

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1320/95

(51) Int.Cl.⁶ : **C12N 15/29**
C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 2. 8.1995

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1996

(45) Ausgabetag: 25. 6.1997

(73) Patentinhaber:

BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT
M.B.H.
A-4020 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(72) Erfinder:

FERREIRA FATIMA DR.
ANTHERING, SALZBURG (AT).
JILEK ALEXANDER MAG.
LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).
EBNER CHRISTOF DR.
WIEN (AT).
KRAFT DIETRICH DR.
WIEN (AT).
RICHTER KLAUS DR.
OBERTRUM, SALZBURG (AT).
BREITENBACH MICHAEL DR.
SALZBURG, SALZBURG (AT).

(54) **REKOMBINANTES 60 KDA PFLANZLICHES PANALLERGEN (KOFAKTOR-UNABHÄNGIGE PHOSPHOGLYCERATMUTASE; E.C. 5.4.2.1.)**

(57) Es wird ein rekombinantes DNA Molekül gezeigt, daß für ein Polypeptid mit der Antigenität der Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) des Birkenpollens kodiert. Dieses Allergen des Birkenpollens ist in Sequenz und Antigenität in allen Pflanzen (aber nicht in tierischen Organismen) hoch konserviert. Die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell- und T-Zell-Epitope des Moleküls werden abgeleitet und gezeigt. Das rekombinante Allergen wurde in *Escherichia coli* exprimiert und bindet Serum IgE von Patienten, die gegen Pollen von Bäumen, Gräsern und Unkräutern sowie gegen verschiedene Nahrungsmittel allergisch sind. Ein monoklonaler Antikörper (BIP 3) bindet spezifisch an dieses hochkonservierte Protein aus allen untersuchten Pflanzen. Die Bedeutung der Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) liegt darin, daß sie zur Kreuzsensibilisierung von Patienten führt. Das rekombinante Molekül und seine Teilpeptide können zu diagnostischen und therapeutischen Verfahren herangezogen werden, die z.B. auf Antigen-Antikörper Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung oder T-Zell-Reaktivität beruhen.

BIP3 ist ein gegen ein Birkenpollenprotein gerichteter monoklonaler Antikörper, der, wie bereits früher gezeigt (1), ein Nebenallergen mit einem Molekulargewicht von 60 kDa erkennt. Eine Birkenpollen-cDNA-Expressionsbank wurde mit BIP3 als Probe gescreent und dabei eine cDNA kodierend für ein Pollenallergen mit dem Molekulargewicht 60 kDa isoliert. Dieses Allergen zeigt hohe Sequenzhomologie mit pflanzlichen Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyceratmutasen.

Phosphoglyceratmutasen (PGM) katalysieren in der Glykolyse und Glukoneogenese die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat. Diese Reaktion findet ubiquitär in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen statt (2). Es gibt zwei Arten von PGM: Kofaktor-abhängige PGM (PGM-d), die 2,3-Bisphosphoglycerat als Kofaktor brauchen, und Kofaktor-unabhängige PGM (PGM-i), die 2,3-Bisphosphoglycerat nicht benötigen. PGM-d wurden in allen Vertebraten nachgewiesen, während Pflanzen PGM-i verwenden. In Prokaryoten und niederen Eukaryoten ist die Situation wesentlich komplizierter. PGM aus Hefe wurde als PGM-d charakterisiert, während PGM aus *Neurospora crassa*, die ebenso wie Hefe zu den Pilzen, und damit zu den niederen Eukaryoten zählt, zu der PGM-i Gruppe gehört. PGM von gram-positiven Bakterien (z.B. *Bacillus*) ist Kofaktor-unabhängig, gram-negative Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) haben Kofaktor-abhängige PGM. PGM von Säugern ist ein Dimer, wobei die Untereinheiten ein Molekulargewicht von 30 kDa haben (2). Das Pflanzenenzym PGM-i ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa (3). Bis jetzt wurden nur PGM-i Sequenzen von Mais (3), Rhizinus und Tabak (4) veröffentlicht. Es wurden keinerlei Sequenzhomologien zwischen PGM-i und PGM-d festgestellt, was den Schluß zuläßt, daß beide Enzyme - obwohl sie die gleiche Reaktion katalysieren - evolutionär unabhängig entstanden sind.

Häufig sind atopische Patienten empfindlich gegen verschiedene Allergene unterschiedlicher Herkunft. In früheren klinischen Studien wurde Allergiesyndrome beschrieben, bei denen die Kreuzreaktivität der Patienten gegen Allergene verschiedener Herkunft (Pollenallergene von Bäumen, Gräsern und Unkräutern, sowie Nahrungsmittelallergene) eine charakteristische Rolle spielt (5,6,7).

Einige bestimmte Kombinationen der Allergenkreuzreaktivität scheinen häufiger aufzutreten. Zum Beispiel haben Patienten mit Birkenpollenallergie oft auch eine Intoleranz gegen eine Vielzahl von Früchten und Gemüse, wie Apfel, Birne, Nüsse, Karotten, Kartoffel, Sellerie und viele andere pflanzliche Nahrungsmittel. Typische Symptome sind lokale Reaktionen der Schleimhäute des oberen respiratorischen bzw. Verdauungstrakts (Jucken, Entzündung, Angioödem), bei vielen Patienten treten aber auch systemische Symptome auf (Urticaria, Asthma, anaphylaktischer Schock).

In den letzten Jahren konnten durch cDNA Klonieren die abgeleiteten Aminosäuresequenzen vieler atopischer Allergene bestimmt werden. Mit Hilfe rekombinanter Allergene konnte in einigen Fällen gezeigt werden, welche allergenen Verbindungen für die Kreuzsensibilisierung verantwortlich sind. In einigen Fällen wurde die Kreuzsensibilisierung durch IgE Antikörper, die homologe Proteine in unterschiedlichen Allergenquellen erkennen, verursacht. Zum Beispiel scheint Bet v 2, das zu der Profilinfamilie gehört und ein Nebenallergen aus Birkenpollen ist (8), in pollenallergischen Patienten eine solche kreuzreaktive Verbindung zu sein. Profiline sind ubiquitäre, aktinbindende Proteine, die in allen eukaryotischen Zellen gefunden werden. Pflanzliche Profiline haben eine hohe Sequenzhomologie, wodurch die hochgradige Kreuzreaktivität mit Patienten-IgE verursacht wird. Als Folge sind Patienten, die gegen Profilin allergisch sind, empfindlich gegen viele pflanzliche Stoffe, wie z.B. Pollen, Früchte, Nüsse, Gemüse etc. Aus diesem Grund wird Profilin als Pflanzen-Panallergen bezeichnet (9). Bet v 1, ein Hauptallergen aus Birkenpollen, ist ein anderes für Kreuzreaktionen verantwortliches Pollenallergen. Bet v 1 gehört zu der Familie der Pflanzen PR (pathogenesis related) Proteine (10), die in vielen Pflanzen vorkommen. Mit Bet v 1 homologe Proteine kommen in Pollen von verwandten Bäumen vor (Erle, Hasel, Hainbuche) (11,12,13), was die Kreuzsensibilität von Baumpollen-allergischen Patienten erklärt. Mit Bet v 1 verwandte Proteine wurden auch in Früchten, Gemüse und Nüssen nachgewiesen (14). Das erklärt die klinische Beobachtung, warum pollenallergische Patienten häufig Symptome nach Einnahme bestimmter Früchte und Gemüse zeigen (7). Die Hauptallergene von Graspollen sind in vielen Grasfamilien konserviert (15), aber bis jetzt wurden nur Profiline als kreuzreaktive Moleküle in Graspollen und pflanzlichen Nahrungsmitteln beschrieben (16). Kreuzreaktivitäten zwischen Katze, Hund und anderen tierischen Allergenquellen werden hauptsächlich dem Albumin zugeschrieben (17). Aus diesen Beobachtungen kann allgemein geschlossen werden, daß kreuzreagierende Allergene hochkonservierte Proteine sind. Diese Beobachtungen führen dazu, daß das Konzept der Allergie gegen eine bestimmte Pflanzenspecies erweitert werden muß durch das Konzept der Allergie gegen ein bestimmtes hochkonserviertes Protein, das in vielen Pflanzenspecies vorkommt. Die genaue Identifizierung und Charakterisierung von kreuzreagierenden Allergenen ist von größter Wichtigkeit für die Diagnose und mögliche Therapie von Typ I-Allergien.

Im folgenden wird gezeigt, daß die pflanzlichen Phosphoglyceratmutasen (E.C.5.4.2.1.) hochkonservierte Pflanzenallergene (d.h. ein Panallergen) sind, die zu einer hochgradigen Kreuzreaktivität von Patienten führen, die gegen Baum-, Gras- und Unkrautpollen bzw. pflanzliche Nahrungsmittel, wie Sellerie und Apfel

allergisch sind.

Beispiele:

5 1. Herstellung der cDNA Bank:

Gesamt RNA wurde aus Birkenpollen (Allergon AB, Engelholm) mit der Guanidinium-Phenol-Extraktionsmethode isoliert. Poly(A)⁺ mRNA wurde mit oligo-dT₃₀ magnetisierbaren Cellulosepartikeln (Sero-tec) nach Angaben des Herstellers isoliert. cDNA Synthese wurde mit dem Lambda-ZAP cDNA Synthese Kit von Stratagene durchgeführt. Die Synthese des ersten Stranges wurde mit einem oligo(dT) Linker-
10 primer, der eine XhoI Schnittstelle enthielt, geprimt. Nach der Synthese des zweiten Stranges wurden EcoRI Adaptoren an die cDNA ligiert. Die mit XhoI verdaute cDNA wurde dann an die vorverdauten Uni-ZAP XR Vektorarme ligiert und *in vitro* verpackt. Der Titer der Primärbank war etwa $1,2 \times 10^6$ rekombinante Plaques. Der Titer der amplifizierten Bank wurde als 10^{10} pfu bestimmt.

15 2. Screening der cDNA Bank mit dem monoklonalen Antikörper BIP 3, *in vitro* Excision und DNA Sequenzanalyse.

Die cDNA Bank wurde mit dem monoklonalen Antikörper BIP 3 gescreent (1). Positive Plaques wurden auf nachfolgende Art sichtbar gemacht: Inkubation mit Kaninchen Antimäus IgG, dann mit ¹²⁵J-Esel Antikaninchen IgG. Abschließend wurde Autoradiographie durchgeführt. Positive Plaques wurden isoliert und durch neuerliches Screening isoliert. Nachfolgend wurden mit den gereinigten Phagen die *in vitro* Excision wie im Stratagene Handbuch beschrieben durchgeführt, um sie in den pBluescript SK + Vektor (Stratagene) subklonieren zu können. Plasmide mit rekombinanten cDNA Inserts wurden isoliert, und die Inserts wurden nach der Sanger Methode (18) unter Verwendung des T7 Sequenzierkits (Pharmacia) sequenziert. Es wurden beide Stränge sequenziert.

25 3. Herstellung der Nitrocellulosefilter mit rekombinanten Birkenpollen PGM-i Allergen und IgE Detektion

Rekombinante Lambda ZAP Phagen, die PGM-i Allergen cDNA exprimieren, wurden verwendet, um *E. coli*, Stamm XL-1 Blue, zu infizieren. Inkubation von *E. coli* erfolgte in LB Medium mit 10 mM MgSO₄. Zur Expression des rekombinanten PGM-i Allergens wurden die Phagen induziert, indem auf die Platten in 10 mM Isopropyl-β-thiogalaktosid (IPTG) getränkte Nitrozellulosefilter gelegt wurden. Die Nitrozellulosefilter wurden dann in Sektoren geschnitten und mit Sera von Patienten mit allergischen Symptomen
30 gegen Pollen von Birke, Gras, Unkraut oder gegen pflanzliche Nahrung inkubiert. Gebundenes IgE wurde mit ¹²⁵J-Kaninchen Antihuman IgE (Pharmacia) detektiert.

Ergebnisse

35 In diesem Teil wird gezeigt, daß es sich bei dem neu klonierten Allergen tatsächlich um ein hochkonserviertes Panallergen handelt und daß es für eine verbesserte Diagnose und Therapie von Patienten mit einer Allergie gegen dieses Protein aus Pollen und pflanzlichen Nahrungsmitteln verwendet werden kann.

Fig. 1 zeigt die cDNA Sequenz und die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von Birkenpollen PGM-i. Wie
40 weiter unten gezeigt, bindet dieses Molekül den monoklonalen Antikörper BIP 3 (Ref.1, Fig. 5A) und IgE von Patienten, die gegen Pollen und pflanzliche Nahrungsmittel empfindlich sind (Fig. 5B, Fig.6).

Fig. 2 zeigt die hohe Sequenzhomologie aller bekannten pflanzlichen PGM-i (81% bis 87% Identität in allen paarweisen Kombinationen). Die drei bis jetzt bekannten pflanzlichen PGM-i wurden von den Autoren nicht als Allergene erkannt (3,4). Da die Sequenzhomologien so hoch sind, konnte aus dem Sequenzvergleich (Fig.2) geschlossen werden, daß in vorliegender Sequenz 29 Aminosäuren (inklusive dem Start-Methionin) fehlen. Allerdings beeinflusst diese kurze N-terminale Deletion nicht die Antikörperbindung (Fig.6).

Die B-Zell Epitope (Fig.3) von Birkenpollen PGM-i wurden mit "PepStructure", einem Teil des GCG Programmpakets berechnet. T-Zell Epitope (Fig.4) von Birkenpollen PGM-i wurden mit einem Programm
50 von Margalit et al. (19) berechnet.

Fig.5A zeigt einen Immunblot mit Pollenextrakten von Birke, Beifuß und Liesehgras sowie Extrakten von Sellerie (Knollen- und Stangensellerie) und Apfel. Gezeigt ist das Autoradiogramm des mit BIP3 inkubierten Blots. Es ist bemerkenswert, daß der monoklonale Antikörper BIP 3 in allen diesen Materialien ein 60 kDa Protein erkennt, was auf eine hohe Konservierung der antigenen Epitope hinweist. Weiters werden (Fig.5B) Immunblots von BIP 3 -immunaffinitätsgereinigtem PGM-i aus Birkenpollen mit Birkenpollenextrakt als
55 Kontrolle gezeigt, geprobt mit zwei Patientensera (HP, HL) und nichtallergischem Normalhumanserum (NHS). Die beiden Patienten sind typische Graspollenallergiker, die das gereinigte Panallergen jedoch im Birkenpollenextrakt ausschließlich PGM-i erkennen. Auch dieses Experiment zeigt die hohe Konservierung

von pflanzlichem PGM-i Allergen und seine Bedeutung für die Kreuzreaktivität der Patientenserum.

Fig.6 zeigt, daß Plaques, die das rekombinante Fusionsprotein bestehend aus der PGM-i Sequenz (Fig.1) und 36 Aminosäuren der β -Galaktosidase enthalten, tatsächlich BIP 3 binden. Die gleichen Plaque-

lifts wurden mit den Seren von 11 ausgewählten Patienten, die allergisch sind gegen Pollen von Bäumen

(SS), Gräsern (CM, HL, HP, SE, MR, CF, BG, GP) oder Unkraut (KG,CW) bzw. Apfel (KG,CW) oder Sellerie

(KG,CW) sind, inkubiert. Als Kontrolle wurde Serum eines gesunden, nicht allergischen Patienten verwendet

(NHS). Fig.5 und Fig.6 zusammen zeigen, daß tatsächlich ein hochkonserviertes Pflanzen Panallergen

Kloniert wurde. Es wird angenommen, daß eine solch hohe Konservierung einer allergenen Sequenz bzw.

Struktur große Bedeutung für die Diagnose und Therapie hat. Patienten, die dieses Molekül erkennen, sind

wahrscheinlich kreuzreaktiv mit vielen Pollen und pflanzlichen Nahrungsmitteln. Sie können aber anderer-

seits durch konventionelle Immuntherapie gut behandelt werden, weil PGM-i aus Pflanzen hochkonserviert

sind, jedoch mit humanem oder tierischem PGM nicht verwandt sind.

Literaturzitate:

1. Jarolim, E., Tejkl, M., Rohac, M., Schlerka, G., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rumpold, H. (1989) Monoclonal antibodies against birch pollen allergens: Characterization by immunoblotting and use for single-step affinity purification of the major allergen Bet v 1. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90: 54-60.
2. Fothergill-Gilmore, L., Watson, H. (1989) *Adv. Enzymol.* 62: 227-313.
3. Graña, X., de Lecea, L., El-Maghrabi, M.R., Ureña, J.M., Caellas, C., Carreras, J., Puigdomenech, P., Pilakis, S.J., Climent, F. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from maize. Possible relationship to the alkaline phosphatase family. *J. Biol. Chem.* 267: 12797-12803.
4. Huang, Y., Blakeley, S.D., McAleese, S.M., Fothergill-Gilmore, L.A., Dennis, D.T. (1993) Higher-plant cofactor-independent phosphoglyceromutase: purification, molecular characterization and expression. *Plant Mol. Biol.* 23: 1039-1053.
5. Aalberse, R.C., Kosthe, V., Clemens, J.G.J. (1981) Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and hymenoptera venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68: 356-364.
6. Eriksson, N.E., Formgren, H., Svenonius, E. (1982) Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy* 37: 437-443.
7. Halmepuro, L., Vuontela, K., Kalimo, K., Björkstén, F. (1984) Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 74: 235-240.
8. Valenta, R., Duchene, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253:557-560.
9. Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edlmann, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1993) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 175:377-385.
10. Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen, Bet v I, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8:1935-1938.
11. Breiteneder, H., Ferreira, F., Reikerstorfer, A., Duchene, M., Valenta, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Kraft, D., Scheiner, O. (1992) Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of Aln g I, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 90:909-917.
12. Breiteneder, H., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1993) Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur. J. Biochem.* 212:355-362.
13. Larsen, J.N., Stroman, P., Ipsen, H. (1992) PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.* 29:703-711.
14. Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* 95: 962-969.
15. Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. (1992) Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 97: 287-294.
16. Van Ree, R., Voitenko, V., Van Leeuwen, W.A., Aalberse, R.C. (1992) Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable food. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98: 97-104.

AT 402 505 B

17. Spitzauer, S., Schweiger, C., Sperr, W.R., Pandjaitan, B., Valent, P., Mühl, S., Ebner, C., Scheiner, O., Kraft, D., Rumpold, H., Valenta, R. (1993) Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. *J. Allergy Clin Immunol.* 93: 614-627.
18. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5468.
19. Margalit, H., Spogue, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., Delisi, C., Berzofsky, J.A. (1987) Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. (1987) *J. Immunol.* 138: 2213.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZ 1: Kofaktor-unabhängiger Phosphoglyceratmutase (E.C.5.4.2.1.)

5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:1

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE:1593 Basenpaare / 531 Aminosäurereste

(B) ART:Nukleinsäure / Protein

15

(C) STRANGFORM:ds

(D) TOPOLOGIE:linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

25

(v) ART DES FRAGMENTS: Teilsequenz

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

30

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

35

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 1:

1	GGG GGC GAG GCC AAG CCC GAT CAG TAC AAC TGC ATC CAT GTG	42
40	Gly Gly Glu Ala Lys Pro Asp Gln Tyr Asn Cys Ile His Val	
43	GCC GAG ACT CCC ACC ATG GAT TCC CTC AAA CAG GGT GCT CCT	84
45	Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp Ser Leu Lys Gln Gly Ala Pro	
85	GAG AAG TGG AGG TTG GTT AGG GCT CAT GGT AAG GCC GTA GGC	126
50	Glu Lys Trp Arg Leu Val Arg Ala His Gly Lys Ala Val Gly	

55

AT 402 505 B

127	CTT CCA ACA GAG GAT GAC ATG GGC AAC AGT GAA GTT GGT CAC	168
5	Leu Pro Thr Glu Asp Asp Met Gly Asn Ser Glu Val Gly His	
169	AAT GCA CTT GGA GCT GGT CGC ATC TTT GCC CAA GGT GCA AAG	210
10	Asn Ala Leu Gly Ala Gly Arg Ile Phe Ala Gln Gly Ala Lys	
211	CTT GTT GAC TCT GCT CTT GCC TCT GGA AAA ATT TAT GAA GGA	252
15	Leu Val Asp Ser Ala Leu Ala Ser Gly Lys Ile Tyr Glu Gly	
253	GAA GGT TTT AAG TAC ATA AAG GAA TGT TTT GAA AAT GGC ACA	294
20	Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys Glu Cys Phe Glu Asn Gly Thr	
295	TTG CAT CTC ATT GGC TTA TTG AGT GAT GGT GGA GTC CAC TCC	336
25	Leu His Leu Ile Gly Leu Leu Ser Asp Gly Gly Val His Ser	
337	AGG CTT GAT CAG TTG CAG TTA TTG CTT AAA GGA GCT AGT GAG	378
30	Arg Leu Asp Gln Leu Gln Leu Leu Leu Lys Gly Ala Ser Glu	
379	CGT GGT GCA AAA AGA ATC CGT GTT CAT ATT CTT ACC GAT GGC	420
35	Arg Gly Ala Lys Arg Ile Arg Val His Ile Leu Thr Asp Gly	
421	CGT GAT GTT TTG GAT GGT TCA AGT GTA GGA TTT GTT GAA ACT	462
40	Arg Asp Val Leu Asp Gly Ser Ser Val Gly Phe Val Glu Thr	
463	CTT GAG AAT GAC CTT GCA AAA CTA CGT GAG AAG GGT GTT GAT	504
45	Leu Glu Asn Asp Leu Ala Lys Leu Arg Glu Lys Gly Val Asp	
505	GCA CAG ATT GCA TCT GGT GGT GGT CGC ATG TAT GTC ACA ATG	546
50	Ala Gln Ile Ala Ser Gly Gly Gly Arg Met Tyr Val Thr Met	

55

AT 402 505 B

547 GAT CGT TAT GAG AAT GAC TGG GAA GTC ATC AAA CGA GGA TGG 588
 Asp Arg Tyr Glu Asn Asp Trp Glu Val Ile Lys Arg Gly Trp

589 GAT GCC CAT GTT CTT GGT GAA GCC CCT TAC AAA TTT AAA AGT 630
 Asp Ala His Val Leu Gly Glu Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ser

631 GCT GTT GAA GCT GTC AAG AAA CTG AGG GAG GAG CTA AAG GTC 672
 Ala Val Glu Ala Val Lys Lys Leu Arg Glu Glu Leu Lys Val

673 AGT GAC CAG TAC TTG CCT CCA TTC GTC ATT GTT GAT GAC AAT 714
 Ser Asp Gln Tyr Leu Pro Pro Phe Val Ile Val Asp Asp Asn

715 GGG AAG CCT GTT GGT CCT ATA GTT GAT GGT GAT GCT GTG GTT 756
 Gly Lys Pro Val Gly Pro Ile Val Asp Gly Asp Ala Val Val

757 ACA ATC AAC TTC CGA GCA GAT CGT ATG GTT ATG ATT GCT AAG 798
 Thr Ile Asn Phe Arg Ala Asp Arg Met Val Met Ile Ala Lys

799 GCA CTT GAA TAT GAA AAT TTT GAC AAG ATT GAT CGA GTT CGA 840
 Ala Leu Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val Arg

841 TTC CCT AAA ATC CGT TAT GCT GGA ATG CTT CAA TAT GAT GGC 882
 Phe Pro Lys Ile Arg Tyr Ala Gly Met Leu Gln Tyr Asp Gly

883 GAG TTG AAG CTC CCG AGC CAT TAC CTT GTT GAA CCT CCA GAG 924
 Glu Leu Lys Leu Pro Ser His Tyr Leu Val Glu Pro Pro Glu

925 ATA GAG AGA ACG TCT GGT GAA TAT CTA GTG CAC AAT GGC GTC 966
 Ile Glu Arg Thr Ser Gly Glu Tyr Leu Val His Asn Gly Val

AT 402 505 B

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

967 CGT ACT TTT GCT TGC AGT GAG ACT GTC AAA TTT GGT CAT GTC 1008
 Arg Thr Phe Ala Cys Ser Glu Thr Val Lys Phe Gly His Val

1009 ACT TTC TTC TGG AAT GGA AAC CGC TCT GGA TAT TTC AAT TCA 1050
 Thr Phe Phe Trp Asn Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Phe Asn Ser

1051 GAA CTG GAG GAA TAC GTG GAA ATT CCA AGT GAT AGT GGA ATT 1092
 Glu Leu Glu Glu Tyr Val Glu Ile Pro Ser Asp Ser Gly Ile

1093 ACA TTC AAC GTC CAG CCA AAG ATG AAG GCA TTG GAG ATT GCT 1134
 Thr Phe Asn Val Gln Pro Lys Met Lys Ala Leu Glu Ile Ala

1135 GAA AAA ACG AGA GAT GCT ATA CTT AGC GGA AAA TTT GAC CAG 1176
 Glu Lys Thr Arg Asp Ala Ile Leu Ser Gly Lys Phe Asp Gln

1177 GTG CGT GTT AAC CTG CCA AAT GGT GAC ATG GTG GGG CAT ACA 1218
 Val Arg Val Asn Leu Pro Asn Gly Asp Met Val Gly His Thr

1219 GGT GAT ATT GAG GAC ACA GTT GTG GCT TGC AAG GCT GCT GAT 1260
 Gly Asp Ile Glu Asp Thr Val Val Ala Cys Lys Ala Ala Asp

1261 GAG GCT GAC AAG ATG ATC CTT GAT GCA ATA GAG CAA GTG GGT 1302
 Glu Ala Asp Lys Met Ile Leu Asp Ala Ile Glu Gln Val Gly

1303 GGA ATT TAT GTT GTT ACT GCG GAT CAT GGG AAT GCT GAG GAC 1344
 Gly Ile Tyr Val Val Thr Ala Asp His Gly Asn Ala Glu Asp

1345 ATG GTG AAG AGG AAC AAG TCC GTG CAA CCT CTT CTT GAC AAG 1386
 Met Val Lys Arg Asn Lys Ser Val Gln Pro Leu Leu Asp Lys

AT 402 505 B

1387 AAT GGC AAT CTT CAA GTG CTC ACC TCT CAC ACC CTC CAA CCA 1428

Asn Gly Asn Leu Gln Val Leu Thr Ser His Thr Leu Gln Pro

5

1429 GTG CCA ATT GCA ATT GGA GGT CCT GCA TTG GCA AGT GGT GTC 1470

Val Pro Ile Ala Ile Gly Gly Pro Ala Leu Ala Ser Gly Val

10

1471 AGG TTC TGC AAG GAT CTT CCT GAT GGT GGG CTT GCC AAT GTT 1512

Arg Phe Cys Lys Asp Leu Pro Asp Gly Gly Leu Ala Asn Val

15

1513 GCT GCA ACT GTG ATC AAT CTA CAT GGG TTT GAG GCT CCT AGT 1554

Ala Ala Thr Val Ile Asn Leu His Gly Phe Glu Ala Pro Ser

20

1555 GAC TAT GAG CCA ACC CTC ATT GAA CTC GTT GAT AAC TAG 1593

Asp Tyr Glu Pro Thr Leu Ile Glu Leu Val Asp Asn *

25

ANGABEN ZU SEQ ID NO:2

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

35

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

40

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

45

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

50

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 2:

55

Gly Gly Glu Ala Lys Pro Asp Gln Tyr Asn Cys Ile
 1 5 10

5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:3

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26

15

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

30

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 3:

Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp Ser Leu Lys Gln Gly Ala Pro Glu Lys Trp

35

1 5 10 15

Arg Leu Val Arg Ala His Gly Lys Ala

20

25

40

ANGABEN ZU SEQ ID NO:4

45

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14

50

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

55

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 4:

Leu Pro Thr Glu Asp Asp Met Gly Asn Ser Glu Val Gly His

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 5:

Gly Lys Ile Tyr Glu Gly Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys Glu Cys Phe Glu

1 5 10 15

Asn

18

ANGABEN ZU SEQ ID NO:6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 6:

Leu Ser Asp Gly Gly Val His Ser Arg Leu Asp Gln Leu

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 7:

Gly Ala Ser Glu Arg Gly Ala Lys Arg Ile Arg Val

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 8:

Leu Thr Asp Gly Arg Asp Val Leu Asp Gly Ser Ser Val

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:9

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Betula verrucosa*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 9:

Glu Thr Leu Glu Asn Asp Leu Ala Lys Leu Arg Glu Lys Gly Val Asp

1 5 10 15

ANGABEN ZU SEQ ID NO:10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Betula verrucosa*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 10:

Tyr Val Thr Met Asp Arg Tyr Glu Asn Asp Trp Glu Val Ile Lys Arg Gly

1 5 10 15

Trp Asp Ala

20

ANGABEN ZU SEQ ID NO:11

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 11:

Val Lys Lys Leu Arg Glu Glu Leu Lys Val Ser Asp Gln Tyr Leu Pro

1 5 10 15

ANGABEN ZU SEQ ID NO:12

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 12:

AT 402 505 B

Ala Leu Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val Arg Phe Pro Lys

1 5 10 15

Ile Arg Tyr Ala

20

ANGABEN ZU SEQ ID NO:13

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 35

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 13:

Met Leu Gln Tyr Asp Gly Glu Leu Lys Leu Pro Ser His Tyr Leu Val Glu

1 5 10 15

Pro Pro Glu Ile Glu Arg Thr Ser Gly Glu Tyr Leu Val His Asn Gly Val

20 25 30

Arg

35

ANGABEN ZU SEQ ID NO:14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 14:

Trp Asn Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Phe Asn Ser Glu Leu Glu Glu Tyr Val

1 5 10 15

Glu Ile Pro Ser Asp Ser Gly Ile

20 25

ANGABEN ZU SEQ ID NO:15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 15:

AT 402 505 B

Ser Gly Lys Phe Asp Gln Val Arg Val Asn Leu Pro Asn Gly Asp Met Val

1 5 10 15

Gly His Thr Gly Asp Ile Glu

20

ANGABEN ZU SEQ ID NO:16

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 16:

Ala Asp His Gly Asn Ala Glu Asp Met Val Lys Arg Asn Lys Ser Val Gln

1 5 10 15

ANGABEN ZU SEQ ID NO:17

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13

(B) ART: Protein

AT 402 505 B

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 17:

His Gly Phe Glu Ala Pro Ser Asp Tyr Glu Pro Thr Leu
1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:18

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 18:

Tyr Asn Cys Ile His Val Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp
1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:19

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 06

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 19:

Glu Lys Trp Arg Leu Val

1 5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 20:

AT 402 505 B

Phe Ala Gln Gly Ala Lys Leu Val Asp Ser

1 5 10

5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:21

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11

(B) ART: Protein

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

20

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 21:

30

Glu Gly Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys Glu Cys

1 5 10

35

ANGABEN ZU SEQ ID NO:22

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40

(A) LÄNGE: 04

(B) ART: Protein

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

50

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

55

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Betula verrucosa*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 22:

Thr Leu Glu Asn

1 4

ANGABEN ZU SEQ ID NO:23

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Betula verrucosa*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 23:

Asn Asp Trp Glu Val Ile Lys Arg Gly Trp Asp

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:24

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 09

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 24:

Val Glu Ala Val Lys Lys Leu Arg Glu

1

5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 25:

Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val

1

5

10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:26

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 26:

Arg Thr Phe Ala Cys Ser Glu Thr Val Lys

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:27

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 27:

AT 402 505 B

Ser Glu Leu Glu Glu Tyr Val Glu Ile Pro Ser

1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:28

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 08

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 28:

His Thr Gly Asp Ile Glu Asp Thr

1 5

ANGABEN ZU SEQ ID NO:29

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 29:

Met Ile Leu Asp Ala Ile Glu Gln Val Gly Gly Ile
1 5 10

ANGABEN ZU SEQ ID NO:30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Betula verrucosa

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO: 30:

Ser Gly Val Arg Phe Cys Lys Asp Leu Pro Asp Gly Gly Leu Ala Asn Val
1 5 10 15
Ala Ala
18

ANGABEN ZU SEQ ID NO:31

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 09

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Betula verrucosa*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(vii) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

Asn Leu His Gly Phe Glu Ala Pro Ser

1

5

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA Molekül, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit der in Fig. 1 dargestellten gesamten Sequenz oder Teilbereichen derselben in homologer Weise übereinstimmt oder die durch Degeneration aus der in Fig. 1 dargestellten Sequenz ableitbar ist und für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Allergens "Kofaktor-unabhängige Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.)" des Birkenpollens besitzt, oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop dieses Allergens aufweist, sowie eine Nukleinsäuresequenz, die mit der genannten Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert, insbesondere für die Kofaktor-unabhängige Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) des Pollens von Birke, Hasel, Erle, Eiche, Buche, Hainbuche und Olive, von Gräsern, wie *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*, von Unkräutern wie Beifuß sowie von pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Apfel, Kartoffel, Banane, Kiwi, Sellerie, Karotte, Birne, Kirsche, Pfirsich, Pflaume, Marille, Walnuß, Haselnuß, Erdnuß, Mandel, Pistazien, Pfeffer, Kümmel und Koriander.
2. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das als Antigen kreuzreaktiv mit der Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) des Birkenpollens ist, insbesondere mit allen pflanzlichen Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyzeratmutasen (E.C. 5.4.2.1.), die zu der in Fig. 1 gezeigten Sequenz eine hohe Homologie aufweisen.
3. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es funktionell mit einer Expressions-Kontrollsequenz zu einem Expressionskonstrukt verbunden ist.
4. Wirtssystem, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Patentanspruch 3 transformiert ist.
5. Aus einem DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2 abgeleitetes rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Antigenität von Kofaktor-unabhängiger Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) des Birkenpollens oder zumindestens eines Epitops davon

aufweist und eine Aminosäuresequenz besitzt, die der in Fig. 1 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht.

- 5 6. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die Antigenität der Kofaktor-unabhängigen Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.) des Birkenpollens oder zumindestens eines Epitops davon aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil aufweist, wobei das gesamte Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruchs 5 kodiert wird.
- 10 7. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil beta-Galaktosidase, eine Teilsequenz der beta-Galaktosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid ist.
- 15 8. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Patentansprüche 5 bis 7 enthält.
- 20 9. Verfahren zum in vitro Nachweis der Allergie eines Patienten gegen Kofaktor-unabhängige Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.), **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 5 bis 7 gemessen wird.
- 25 10. Verfahren zum in vitro Nachweis der zellulären Reaktion auf Kofaktor-unabhängige Phosphoglyzeratmutase (E.C. 5.4.2.1.), **dadurch gekennzeichnet**, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 5 bis 7 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

Hiezu 10 Blatt Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

Fig.1: cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Kofaktor-unabhängiger Phosphoglyceratmutase (E.C. 5.4.2.1.)

1	GGG GGC GAG GCC AAG CCC GAT CAG TAC AAC TGC ATC CAT GTG	42
	Gly Gly Glu Ala Lys Pro Asp Gln Tyr Asn Cys Ile His Val	
43	GCC GAG ACT CCC ACC ATG GAT TCC CTC AAA CAG GGT GCT CCT	84
	Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp Ser Leu Lys Gln Gly Ala Pro	
85	GAG AAG TGG AGG TTG GTT AGG GCT CAT GGT AAG GCC GTA GGC	126
	Glu Lys Trp Arg Leu Val Arg Ala His Gly Lys Ala Val Gly	
127	CTT CCA ACA GAG GAT GAC ATG GGC AAC AGT GAA GTT GGT CAC	168
	Leu Pro Thr Glu Asp Asp Met Gly Asn Ser Glu Val Gly His	
169	AAT GCA CTT GGA GCT GGT CGC ATC TTT GCC CAA GGT GCA AAG	210
	Asn Ala Leu Gly Ala Gly Arg Ile Phe Ala Gln Gly Ala Lys	
211	CTT GTT GAC TCT GCT CTT GCC TCT GGA AAA ATT TAT GAA GGA	252
	Leu Val Asp Ser Ala Leu Ala Ser Gly Lys Ile Tyr Glu Gly	
253	GAA GGT TTT AAG TAC ATA AAG GAA TGT TTT GAA AAT GGC ACA	294
	Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys Glu Cys Phe Glu Asn Gly Thr	
295	TTG CAT CTC ATT GGC TTA TTG AGT GAT GGT GGA GTC CAC TCC	336
	Leu His Leu Ile Gly Leu Leu Ser Asp Gly Gly Val His Ser	
337	AGG CTT GAT CAG TTG CAG TTA TTG CTT AAA GGA GCT AGT GAG	378
	Arg Leu Asp Gln Leu Gln Leu Leu Leu Lys Gly Ala Ser Glu	
379	CGT GGT GCA AAA AGA ATC CGT GTT CAT ATT CTT ACC GAT GGC	420
	Arg Gly Ala Lys Arg Ile Arg Val His Ile Leu Thr Asp Gly	
421	CGT GAT GTT TTG GAT GGT TCA AGT GTA GGA TTT GTT GAA ACT	462
	Arg Asp Val Leu Asp Gly Ser Ser Val Gly Phe Val Glu Thr	
463	CTT GAG AAT GAC CTT GCA AAA CTA CGT GAG AAG GGT GTT GAT	504
	Leu Glu Asn Asp Leu Ala Lys Leu Arg Glu Lys Gly Val Asp	
505	GCA CAG ATT GCA TCT GGT GGT GGT CGC ATG TAT GTC ACA ATG	546
	Ala Gln Ile Ala Ser Gly Gly Gly Arg Met Tyr Val Thr Met	
547	GAT CGT TAT GAG AAT GAC TGG GAA GTC ATC AAA CGA GGA TGG	588
	Asp Arg Tyr Glu Asn Asp Trp Glu Val Ile Lys Arg Gly Trp	
589	GAT GCC CAT GTT CTT GGT GAA GCC CCT TAC AAA TTT AAA AGT	630
	Asp Ala His Val Leu Gly Glu Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ser	
631	GCT GTT GAA GCT GTC AAG AAA CTG AGG GAG GAG CTA AAG GTC	672
	Ala Val Glu Ala Val Lys Lys Leu Arg Glu Glu Leu Lys Val	
673	AGT GAC CAG TAC TTG CCT CCA TTC GTC ATT GTT GAT GAC AAT	714
	Ser Asp Gln Tyr Leu Pro Pro Phe Val Ile Val Asp Asp Asn	

715	GGG AAG CCT GTT GGT CCT ATA GTT GAT GGT GAT GCT GTG GTT	756
	Gly Lys Pro Val Gly Pro Ile Val Asp Gly Asp Ala Val Val	
757	ACA ATC AAC TTC CGA GCA GAT CGT ATG GTT ATG ATT GCT AAG	798
	Thr Ile Asn Phe Arg Ala Asp Arg Met Val Met Ile Ala Lys	
799	GCA CTT GAA TAT GAA AAT TTT GAC AAG ATT GAT CGA GTT CGA	840
	Ala Leu Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val Arg	
841	TTC CCT AAA ATC CGT TAT GCT GGA ATG CTT CAA TAT GAT GGC	882
	Phe Pro Lys Ile Arg Tyr Ala Gly Met Leu Gln Tyr Asp Gly	
883	GAG TTG AAG CTC CCG AGC CAT TAC CTT GTT GAA CCT CCA GAG	924
	Glu Leu Lys Leu Pro Ser His Tyr Leu Val Glu Pro Pro Glu	
925	ATA GAG AGA ACG TCT GGT GAA TAT CTA GTG CAC AAT GGC GTC	966
	Ile Glu Arg Thr Ser Gly Glu Tyr Leu Val His Asn Gly Val	
967	CGT ACT TTT GCT TGC AGT GAG ACT GTC AAA TTT GGT CAT GTC	1008
	Arg Thr Phe Ala Cys Ser Glu Thr Val Lys Phe Gly His Val	
1009	ACT TTC TTC TGG AAT GGA AAC CGC TCT GGA TAT TTC AAT TCA	1050
	Thr Phe Phe Trp Asn Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Phe Asn Ser	
1051	GAA CTG GAG GAA TAC GTG GAA ATT CCA AGT GAT AGT GGA ATT	1092
	Glu Leu Glu Glu Tyr Val Glu Ile Pro Ser Asp Ser Gly Ile	
1093	ACA TTC AAC GTC CAG CCA AAG ATG AAG GCA TTG GAG ATT GCT	1134
	Thr Phe Asn Val Gln Pro Lys Met Lys Ala Leu Glu Ile Ala	
1135	GAA AAA ACG AGA GAT GCT ATA CTT AGC GGA AAA TTT GAC CAG	1176
	Glu Lys Thr Arg Asp Ala Ile Leu Ser Gly Lys Phe Asp Gln	
1177	GTG CGT GTT AAC CTG CCA AAT GGT GAC ATG GTG GGG CAT ACA	1218
	Val Arg Val Asn Leu Pro Asn Gly Asp Met Val Gly His Thr	
1219	GGT GAT ATT GAG GAC ACA GTT GTG GCT TGC AAG GCT GCT GAT	1260
	Gly Asp Ile Glu Asp Thr Val Val Ala Cys Lys Ala Ala Asp	
1261	GAG GCT GAC AAG ATG ATC CTT GAT GCA ATA GAG CAA GTG GGT	1302
	Glu Ala Asp Lys Met Ile Leu Asp Ala Ile Glu Gln Val Gly	
1303	GGA ATT TAT GTT GTT ACT GCG GAT CAT GGG AAT GCT GAG GAC	1344
	Gly Ile Tyr Val Val Thr Ala Asp His Gly Asn Ala Glu Asp	
1345	ATG GTG AAG AGG AAC AAG TCC GTG CAA CCT CTT CTT GAC AAG	1386
	Met Val Lys Arg Asn Lys Ser Val Gln Pro Leu Leu Asp Lys	
1387	AAT GGC AAT CTT CAA GTG CTC ACC TCT CAC ACC CTC CAA CCA	1428
	Asn Gly Asn Leu Gln Val Leu Thr Ser His Thr Leu Gln Pro	
1429	GTG CCA ATT GCA ATT GGA GGT CCT GCA TTG GCA AGT GGT GTC	1470
	Val Pro Ile Ala Ile Gly Gly Pro Ala Leu Ala Ser Gly Val	
1471	AGG TTC TGC AAG GAT CTT CCT GAT GGT GGG CTT GCC AAT GTT	1512
	Arg Phe Cys Lys Asp Leu Pro Asp Gly Gly Leu Ala Asn Val	

1513 GCT GCA ACT GTG ATC AAT CTA CAT GGG TTT GAG GCT CCT AGT 1554
Ala Ala Thr Val Ile Asn Leu His Gly Phe Glu Ala Pro Ser
1555 GAC TAT GAG CCA ACC CTC ATT GAA CTC GTT GAT AAC TAG 1593
Asp Tyr Glu Pro Thr Leu Ile Glu Leu Val Asp Asn *

Fig.2: Sequenzvergleich von PGM-i aus Birkenpollen (bvmut), Rhizinus (rcmut), Mais (zmmut) und Tabak (ntmut)

Plurality: 2.00 Threshold: 1.00 AveWeight 1.00 AveMatch 0.54
AvMisMatch -0.40

PRETTY of: mut.msf{*} July 22, 1995 19:13 ..

	1				50
mut.msf{bvmut}	g	GEAKPDQYNC	IHVAETPtMD		
mut.msf{rcmut}	...geFtWKL aDHPKLPKGK TIAMVVLDGW	GEAKPDQYNC	IHVAETPtMD		
mut.msf{zmmut}	MGSSGFsWtL pDHPKLPKGK sVAVVVLDGW	GEAnPDQYNC	IHVAqTPvMD		
mut.msf{ntmut}	MGSSGdaWKL kDHPKLPKGK TVAVIVLDGW	GEAKPneFNa	IHVAETPvMy		
Consensus	-----	GEA-P---N-	IHVA-TP-M-		
	51				100
mut.msf{bvmut}	SLKqGAPEKW RLVrAHGkAV GLPTEDDMGN	SEVGHNALGA	GRIFAQGAkl		
mut.msf{rcmut}	SFKktAPERW RLIKAHGTA V GLPTEDDMGN	SEVGHNALGA	GRIYAQGAkl		
mut.msf{zmmut}	SLKNGAPEKW RLVKAHGTA V GLPsDDDMGN	SEVGHNALGA	GRIFAQGAkl		
mut.msf{ntmut}	SLKNGAPEKW RLIKAHGnAV GLPTEDDMGN	SEVGHNALGA	GRIFAQGAkl		
Consensus	S-K--APE-W RL--AHG-AV GLP--DDMGN	SEVGHNALGA	GRI-AQGAkl		
	101				150
mut.msf{bvmut}	VDsALASGKI YEGEGFKYIK ECFEnGTLHL	IGLLSDGGVH	SRLDQLQLLL		
mut.msf{rcmut}	VDLALASGKI YEGEGFKYVK ECFDKGTLHL	IGLLSDGGVH	SRLDQLQLLL		
mut.msf{zmmut}	VDqALASGKI YDGDGFnYIK EsFEsGTLHL	IGLLSDGGVH	SRLDQLQLLL		
mut.msf{ntmut}	VDLALASGKI YEGEGFKYVK ECFEKGTlHL	IGLLSDGGVH	SRLDQvQLLL		
Consensus	VD-ALASGKI Y-G-GF-Y-K E-F--GTLHL	IGLLSDGGVH	SRLDQ-QLLL		
	151				200
mut.msf{bvmut}	KGAsErGAKR IRVHILTDGR DVLDGSSVGF	VETLENDLak	LREKGVDAQI		
mut.msf{rcmut}	KGAAehGAKR IRVHVLTdGR DVIdGtSVGF	aETLEkDLen	LREKGVDAQV		
mut.msf{zmmut}	KGvsErGAKk IRVHILTDGR DVLDGSSIGF	VETLENDLle	LRaKGVDAQI		
mut.msf{ntmut}	KGAakhGAKR IRVHaLTDGR DVLDGSSVGF	mETLEnsLaq	LREKGIDAQV		
Consensus	KG----GAK- IRVH-LTDGR DV-DG-S-GF	-ETLE--L--	LR-KG-DAQ-		
	201				250
mut.msf{bvmut}	ASGGGRMYVT MDRYENDWEV IKRGWDahVL	GEAPYKFKSA	VEAVKKLREE		
mut.msf{rcmut}	ASGGGRMYVT MDRYENDWnV VKRGWDAQVL	GEAPYKFKSA	VEAIKKLREE		
mut.msf{zmmut}	ASGGGRMYVT MDRYENDWDV VKRGWDAQVL	GEAPYKFKSA	leAVKtLRaq		
mut.msf{ntmut}	ASGGGRMYVT MDRYENDWDV VKRGWDAQVL	GEAPhKFKdp	VEAVKKLRqE		
Consensus	ASGGGRMYVT MDRYENDW-V -KRGWDA-VL	GEAP-KFK--	-EA-K-LR--		
	251				300
mut.msf{bvmut}	lKvsDQYLPP FVIVDDNGKP VGPIvDGDAV	VTINFRADRM	VMiAKALEYE		
mut.msf{rcmut}	PKANDQYLPP FVIVDENGKP VGPIvDGDAV	VTINFRADRM	VMLAKALEYE		
mut.msf{zmmut}	PKANDQYLPP FVIVDDsGna VGPVldGDAV	VTINFRADRM	VMLAKALEYa		
mut.msf{ntmut}	PnANDQYLp FVIVDDNGKP VaaIldGDAV	VTfnFRADRM	VMLAKALEYE		
Consensus	----DQYL-P FVIVD--G-- V----DGDAV	VT-NFRADRM	VM-AKALEY-		

	301		350
mut.msf{bvmut}	NFDKiDRVRf	PKIRYAGMLQ	YDgELKLPSH YLVePPEIER TSGEYLVHNG
mut.msf{rcmut}	NFDtFDRVRf	PKIhYAGMLQ	YDgELKLPSH YLVSPPEIER TSGEYLVHNG
mut.msf{zmmut}	dFDnFDRVRv	PKIRYAGMLQ	YDgELKLPSr YLVSPPEIDR TSGEYLVkNG
mut.msf{ntmut}	NFDKFDRVRv	PKIRYAGMLQ	YhGELqLPSH YLVSPPEIaR hSGEYLVrNG
Consensus	-FD--DRVR-	PKI-YAGMLQ	Y-GEL-LPS- YLV-PPEI-R -SGEYLV-NG
	351		400
mut.msf{bvmut}	VRTFACSETV	KFGHVTFFWN	GNRSGYFNsE LEEYVEIPSD SGITFNVQPK
mut.msf{rcmut}	VhTFACSETV	KFGHVTFFWN	GNRSGYFNpE MEEYVEIPSD vGITFNVQPK
mut.msf{zmmut}	IRTFACSETV	KFGHVTFFWN	GNRSGYFdat kEEYVEVPSD SGITFNVaPn
mut.msf{ntmut}	VRTFACSETV	KFGHVTFFWN	GNRSGYFNek LEEYVEIPSD SGITFNVkPK
Consensus	--TFACSETV	KFGHVTFFWN	GNRSGYF--- -EEYVE-PSD -GITFNV-P-
	401		450
mut.msf{bvmut}	MKALEIAEKt	RDAILSGKFD	QVRVNLPNGD MVGHTGDIED TVVACKAADE
mut.msf{rcmut}	MKAiEIAEKa	RDAILSGKFq	QVRVNiPNGD MVGHTGDVEA TVVgCKAADE
mut.msf{zmmut}	MKALEIAEKa	RDAILSGKFD	QVRVNLPNGD MVGHTGDIEA TVVACKAADE
mut.msf{ntmut}	MKALEIAErt	RDAILSGKFD	QVRVNLPNGD MVGHTGDika TIeACKsADE
Consensus	MKA-EIAE--	RDA-LSGKF-	QVRVN-PNGD MVGHTGD--- T---CK-ADE
	451		500
mut.msf{bvmut}	AdKMILDAIE	QVGGIYvVTA	DHGNAEDMVK RNKSvqPLLD KNGNIQVLTS
mut.msf{rcmut}	AVKMIiDAIE	QVGGIYvVTA	DHGNAEDMVK RdKSGKPMaD KsGkIQILTS
mut.msf{zmmut}	AVKiILDave	QVGGIYlVTA	DHGNAEDMVK RNKSGKPLLD KNdrIQILTS
mut.msf{ntmut}	AVKMILEAIE	QVGGIYlVTA	DHGNAEDMVK RNKkGePaLD KNGNIQILTS
Consensus	A-K-I--A-E	QVGGIY-VTA	DHGNAEDMVK R-K---P--D K----Q-LTS
	501		550
mut.msf{bvmut}	HTLQVPVIAI	GGPaLasGVR	FckDlPdGGL ANVAATViNL HGFEAPSDYE
mut.msf{rcmut}	HTLQVPVIAI	GGPGLtPGVR	FRsDiPTGGL ANVAATVMNL HGFEAPSDYE
mut.msf{zmmut}	HTLQVPVVAI	GGPGLhPGVk	FRnDiqTpGL ANVAATVMNL HGFEAPaDYE
mut.msf{ntmut}	HTcePVPIAI	GGPGLAPGVR	FRqDlPTGGL ANVAATfMNL HGsEAPSDYE
Consensus	HT--PVP-AI	GGP-L--GV-	F--D----GL ANVAAT--NL HG-EAP-DYE
	551	560	
mut.msf{bvmut}	PTLIElVDN.		
mut.msf{rcmut}	PTLIEaVDN.		
mut.msf{zmmut}	qTLIEVaDN.		
mut.msf{ntmut}	PsLIEVVDNm		
Consensus	--LIE--DN-		

**Fig.3: B-Zell Epitope von Kofaktor-unabhängiger
Phosphoglyceratmutase (E.C. 5.4.2.1.) aus
Birkenpollen**

Folgende B-Zell Epitope wurden bestimmt:

- Epitop 1: Gly Gly Glu Ala Lys Pro Asp Gln Tyr Asn Cys Ile
(AS 1-12)
- Epitop 2: Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp Ser Leu Lys Gln Gly Ala
Pro Glu Lys Trp Arg Leu Val Arg Ala His Gly Lys Ala
(AS 15-40)
- Epitop 3: Leu Pro Thr Glu Asp Asp Met Gly Asn Ser Glu Val Gly
His (AS 43-56)
- Epitop 4: Gly Lys Ile Tyr Glu Gly Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys
Glu Cys Phe Glu Asn (AS 79-96)
- Epitop 5: Leu Ser Asp Gly Gly Val His Ser Arg Leu Asp Gln Leu
(AS 105-117)
- Epitop 6: Gly Ala Ser Glu Arg Gly Ala Lys Arg Ile Arg Val
(AS 123-134)
- Epitop 7: Leu Thr Asp Gly Arg Asp Val Leu Asp Gly Ser Ser Val
(AS 137-149)
- Epitop 8: Glu Thr Leu Glu Asn Asp Leu Ala Lys Leu Arg Glu Lys
Gly Val Asp (AS 153-168)
- Epitop 9: Tyr Val Thr Met Asp Arg Tyr Glu Asn Asp Trp Glu Val
Ile Lys Arg Gly Trp Asp Ala (AS 179-198)
- Epitop 10: Val Lys Lys Leu Arg Glu Glu Leu Lys Val Ser Asp Gln
Tyr Leu Pro (AS 215-230)
- Epitop 11: Ala Leu Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val
Arg Phe Pro Lys Ile Arg Tyr Ala (AS 267-287)
- Epitop 12: Met Leu Gln Tyr Asp Gly Glu Leu Lys Leu Pro Ser His
Tyr Leu Val Glu Pro Pro Glu Ile Glu Arg Thr Ser Gly Glu Tyr
Leu Val His Asn Gly Val Arg (AS 289-323)
- Epitop 13: Trp Asn Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Phe Asn Ser Glu Leu
Glu Glu Tyr Val Glu Ile Pro Ser Asp Ser Gly Ile
(AS 340-364)
- Epitop 14: Ser Gly Lys Phe Asp Gln Val Arg Val Asn Leu Pro Asn
Gly Asp Met Val Gly His Thr Gly Asp Ile Glu (AS 387-410)

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben 25. 6.1997
Blatt 7

Patentschrift Nr. AT 402 505 B
Int. Cl.⁶ : C12N 15/29
C12Q 1/68

Epitop 15: Ala Asp His Gly Asn Ala Glu Asp Met Val Lys Arg Asn
Lys Ser Val Gln (AS 441-457)

Epitop 16: His Gly Phe Glu Ala Pro Ser Asp Tyr Glu Pro Thr Leu
(AS 512-524)

**Fig.4: T-Zell Epitope von Kofaktor-unabhängiger
Phosphoglyceratmutase (E.C. 5.4.2.1.) aus
Birkenpollen**

Folgende T-Zell Epitope wurden bestimmt:

Epitop 1: Tyr Asn Cys Ile His Val Ala Glu Thr Pro Thr Met Asp
(AS 9-21)

Epitop 2: Glu Lys Trp Arg Leu Val (AS 29-34)

Epitop 3: Phe Ala Gln Gly Ala Lys Leu Val Asp Ser (AS 65-74)

Epitop 4: Glu Gly Glu Gly Phe Lys Tyr Ile Lys Glu Cys (AS 83-93)

Epitop 5: Thr Leu Glu Asn (AS 154-157)

Epitop 6: Asn Asp Trp Glu Val Ile Lys Arg Gly Trp Asp
(AS 187-197)

Epitop 7: Val Glu Ala Val Lys Lys Leu Arg Glu (AS 212-220)

Epitop 8: Glu Tyr Glu Asn Phe Asp Lys Ile Asp Arg Val
(AS 269-279)

Epitop 9: Arg Thr Phe Ala Cys Ser Glu Thr Val Lys (AS 323-332)

Epitop 10: Ser Glu Leu Glu Glu Tyr Val Glu Ile Pro Ser
(AS 350-360)

Epitop 11: His Thr Gly Asp Ile Glu Asp Thr (AS 405-412)

Epitop 12: Met Ile Leu Asp Ala Ile Glu Gln Val Gly Gly Ile
(AS 425-436)

Epitop 13: Ser Gly Val Arg Phe Cys Lys Asp Leu Pro Asp Gly Gly
Leu Ala Asn Val Ala Ala (AS 488-506)

Epitop 14: Asn Leu His Gly Phe Glu Ala Pro Ser (AS 510-518)

Fig.5A: BIP 3 Immunblot mit Pollenextrakten von Birke, Beifuß und Lieschgras, und Extrakten von Sellerie und Apfel.

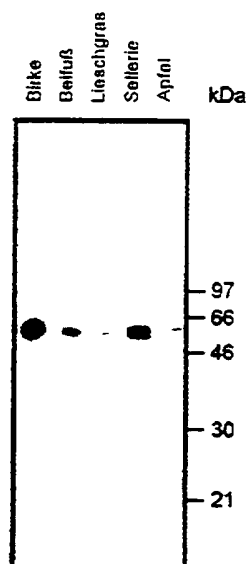


Fig.5B: IgE Immunblots von BIP 3-immunaffinitätsgereinigtem PGM-i aus Birkenpollen (MU), Birkenpollenextrakt (BPEX). Sera von graspollenallergischen Patienten (HP, HL), Normalhumanserum (NHS).

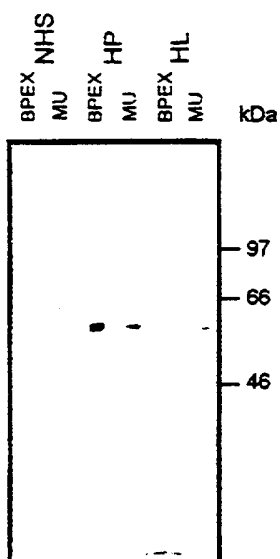


Fig.6: Plaque-lifts getestet mit Patientensera und BIP 3

