



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 401 181 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2038/94

(51) Int.Cl.⁶ : C12N 15/12

(22) Anmeldetag: 2.11.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1995

(45) Ausgabetag: 25. 7.1996

(56) Entgegenhaltungen:

CHEMICAL ABSTRACTS 120-132236
CHEMICAL ABSTRACTS 115-90351
CHEMICAL ABSTRACTS 93-130366

(73) Patentinhaber:

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

(54) REKOMBINANTE DNA MOLEKÜLE

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die vollständigen cDNA-Sequenzen der Alternaria alternata Allergene Alt a 45 und Alt a 12. Im Rahmen der molekularbiologischen Analyse der Allergene konnte Alt a 45 als Protein-disulphidisomerase identifiziert werden. Es handelt sich bei diesem Protein um ein 45kD großes Protein, das von 47% der Patienten erkannt wird und somit ein wichtiges Hauptallergen darstellt. Alt a 12 (wird von 8% der Patienten erkannt) konnte als ribosomales Protein identifiziert werden. Dieses Protein ist insofern interessant, weil in Lupus Patienten Autoantikörper gegen ribosomale Proteine zu finden sind. Ob zwischen Schimmelpilzallergie und Autoimmunkrankheiten ein Zusammenhang besteht, muß erst gezeigt werden. Mit Hilfe dieser rekombinanten Sequenz konnten mit Computeranalyse hoch potente B- und T-Zellepitope bestimmt werden. Die von den rekombinanten Proteinen abgeleiteten Peptide könnten für die Diagnose einer Alternaria alternata Schimmelpilzallergie verwendet werden. Im weiteren könnten die Peptide für eine in vitro aber auch in vivo allergenspezifische Stimulation von T-Zellen (Proliferation, Interleukinproduktion) eingesetzt werden oder aber auch zu einer Blockierung von T-Zellen, die zu einer Toleranz der allergenspezifischen T-Lymphozyten führen.

AT 401 181 B

Die Erfindung betrifft rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Alt a 45 und Alt a 12 besitzen oder für Peptide, die mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen.

Insbesondere betrifft die Erfindung die vollständigen cDNA Sequenzen Alt a 45, und Alt a 12 von Alternaria alternata sowie die von diesen Primärsequenzen abgeleiteten Peptidsequenzen, die bei Pilzallergikern zu einer pathologischen Immunantwort mit einem Überschreiten von IgE-Antikörpern führt. Rekombinante Allergene, bzw. immunogen wirkende Teipeptide können neben einer verbesserten Diagnostik auch zu einer in vivo oder in vitro Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von T-Lymphozyten Verwendung finden.

10 Immunologische Mechanismen, die zur Abwehr von Antigenen aus der Umwelt im Laufe der Evolution etabliert wurden, können normalerweise zwischen Selbst und nicht-Selbst unterscheiden. Wie es jedoch bei komplexen Kontrollmechanismen oft der Fall ist, unterliegt auch das Immunsystem einer gewissen Fehlerhäufigkeit, und bei Versagen erfolgt ein Angriff auf eigenes Gewebe. Es gibt 4 prinzipielle Situationen, in denen der Körper von seinem eigenen Immunsystem angegriffen wird. Die Situationen unterscheiden sich 15 in der Herkunft der Antigene, die den Angriff auslösen, und in dessen Mechanismus und deren Manifestation. Die Antwort kann durch Umweltantigene, durch ein infektiöses Agens (aber auch durch harmlose Substanzen), durch Gewebsantigene, die von einer anderen Person stammen, und durch Antigene des Individuums selbst ausgelöst werden. Die Reaktion bezeichnet man als "allergisch".

20 Ein prinzipielles Merkmal bei Allergien ist, daß eine applizierte Substanz statt einer Protektion eine erhöhte Sensibilität oder Hypersensibilität induziert. Einige dieser Substanzen sind Toxine, andere harmlose Proteine.

Heute unterscheidet man 4 Typen der Hypersensibilität: Typ I-IV. Typ I-III werden durch Antikörper vermittelt, während Typ IV durch T-Lymphozyten vermittelt wird.

25 Die Typ I Hypersensibilität wird auch Hypersensibilität vom Soforttyp bezeichnet, weil ihre Wirkung innerhalb von Stunden nach Antigenkontakt auftritt. In der initialen Sensibilisierungsphase dieses Mechanismus gelangt Antigen (Allergen) in den Körper, wird von Antigen präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und prozessiert. Das prozessierte Antigen wird anschließend zusammen mit MHC II an der Oberfläche der APC den T-Helferzellen (Th) präsentiert. Die Th produzieren Lymphokine, die den B-Lymphozyten helfen, zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu differenzieren. Die B-Lymphozyten erkennen das 30 Allergen über ihre Oberflächenrezeptoren und sezernieren IgE. Sie binden an Rezeptoren von Mastzellen und Basophilen. Die initiale Bindung hat jedoch keinen offensichtlichen Effekt auf die Zellen.

35 Wenn jedoch das Allergen erneut in den Körper kommt, beginnen die Schwierigkeiten. Das multivalente Allergen bindet an IgE und über andere Epitope an weitere IgE-Moleküle, so daß es zu einer Brückenbildung (Kreuzvernetzung) zwischen den IgE-Molekülen kommt. Die Aggregation immobilisiert den Rezeptor und induziert eine Signaltransduktionskette, die schließlich zur Degranulation der Mastzellen führt. Die Degranulation führt zur Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Die freigesetzten Substanzen sind vor allem Histamin und Heparin. Histamin stimuliert glatte Muskelzellen, Gefäßendothelzellen und Nervenendigungen. Heparin übt eine inhibitorische Wirkung auf Thrombozyten aus. Die allergische Antwort wird sowohl in der Akut- als auch in der Spätpause vom Nervensystem beeinflußt. Die Neurotransmitter 40 interagieren mit den korrespondierenden Rezeptoren auf den Effektorzellen und aktivieren diese entweder über cAMP oder über cGMP. Die Zielzellen der Neurotransmitter sind wiederum die Mastzellen, die glatte Muskulatur und die epithelialen und sekretorischen Zellen.

Nicht alle Personen die dem Allergen ausgesetzt sind entwickeln eine Allergie. Wieso? Man denkt, daß die primäre Ursache des allergischen Zustandes ein Defekt im Immunsystem ist.

45 Die neo- und postnatalen Serum-Immunglobulin-Spiegel, besonders IgA, sind sehr niedrig. Allergiker haben oft weniger T-Lymphozyten (CD8+). Viele Allergiker hatten bei der Geburt einen erhöhten IgE-Spiegel. Ihre Basophilen degranulieren leichter. Manche haben auch einen Defekt in den Suppressor-T-Zellen. Der IgE-Spiegel steigt wenn Ts abnimmt.

Ein starkes Argument, gegen einen immunologischen Defekt liegt darin, daß der asthmatische Zustand 50 auch oft ohne Beteiligung des Allergens ausgelöst werden kann. Die Befürworter argumentieren, daß die primäre Ursache der Allergien eher physiologisch als immunologisch ist. Vielleicht sind die Nervenendigungen in der glatten Muskulatur den sekretorischen Drüsen und den Blutgefäßen der Zielorgane bei allergischen Patienten genetisch hyperaktiv.

Sie wird durch charakteristische Veränderungen nach einer Zweitexposition mit dem gleichen Antigen 55 ausgelöst. Die für eine Sensibilisierung erforderliche Antigenmenge schwankt erheblich. Eine zu geringe Dosis bewirkt keine Antwort, und eine zu große Dosis kann in einer Protektion statt in einer Sensibilisierung enden. Ein desensibilisierter Zustand kann erzeugt werden, wenn man einen Schock-Zustand überstanden hat. Der Spiegel von reaktivem IgE kehrt aber nach wenigen Wochen wieder zurück.

AT 401 181 B

Die beste Behandlung ist die Allergenvermeidung. Da die Allergenvermeidung ja kaum hundertprozentig zu erreichen ist, liegen weitere Möglichkeiten im Einsatz von Antihistaminika. Probiert wird heute auch eine sogenannte Immuntherapie. Dabei wird eine Unfähigkeit induziert, auf spezifische Allergene zu antworten. Zu diesem Zweck wird der Patient wiederholt mit einer Allergenmixtur immunisiert. Man beginnt mit niedrigen Dosen und erhöht langsam, bis der Patient nicht mehr darauf reagiert. Erfolge erzieht man mit der Immuntherapie bei Heuschnupfen, Insektstichen und allergischem Asthma. Die Behandlung scheint eine Form der partiellen immunologischen Toleranz zu induzieren. Die Desensibilisierung des Patienten ist aber niemals absolut.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist jedoch weder die Diagnose noch die Therapie von allergischen Erkrankungen zufriedenstellend. Die molekulare Charakterisierung der Hauptallergene von Alternaria mittels cDNA-Klonierung, Sequenzierung, Sequenzvergleich des allergenen Proteins mit Proteindatenbanken, sowie die Produktion von rekombinanten Allergenen wird mehr Aufschluß über die in vivo Funktion der Proteine geben, die die falschen Immunreaktionen auslösen. Diese Informationen sind aus folgenden Gründen interessant:

- 15 1) Hochreine rekombinante Allergene können für eine sorgfältigere Diagnose, besser als es heute mit Rohextrakten möglich ist, herangezogen werden.
- 2) Die Sequenz der Allergene wird dabei helfen, tolerogene Peptide zu definieren und eventuell auch den "IgE-Class-switch", der bei der Immunisierung mit dem Allergen passiert, verstehen zu lernen.

Seit Jahrzehnten werden IgE bedingte Allergien, so z.B. auch Allergien gegen Pilzsporen, durch Hyposensibilisierung therapiert (Bousquet et al. 1991). Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen in steigender Dosierung, bis eine Erhaltungsdosis über mehrere Jahre erreicht ist. Resultat dieser Therapie ist das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich in einer Abnahme der Krankheitssymptome äußert (Birkner et al. 1990). Das Problem bei dieser Art der Behandlung liegt in der Vielzahl der dadurch auftretenden Nebenwirkungen. Bei der Hyposensibilisierungstherapie sind Fälle von anaphylaktischem Schock während der Behandlung aufgetreten. Das Problem hiebei liegt in der schweren Standardisierbarkeit der Pilzprotein-Isolate. Bei einem Einsatz von Allergen-abgeleiteten, aber nicht anaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen verabreicht werden und damit eine wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden.

Alternaria alternata ist praktisch überall in der Natur anzutreffen. Beliebte Standorte, bzw. Lebensräume des Pilzes sind verschiedene Bodentypen, Getreidesilos, verrottetes Holz, aber auch lebende Pflanzen, Kompostplätze und Vogelnester. Findet man auf Tomaten schwarze Flecken, so röhren auch sie mit großer Wahrscheinlichkeit von Alternaria her. Aber nicht nur in freier Natur ist Alternaria alternata anzutreffen. Sehr häufig findet man den Pilz in feuchten Innenräumen und an Fensterrahmen. Warme Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit begünstigen das Wachstum des Pilzes im allgemeinen.

a) Beschreibung der allergenen Proteine von Alternaria alternata mittels Western-Blotting

Für die Klonierung der vorliegenden Allergene von Alternaria alternata standen 128 Patientenserum zur Verfügung. Um die Reaktivität der Patienten mit Pilzproteinextrakt zu testen, wurde Alternaria alternata (Sammlung Prof. Windisch Berlin Nummer: 08-0203) auf festem Medium (2% Glukose, 2% Pepton, 1% Hefeextrakt) gezüchtet. Für die Proteinextraktion wurde die Pilzmatte nach 3 Tagen Wachstum bei 28°C abgezogen und mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die Auftrennung der extrahierten Proteine erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel das anschließend geblottet, mit Patientenserum inkubiert und mit ¹²⁵I-markiertem anti human IgE detektiert wurde. In Prozentzahlen ausgedrückt reagierten die Patienten auf die allergenen Proteine wie folgt:

Alt a 45	47%
Alt a 12	8%

Wie aus diesen Zahlen ersichtlich ist, handelt es sich bei Alt a 45 um ein Haupt-, und bei Alt a 11 um ein Nebenallergen.

55 b) Konstruktion der cDNA Expressionsbank

Gesamt-RNA wurde nach der sauren Guanidium-Phenol-Extraktionsmethode aus selbst gezüchtem Pilzmaterial gewonnen; poly(A)plus Anreicherung erfolgte mit Oligo(dT) Cellulose der Firma Boehringer. Die

AT 401 181 B

cDNA Synthese (1. und 2. Strang) wurde durchgeführt, wie im Manual des Lambda ZAP-Systems der Firma Stratagene beschrieben. Die cDNA wurde anschließend (3'- seitig) mit EcoRI und (5'-seitig) mit XbaI Linkern versehen, in vorverdaute Lambda-ZAP-Arme ligiert und verpackt. Der Titer der Primärbank betrug 900000 Klone.

5

c) Screening der cDNA Genbank mit Patientenserum, in vivo Excision, Sequenzierung

Das Screenen der Expressionsbank erfolgte mittels Inkubation der "gelifteten" Phagenplaques mit einem Seragemisch aus 2 Patienten, von denen man durch das Westernblotting wußte, daß sie das Spektrum der detektierten Antigene abdecken. Die Detektion erfolgte wieder mit anti human IgE RAST Antikörper der Firma Pharmacia. Nach Sekundär- und Tertiärscreening blieben 150 positive Klone übrig. Die beschriebenen 2 Klone wurden nach der Sangermethode (Sanger 1977) sequenziert.

d) Expression der Alt a 45 und Alt a 12 cDNAs als β -Galaktosidasefusionsprotein

15

Die jeweiligen rekombinanten Plasmide wurden in den E.coli Stamm XL1-Blue transformiert und mit IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Der E.coli Gesamtproteinextrakt wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Das Fusionsprotein wurde mittels Serum IgE von Pilzallergikern und einem jodmarkiertem Kaninchen anti human IgE Antikörper (Pharmacia, Uppsala Schweden) detektiert.

Der β -Galaktosidaseanteil des Fusionsproteins beträgt 36 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 3800 Dalton gleichkommt. Unter Berücksichtigung dieser "Vergrößerung" zeigt sich genau, daß die rekombinanten Fusionsproteine Alt a 45 und Alt a 12 ebenfalls IgE-Bindung zeigen.

25

e) Bestimmung von B- und T-Zell Epitopen bei den rekombinanten Allergenen

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Allergene bietet die Voraussetzung für die Vorhersage von B- und T-Zellepitopen mittels geeigneter Computerprogramme. Mit diesen Untersuchungen können spezifische T- und B-Zell-Epitope definiert werden, die die Fähigkeit besitzen, zB. T-Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen, aber die Zellen (bei genau definierter Dosis) auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (Rothbard et al. 1991). Die bestimmten Epitope werden jeweils bei der Beschreibung des rekombinanten Proteins in eigenen Figuren angeführt.

Die Suche nach B-Zellepitopen wurde mit Hilfe des GCG-Programmes (Genetics Computer Group) durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf einer Abwägung der Parameter Hydrophilität (Kyte-Doolittle), Sekundärstruktur (Chou-Fasman), Oberflächenlokalisierung (Robson-Garnier) und Flexibilität, wodurch die Antigenität von Teilpeptiden errechnet wird.

Das Prinzip der T-Zellepitop-Voraussage erfolgte im Prinzip nach dem Algorithmus von Margalit et al. (1987). Das Prinzip besteht in der Suche nach amphipathischen Helices laut Primärsequenz des zu bestimmenden Proteins, flankiert von hydrophilen Bereichen. Der berechnete Score muß für relevante T-Zellepitope größer als 10 sein. Bei MHC II assoziierten Peptiden kann kein Konsensus, weder der Sequenz noch der Länge des Peptids nach, wie bei HLA-A2 (human leucocyte antigen) (MHC I) assoziierten definiert werden. Bei HLA-A2 assoziierten Peptiden beträgt die Länge des Peptids 10 Aminosäuren, wobei die 2. Aminosäure ein Tyrosin und die letzte Aminosäure ein Leucin darstellt (Rammensee et al. 1993). Die berechneten Epitope werden bei der Beschreibung der einzelnen allergenen Sequenzen getrennt angeführt.

45 Im folgenden Kapitel werden nun die cDNA Sequenzen und die mit ihnen durchgeföhrten Analysen der Reihe nach angeführt. Die Computerauswertung der nachfolgenden Sequenzen wurden auf einer Ultrix-DEC 5000 Workstation unter Zuhilfenahme des GCG-Softwarepaketes (= Wisconsin Paket: die Algorithmen dieses Paketes wurden von der "University of Wisconsin" entwickelt) durchgeföhrt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle weisen daher eine Nucleinsäuresequenz auf, die mit den nachfolgenden Sequenzen (1-6), oder mit Teilstücken dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw. Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Nucleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Der Grad der Stringenz ist durch $0,1 \times SSC$ definiert. Der Grad der Homologie soll mehr als 60% betragen.

55 A. Alt a 45

Die nachfolgende Sequenz 1 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Alt a 45, beginnend mit dem Start-ATG. Die Länge der cDNA beträgt 1302bp, was einem berechneten Molekulargewicht von 45904

AT 401 181 B

Dalton entspricht. Die beobachtete Bande im Westernblot bei 45kD korreliert somit dem Molekulargewicht nach mit dem klonierten und sequenzierten Allergen. Dem reifen Protein dürfte nach bisheriger Analyse kein Signalpeptid voranstehen.

5

Sequenz 1: Alt a 45 45904 Dalton

10

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1302 Basenpaare / 434 Aminosäurereste

20

25

30

35

40

45

50

55

(B) ART: Nukleinsäure / Protein

5 (C) STRANGFORM: ds

(D) TOPOLOGIE: linear

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

10 (iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Alternaria alternata

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

20

DNA Sequenz 1302 b.p. ATGACCAAGCAG ... GACGAGTTGTAA linear

25

1 / 1 31 / 11
ATG ACC AAG CAG GCT CTC CCC GCC GTC TCC GAA GTC ACC AAG GAC ACA CTC GAG GAG TTC
met thr lys gln ala leu pro ala val ser glu val thr lys asp thr leu glu glu phe
30 61 / 21 91 / 31
AAG ACC GCC GAC AAG GTC GTC CTC GTC GCC TAC TTC GCC GCC GAC GAC AAG GCC TCC AAC
lys thr ala asp lys val val leu val ala tyr phe ala ala asp asp lys ala ser asn
35 121 / 41 151 / 51
GAG ACC TTC ACC TCG GTC GCC AAC GGT CTC CGT GAC AAC TTC CTC TTC GGT GCC ACC AAC
glu thr phe thr ser val ala asn gly leu arg asp asn phe leu phe gly ala thr asn
40 181 / 61 211 / 71
GAC GCT GCT CTG GCC AAG GCT GAG GGT GTC AAG CAG CCC GGT CTC GTC TGT ACA AGT CCT
asp ala ala leu ala lys ala glu gly val lys gln pro gly leu val cys thr ser pro
45 241 / 81 271 / 91
TCG ACG ACG GCA AGG ACG TCT TCA CCG AGA CCT TCG ATG CGG ACG TAT CCG CGA CTT CGC
ser thr thr ala arg thr ser ser pro arg pro ser met arg thr tyr pro arg leu arg
50 301 / 101 331 / 111
AAG GTC GCC TCC ACA CCC CTC ATT GGT GAG GTT GGC CCC GAG ACC TAC GCC GGA TAC ATG
lys val ala ser thr pro leu ile gly glu val gly pro glu thr tyr ala gly tyr met
55 361 / 121 391 / 131
GCC GCT GGC ATT CCC CTC GCA TAC ATC TTC GCC GAG ACT CCC GAG GAA CGT GAG GAG TTT

55

AT 401 181 B

ala ala gly ile pro leu ala tyr ile phe ala glu thr pro glu glu arg glu glu phe
 421 / 141 451 / 151

5 GCC AAG GAG CTG AAG CCC CTC GCT CTC AAG CAC AAG GGC GAG ATC AAC TTC GCT ACC ATC
 ala lys glu leu lys pro leu ala leu lys his lys gly glu ile asn phe ala thr ile
 481 / 161 511 / 171

10 GAC GCC AAG TCC TTC GGC CAG CAC GCT GGC AAC CTT AAC CTC AAG GTC GGC ACC TGG CCC
 asp ala lys ser phe gly gln his ala gly asn leu asn leu lys val gly thr trp pro
 541 / 181 571 / 191

15 GCT TTC GCT ATC CAG CGC ACC GAG AAG AAC GAG AAG TTC CCT ACG AAC CAG GAG GCC AAG
 ala phe ala ile gln arg thr glu lys asn glu lys phe pro thr asn gln glu ala lys
 601 / 201 631 / 211

20 75 ATC ACC GAG AAG GAG ATT GGC AAG TTC GTT GAC GAC TTC CTC GCT GGC AAG ATT GAC CCT
 ile thr glu lys glu ile gly lys phe val asp asp phe leu ala gly lys ile asp pro
 661 / 221 691 / 231

25 AGC ATC AAG TCT GAG CCC ATT CCC GAA TCC AAT GAC GAG GGT CCC GTA ACT GTC GTC GTT GCC
 ser ile lys ser glu pro ile pro glu ser asn asp gly pro val thr val val val ala
 721 / 241 751 / 251

30 CAC AAC TAC AAG GAT GTC GTC ATT GAC AAC GAC AAG GAC GTT CTC GAG TTC TAC GCC
 his asn tyr lys asp val val ile asp asn asp lys asp val leu val glu phe tyr ala
 781 / 261 811 / 271

35 CCC TGG TGC GGT CAC TGC AAG GCT CTT GCT CCC AAG TAC GAG GAG CTC GGC CAG CTC TAC
 pro trp cys gly his cys lys ala leu ala pro lys tyr glu glu leu gly gln leu tyr
 841 / 281 871 / 291

40 40 GCT TCC GAC GAG CTC TCC AAG TTG GTG ACC ATT GCC AAG GTT GAC GCT ACT CTC AAC GAC
 ala ser asp glu leu ser lys leu val thr ile ala lys val asp ala thr leu asn asp
 901 / 301 931 / 311

45 45 GTT CCC GAC GAG ATC CAA GGT TTC CTA CCA TCA AGC CTC TTC CCG CTG GCA AGA AGG ATG
 val pro asp glu ile gln gly phe leu pro ser ser leu phe pro leu ala arg arg met
 961 / 321 991 / 331

50 CCC CAG TCG ACT ACT CTG GTT CCG CAC TGT CGA GGA TCT CGT CCA GTT CAT CGA AGA GAA
 pro gln ser thr thr leu val pro his cys arg gly ser arg pro val his arg arg glu
 1021 / 341 1051 / 351

45 CGG CTC ACA CAA GCT AGC GCC AGC GTT GGC GAA GCT GTC GAA GAT GCT ACC GAG TCC GCC
 arg leu thr gln ala ser ala ser val gly glu ala val glu asp ala thr glu ser ala
 1081 / 361 1111 / 371

50 AAG GCC AGT GCC TCT TCC GCC ACA GAC TCT GCT GCC TCA GCT GTA TCA GAA GGC ACC GAG
 lys ala ser ala ser ser ala thr asp ser ala ala ser ala val ser glu gly thr glu
 1141 / 381 1171 / 391

55 ACG GTC AAG TCT GGT GCG TCT GTC GCT TCC GAC TCA GCC TCT TCC GCC GCT TCC GAG GCT

thr val lys ser gly ala ser val ala ser asp ser ala ser ser ala ala ser glu ala
1201 / 401 1231 / 411
ACC AAG TCT GTC AAG TCT GCC GCG TCC GAG GTT ACC AAC TCT GCC TCG TCG GCT GCG TCA
5
thr lys ser val lys ser ala ala ser glu val thr asn ser ala ser ser ala ala ser
1261 / 421 1291 / 431
GAG GCT TCA GCT TCG GCC TCA AGC GTC AAG GAC GAG TTG TAA
10
glu ala ser ala ser ala ser val lys asp glu leu och

Homologiesuchen mit Alt a 45 in der SWISSPROT-Proteindatenbank ergaben, daß es sich bei Alt a 45 um eine Protein-Disulphidisomerase (PDI) handelt. Ein "multiple Alignment" mit PDI-Sequenzen von mehreren Organismen spiegelte die hohe Homologie von Alt a 45 zu PDI-Sequenzen wieder. Der ermittelte 15 Konsensus zeigt Identitäten von Aminosäuren quer durch alle Organismen. Zentrales Motiv der Homologie ist durch die Sequenz "EFYAPWCGHCK" gegeben. Die Funktion der Proteindisulfidisomerase (PDI) liegt in der Unterstützung beim Faltvorgang von Proteinen. Der exakte Mechanismus ist noch nicht bekannt. Die aktive Stelle von PDI ähnelt der von Thioredoxin. Der hohe Konsensus zwischen den homologen Proteinen findet sich von Bakterien zu Pflanzen und weiter zu höheren Säugern. Das PDI-Protein findet man im 20 Lumen des Endoplasmatischen Retikulums.

Sequenz 2: Alt a 45: B-Zellepitope

25

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

35

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

40

(iii) HYPOTHETISCH: nein

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

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45

(A) ORGANISMUS: Alternaria alternata

50

55

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

5 Gly Glu Val Thr Lys Asp Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Lys Thr Ala Asp Lys (11-25)

10 Phe Ala Ala Asp Asp Lys Ala Ser Asn Gly Glu Thr Phe Thr Ser Val Ala (32-47)

15 Ser Pro Ser Thr Thr Ala Arg Thr Ser Ser Pro Arg Pro Ser Met Arg Thr Tyr Pro Arg
Leu Arg Lys Val Ala (79-103)

20 Phe Ala Gly Glu Thr Pro Gly Glu Gly Glu Arg Gly Glu Gly Glu Phe Ala Lys Gly Glu
Leu Lys Pro Leu Ala Leu (130-149)

25 Gln Arg Thr Gly Glu Lys Asn Gly Glu Lys Phe Pro Thr Asn Gln Gly Glu Ala Lys Ile
Thr Gly Glu Lys Gly Glu Ile Gly Lys Phe Val Asp Asp (185-212)

30 Asp Pro Ser Ile Lys Ser Gly Glu Pro Ile Pro Gly Glu Ser Asn Asp Gly Pro Val Thr
(219-236)

35 Ala Arg Arg Met Pro Gln Ser Thr Thr Leu Val Pro His Cys (317-330)

40 Arg Gly Ser Arg Pro Val His Arg Arg Gly Glu Arg Leu Thr Gln Ala Ser Ala Ser Val
Gly Glu Ala (331-352)

30 Sequenz 3: Vorausgesagte amphipatische Segmente = T-Zellepitope

	Flags	Midpoints	Angles	Score	
	-----	-----	-----	-----	
35	K	9:22	85:120	33.4	VSEVTKDTLEEFKT
	*	41:50	85:105	23.4	
40	K P	66:71	125:135	11.9	KAEGVK
	P	82:85	115:125	6.3	
	K P	96:101	115:120	16.0	YPRLRK
	P	110:114	80:90	6.8	
45	P	116:120	85:105	10.4	
	K P	141:145	100:125	9.4	AKELK
	P	178:182	130:135	8.1	
50	K P	204:216	80:100	31.5	KEIGKFVDDFLAG
	K P	257:267	95:110	28.8	EFYAPWCCHCK
		275:281	110:125	15.2	

	K	283:293	90:130	25.6	DELSKLVTIAK
	P	295:309	85:105	39.9	DATLNDVPDEIQGFL
5	K	345:361	90:125	45.9	ASASVGEAVEDATESAK
	K	364:385	85:135	49.3	ASSATDSAASAVSEGTEVKSG
	K	391:413	80:115	73.2	DSASSAASEATKSVKSAASEVTN

10

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

20 (B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

(iii) HYPOTHETISCH: nein

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

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

30 (A) ORGANISMUS: Alternaria alternans

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

35 Val Ser Gly Glu Val Thr Lys Asp Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Lys Thr (9-22)

Lys Ala Gly Glu Gly Val Lys (66-71)

Tyr Pro Arg Leu Arg Lys (96-101)

Ala Lys Gly Glu Leu Lys (141-145)

40 Lys Gly Glu Ile Gly Lys Phe Val Asp Asp Phe Leu Ala Gly (204-216)

Gly Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys (257-267)

Asp Gly Glu Leu Ser Lys Leu Val Thr Ile Ala Lys (283-293)

Asp Ala Thr Leu Asn Asp Val Pro Asp Gly Glu Ile Gln Gly Phe Leu (295-309)

45 Ala Ser Ala Ser Val Gly Gly Glu Ala Val Gly Glu Asp Ala Thr Gly Glu Ser Ala Lys (345-361)

Ala Ser Ser Ala Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Glu Gly Thr Gly Glu Thr Val Lys Ser Gly (364-385)

50 Asp Ser Ala Ser Ser Ala Ala Ser Gly Glu Ala Thr Lys Ser Val Lys Ser Ala Ala Ser Gly Glu Val Thr Asn (391-413)

Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) flankiert werden (= Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

AT 401 181 B

B: Alt a 12

Die folgende Sequenz 4 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Alt a 12 und der von ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz. Der offene Leserahmen umfaßt 333bp bzw. 111 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 11728 Dalton und entspricht somit dem 11kD großen antigenen Protein, das im Westernblot von 8% der Patienten erkannt wird.

Sequenz 4: Alt a 12 11728 Dalton

10

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 333 Basenpaare / 111 Aminosäurereste

20

(B) ART: Nukleinsäure / Protein

(C) STRANGFORM: ds

25

(D) TOPOLOGIE: linear

30

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

(iii) HYPOTHETISCH: nein

35

(iv) ANTISENSE: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz

40

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Alternaria alternata

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

DNA sequence 333 b.p. ATGTCTACCTCC ... CTCTTCGACTAA linear

45

50

55

AT 401 181 B

1 / 1	31 / 11
ATG TCT ACC TCC GAG CTC GCC ACC TCT TAC GCC GCT CTC ATC CTC GCT GAT GAC GGT GTC met ser thr ser glu leu ala thr ser tyr ala ala leu ile leu ala asp asp gly val	
5 61 / 21	91 / 31
GAC ATC ACT GCC GAC AAG CTT CAA TCC CTC ATC AAG GCC GCA AAG ATC GAG GAG GTC GAG asp ile thr ala asp lys leu gln ser leu ile lys ala ala lys ile glu glu val glu	
10 121 / 41	151 / 51
CCC ATC TGG ACG ACC CTG TTC GCC AAG GCT CTT GAG GGC AAG GAT GTC AAG GAC CTG CTA pro ile trp thr thr leu phe ala lys ala leu glu gly lys asp val lys asp leu leu	
15 181 / 61	211 / 71
CTG AAC GTC GGC TCA GGC GGC GGT GCT GCC CCG CTG CCG GAG gCg cTG CTC CTG CGC TGG leu asn val gly ser gly gly ala ala pro leu pro glu ala leu leu leu arg trp	
20 241 / 81	271 / 91
CGT GCT GCT GAT GCC GCA CCA GCT GCT GAG GAG AAG AAG GAG GAG GAG AAG GAG GAG TCG arg ala ala asp ala ala pro ala ala glu glu lys lys glu glu glu lys glu glu ser	
25 301 / 101	331 / 111
GAC GAG GAC ATG GGC TTC GGT CTC TTC GAC TAA asp glu asp met gly phe gly leu phe asp OCH	

Homologiesuchen in der SWISSPROT-Proteindatenbank ergaben hier Homologien zu ribosomalen Proteinen. Das allergene Protein Alt a 12 ist nicht nur wegen seiner Eigenschaft als Allergen von Alternaria alternata interessant. Ribosomale Proteine, hier im speziellen die humanen ribosomalen Proteine P1 und P2, sind in der Literatur als Autoantigene beschrieben worden (Francoeur et al. 1985, Rich et al. 1987, Hines et al. 1991). 20% der Patienten mit Lupus erythematosus besitzen Autoantikörper (anti-rRNP) gegen Komponenten der Ribosomen, im speziellen Autoantikörper gegen die ribosomalen Proteine P0 (38kD), P1 (16kD) und P2 (15kD). Die humanen Autoantikörper kreuzreagieren mit ähnlichen Proteinen, was heißt, daß Epitope erkannt werden die in der Evolution stark konserviert wurden. Die Basis der immunologischen Kreuzreaktivität bildet die 17 Aminosäurereste lange carboxyterminale Region KEESEESD(D/E)DMGFGLFD. Ob eine in der Kindheit und Jugend erfolgte Sensibilisierung durch Alt a 12 mit einem im Erwachsenenalter auftretenden Autoimmunkrankheit korreliert, bedarf einer genauen Prüfung. Applikationen von ribosomalen Proteinen konnten allerdings in Mäusen keine Autoimmunkrankheit erzeugen (Hines et al. 1991). Andere ribosomale Proteine (Cla h 11 und Alt a 11) wurden ebenfalls schon als Allergene identifiziert (Achatz et al. 1994).

Die gezeigten B-Zellepitope in der nächsten Sequenz 5 sind unter Berücksichtigung von Sekundärstruktur, Oberflächenlage, Hydrophilität, Flexibilität etc. berechnet worden.

45

50

55

Sequenz 5: Alt a 12: B-Zellepitope

5

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:510 **(i) SEQUENZKENNZEICHEN:**

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

15 **(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide**

(iii) HYPOTHETISCH: nein

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

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Alternaria alternata

25 **(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen**

30 Ala Asp Asp Gly Val Asp (16-21)

Thr Ala Asp Lys Leu Gln Ser Leu (23-30)

Ala Lys Ile Gly Glu Gly Glu Val Gly Glu Pro Ile Trp Thr (34-44)

Ala Leu Gly Glu Gly Lys Asp Val Lys Asp (50-58)

35 Val Gly Ser Gly Gly Ala Ala (63-70)

Trp Arg Ala Ala Asp Ala (80-85)

40 Ala Pro Ala Ala Gly Glu Gly Glu Lys Lys Gly Glu Gly Glu Lys Gly Glu Gly
Glu Ser Asp Gly Glu Asp Met Gly (105)**Sequenz 6: Vorausgesagte amphipatische Segmente = T-Zellepitope**

Flags	Midpoints	Angles	Score
-------	-----------	--------	-------

45

-----	-----	-----	-----	
K P	26:37	90:135	27.6	KLQSLIKAAKIE
K	39:49	80:115	22.0	VEPIWTILFAK
K	52:55	80:135	6.4	

50

55

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6

5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

10

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

15

(iii) HYPOTHETISCH: nein

20

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

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Alternaria alternans

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

30

Lys Leu Gln Ser Leu Ile Lys Ala Ala Lys Ile Gly Glu (26-37)

Val Gly Glu Pro Ile Trp Thr Thr Leu Phe Ala Lys (39-49)

35 Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) flankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

6. Literatur

40

Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D., Breitenbach, M. (1994).

Molecular cloning of major and minor allergens of Alternaria alternata and Cladosporium herbarum. Mol. Immunol. in press.

45

Birkner, T., Rumpold, H., Jarolim, E., Ebner, H., Breitenbach, M., Skarvil, F., Scheiner, O., Kraft, D. (1990). Evaluation of immunotherapy-induces changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. Allergy 45, 418.

Bousquet, J., Becker, W.M., Heijaoudi, A. (1991).

Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts.

J. Allergy Clin. Immunol. 88, 43.

Francoeur, A.M., Peebles, C.L., Heckman, K.J., Lee, J.C., Tan, E.M. (1985).

Identification of ribosomal protein autoantigens.

50 J. Immunol. 135, 1767.

Hines, J.J., Weissbach, H., Brot, N., Elkon, K. (1991).

Anti-P autoantibody production requires P1/P2 as immunogens but is not driven by exogenous self-antigen in mrl mice.

J. Immunol. 146, 3386.

55 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.

J. Immunol. 138, 2213.

Rammensee, H.G., Falk, K., Rötzschke, O. (1993).

- MHC molecules as peptide receptors.
Current Opinion in Immunol. 5, 35.
Rich, B.E., Steitz, J.A. (1987).
Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and assembly.
Mol. Cell. Biol. 7, 4065.
Rothbard, J.B., Gefter, M.L. (1991).
Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins.
Ann. Rev. Immunol. 9, 527.
10 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5468

Patentansprüche

- 15 1. Rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Alt a 45 und Alt a 12 besitzen oder für Peptide, die mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die mit den Sequenzen (1-6) oder mit Teilbereichen dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw. Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Nucleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
- 20 2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die durch Degeneration aus den Sequenzen 1 bis 6 ableitbar sind.
- 25 3. Rekombinante DNA Moleküle nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die für Polypeptide kodieren, die als Antigene kreuzaktiv mit den Allergenen Alt a 45 und Alt a 12 sind und zu diesen eine hohe Homologie aufweisen.
- 30 4. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz zu einem Expressionskonstrukt verbunden sind.
- 5 5. Wirtssystem zur Expression von Polypeptiden, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Anspruch 4 transformiert ist.
- 35 6. Aus einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 abgeleitetes rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Antigenität von Alt a 45 oder Alt a 12 oder zumindest von einem Epitop dieser Proteine aufweist.
- 40 7. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder ein Polypeptid nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die den gezeigten Sequenzen 1-6 zur Gänze oder teilweise entspricht.
- 45 8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die Antigenität der Allergene Alt a 45 oder Alt a 12 oder zumindest eines Epitops davon aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil besitzt, wobei das gesamte Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruch 4 kodiert wird.
- 50 9. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil β -Galaktosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid ist.
- 55 10. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9 enthält.
11. Verfahren zum in vitro -Nachweis der Allergie eines Patienten gegen die Allergene Alt a 45 oder Alt a 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 gemes-

AT 401 181 B

sen wird.

12. Verfahren zum in vitro - Nachweis der zellulären Reaktion auf die Allergene Alt a 45 oder Alt a 12,
dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach
5 einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55