

독일바퀴 주 알레르겐 Bla g 2의
peptide 단편에 대한 IgE 반응

연세대학교 대학원

의과학과

이 해 석

독일바퀴 주 알레르겐 Bla g 2의
peptide 단편에 대한 IgE 반응

지도 용 태 순 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

이 해 석

이해석의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006 년 6 월 일

감사의 글

2년 동안 훌륭한 환경과 사람들 안에서 배우고 발전할 수 있도록 이끌어 주신 주님 감사드립니다.

짧은 2년이지만 많은 것을 배우고 성장하여 돌아옵니다. 비록 아쉬운 점도 많지만, 뒤쳐지지 않고 무사히 졸업을 할 수 있게 된 것을 뒤 돌아 보면 그동안 저를 도와준 많은 고마운 분들이 계셨다는 것을 다시금 생각하게 합니다.

먼저 이 논문이 완성되기까지 많은 관심과 격려로 늘 변함없이 따뜻하게 지도해 주신 용태순 교수님께 진심으로 감사드립니다. 정확한 비평과 조언으로 도움을 주신 미생물학 교실의 김세종 교수님, 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 충고와 조언을 해주신 박중원 교수님께 감사의 뜻을 전합니다. 많은 것을 생각하고 공부의 의욕을 선물해 주신 실질적인 조언자 정경용 선생님과 이종원 선생님께도 감사의 말을 전합니다. 끝으로 2년 동안 저를 위해 기도와 사랑으로 응원해준 사랑하는 아내와 가족들에게 깊은 사랑과 존경을 드립니다. 좁은 지면에 그분들을 일일이 열거하면서 감사의 마음을 전하지는 못하지만 이 모든 것이 결코 저 혼자 힘만으로 된 것이 아니었음을 고백하지 않을 수 없습니다. 제게 힘을 주셨던 모든 분들께 다시 한번 감사드리며, 앞으로의 삶에 있어서 보다 발전된 모습으로 보답할 것을 약속드립니다.

2006년 6월
이 해 석 드림

차 례

그림 및 표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 재료	8
가. 환자 및 혈청	8
나. 독일바퀴 조항원 제조	8
2. 방법	9
가. 바퀴로부터 total RNA 분리	9
나. RT-PCR 및 pGEM T-Easy vector cloning	9
다. DNA 염기서열 분석	10
라. 재조합 Bla g 2 단편 생산	10
마. 재조합 Bla g 2 알레르겐의 발현 및 분리	12
바. SDS-PAGE	12
사. ELISA를 이용한 PrBla g 2와 rBla g 2의 IgE 반응성 비교 및 재조합 알레르겐 단편에 대한 IgE 반응성 조사	13
III. 결과	14
1. total RNA분리 및 RT-PCR	14
2. Bla g 2 유전자 클로닝	14
3. Bla g 2 유전자의 subcloning 및 재조합단백질의 발현	16

4. rBla g 2와 PrBla g 2의 IgE 반응성 비교	18
5. 재조합 Bla g 2 단백질 및 재조합 단편들의 IgE 결합능 조사	19
IV. 고찰	21
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	32

그림 차례

Fig. 1. Four species of domestic cockroaches found in Korea	7
Fig. 2. Schematic representation of Bla g 2 fragments for the epitope analysis	11
Fig. 3. Total RNA isolation and RT-PCR of Bla g 2	14
Fig. 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Bla g 2	15
Fig. 5. PCR amplification of Bla g 2 full-length and fragments	16
Fig. 6. Purification of recombinant Bla g 2 full-length and fragments	17
Fig. 7. Binding profiles of IgE antibodies to PrBla g 2 and rBla g 2	18
Fig. 8. Binding profiles of IgE antibodies to recombinant Bla g 2 and fragments	20

표 차례

Table 1. Sequence of oligonucleotides used for production of fragmented Bla g 2	11
Table 2. IgE binding reactivities of peptide fragments of recombinant Bla g 2	20

독일바퀴 주 알레르겐 Bla g 2의 peptide 단편에 대한 IgE 반응

바퀴는 천식이나 여러 가지 호흡기 알레르기 질환을 일으킨다. 바퀴알레르겐 중 Bla g 2는 가장 중요한 알레르겐으로 알려졌다.

Bla g 2가 바퀴알레르기를 유발하는데 매우 중요한 요소임에도 불구하고, Bla g 2의 대한 B cell epitope과 T cell epitope에 대한 연구는 아직 이루어 지지 않았다. 따라서 본 논문에서는 재조합 단백질 이용하여 B cell과 결합하는 Bla g 2의 IgE binding epitope의 위치를 알아보고자 하였다.

독일바퀴의 성충으로부터 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 이용해 Bla g 2 유전자를 클로닝하여 기존의 Bla g 2 DNA서열 (U28863)과 비교하였다. 그 결과, 11개의 클론 중 10개의 클론이 다음과 같은 4개의 아미노산 서열이 치환되어 있었고 : amino acid position 87 (K → R), 116 (S → F), 142 (V → G), 322 (T → A), 1개의 클론은 다음과 같은 5개의 아미노산 서열이 치환되어 있었다 : amino acid position 87 (K → R), 116 (S → F), 142 (V → G), 199 (Y → C), 322 (T → A).

*E. coli*에서 발현한 rBla g 2와 *Pichia pastoris*에서 발현한 PrBla g 2 (INDOOR biotechnologies Inc, Manchester, U.K)에 대한 IgE 반응을 비교하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 세브란스 병원의 알레르기 클리닉을 찾은 바퀴알레르기 환자 38명의 혈청을 연구에 이용하였다. 그 결과 총 38명의 환자들 중 17명이 PrBla g 2와 rBla g 2에 반응한 것을 알 수 있었으며, 2명은 PrBla g 2에 강하게 반응하였다.

클로닝한 Bla g 2를 5개의 단편으로 나누어 발현하고 재조합 단

백질을 생산하였다. rBla g 2와 PrBla g 2에 강하게 반응한 환자 중 10명의 환자를 선별하여 rBla g 2 단편의 재조합단백질에 대한 IgE 결합능을 ELISA를 통해 알아보았다. 그 결과 바퀴알레르기환자 혈청 10명 모두에서 rBla g 2에 반응을 보였으며, 단편A는 8명 (80%), 단편B는 5명 (50%), 단편C는 10명 (100%), 단편D는 3명 (30%), 단편E는 4명 (40%)로, 나타났다. 따라서 모든 단편에 IgE binding 서열이 존재하나 특히 아미노산 1~75와 146~225 서열이 IgE-binding에 중요한 서열을 포함하고 있음을 알 수 있었다.

재조합 알레르겐을 이용한 Bla g 2의 linear B cell epitope에 대한 연구는 정확한 진단과 면역치료를 위한 기초자료로 활용될 것이다.

핵심되는 말 : 독일바퀴, 알레르겐, Bla g 2, IgE epitope

독일바퀴 주 알레르겐 Bla g 2의 peptide 단편에 대한 IgE 반응

<지도교수 용태순>

연세대학교 대학원 의과학과

이 해 석

I. 서론

바퀴는 3억 4천만년 전 (고생대 석탄기)부터 현재까지 환경에 적응하며 생존해 왔으며, 지금까지 약 3,500여 종이 알려져 있다. 대부분의 바퀴는 옥외서식성으로 낙엽 밑, 쓰레기나 돌 밑, 나무 위, 죽은 나무 껍질 속, 동굴 등에서 생활하며, 1% 미만인 50여종 만이 거주성 바퀴로 인간생활과 관계를 갖고 있어 의용곤충으로 취급되고 있다.¹

바퀴는 분류학적으로 곤충강 (Insecta), 바퀴목 (Blattaria)에 속하며 옥외 및 주가생활하는 벌레이다.¹ 인간에게 문제가 되는 종은 크게 왕바퀴과 (Blattidae)와 바퀴과 (Blattellidae)로 나뉘며 대표적으로 왕바퀴과에는 이질바퀴 (*Periplaneta americana*), 떡바퀴 (*Periplaneta fuliginosa*), 집바퀴 (*Periplaneta japonica*)가 있으며, 바퀴과에는 독일바퀴 (*Blattella germanica*)가 있다 (Fig. 1). 우리나라에서는 독일바퀴 36.2% (63/174), 이질바퀴 33.3% (58/174), 떡바퀴 1.7% (3/174) 그리고 집바퀴 1.1% (2/174) 가 서울에 서식하고 있다.²

그 중에서 특히 이질바퀴와 독일바퀴가 문제시 되고 있다. 독일바퀴

는 몸길이 약 12 mm로 밝은 갈색을 띠고 있으며 번식력이 매우 강하고, 이질바퀴의 몸길이는 약 35~40 mm로 매우 큰 편이며 번식력은 독일바퀴보다는 못하다.³ 우리나라에서는 독일바퀴가 더 많이 분포한다. 바퀴의 먹이습성은 잡식성으로 음식물뿐만 아니라 사람과 동물의 배설물이나, 객담 등 병원체가 섞여 있는 물질도 즐겨 섭취하기 때문에 질병 매개능력을 가지는 것으로 알려져 있는데,⁴ 몇몇 기생충의 중간숙주로의 역할을 한다는 보고도 있으며 의학적으로 중요한 *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*과 같은 fungus를 운반하는 매개체로 보고되어 진 바 있다.⁵

바퀴는 우리나라를 비롯한 아시아 여러 나라와 미국과 유럽 여러 지역에서 천식과 같은 호흡기 질환의 유발과 매우 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다.⁶ 이러한 문제는 사회경제적인 요인과의 밀접한 관계가 있고, 특히 저소득층의 소아들에게 많은 문제를 일으킨다고 알려져 있으며,⁷ 최근에는 소아들에게 바퀴 항원이 천식을 유발하는 중요한 요인이라고 보고되고 있다.⁸ 특히 도시 거주자에게서는 바퀴항원에 대한 알레르기가 집먼지진드기에 대한 알레르기보다 천식발작을 일으켜 응급실을 방문하게 하는데 더 큰 역할을 한다는 보고도 있다.⁹ 또한 천식을 가지고 있는 바퀴알레르기 환자들은 바퀴알레르기를 가지고 있지 않은 천식환자들 보다 IgE 항체의 농도가 더 높게 나타났다.¹⁰ 국내에서도 알레르기성 천식 환자에서 피부 반응 검사 등을 통해 확인된 보고가 계속되고 있다.¹¹⁻¹³

바퀴 살충제가 많이 개발되어 바퀴를 효율적으로 퇴치하고 있기 때문에 바퀴의 구제는 간편해졌으나, 바퀴의 분비물과 잔유물은 집먼지속에 남아 알레르기 항원이 된다는 보고들에 비추어 볼 때 심화된 연구를 필요로 한다.¹⁰

바퀴는 알레르기 질환을 일으키는데 중요한 IgE와 결합하는 단백질을 생산하는데, 수 년 동안 독일바퀴로부터 여러 가지 많은 알레르겐

들이 밝혀졌다.¹⁴ 미국의 Berton과 Brown이 뉴욕의 알레르기 환자 755명을 대상으로 44%가 피부단자시험에 반응함을 보고함을 시작으로 많은 연구가 수행되어져 왔다.¹⁵ 바퀴 알레르겐은 바퀴의 타액, 분변, 분비물, 체표, 부스러기, 죽은 사체 등에 존재하는 것으로 알려져 있는데, 지금까지 독일바퀴로부터 보고된 알레르겐은 다음과 같다. Bla g 1은 100개의 아미노산이 반복하는 구조의 단백질로 바퀴알레르기 환자의 약 26%에서 양성반응을 나타낸다.¹⁶ Bla g 2는 바퀴알레르기 환자의 약 58%가 양성반응을 나타내며 36 kDa으로 inactive aspartic protease로 알려져있다.¹⁷ Bla g 4는 21 kDa이고 페로몬에 결합하는 단백질 (calycin)이라고 보고되었다.¹⁸ Bla g 5은 25 kDa이며 glutathione-S-transferase이다.¹⁹ Bla g 6은 분자량이 25 kDa인 troponin C이다.²⁰ Bla g 7은 분자량이 33 kDa인 tropomyosin이고 다른 종들과 교차항원성을 가지고 있다.²¹ 그 중에서 Bla g 2는 바퀴알레르겐 중 가장 중요한 알레르겐이다. 최근 연구에 따르면 118명의 바퀴알레르겐 환자들을 대상으로 바퀴알레르겐 5종류 (Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Per a 7)의 감작정도를 알아보는 실험에서 Bla g 2에 감작된 환자들이 가장 높게 나타났다 (54~71%).²² Bla g 2는 35.939 kDa의 glycoprotein으로서 아미노산 서열뿐만 아니라, 3차원 구조 또한 aspartic proteinase와 매우 높은 상동성이 있지만 효소활성은 없다.²³ 최근의 Bla g 2 단백질의 3차원 구조 연구에 의해 5개의 disulfide bridges와 Zn-binding site가 Bla g 2의 안정성에 기여한다는 보고도 있다.²⁴ 또한 Bla g 2는 바퀴의 식도나 내장과 같은 소화기관에서 매우 높은 농도로 존재하는데,²⁰ 독일바퀴 배설물에서는 바퀴 총체의 약 3배의 Bla g 2 양이 존재하는 것이 two-site ELISA에 의해 밝혀졌다.²⁵ 그렇지만 Bla g 2에 대한 생물학적 기능과 알레르기를 유발하는 원리는 아직 정확하게 규명되지 않았다.

현재까지 알레르기 질환의 치료는 약물치료를 주로 이용하고 있지

만, 면역체계를 개선하여 지속적인 치료효과를 기대할 수 있는 것은 면역치료 방법이 유일하다.²⁶ 정확한 진단과 치료를 위해서는 높은 질의 조항원이 요구된다. 하지만 조항원내에는 다른 알레르겐이 포함되어 있을 가능성이 매우 높고, 단백질분해효소 (proteolytic enzyme)가 존재할 수도 있다.²⁷ Proteolytic enzyme의 존재는 알레르겐의 안정성을 저해하거나 알레르기 반응에 영향을 줄 수 있는데, 많은 알레르겐 추출물들이 proteolytic enzyme을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.²⁸ 이러한 문제는 재조합 알레르겐을 이용하여 극복할 수 있다. 재조합 알레르겐의 이용으로 치료에 필요한 만큼 많은 양을 얻을 수 있고, 높은 순도의 알레르겐을 얻을 수 있어서 치료에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다.²⁹ 재조합 알레르겐을 이용하여 정확한 면역치료를 하기 위해서는 B cell epitope과 T cell epitope에 대한 연구가 선행되어야 한다. IgE epitope이 밝혀지면 epitope부위의 아미노산을 치환하여 IgE binding capacity가 낮은 알레르겐을 합성하여 면역치료에 이용할 수 있다.³⁰ Bla g 2가 바퀴알레르기를 유발하는데 매우 중요한 요소임에도 불구하고, Bla g 2에 대한 B cell epitope과 T cell epitope에 대한 연구는 아직 이루어 지지 않았다.

본 연구에서는 독일바퀴의 알레르겐으로 잘 알려진 Bla g 2를 클로닝하고, expression vector를 이용하여 과발현시킨 재조합단백질을 이용하여, Bla g 2의 IgE-binding epitope의 위치를 알아보고자 한다. Bla g 2의 IgE-binding epitope 연구는 정확한 진단과 치료에 있어서 도움을 줄 수 있는 기초자료를 제공할 수 있을 것이다.

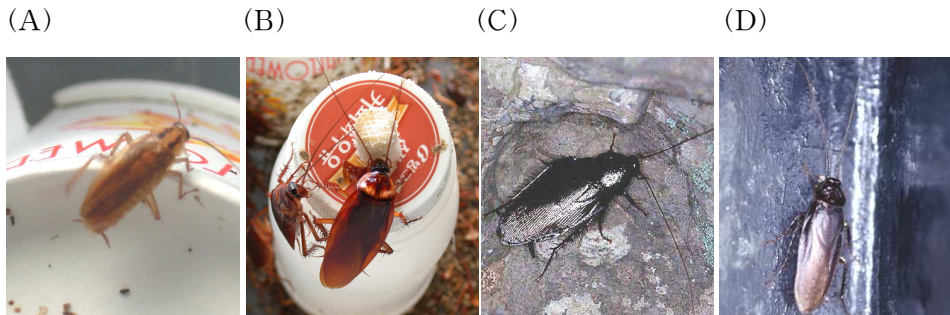


Figure. 1. Four species of domestic cockroaches found in Korea.
(A) German cockroach (*Blattella germanica*): 10–15 mm, (B)
American cockroach (*Periplaneta americana*): 35–40 mm, (C)
Dusky brown cockroach (*Periplaneta fuliginosa*): 30–35 mm, (D)
Japanese cockroach (*Periplaneta japonica*): 20–25 mm

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 환자 및 혈청

1998년부터 2005년 사이에 알레르기 증상 즉 천식, 두드러기, 비염, 아토피피부염으로 연세대학교 의과대학 세브란스병원 알레르기 클리닉을 찾은 환자들 중 *Blattella germanica* 의 IgE 항체를 보유한 환자로서 Uni-CAP system (Pharmacia, Uppsala, Sweden)³¹ 결과를 통해 0.7 kU 이상인 환자 38명을 선별하였다 (age ranging from 7 to 65 years, mean age 33 years). 음성대조군은 Uni-CAP test에서 모두 음성반응을 보인 20명의 환자혈청을 사용하였다.

나 독일바퀴 조항원 제조

독일바퀴 성충 30 g을 액체질소에서 막자사발을 사용하여 분쇄한 후 지질을 제거하기 위하여 ethyl ether와 ethyl acetate를 1:1로 혼합한 용액 200 mL을 넣고 4°C에서 교반기를 사용하여 24시간 반응시켰다. Phosphate buffered-saline (PBS), pH 7.4 에 6 mM 2-mercaptoethanol, 1/1000 volume의 protease inhibitor set III (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 1 mg/mL 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣고 다시 24시간 반응시킨 후 4°C 10,000 g에서 30분 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 0.22 μ m-pore-size filter (Milipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 여과시키고 -70°C에 보관하였다.

2. 방법

가. 바퀴로부터 total RNA를 분리

바퀴 성충을 액체질소에서 막자사발을 사용하여 분쇄한 후, Trizol reagent (GibcoBRL, Rockville, MD, USA)를 사용하여 용해시키고 chloroform 용액을 이용하여 단백질을 제거하였다. Isopropyl alcohol 을 첨가하고 75% 에탄올을 이용하여 wash 하여 이를 건조시키고 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 total RNA를 얻었다.

이렇게 얻어진 tRNA (total RNA)를 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

나. RT-PCR 및 pGEM T-Easy vector 클로닝

위에서 기술한 방법으로 얻어 보관한 독일바퀴의 tRNA 11 μ l로 oligo-dT (T₁₈) primer를 사용하여 Bla g 2의 first-strand cDNA를 얻었다. 독일바퀴 Bla g 2의 cDNA의 증폭을 위하여 이미 알려진 Bla g 2 서열 (EMBL Data Bank with accession number U28863)를 바탕으로 *Bam*H I과 *Xho* I서열을 포함하는 specific primer를 제작하여 (forward: GGATCCTATGATGATTGGCCTAAAGCT), (reverse: CTCGAGCTTAGACGCTTTCTACT) PCR을 수행하였다. Single-strand cDNA를 standard PCR mix와 섞고 Tag DNA polymerase로 다음과 같이 증폭하였다. 처음 주형의 변성을 위해 95°C에서 5분 반응 후, 각각 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분씩 35번 반복 수행하였다. 증폭되어진 Bla g 2의 DNA를 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝 한 후 *E. coli* (DH5a)에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli* 에서 plasmid를 Plasmid SV mini kit (GENE ALL, Seoul, KOREA)

을 사용하여 분리 한 후 제한효소 *Bam*H I과 *Xho* I 으로 37°C에서 1시간 절단하여 cDNA insert 크기를 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

다. DNA 염기서열 분석

클로닝 된 *Bla* g 2의 염기서열을 Thermo Sequense kit (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio, USA)과 Long readIR 4200 DNA sequencer (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA)를 사용하여 확인하였으며, insert에 대해 5'과 3'양쪽 모두 동시에 수행하였다. Sequencing primer로는 T7(5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3')와 SP6(3'-ATTTAGGTGACACTATAGA-5')을 사용하였다. 판독되어진 염기서열 정보는 CLUSTAL X programe을 사용하여 EMBL Data Bank에 있는 *Bla* g 2 염기서열 (U28863)과 비교하였다.

라. 재조합 *Bla* g 2 단편 생산

Epitope분석을 위하여 *Bla* g 2 전체서열을 5개의 아미노산이 중첩 되도록 5개의 단편으로 나누어 (Fig. 2), 단편 각각의 primer를 제작 하고(Table. 1) PCR을 통하여 증폭하였다. 증폭되어진 *Bla* g 2 DNA 단편들을 T4 DNA Ligase (New England BioLabs Inc.)를 사용하여 pGEM-T Easy vector 와 4°C에서 24시간 Ligation 시킨 후 *E. coli* (DH5a)에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli* 에서 plasmid를 plasmid SV mini kit을 사용하여 분리 한 후, 제한효소 *Bam*H I과 *Xho* I으로 절단하여 cDNA insert 크기를 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

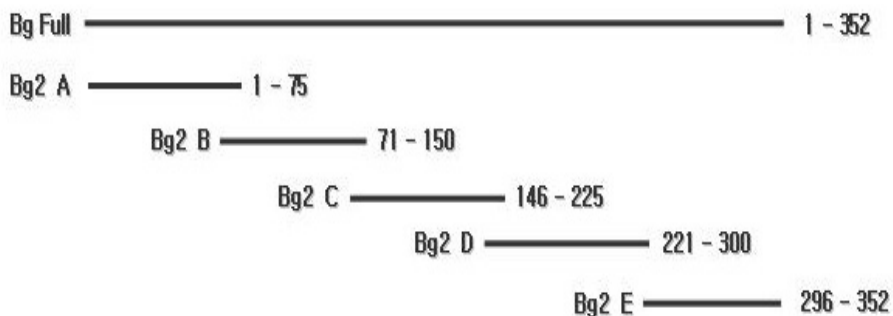


Fig. 2. Schematic representation of Bla g 2 fragments for the epitope analysis.

Table 1. Sequence of oligonucleotides used for production of Bla g 2 fragments

Oligonucleotides	Sequence
Bla g 2 AF	5'- <u>GGATCCAAT</u> GATTGGCCTAAAGCT-3'
Bla g 2 AR	5'- <u>CTCGAGT</u> TTTTTGTAGATTTGGACA-3'
Bla g 2 BF	5'- <u>GGATCCAGGAGCT</u> TGTGTATGTCCA-3'
Bla g 2 BR	5'- <u>CTCGAGCAGTGCATTAGGGCATCC</u> -3'
Bla g 2 CF	5'- <u>GGATCCAATAGCAGCCCCAGGATGC</u> -3'
Bla g 2 CR	5'- <u>CTCGAGAGCAACAGTTGTGTCACC</u> -3'
Bla g 2 DF	5'- <u>GGATCCAGGTGTGAAAATAGGTGAC</u> -3'
Bla g 2 DR	5'- <u>CTCGAGGTTCTGTTGGATGTAATA</u> -3'
Bla g 2 EF	5'- <u>GGATCCAATCAGCTCACAAATATTAC</u> -3'
Bla g 2 ER	5'- <u>CTCGAGGACGCTTCTACTGAACG</u> -3'

마. 재조합 Bla g 2 알레르겐의 발현 및 분리

pGEM-T Easy vector에 클로닝 된 Bla g 2 전체서열과 각각의 단편들을 *Bam*H I 과 *Xho* I 제한효소를 사용하여 vector로부터 분리하고 pET28b expression vector의 *Bam*H I과 *Xho* I부분에 T4 DNA Ligase (New England BioLabs Inc.)를 사용하여 클로닝하고, *E. coli* (BL21)에 형질전환시켰다. 형질전환 된 cell을 kanamycin (50 mg/mL)이 포함된 Luria Bertani broth 배지에 접종하고 Bla g 2 전체서열과 단편 B는 37°C, 단편 A와 C는 30°C, 단편 E는 35°C에서 각각 0.5 OD₆₀₀ 까지 키운 후, isopropyl-1-β-galactopyranoside (1 mM)을 넣어주고 단백질 발현을 유도하였다. 4시간 후 원심분리기를 사용하여 상층액을 제거하고 pellet은 수거하였다.

Pellet을 Lysis buffer (10 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0)로 resuspension하고, French presser를 사용하여 cell을 용해하였다. 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 6 M urea, pH 7.9 용액으로 solubilize 시키고 Ni-nitrilotriacetic (NTA) agarose resin (Quagen, Valencia, CA, USA)과 상온에서 1시간동안 binding 시켰다. Wash buffer (20 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.9)로 wash 한 후 Elution buffer (250 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.9)로 각각 5 mL 씩 elution 하였다.

바. SDS-PAGE

분리된 각각의 재조합 단백질들을 2-mercaptoethanol 이 포함되어 있는 buffer에 resuspension하고 sodium dodecyl sulfate가 포함된 15% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다 (Laemmli, 1970). 전기영동 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich Inc.

St. Louis, MO, USA)로 염색하였다.

사. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용한 PrBla g 2와 rBla g 2의 IgE 반응성 비교 및 재조합 알레르겐 단편에 대한 IgE 반응성 조사

Bla g 2의 IgE-epitope을 분석하기 위하여 38명의 환자들 중 ELISA를 통하여 *Pichia pastoris*에서 발현된 PrBla g 2 (INDOOR biotechnologies Inc, Manchester, U.K)과 비교하여 rBla g 2와 PrBla g 2에 강하게 반응하는 환자 10명을 선별하였다 (Fig. 7). Microtiter plate (COSTAR Inc., USA)의 well에 재조합단백질 (Bla g 2 full-length, Bla g 2 A~E)들을 2 μ g씩 coating buffer (0.1M sodium carbonate, pH 9.6)에 희석하여 4°C에서 24시간 반응하였다. PBST (PBS-0.05% Tween 20, 1% bovine serum albumin)로 wash후 skim milk (3% Skim milk in PBS)로 blocking하였다. 1:4로 희석한 환자혈청 각 well당 50 μ l씩 넣고 1시간 반응시켰다. Biotinylated goat anti-human IgE (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)를 PBST에 1:1000으로 희석시킨 것을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세척 후 Conjugated enzyme streptavidin-peroxidase (Sigma)를 PBST에 1:1000으로 희석시킨 것을 넣고 30분 동안 반응시켰다. 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, KPL, Gaithersburg, MD, USA) 용액을 사용하여 발색하고, automatic microplate reader (TECAN, Salzburg, Austria)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같이 2번 반복 실험하였으며 음성대조군 20개의 혈청으로 5 standard deviations (SD)을 통해 cut-off value를 정하였다.

III. 결과

1. 독일바퀴의 total RNA분리 및 RT-PCR

Trizol reagent를 사용하여 독일바퀴의 total RNA를 얻었다 (Fig. 3A). 이 total RNA를 주형으로 Single-strand cDNA를 합성한 후 Tag DNA polymerase로 증폭하여 1056bp의 Bla g 2 전체서열을 얻었다 (Fig. 3B).

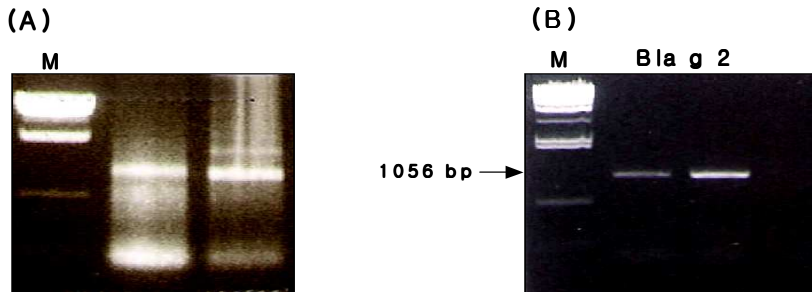


Fig. 3. Total RNA isolation and RT-PCR of Bla g 2. Panel A, isolated total RNA of Bla g 2; B, RT-PCR result of Bla g 2. HindIII marker (lane M).

2. 독일바퀴 알레르겐 (Bla g 2) 유전자 클로닝

클로닝한 Bla g 2 유전자의 분자량은 38.5 kD, pI값은 5.13으로 나타났다 (Fig. 4). 또한 기존의 Bla g 2 DNA서열 (EMBL Data Bank with accession number(s) U28863)와 비교한 결과 11개의 클론 중 10개의 클론이 다음과 같이 4개의 아미노산 서열이 치환되어 있었고 : amino acid position 87 (K → R), 116 (S → F), 142 (V → G), 322 (T → A), 1개의 클론은 다음과 같이 5개의 아미노산 서열이 치환되어 있었다 : amino acid position 87 (K → R), 116 (S → F), 142 (V → G), 199 (Y → C), 322 (T → A).

1	<u>ATGATTGGCC TAAAGCTAGT</u> GACAGTTCTC TTTGCGGTTG CTACCATAAC ACATGCAGCT	60
	M I G L K L V T V L F A V A T I T H A A	
61	GAGCTTCAAC GTGTTCCATT GTACAAATTG GTGCACGTTT TCATTAACAC TCAATAOGCT	120
	E L Q R V P L Y K L V H V F I N T Q Y A	
121	GGTATAACCA AGATTGGAAA CCAGAACTTC CTAACAGTAT TCGATAGCAC CTCATGCAAT	180
	G I T K I G N Q N F L T V F D S T S C N	
181	GTAGTCGTTG CCAGTCAAGA ATGCGTTGGT GGAGCTTGTG TATGTCEAAA TCTACAAAAA	240
	V V V A S Q E C V G G A C V C P N L Q K	
241	TATGAGAAAC TTA AACCGAG GTATATCTCT GATGGGAATG TACAGGTGAA ATTCTTOGAC	300
	Y E K L K P R Y I S D G N V Q V K F F D	
301	ACTGGTAGCG CAGTTGGTAG AGGCATTGAA GATTCCTTA CGATTTTTAA CCTCAGACA	360
	T G S A V G R G I E D S L T I F N L T T	
361	TCTCAACAAG ACATTGTCTT TGCCGATGAA CTCAGTCAAG AAGCTGCAT TCTATCTGCT	420
	S Q Q D I V L A D E L S Q E V C I L S A	
421	GACGGAGTTG TAGGAATAGC AGCCCCAGGA TGCCCTAATG CACTGAAAGG AAAAACTGTT	480
	D G V V G I A A P G C P N A L K G K T V	
481	CTCGAAAAC TTTGCGAAGA AAATCTTATT GCGCCTGTCT TTTCTATTCA TCATGCTAGA	540
	L E N F V E E N L I A P V F S I H H A R	
541	TTTCAAGATG GAGAACATTT DGGAGAAATT ATTTTCGGAG GTTCTGATG GAAATACGTT	600
	F Q D G E H F G E I I F G G S D W K Y V	
601	GATGGTGAAT TCACCTTATGT TCCACTTGTG GGTGATGATT CCTGGGAAGTT CAGGCTGGAT	660
	D G E F T Y V P L V G D D S W K F R L D	
661	GGTGTGAAGA TAGGTGACAC AACTGTTGCT CCAGCAGGTA CACAGGCCAT CATOGACACA	720
	G V K I G D T T V A P A G T Q A I I D T	
721	AGCAAAAGCTA TCATTGTCGG ACCTAAAGCC TATGTTAATC CAATCAACGA AGCTATTGGG	780
	S K A I I V G P K A Y V N P I N E A I G	
781	TGTGTAGTGG AAAAGACAAC AACCAAGAGA ATATGCAAGC TTGACTGCAG CAAGATACCA	840
	C V V E K T T T R R I C K L D C S K I P	
841	TCTCTCCCTG ATGTCACATT TGTGATCAAT GGCAGGAATT TCAACATCAG CTCACAATAT	900
	S L P D V T F V I N G R N F N I S S Q Y	
901	TACATECCAAC AGAACGGGAA CTTGTGCTAT TCEGGCTTCC AACCATGCGG TCACTCCGAT	960
	Y I Q Q N G N L C Y S G F Q P C G H S D	
961	CACTTTTTTA TTGGTGACTT CTTTGTGAT CATTATTATT CTGAATTCAA CTGGGAGAAC	1020
	H F F I G D F F V D H Y Y S E F N W E N	
1021	AAGGCCATGG GATTCGGCG <u>TTCAGTAGAA</u> <u>AGEGCTCAA</u>	1056
	K A M G F G R S V E S V *	

Fig. 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Bla g 2.

3. 독일바퀴 Bla g 2 유전자의 subcloning 및 재조합 단백질의 발현

Bla g 2 full-length 및 단편들을 BamH I 과 Xho I을 포함한 primer를 제작하고 PCR을 수행하여 PCR을 수행한 결과 단편 A~D는 225bp, 단편 E는 168bp의 PCR산물을 얻었다 (Fig. 5). 이를 pET28b expression vector에 클로닝 하여 *E. coli* (BL21)에 형질전환시키고 단백질을 분리하여 각각의 재조합 단백질을 분리하였다. Bla g 2 전체서열의 분자량은 36 kD, 단편A~D는 8 kD, 단편E는 6 kD이지만 Ni-affinity chromatography를 수행하기 위해, 전체서열은 6개의 histidine을 포함하는 34개의 아미노산 (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDP)이 N-terminus에 결합된 형태로 발현하였고, 나머지 Fragment A~E는 N-terminus와 C-terminus에 histidine을 포함하는 8개의 아미노산 (LEHHHHHH)이 결합되어 있는 형태로 발현되었다. 따라서 15% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였을 때 Bla g 2 전체서열은 42 kD, 단편A~D는 13 kD, 단편E는 11 kD으로 분자량이 증가되었다 (Fig. 6).

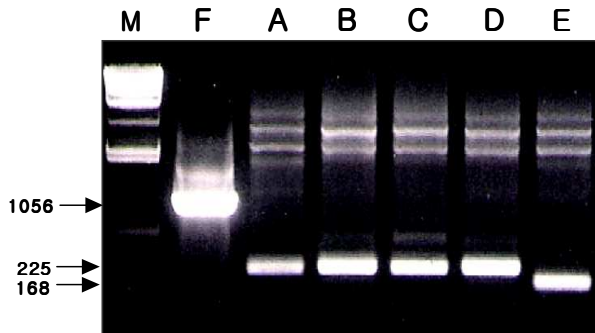


Fig. 5. PCR amplification of Bla g 2 full-length and fragments.
Lanes : M, HindIII marker; F, Bla g 2 full-length; A, Bla g 2 fragment A; B, Bla g 2 Fragment B; C, Fragment C; D, Fragment D; E, Fragment E. The numbers on the left are in bp.

Fig. 6. Purification of recombinant Bla g 2 full-length and fragments. Protein were separated on a 5~20% gradient SDS gel (Invitrogen) and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: M, molecular mass marker; F, Bla g 2 full-length; A, Bla g 2 fragment A; B, Bla g 2 fragment B; C, Bla g 2 fragment C; D, Bla g 2 fragment D; E, Bla g 2 fragment E. The numbers on the left are in kilodaltons.

4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용한 rBla g 2와 PrBla g 2의 IgE 반응성 비교

바퀴알레르기 환자 38명중 17명 (45%)이 rBla g 2와 PrBla g 2에 공통적으로 반응하였으며, 그 중 환자 2명 (5.2%)는 PrBla g 2에 강하게 반응하였다 (Fig. 7).

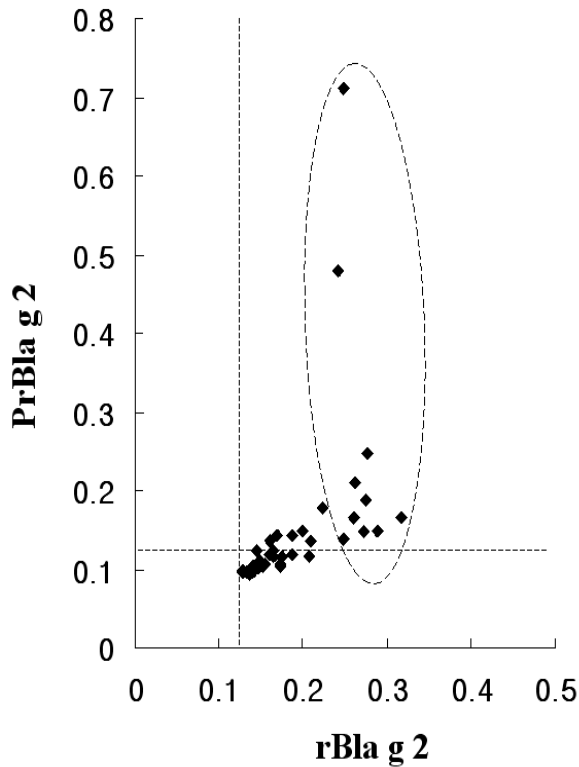


Fig. 7. Binding profiles of IgE antibodies to PrBla g 2 and rBla g 2. ◆, German cockroach sensitized sera; Dotted line, cut-off value (mean absorbance plus 2 standard deviations for sera from 15 healthy controls)

5. 재조합 Bla g 2 단백질 및 재조합 단편들의 IgE 결합능 조사

Bla g 2 전체서열을 5개의 아미노산이 중첩되도록 5개의 단편으로 다음과 같이 나누고 A (아미노산 1-75), B (아미노산 71-150), C (아미노산 146-225), D (아미노산 221-300), E (아미노산 296-352), 5개의 단편에 대한 재조합 단백질을 생산하여 rBla g 2와 PrBla g 2에 강하게 반응한 10명의 환자들을 대상으로 ELISA를 수행하였다.

바퀴알레르기환자 혈청 10명 모두가 Bla g 2 재조합 알레르겐에 반응을 보였으며, 단편A (amino acid 1~75)는 8명 (80%), 단편B (71~150)는 5명 (50%), 단편C (146~225)는 10명 (100%), 단편D (221~300)는 3명 (30%), 단편E (296~352)는 4명 (40%)이 반응하였다 (Fig. 8)(Table. 2).

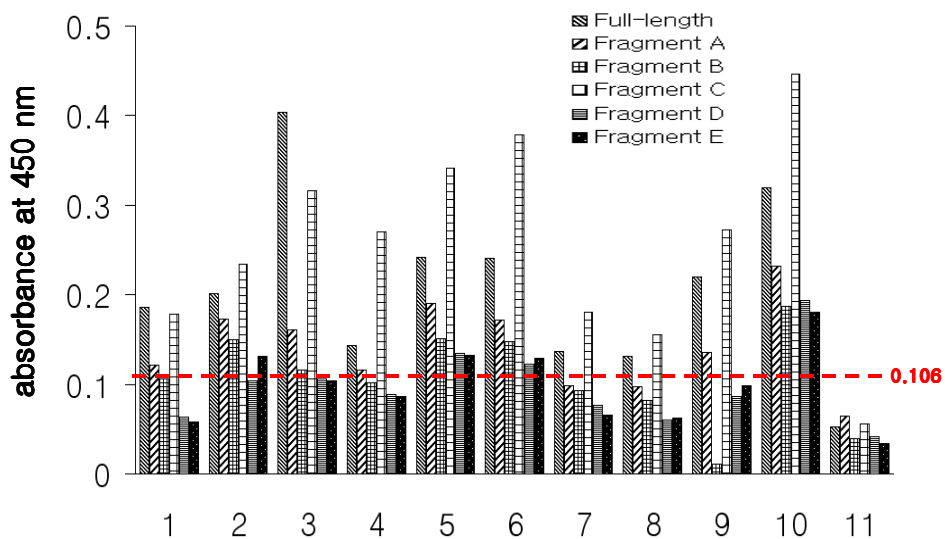


Fig. 8. Binding profiles of IgE antibodies to recombinant Bla g 2 and fragments. Dotted line, cut-off value (mean absorbance plus 5 standard deviations for sera from 15 healthy controls); 1 to 10, serum samples from 10 allergic patients, respectively; 11, healthy non-allergic subjects.

Table 2. IgE binding reactivities of peptide fragments of recombinant Bla g 2

Subjects rProtein	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(-)	Reactivity frequency
Bla g 2 F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		10/10
Fragment A	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■		8/10
Fragment B	□	■	■	□	■	■	■	■	■	■		5/10
Fragment C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		10/10
Fragment D	□	□	□	□	■	■	□	□	□	■		3/10
Fragment E	□	■	□	□	■	■	□	□	□	■		4/10

IV. 고찰

알레르기 반응은 알레르겐의 염기서열의 변화 (sequence variation)와 항원결정기 (IgE binding epitope)의 유형에 따라 다르게 나타날 수 있다. 아미노산의 변화는 환경과 지역적 특성에 따라 각기 다르게 나타날 수 있으며, 그에 따라 IgE binding epitope에도 영향을 주어 알레르기 반응성 뿐만 아니라 다른 알레르겐과의 교차반응성에도 영향을 줄 수 있다.³² 본 실험에서 클로닝한 Bla g 2 유전자를 기존의 Bla g 2 DNA 염기서열 (EMBL Data Bank with accession number(s) U28863)와 비교한 결과 총 11개의 클론 중 10개의 클론 중 4개의 아미노산이 K87R, S116F, V142G, T322A로 치환되었고, 1개는 K87R, S116F, V142G, Y199C, T322A로 치환되어 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 우리나라 독일바퀴 Bla g 2는 다형성 (polymorphism)이 존재함을 알 수 있었다.

집먼지진드기의 경우에도 cDNA를 클로닝 할 때 아미노산 서열의 변화에 따른 다형성들이 발견되어져 왔는데 이러한 isoallergen들마다 각기 다른 알레르기 반응성을 가진다는 보고가 있으며, 자작나무 꽃가루 알레르겐 (Bet v 1) 또한 IgE 반응성이 나타나지 않거나 매우 낮은 반응성을 나타낸 보고도 있다.³³⁻³⁴ 따라서 cDNA서열의 변화에 따른 Bla g 2 polymorphism들의 알레르기 반응의 다양성을 비교하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

최근에는 yeast, insect, mammalian cell 또는 plant와 같은 진핵생물의 발현기작을 이용하여 재조합 알레르겐을 생산하여 진단에 이용되고 있다. *Pichia pastoris* (yeast)등에서 생성된 재조합 단백질은 disulfide-bridge formation이나 glycosylation과 같은 *E. coli*와 같은 원핵생물에서 일어나지 않거나 일어나기 힘든 post-translational

modification이 일어날 수 있고, 발현량 또한 *E. coli*보다 높은 효율을 나타낸다.³⁵ 하지만 yeast에서 발현되어진 재조합 단백질은 진단에는 이용할 수 있으나, 치료에 이용할 수 없다. 치료에 사용하기 위해서는 IgE binding epitope을 밝히고, 밝혀진 epitope부위의 아미노산을 치환하여 IgE binding capacity가 낮은 알레르겐을 합성하여 면역치료에 이용할 수 있어야 한다.³⁰ 따라서 본 연구에서는 *Pichia pastoris* (yeast)에서 발현된 PrBla g 2 (INDOOR biotechnologies Inc, Manchester, U.K)와 *E. coli*에서 발현한 rBla g 2에 대한 IgE 반응성을 ELISA를 통해서 비교하고, Bla g 2의 linear한 IgE-binding epitope의 위치를 알아보기 위하여 각 단편들에 대한 IgE반응성을 조사하였다. 총 38명의 환자들 중 17명 (45%)이 rBla g 2와 PrBla g 2에 반응하였으며, 2명 (5.2%)이 PrBla g 2에 강하게 반응하는 것을 알 수 있었다. 대부분의 환자가 rBla g 2와 PrBla g 2에 매우 유사하게 반응하는 것을 알 수 있었고, 2명의 환자가 PrBla g 2에 강하게 반응하는 것으로 미루어 보아 linear epitope뿐만 아니라 conformational epitope이 모두 존재하는 것으로 사료된다 (Fig. 7). 알레르기 반응에 있어서 linear epitope과 conformational epitope이 모두 중요하다는 것은 여러 연구 결과를 통하여 알 수 있다. 지금까지 많은 알레르겐들의 IgE epitope에 대한 연구가 수행되어져 왔는데, Group V timothy grass pollen 알레르겐 (Phl p va)³⁶, 자작나무 꽃가루 알레르겐 (Bet v 1)³⁷, *Chironomus thummi* allergen (Chi t I)³⁸, 새우 알레르겐 (*Penaeus aztecus*, Pen a 1)³⁹, latex 알레르겐 (Hev b 5)⁴⁰ 등은 linear epitope을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, Group I velvet grass pollen 알레르겐 (Hol i 1)⁴¹ 과 house dust mite 알레르겐 (Der p 2, Der f 2)⁴²⁻⁴³ 는 conformational epitope과 linear epitope을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

면역치료를 위해서는 conformational epitope과 linear epitope을 모

두 규명하여 low-IgE binding allergen (hypoallergens)을 생산하는 것이 바람직하다. 따라서 본 실험에서는 Bla g 2의 IgE-binding epitope의 위치를 알아보기 위하여 rBla g 2와 PrBla g 2에 모두 반응한 환자 10명을 대상으로 각 단편들에 대한 IgE반응성을 ELISA를 통해 조사한 결과, 모든 환자가 rBla g 2 전체서열을 포함한 제조합 단백질에 반응하였으며, 단편A는 8명 (80%), 단편B는 5명 (50%), 단편C는 10명 (100%), 단편D는 3명 (30%), 단편E는 4명 (40%)로, 나타났다. 이번 실험을 통하여 Bla g 2 알레르겐의 정확한 IgE 항원결정기의 위치를 알 수 없었지만 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 모든 단편에 IgE binding 서열이 존재하나 특히 단편A (아미노산 1~75)와 단편B (아미노산 146~225) 서열이 IgE-binding에 중요한 서열을 포함하고 있는 것으로 사료된다 (Fig. 8). 비록 이와 같은 결과는 linear epitope에 국한되어지지만, 앞으로 conformational epitope에 대한 연구도 필요할 것으로 생각되며, B cell뿐만 아니라 T-cell epitope에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다. IgE epitope이 밝혀지면 epitope부위의 아미노산을 치환하여 IgE binding capacity가 낮은 알레르겐을 합성 하여 면역치료에 이용할 수 있을 것이다.

Bla g 2 는 바퀴알레르겐 중 가장 중요한 알레르겐이다. 그렇지만 Bla g 2의 B cell epitope과 T cell epitope에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 Bla g 2의 전체서열을 5개의 단편으로 나누고 각각의 단편의 알레르기 반응성을 통하여 IgE binding epitope의 위치를 알아보려고 하였다. 따라서 이와 같은 Bla g 2의 IgE binding epitope 연구는 정확한 진단과 치료를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

V. 결론

독일바퀴의 주 알레르겐 Bla g 2를 클로닝하고, 과발현시킨 재조합 단백질을 이용하여, Bla g 2의 IgE-binding epitope의 위치에 대해 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 독일바퀴의 성충에서 Bla g 2 유전자를 얻은 후 기존의 Bla g 2 DNA sequence (EMBL Data Bank with accession number U28863)와 비교한 결과 총 11개의 클론 중 10개의 클론이 4개의 아미노산이 K87R, S116F, V142G, T322A로 치환되었고, 1개는 K87R, S116F, V142G, Y199C, T322A로 치환되어 있었다.

2. Bla g 2 유전자를 이용하여 Bla g 2 전체와 단편들을 *E. coli*에서 재조합 단백질로 발현하였다. *E. coli*에서 발현한 rBla g 2와 *Pichia pastoris*에서 발현한 PrBla g 2 (INDOOR biotechnologies Inc, Manchester, U.K)에 대한 IgE 반응성을 비교한 결과 38명중 45% (17명)가 rBla g 2와 PrBla g 2에 모두 반응하였으나 그 중 5.2% (2명)은 PrBla g 2에 강하게 반응하였다.

3. rBla g 2와 PrBla g 2에 높이 반응한 환자 10명의 혈청을 사용한 결과, 단편A에 8명 (80%), 단편B에 5명 (50%), 단편C에 10명 (100%), 단편D에 3명 (30%), 단편E에 4명 (40%)이 반응하였다.

따라서 Bla g 2의 모든 재조합단백질 단편에 IgE binding 서열이 존재하나 특히 아미노산 1~75와 146~225 서열이 IgE-binding에 중요한 서열을 포함하고 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 이한일. 위생곤충학. 4판: 고문사; 2005.
2. Jeong KY, Lee IY, Lee J, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Effectiveness of health education for the control of dust mites and cockroaches in Seoul, Korea. Korean J Parasitol 2006; 44: 73-79.
3. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VP, Santos AB, Pomes A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 419-428.
4. Kim KT, Jeon JH, Lee DK. Various pathogenic bacteria on German cockroaches (*Blattellidae*, *Blattaria*). Korean J Entomol 1995; 25: 85-88.
5. Lemos AA, Lemos JA, Prado MA, Pimenta FC, Gir E, Silva HM, Silva MR. Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. Mycoses 2006; 49: 23-25.
6. Aruuda LK. Cockroach allergens. Curr Allergy Asthma Rep 2005; 5: 411-416.
7. De Blay F, Sanchez J, Hedlin G, et al. Dust and airborne exposure to allergens derived from cockroach (*Blattella*

- germanica*) in low-cost public housing in Strasbourg (France).
J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 107-112.
8. Huss K, Adkinson NF, Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 48-64.
 9. Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cockroach allergen in the home is associated with incident doctor-diagnosed asthma and recurrent wheezing. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 41-47.
 10. Arruda LK, Chapman MD. The role of cockroach allergens in asthma. Curr Opin Pul Med 2001; 7: 14-19.
 11. 이기영, 김규언, 정병주, 이수영, 김동수. 한국에 서식하고 있는 바퀴벌레 *Blattella germanica*의 알레르기 항원성에 관한 면역학적 연구. 알레르기 1991; 11: 30-38.
 12. 이수영, 정병주, 김동수, 김규언, 이기영. 아토피성 소아천식에서 독일바퀴 항원을 이용한 기관지 유발시험에 관한 연구. 소아알레르기 및 호흡기 1993; 3: 73-83.
 13. 정병주, 류정우, 엄혜영, 박중원, 홍천수, 이한일, 용태순, 김규언, 이기영. 독일 바퀴알레르겐의 특성규명에 관한 연구. 소아알레르기 및 호흡기 1998; 8: 221-228.

14. Jeong KY, Hong CS, Yong TS. Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy of allergic disorders, with emphasis on cockroach allergy. *Curr Protein Pept Sci* 2006; 7: 57-71.
15. Berton H, Brown H. Insect allergy—preliminary studies of the cockroach. *J Allergy* 1964; 35: 506-513.
16. Helm R, Cockrell G, Stanley JS, et al. Isolation and characterization of a clone encoding a major allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE-mediated cockroach hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 172-180.
17. Pomés A, Chapman MD, Vailes LD, Blundell TL, Dhanaraj V. Cockroach allergen Bla g 2: Structure, function, and implications for allergic sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 391-397.
18. Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 1995; 270: 31196-31201.
19. Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD. Induction of IgE antibody responses by glutathione-S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*). *J Biol Chem* 1997; 270: 20907-20912.

20. Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 295-297.
21. Jeong KY, Lee J, Lee IY, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy* 2003; 58: 1059-1063.
22. Satinover SM, Reefer AJ, Pomes A, Chapman MD, Platts-Mills TA, Woodfolk JA. Specific IgE and IgG antibody-binding patterns to recombinant cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 803-809.
23. Wunschmann S, Gustchina A, Chapman MD, Pomes A. Cockroach allergen Bla g 2: unusual aspartic proteinase. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 140-145.
24. Gustchina A, Wunschmann S, Chapman MD, Pomes A, Wlodawer A. Crystal structure of cockroach allergen Bla g 2, an unusual zinc binding aspartic protease with a novel mode of self-inhibition. *J Mol Biol* 2005; 348: 433-444.
25. Yun YY, Ko SH, Park JW, Lee IY, Ree HI, Hong CS. Comparison of allergenic components between German cockroach whole body and fecal extract. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 551-556.
26. Creticos PS. Managing asthma in adults. *Am J Manag Care*

2000; 6: 940-963.

27. Van der Veen MJ, Mulder M, Witteman AM, van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM, et al. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 1028-1034.
28. Robinson C, Kalsheker NA, Srinivasan N, King CM, Garrod DR, Thompson PJ, et al. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 10-21.
29. Mothes N, Valenta R, Spitzauer S. Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 125-132.
30. Larche M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune disease. *Nat Med* 2005; 11: 69-76.
31. Bousquet J, Chanez P, Chanal I, Michel FB. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 1039-1043.
32. Lagares A, Puerta L, Caraballo L. Polymorphism in allergens. *Biomedica* 2002; 22: 51-62.
33. Park JW, Kim KS, Jin HS, Kim CW, Kang DB, Choi SY, et al.

Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1042-1047.

34. Thomas WR, Smith W, Hales BJ, Carter MD. Functional effects of polymorphisms of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 96-98.
35. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 189-197.
36. Bufe A, Becker WM, Schramm G, Petersen A, Mamat U, Schlaak M. Major allergen Phl p Va (timothy grass) bears at least two different IgE-reactivity epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 173-181.
37. Vik H, Steinvag SK, Elsayed S. Studies on the allergenicity of the amino-terminal epitope (Bet v I 23-38) from birch pollen allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101: 89-94.
38. Liebers V, Raulf M, Mazur G, Modrow S, Baur X. Epitope mapping with peptides of Chi t I component III and immunomodulation of the Chi t immune response. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 334-339.

39. Reese G, Daul CB, Leher SB. Antigenic analysis (IgE and monoclonal antibodies) of the major shrimp allergen Pen a 1 (Tropomyosin) from *Penaeus aztecus*. Int Arch Allergy. Immunol 1995; 107: 245-247.
40. Beezhold DH, Hickey VL, Slater JE, Sussman GL. Human IgE-binding epitopes of the latex allergen Hev b 5. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 1116-1172.
41. Schramm G, Bufe A, Petersen A, Haas H, Schlaak M, Becker WM. Mapping of IgE-binding epitopes on the recombinant major group I allergen of velvet grass pollen, rHol I 1. J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 781-787.
42. Smith AM, Chapman MD. Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. Mol Immunol 1996; 33: 339-405.
43. Takai T, Yuuki T, Okumura Y, Mori A, Okudaira H. Determination of the N- and C-terminal sequences required to bind human IgE of the major house dust mite allergen Der f 2 and epitope mapping for monoclonal antibodies. Mol Immunol 1997; 34: 225-261.

Abstract

IgE reactivity to peptide fragments of German cockroach allergen Bla g 2

Hae Seok Lee

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Tai-Soon Yong)

Cockroach allergy has been recognized as an important cause of asthma. Bla g 2 is one of the most important cockroach allergens.

The aim of this study was to identify linear IgE-binding epitopes of Bla g 2. The cDNA encoding Bla g 2 was cloned by RT-PCR and its recombinant protein was expressed. Eleven Bla g 2 cDNA clones were sequenced and analysed, and amino acid sequences were compared with a previously reported Bla g 2 sequence (U28863). Ten clones were substituted at 4 amino acid positions : position 87 (K to R), 116 (S to F), 142 (V to G), 322 (T to A). Only one clone was substituted at 5 amino acid positions : position 87 (K to R), 116 (S to F), 142 (V to G), 199 (Y to C), 322 (T to A). The reactivities of commercial *Pichia* expressed recombinant protein (PrBla g 2) and *E. coli* expressed recombinant protein (rBla g 2) were evaluated in an ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay) using sera from 38 cockroach allergic patients. The sera of 17 patients reacted with rBla g 2 and PrBla g 2, and two patients showed high IgE reactivity to PrBla g 2. Five cDNA fragments were generated by PCR and their recombinant proteins were expressed and purified. IgE-binding reactivity of recombinant fragments were determined by ELISA with sera from 10 patients who showed high IgE reactivity both to the rBla g 2 and PrBla g 2. All 10 patients (100%) showed IgE reactivity to the Bla g 2 full-length and fragment C (amino acid sequence 146~225), 8 patients (80%) reacted with fragment A (amino acid sequence 1~75). These result indicated that the major linear IgE-binding epitopes may be located within the amino acid sequence 1~75 and 146~225 of Bla g 2. Analysis of IgE epitopes provide the basis for the development of safe forms of specific immunotherapy with reduced allergenic molecules.

Key Words : allergen, Bla g 2, German cockroach, IgE epitope