Sohn, H. D. & Jin, B. R. 2005. Molecular Cloning and Characterization of a Peroxiredoxin Gene From the Mole Cricket, Gryllotalpa Orientalis. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 140: 579-587.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. 2004. Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68: 138-145.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A., Boukouvala, E. & Papadopoulou-Mourkidou, E. 2001. Glutathione S-Transferase in the Defence Against Pyrethroids in Insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 313-319.
- Kucharski, R. & Maleszka, R. 1998. Arginine Kinase Is Highly Expressed in the Compound Eye of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Gene* 211: 343-349.
- Kucharski, R. & Maleszka, R. 2003. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* 27: 8pp.
- Kussebi, F., Karamloo, F., Rhyner, C., Schmid-Grendelmeier, P., Salagianni, M., Mannhart, C., Akdis, M., Soldatova, L., Markovic-Housley, Z., Von Beust, B. R., Kundig, T., Kemeny, D. M., Blaser, K., Cramer, R. & Akdis, C. A. 2005. A Major Allergen Gene-Fusion Protein for Potential Usage in Allergen-Specific Immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 323-329.
- Landis, G. N. & Tower, J. 2005. Superoxide Dismutase Evolution and Life Span Regulation (Vol 126, Pg 365, 2005). *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 907-908.
- Law, J. H. 2002. Insects, Oxygen, and Iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 1191-1195.
- Lee, K. S., Kim, S. R., Park, N. S., Kim, I., Kang, P. D., Sohn, B. H., Choi, K. H., Kang, S. W., Je, Y. H., Lee, S. M., Sohn, H. D. & Jin, B. R. 2005. Characterization of a Silkworm Thioredoxin Peroxidase That Is Induced by External Temperature Stimulus and Viral Infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 73-84.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. & Chapple, C. 2000. Cloning of the Sng1 Gene of Arabidopsis Reveals a Role for a Serine Carboxypeptidase-Like Protein as an Acyltransferase in Secondary Metabolism. *Plant Cell* 12: 1295-1306.

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- Leonova, T., Qi, X. Y., Bencosme, A., Ponce, E., Sun, Y. & Grabowski, G. A. 1996. Proteolytic Processing Patterns of Prosaposin in Insect and Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 271: 17312-17320.
- Leung, P. S. C. & Gershwin, M. E. 1991. The Immunobiology of Heat-Shock Proteins. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 1: 23-30.
- Leyva, J. A., Bianchet, M. A. & Amzel, L. M. 2003. Understanding Atp Synthesis: Structure and Mechanism of the F1-Atpase (Review). *Molecular Membrane Biology* 20: 27-33.
- Liao, D. F., Jin, Z. G., Baas, A. S., Daum, G., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Berk, B. C. 2000. Purification and Identification of Secreted Oxidative Stress-Induced Factors From Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275: 189-196.
- Lindquist, S. 1993. Autoregulation of the heat-shock response. In Ilian, J. (Ed) Translational regulation of gene expression 2 (pp. 279-320). New York: Plenum Press.
- Luque, T., Marfany, G. & Gonzalezduarte, R. 1997. Characterization and Molecular Analysis of Adh Retrosequences in Species of the Drosophila Obscura Group. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1316-1325.
- Magkrioti, C. K., Spyropoulos, I. C., Iconomidou, V. A., Willis, J. H. & Hamodrakas, S. J. 2004. Cuticledb: a Relational Database of Arthropod Cuticular Proteins. *Bmc Bioinformatics* 5.
- Mahroof, R., Zhu, K. Y., Neven, L., Subramanyam, B. & Bai, J. F. 2005. Expression Patterns of Three Heat Shock Protein 70 Genes Among Developmental Stages of the Red Flour Beetle, Tribolium Castaneum (Coleoptera : Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 141: 247-256.
- Marivet, J., Margispinheiro, M., Frendo, P. & Burkard, G. 1994. Bean Cyclophilin Gene-Expression During Plant Development and Stress Conditions. *Plant Molecular Biology* 26: 1181-1189.
- Mittapalli, O., Wise, I. L. & Shukle, R. H. 2006. Characterization of a Serine Carboxypeptidase in the Salivary Glands and Fat Body of the Orange Wheat Blossom Midge, Sitodiplosis Mosellana (Diptera : Cecidomyiidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 154-160.
- Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N. & Cotto, J. J. The Heat-Shock Response: Regulation and Function of Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones. 32, 17-29. 1997. Essays in Biochemistry.
- Munford, R. S., Sheppard, P. O. & Ohara, P. J. 1995. Saposin-Like Proteins (Saplip) Carry Out Diverse Functions on a Common Backbone Structure. *Journal of Lipid Research* 36: 1653-1663.
- Munks, R. J. L., Sant'anna, M. R. V., Grail, W., Gibson, W., Igglesden, T., Yoshiyama, M., Lehane, S. M. & Lehane, M. J. 2005. Antioxidant Gene Expression in the Blood-Feeding Fly Glossina morsitans morsitans. *Insect Molecular Biology* 14: 483-491.
- Nichol, H., Law, J. H. & Winzerling, J. J. 2002. Iron Metabolism in Insects. *Annual Review of Entomology* 47: 535-559.
- Noiva, R. & Lennarz, W. J. 1992. Protein Disulfide Isomerase - a Multifunctional Protein Resident in the Lumen of the Endoplasmic-Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 267: 3553-3556.
- Nuttall, T. J., Hill, P. B., Bensignor, E. & Willemse, T. 2006. House Dust and Forage Mite Allergens and Their Role in Human and Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology* 17: 223-235.
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. & Kurimoto, M. 2003. Major Royal Jelly Protein 3 Modulates Immune Responses in Vitro and in Vivo. *Life Sciences* 73: 2029-2045.

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- Oliver, J. D., Vanderwal, F. J., Bulleid, N. J. & High, S. 1997. Interaction of the Thiol-Dependent Reductase Erp57 With Nascent Glycoproteins. *Science* 275: 86-88.
- Olsson, S. & Van Hage-Hamsten, M. 2000. Allergens From House Dust and Storage Mites: Similarities and Differences, With Emphasis on the Storage Mite *Lepidoglyphus destructor*. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 912-919.
- Ortona, E., Vaccari, S., Margutti, E., Delunardo, F., Rigano, R., Profumo, E., Buttari, B., Rasool, O., Teggi, A. & Siracusano, A. 2002. Immunological Characterization of *Echinococcus granulosus* Cyclophilin, an Allergen Reactive With IgE and IgG4 From Patients With Cystic Echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology* 128: 124-130.
- Papadopoulos, A. I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A. & Tananaki, C. 2004a. Glutathione S-Transferase in the Developmental Stages of the Insect *Apis mellifera* Macedonica. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 139: 87-92.
- Papadopoulos, A. I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A. & Tananaki, C. 2004b. Glutathione S-Transferase in the Insect *Apis mellifera* Macedonica - Kinetic Characteristics and Effect of Stress on the Expression of Gst Isoenzymes in the Adult Worker Bee. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 139: 93-97.
- Peiren, N., de Graaf, D. C., Brunain, M., Bridts, C. H., Ebo, D. G., Stevens, W. J. & Jacobs, F. J. 2006. Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *FEBS Letters* 580: 4895-9.
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., De Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J. & Jacobs, F. J. 2005. The Protein Composition of Honeybee Venom Reconsidered by a Proteomic Approach. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1752: 1-5.
- Pena, P. & Garesse, R. 1993. The Beta-Subunit of the *Drosophila melanogaster* Atp Synthase - Cdna Cloning, Amino-Acid-Analysis and Identification of the Protein in Adult Flies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195: 785-791.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. & Sistonen, L. 2001. Roles of the Heat Shock Transcription Factors in Regulation of the Heat Shock Response and Beyond. *Faseb Journal* 15: 1118-1131.
- Radyuk, S. N., Klichko, V. I., Spinola, B., Sohal, R. S. & Orr, W. C. 2001. The Peroxiredoxin Gene Family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1090-1100.
- Radyuk, S. N., Sohal, R. S. & Orr, W. C. 2003. Thioredoxin Peroxidases Can Foster Cytoprotection or Cell Death in Response to Different Stressors: Over- and Under-Expression of Thioredoxin Peroxidase in *Drosophila* Cells. *Biochemical Journal* 371: 743-752.
- Rebers, J. E. & Willis, J. H. 2001. A Conserved Domain in Arthropod Cuticular Proteins Binds Chitin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1083-1093.
- Rose, Z. B. 1982. Intermediates in the Phosphoglycerate Mutase and Bisphosphoglycerate Synthase Reactions. *Methods in Enzymology* 87: 42-51.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. 1992. In-Gel Digestion of Proteins for Internal Sequence-Analysis After 1-Dimensional or 2-Dimensional Gel-Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 203: 173-179.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Miklos, G. L. G., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S. B., Gong, F. C., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J. Y., Li, Z. Y., Hynes, R. O., Jones, S. J. M., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Voshall, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. Q. H., Zhong,

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

- F., Zhong, W. Y., Gibbs, R., Venter, J. C., Adams, M. D. & Lewis, S. 2000. Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* 287: 2204-2215.
- Sanchez, J. C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M. R. & Hochstrasser, D. F. 1997. Improved and Simplified in-Gel Sample Application Using Reswelling of Dry Immobilized Ph Gradients. *Electrophoresis* 18: 324-327.
- Santos, K. S., Dos Santos, L. D., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Malaspina, O. & Palma, M. S. 2005. Profiling the Proteome Complement of the Secretion From Hypopharyngeal Gland of Africanized Nurse-Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 85-91.
- Severcan, F., Durmus, H. O., Eker, F., Akinoglu, B. G. & Haris, P. I. 2000. Vitamin D-2 Modulates Melittin-Membrane Interactions. *Talanta* 53: 205-211.
- Shi, L. & Paskewitz, S. M. 2004. Identification and Molecular Characterization of Two Immune-Responsive Chitinase-Like Proteins From Anopheles Gambiae. *Insect Molecular Biology* 13: 387-398.
- Snutch, T. P., Heschl, M. F. P. & Baillie, D. L. 1988. The Caenorhabditis-Elegans Hsp70 Gene Family - a Molecular Genetic-Characterization. *Gene* 64: 241-255.
- Sookrung, N., Chaicumpa, W., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., Bunnag, C., Ramasoota, P., Tongtawe, P., Sakolvaree, Y. & Tapchaisri, P. 2006. Periplaneta Americana Arginine Kinase as a Major Cockroach Allergen Among Thai Patients With Major Cockroach Allergies. *Environmental Health Perspectives* 114: 875-880.
- Sun, L. K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., Li, Y. P., Kariya, K., Nozaki, M. & Morine, N. 2003. Apoptotic Effect in the Glioma Cells Induced by Specific Protein Extracted From Okinawa Habu (Trimeresurus Flavoviridis) Venom in Relation to Oxidative Stress. *Toxicology in Vitro* 17: 169-177.
- Talamillo, A., Fernandez-Moreno, M. A., Martinez-Azorin, F., Bornstein, B., Ochoa, P. & Garesse, R. 2004. Expression of the Drosophila Melanogaster Atp Synthase Alpha Subunit Gene Is Regulated by a Transcriptional Element Containing Gaf and Adf-1 Binding Sites. *European Journal of Biochemistry* 271: 4003-4013.
- Tracy, M. R. & Hedges, S. B. 2000. Evolutionary History of the Enolase Gene Family. *Gene* 259: 129-138.
- Vanrobaeys, F., Devreese, B., Lecocq, E., Rychlewski, L., De Smet, L. & Van Beeumen, J. 2003. Proteomics of the Dissimilatory Iron-Reducing Bacterium Shewanella Oneidensis Mr-1, Using a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Tandem-Time of Flight Mass Spectrometer. *Proteomics* 3: 2249-2257.
- Verma, J., Singh, B. P., Sridhara, S., Gaur, S. N. & Arora, N. 2003. Purification and Characterization of a Cross-Reactive 45-Kd Major Allergen of Fusarium Solani. *International Archives of Allergy and Immunology* 130: 193-199.
- Vuori, K., Myllyla, R., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K. I. 1992. Expression and Site-Directed Mutagenesis of Human Protein Disulfide Isomerase in Escherichia-Coli - This Multifunctional Polypeptide Has 2 Independently Acting Catalytic Sites for the Isomerase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 267: 7211-7214.
- Wagner, S., Breiteneder, H., Simon-Nobbe, B., Susani, M., Krebitz, M., Niggemann, B., Brehler, R., Scheiner, O. & Hoffmann-Sommergruber, K. 2000. Hev B 9, an Enolase and a New Cross-Reactive Allergen From Hevea Latex and Molds - Purification, Characterization, Cloning and Expression. *European Journal of Biochemistry* 267: 7006-7014.
- Wang, J. J., Sykes, B. D. & Ryan, R. O. 2002. Structural Basis for the Conformational Adaptability of Apolipoprotein Iii, a Helix-Bundle Exchangeable Apolipoprotein. *Proceedings of the National*

Hoofdstuk VII: Proteoomstudie van een aangerijkt gifpreparaat bekomen door lysis van de gifblaas en de gifklieren van de honingbij (*Apis mellifera* L.).

Academy of Sciences of the United States of America 99: 1188-1193.

Wang, P. & Heitman, J. 2005. The Cyclophilins. *Genome Biology* 6.

Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M. & Tanaka, H. 1993. Identification of Glutamic Acid-204 and Aspartic Acid-200 in Chitinase-A1 of *Bacillus-Circulans* W1-12 as Essential Residues for Chitinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 268: 18567-18572.

Weirich, G. F., Collins, A. M. & Williams, V. P. 2002. Antioxidant Enzymes in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33: 3-14.

Wheeler, J. C., King, V. & Tower, J. 1999. Sequence Requirements for Upregulated Expression of *Drosophila* Hsp70 Transgenes During Aging. *Neurobiology of Aging* 20: 545-553.

White, M. F. & Fothergillgilmore, L. A. 1988. Sequence of the Gene Encoding Phosphoglycerate Mutase From *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Febs Letters* 229: 383-387.

Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J. R., Robertson, H. M., Soares, M. B. & Robinson, G. E. 2002. Annotated Expressed Sequence Tags and Cdna Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. *Genome Research* 12: 555-566.

Whitten, M. M. A., Tew, I. F., Lee, B. L. & Ratcliffe, N. A. 2004. A Novel Role for an Insect Apolipoprotein (Apolipoprotein Iii) in Beta-1,3-Glucan Pattern Recognition and Cellular Encapsulation Reactions. *Journal of Immunology* 172: 2177-2185.

Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. 2002. Superoxide Dismutase Multigene Family: a Comparison of the Cuzn-Sod (Sod1), Mn-Sod (Sod2), and Ec-Sod (Sod3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 337-349.

Zhang, J., Iwai, S., Tsugehara, T. & Takeda, M. 2006. Mbidgf, a Novel Member of the Imaginal Disc Growth Factor Family in *Mamestra Brassicae*, Stimulates Cell Proliferation in Two Lepidopteran Cell Lines Without Insulin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 536-546.

Hoofdstuk VIII: Algemeen besluit / General conclusion

A. Algemeen besluit

De recente ontwikkelingen in de diagnostiek en therapie van bijengifallergie brengen een nood met zich mee om de samenstelling van bijengif zo volledig mogelijk te kennen. Met dit onderzoek hebben we geprobeerd een bijdrage te leveren tot het ontrafelen van deze puzzel. In ons onderzoek zijn we er in geslaagd 3 nieuwe proteïnen te ontdekken: PVF1, icarapine en MRJP9. Icarapine is een proteïne waarvan de functie momenteel nog niet gekend is. Het heeft een kenmerkend domein dat eveneens bij andere insecten waargenomen wordt. Icarapine kent een alternatieve splitsing van mRNA bij de transcriptie. Het is een potentieel nieuw allergeen omwille van de IgE-bindende eigenschappen van de recombinant proteïne. De annotatie van PVF1 is gebaseerd op de volledige coderende sequentie van het overeenkomstig cDNA uit gifklierweefsel, welke een sterke homologie vertoont met het *Drosophila melanogaster* PVF1. Het vervult een aantal functies waaronder het verhogen van de capillaire permeabiliteit. Ook hier werd alternatieve splitsing waargenomen, wat trouwens typisch is voor deze familie. svVEGF, een gifcomponent bij adders, kan ook bij deze familie worden ondergebracht. MRJP9 behoort samen met MRJP8 tot de MRJP/yellow familie. De MRJPs zijn bijenspecifiek, terwijl de “yellow” leden bij andere insecten en bij bacteriën worden waargenomen. De functionaliteit is niet goed gekend. Het lijkt erop dat deze twee proteïnen nauwst verwant zijn met de yellow proteïne waaruit de MRJP familie ontstaan is. MRJP9 kan met bijna zekerheid als een allergeen bestempeld worden. Van een ander allergeen, de protease inhibitor Api m 6, werd allelische variatie waargenomen. Dit verklaart de C-terminale proteïne variatie van deze component. Deze allelische variatie gaat meestal gepaard met het voorkomen van indels die de correcte assemblage van het bijengenoem vertraagd en bemoeilijkt hebben. Het aangerijkt bijengifpreparaat vertoont, naast cellulaire componenten en de meeste bijengifcomponenten, een aantal proteïnen die in de toekomst onze verdere aandacht zullen krijgen. Deze laatste studie leidde tot de identificatie van opvallend veel antioxidantia in de meest dominante spots. Er konden ook een aantal proteïnen geïdentificeerd worden waarvan sommige homologen bij de mens allergie veroorzaken.

Naast het vinden van een reeks nieuwe gifcomponenten, waarvan sommige mogelijks nieuwe allergenen vertegenwoordigen, onthult deze studie ook een opvallende proteïne heterogeniteit die zijn oorsprong vindt in allelische variatie en

alternatieve splitsing van het transcript. Dit laatste aspect werd eveneens waargenomen bij de antibacteriële component apidaecine. Mogelijk is dit fenomeen kenmerkend voor de componenten die onderhevig zijn aan een hoge selectiedruk.

B. General conclusion

Recent developments in the diagnosis and therapy of bee venom allergy hyphenates the need to know the composition of bee venom to the fullest possible extent. With this study we have tried to make a contribution to unravel this puzzle. We have discovered 3 new proteins: PVF1, icarapin and MRJP9. Icarapin is a protein of which the function is at present not yet known. It has a characteristic domain that is also observed in other insects. Icarapin has an alternative splicing of mRNA during transcription. It is a potentially new allergen because of the IgE-binding properties of the recombinant protein. The annotation of PVF1 was based on the complete encoding sequence of the corresponding cDNA from venom glands, which shows a strong homology with *Drosophila melanogaster* PVF1. It fulfils a number of functions among which raising the capillary permeability. Alternative splicing was also observed, being a typical characteristic for this family. svVEGF, a venom component from vipers, also belongs to this family. MRJP9 together with MRJP8 are members of the MRJP/yellow family. The MRJPs are bee-specific, whereas the yellow members are observed in other insects and bacteria. The function has not been well known. It seems that these two proteins are related the closed with the yellow protein from which the MRJP family has arisen. MRJP9 can be designated with almost certainty as an allergen. Of another allergen, the protease inhibitor Api m. 6, allelic variation was observed. This explains the protein variation of this component at the C terminal end. This allelic variation is mostly accompanied by the occurrence of indels which has slowed down and hampered the correct assembly of bee genome. The enriched bee venom preparation shows, beside cellular components and most of the bee venom components, a number of proteins which will get our further attention in the future. This last study led to the identification of many antioxidants in the most dominant spots. We also identified a number of proteins of which some homologues cause allergy in man.

In addition to the finding of a range of new venom components from which some represent possible new allergens, this study also reveals a striking protein heterogeneity which is originated in allelic variation and alternative splicing of the transcript. This last aspect was also observed with the antimicrobial component apidaecin. Possibly this phenomenon is characteric for components which are exposed to a high selective pressure.